



**CAMPUS VIII – PROFESSORA MARIA DA PENHA – ARARUNA  
CENTRO DE CIÊNCIAS, TECNOLOGIA E SAÚDE  
CURSO DE ODONTOLOGIA**

**Abordagem *in silico* para identificação de potenciais alvos e antimicrobianos  
específicos para *Streptococcus mutans***

**Diego Romário da Silva**

**Araruna / PB**

**2015**

**Diego Romário da Silva**

**Abordagem *in silico* para identificação de potenciais alvos e antimicrobianos  
específicos para *Streptococcus mutans***

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Coordenação do Curso de  
Odontologia da UEPB – Campus VIII, como  
requisito para obtenção do título de  
Cirurgião-dentista.

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andréa Cristina Barbosa da Silva**

**Araruna / PB**

**2015**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

S586a Silva,Diego Romário da  
Abordagem in silico para identificação de potenciais alvos e antimicrobianos específicos para streptococcus mutans.  
[manuscrito] / Diego Romario da Silva. - 2015.  
54 p.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia)  
- Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências  
Tecnologia e Saúde, 2015.

"Orientação: Dr<sup>a</sup>Andréa Cristina Barbosa da Silva,  
Departamento de Odontologia".

1. Cárie. 2.Bactérias. 3.Dentes. I. Título.

21. ed. CDD 617.67

DIEGO ROMÁRIO DA SILVA

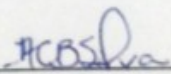
ABORDAGEM *in silico* PARA IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS ALVOS E  
ANTIMICROBIANOS ESPECÍFICOS PARA *Streptococcus mutans*.

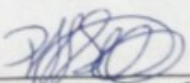
Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à coordenação do curso de  
Odontologia da UEPB - Campus VIII  
como requisito para obtenção do título  
de Cirurgiã-Dentista.

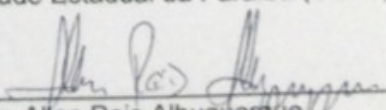
Orientador: Prof.ª Dr.ª Andréa Cristina Barbosa da Silva

Aprovada em: 24 de julho de 2015.

BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Andréa Cristina Barbosa da Silva (Orientadora)  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. MSc. Pedro Henrique Sette de Souza  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Allan Reis Albuquerque  
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

*Dedico este trabalho os meus pais, José e Arilânia, pelo amor, dedicação e incentivo aos meus estudos.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, criador de tudo, por tornar possível cada conquista em minha vida.

Aos meus amados pais, José e Arilânia, por serem a fonte de força para cada vitória. Por serem os melhores pais do mundo, tão dedicados e amorosos.

Às minhas queridas irmãs, Amanda e Vitória, pelo apoio de sempre e por fazerem a minha vida mais feliz e divertida.

À minha estimada orientadora, Prof.<sup>a</sup> Andréa Silva, por acreditar no meu potencial e por ser item essencial na minha formação e amadurecimento científico. Agradeço pela paciência, por todos os ensinamentos, conselhos e por sua amizade, que levarei por toda a vida.

Ao amigo Allan Albuquerque, por sua ajuda em inúmeros projetos e pelos conselhos e ensinamentos.

À Prof.<sup>a</sup> Thaís Gaudêncio, por contribuir significativamente para a realização deste trabalho, com sua grande experiência na área de bioinformática.

Ao Prof. Pedro Sette, por sempre estar disponível contribuindo para a minha formação científica.

À coordenação deste curso, nas pessoas do Prof. Gustavo Agripino e Prof. Pierre Andrade, pela forma responsável que conduzem o curso e pelo grande incentivo à pesquisa científica.

Às amigas Juliana e Gal, pelo apoio, incentivo e diversão durante todos esses anos.

Aos amigos Sabrina Avelar, Paulo Ricart e Núbia Santana, por se dedicarem tanto aos nossos projetos e por serem sempre uma ótima companhia.

## **Abordagem *in silico* para identificação de potenciais alvos e antimicrobianos específicos para *Streptococcus mutans***

### **RESUMO**

A cárie dentária afeta a maior parte da população nos países desenvolvidos. A etiologia multifatorial da patologia inclui espécies bacterianas múltiplas, sendo o *Streptococcus mutans* o principal patógeno associado à doença. Esta bactéria se adere à superfície dos dentes e permite a colonização de outros microrganismos, resultando na formação do biofilme dental. Vários agentes terapêuticos estão disponíveis para tratar ou prevenir a cárie, mas nenhum, com exceção do fluoreto, tem influenciado significativamente o peso global da doença. Além disso, o provável desenvolvimento de resistência dos microrganismos aos agentes antibacterianos existentes e a escassez de bons agentes antimicrobianos motiva esse esforço para a inovação. O conhecimento detalhado obtido, nos últimos anos, sobre o *S. mutans*, permitiu a identificação de alvos potenciais neste microrganismo, possibilitando o desenvolvimento de drogas específicas para o combate da cárie dentária. Assim, a identificação de alvos potenciais nestes patógenos é a primeira etapa no processo de descoberta de novos agentes terapêuticos. Atualmente, os ensaios experimentais utilizados para este fim são caros e demorados. Em contraste, os métodos de bioinformática para predição de alvos de drogas são baratos, rápidos e rotineiros na área de biotecnologia. Este artigo revisará os potenciais alvos de drogas em *S. mutans*, assim como os métodos de bioinformática utilizados para identificação destes alvos e de drogas efetivas para o tratamento farmacológico específico da cárie dentária.

**Palavras chaves:** Bioinformática. Biotecnologia. *Streptococcus mutans*.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	8
2 OBJETIVOS .....	10
3 ARTIGO.....	11
3.1 INTRODUÇÃO .....	12
3.2 CÁRIE DENTÁRIA, BIOFILMES DENTAIS E <i>Streptococcus mutans</i> .....	13
3.3 CONTROLE DA CÁRIE E PESQUISA POR NOVOS ANTIMICROBIANOS ....	15
3.4 POTENCIAIS ALVOS MICROBIANOS E ALVOS ESTRATÉGICOS EM <i>Streptococcus mutans</i> .....	18
3.5 DETECÇÃO COMPUTACIONAL DE ALVOS MOLECULARES PARA O DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS .....	22
3.6 FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA PARA ESTUDOS DE DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS .....	24
3.7 PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS BASEADO NA ESTRUTURA DO RECEPTOR .....	24
3.8 PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS BASEADO NA ESTRUTURA DO LIGANTE.....	26
3.9 CONCLUSÃO .....	28
3.10 REFERENCIAS .....	30

**ANEXO**

**APÊNDICE**



## 1. INTRODUÇÃO

A cárie dentária é, ainda, uma das doenças infecciosas mais prevalentes no mundo (BAGRAMIAN, GARCIA-GODOY e VOLPE, 2009). Trata-se de uma doença multifatorial, onde sua etiologia envolve a microbiota associada, a dieta, o tempo e a resposta do hospedeiro. Ela resulta de um deslocamento ecológico na interface dente-biofilme, que leva a um desequilíbrio mineral entre o fluido da placa e a superfície dentária, podendo causar cavitação (FEJERSKOV, 2004).

As bactérias envolvidas na etiologia da cárie, podem desenvolver-se na forma de biofilme dental, uma comunidade diversa de microrganismos presentes na superfície dos dentes, embebidos em uma matriz de polímeros. Este sistema de organização microbiana proporciona maior resistência aos microrganismos em relação às drogas (MARSH, 2003). O *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) é considerado o microrganismo mais associado a cárie dentária em humanos (NYVAD et al., 2013). Esta bactéria apresenta alguns sistemas de virulência considerados essenciais para a formação do biofilme: a capacidade 1) para aderir à superfície dos dentes, 2) para produzir ácidos e 3) para resistir a este ambiente sem sofrer danos (MICHALEK; CHILDERS, 1990).

Além das medidas tradicionais que são rotineiramente utilizadas no controle da cárie, como os produtos de higiene bucal de ação mecânica (escovas e fios dentais) e os métodos de prevenção populacional (fluoretação da água) (FEATHERSTONE, 1999; LEVINE, OWEN e AVERY, 2005), os produtos de ação química (dentifrícios e colutórios), têm sido considerados uma alternativa importante no controle do biofilme e, conseqüentemente, da cárie dentária. No entanto, estes antimicrobianos de uso odontológico deveriam ser capazes de inibir significativamente o crescimento celular dos patógenos cariogênicos sem causar efeitos adversos ao hospedeiro (BALAKRISHMAN, SIMMONDS e TAGG JUNIOR, 2000; RUSSEL et al., 2004), e isso, é um desafio.

Neste contexto, modernas estratégias têm sido utilizadas para o planejamento racional de novos compostos-protótipos, permitindo planejar a estrutura química de uma nova molécula com base na definição prévia do mecanismo de ação terapêutica, ou seja, a biomacromolécula à qual o novo fármaco irá se ligar para alterar um determinado processo bioquímico. Conhecendo-se a estrutura molecular tridimensional do alvo terapêutico eleito, ou seja, da região responsável pela

interação química, é possível identificar um composto capaz de se ligar àquele sítio ativo e alterar suas propriedades, por meio de técnicas computacionais de modelagem molecular (GUIDO e ANDRICOPULO, 2008; ANDRICOPULO, SALUM e ABRAHAM, 2009).

Para a odontologia, a compreensão dos mecanismos envolvidos na formação, virulência e resistência às drogas dos biofilmes dentais, torna-se vital e tem nas ciências da computação o suporte necessário para obter maior precisão no desenvolvimento de substâncias capazes de desestabilizar a estrutura do biofilme formado, sobretudo por *S. mutans*. Este trabalho destacará os potenciais alvos moleculares em *S. mutans*, assim como os principais métodos computacionais utilizados para a detecção destes alvos e de drogas específicas para o tratamento da cárie dentária.

## **2. OBJETIVO**

O objetivo deste estudo foi revisar a literatura acerca do uso da bioinformática como ferramenta para identificação de potenciais alvos e antimicrobianos específicos para *S. mutans*.

### 3. ARTIGO

**Abordagem *in silico* para identificação de potenciais alvos e antimicrobianos específicos para *Streptococcus mutans*.**

**Diego Romário da Silva<sup>1</sup>**

**Andréa Cristina Barbosa da Silva<sup>2</sup>**

1. Acadêmico do Curso de Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba;
2. Professora do Curso de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba – Campus VIII, Araruna – PB, Brasil.

Endereço para correspondência:

Diego Romário da Silva

Rua Peregrino de Carvalho, 170, Centro, Campina Grande, PB, Brasil

CEP: 58400-143

E-mail: diegoromarioo@gmail.com

Phone: (83) 99175-7234

### 3.1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária ainda apresenta elevadas prevalência e incidência na população mundial (XU, ZHOU e WU, 2011). É uma doença microbiana irreversível dos tecidos dentários duros, caracterizada por desmineralização da porção inorgânica e destruição do material orgânico do dente, o que, muitas vezes, conduz à cavitação (SMITH e TAUBMAN, 1996). As bactérias presentes no biofilme, produzem ácidos a partir da metabolização de carboidratos provenientes da dieta do hospedeiro (FEJERSKOV e KIDD, 2003).

O *Streptococcus mutans* é uma bactéria Gram-positiva, acidúrica e acidogênica, sendo considerado o microrganismo mais associado à cárie dentária (LOESCHE, 1986). Essa bactéria é capaz de se organizar em comunidades bacterianas por meio da interação célula-célula e da ligação com outros componentes presentes no meio, como polissacarídeos, proteínas e DNA, formando o biofilme dental. As bactérias inseridas neste sistema são mais sésseis e resistentes que as planctônicas (LEWIS, 2012), formando uma barreira eficaz contra a penetração dos agentes antimicrobianos, capaz de proporcioná-los um elevado nível de resistência a antibióticos, (ZESHI, NADEZHINA e WILKINSON, 2010).

Além das medidas tradicionais que são rotineiramente utilizadas no controle da cárie, como os produtos de higiene bucal de ação mecânica (escovas e fios dentais) e os métodos de prevenção populacional (fluoretação da água) (FEATHERSTONE, 1999, LEVINE, OWEN e AVERY, 2005), os produtos de ação química (dentifrícios e colutórios), têm sido considerados uma alternativa interessante no controle do biofilme e, conseqüentemente, da cárie dentária. No entanto, estes antimicrobianos de uso odontológico devem ser capazes de inibir significativamente o crescimento celular dos patógenos cariogênicos sem causar efeitos adversos ao hospedeiro (BALAKRISHMAN, SIMMONDS e TAGG J, 2000; RUSSEL et al., 2004).

Neste contexto, modernas estratégias têm sido utilizadas para o planejamento racional de novos compostos-protótipos, permitindo planejar a estrutura química de uma nova molécula com base na definição prévia do mecanismo de ação terapêutica, ou seja, a biomacromolécula à qual o novo fármaco irá se ligar para alterar um determinado processo bioquímico. Conhecendo-se a estrutura molecular tridimensional do alvo terapêutico eleito, ou seja, da região responsável pela

interação química, é possível identificar um composto capaz de se ligar àquele sítio ativo e alterar suas propriedades, por meio de técnicas computacionais de modelagem molecular (GUIDO e ANDRICOPULO, 2008; ANDRICOPULO, SALUM e ABRAHAN, 2009).

Para a odontologia, a compreensão dos mecanismos envolvidos na formação, virulência e resistência às drogas dos biofilmes dentais, torna-se vital e tem nas ciências da computação o suporte necessário para obter maior precisão no desenvolvimento de substâncias capazes de desestabilizar a estrutura do biofilme formado, sobretudo por *S. mutans*. Este trabalho destacará os potenciais alvos moleculares em *S. mutans*, assim como os principais métodos computacionais utilizados para a detecção destes alvos e de drogas específicas para o tratamento da cárie dentária.

### **3.2 CÁRIE DENTÁRIA, BIOFILMES DENTAIS E *Streptococcus mutans***

A cárie dentária é uma doença localizada, de caráter multifatorial, dependente da dieta, da microbiota bucal e resposta do hospedeiro (XU, ZHOU e WU, 2011). A redução do pH, causada pela produção de ácidos pelos microrganismos cariogênicos inseridos no biofilme, por meio da metabolização carboidratos, provoca dissolução de íons do esmalte dentário para o meio, causando assim a cavitação no tecido (SMITH e TAUBMAN, 1996). O *Streptococcus mutans*, uma bactéria Gram-positiva, é considerado o microrganismo mais associado à cárie dentária (LOESCHE, 2986).

O biofilme dental pode ser definido como uma comunidade diversa de microrganismos presentes na superfície dos dentes, como um biofilme, embebidos em uma matriz de polímeros de origem microbiana e do hospedeiro. Este sistema de organização microbiana tem sido extensivamente estudado nos últimos anos, especialmente nos estudos com antimicrobianos, uma vez que apresenta características específicas que permitem aos microrganismos que nele residem resistirem melhor que as formas plantônicas às drogas (MARSH, 2004).

Um desequilíbrio nestes biofilmes dentais microbianos, pode permitir o aparecimento da cárie dentária, uma vez que é causada por microrganismos pertencentes à microbiota oral residente. Antes do estabelecimento da lesão cariosa, um ambiente com baixo pH causado pela fermentação microbiana dos carboidratos da dieta seleciona uma população de cepas produtoras e resistentes a ácidos como

os estreptococos dos grupo mutans e os lactobacilos. Estas espécies aumentam a formação ácida que pode causar desmineralização (MARSH, 1994).

Os biofilmes têm um fenótipo mais tolerante a agentes antimicrobianos, estresse e a defesas do hospedeiro que as culturas plantônicas, tornando-os difíceis de tratar (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2002). Isto significa que a efetividade de produtos usados na prevenção da cárie dentária, devem ser avaliados em biofilmes e não em culturas líquidas tradicionais (BUTCHER, 2003). Os padrões de expressão gênica em biofilmes são também diferenciados daqueles das células plantônicas (SILVA, 2010), justificando a necessidade de se fazer ensaios laboratoriais sob ambas as condições para melhor entender o efeito dos antimicrobianos nestas células.

O *Streptococcus mutans* pode desenvolver-se formando biofilmes sobre os tecidos dentários [6]. A fase inicial de colonização depende da interação específica entre *S. mutans* e proteínas/glicoproteínas de origem salivar e microbiana adsorvidas na película adquirida que recobre o esmalte dentário (KOO et al., 2010). Durante a formação do biofilme, as bactérias agregam-se umas às outras, envoltas por uma rede de polissacarídeos extracelulares gerando, dentro da população bacteriana séssil, novas condições que aumentam a tolerância antimicrobiana, tornando esses microrganismos organizados e mais resistentes, se comparados com bactérias planctônicas (LEWIS, 2012; ROMLING e BALSALOBRE, 2012).

Estes microrganismos desenvolveram alguns sistemas de defesa para que conseguissem estabelecer um ecossistema microbiano, sendo três destes sistemas considerados essenciais para a formação do biofilme e desenvolvimento da cárie: a capacidade 1) para aderir à superfície dos dentes, 2) para produzir ácidos e 3) para resistir a este ambiente sem sofrer danos (MICHALEK e CHILDERS, 1990). Em relação ao processo de aderência, três principais grupos de antígenos (Ags) associados à superfície destes microrganismos participam do processo de aderência e acúmulo de *S. mutans* no biofilme: a adesina antígeno I/II (Ag I/II), as glicosiltransferases (GTFs) e as proteínas ligantes de glucano (PLG) (ROBINETTE et al., 2011).

As glicosiltransferases, produzidas pelo *S. mutans*, são capazes de sintetizar polissacarídeos extracelulares (PECs) e intracelulares (PICs) a partir de sacarose proveniente da dieta. Na falta de carboidratos, esses os PICs são metabolizados para a obtenção de energia. Os PECs possibilitam a agregação de *S. mutans* a

outros estreptococos orais, o que parece ocorrer por meio da interação com proteínas ligantes de glucanos associadas à superfície celular. Foram identificadas quatro Gtfs na espécie *S. mutans*, GtfA, GtfB, GtfC e GtfD. Algumas dessas proteínas podem ser secretadas ou estarem associadas às superfícies celulares (GtfA, GtfB e GtfD) ou ligarem-se covalentemente à parede celular (GtfC) (ROBINETTE et al., 2011).

Os *S. mutans* também possuem diversos sistemas de transporte de açúcar, incluindo os sistemas de fosfoenolpiruvato-fosfotransferase de alta afinidade (PEP-PTS), capaz de captar açúcar quando presente em baixas concentrações no ambiente oral. Essa propriedade torna o *S. mutans* uma bactéria extremamente resistente, capaz de se adaptar em ambientes escassos de carboidratos (XU, ZHOU e WU, 2011).

### **3.3 CONTROLE DA CÁRIE E PESQUISA POR NOVOS ANTIMICROBIANOS**

Atualmente, a melhor forma de se prevenir a iniciação e controlar a progressão da cárie e, conseqüentemente, a perda dos tecidos dentários duros, ainda é a utilização de formas mecânicas (escovas e fios dentais) para desorganizar o biofilme da superfície dentária, e formas químicas (colutórios e dentifrícios) para matar as bactérias inseridas na matriz do biofilme (FEATHERSTONE, 2000).

Antimicrobianos eficazes contra os microrganismos responsáveis pelo desenvolvimento da doença cárie podem desempenhar um papel significativo na prevenção da doença (KUBO, MUROI e HIMEJIMA, 1993). Entretanto, eles não são prescritos e utilizados, em larga escala, para este fim pelo risco de desenvolver efeitos adversos, selecionar bactérias resistentes a determinados antimicrobianos e provocar coloração nos dentes (TREDWIN, SCULLY e BAGAN-SEBASTIAN, 2005).

Nos últimos anos a atenção têm-se voltado para pesquisas com antimicrobianos naturais, que possam ser eficazes contra bactérias orais, porém sem serem prejudiciais ao hospedeiro (SINGH et al., 2007). Alguns estudos realizaram ensaios com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de diversas plantas contra patógenos relacionados à cárie dentária, visando o desenvolvimento de um antimicrobiano natural eficaz (ADONIZIO, KONG e MATHEE, 2008; HOSSEINI, ADLGOSTAR, e SHARIFNIA, 2013).



Os produtos naturais com efeito antibiofilme (AL-SOHAIBANI e MURUGAN, 2012) também constituem uma linha de pesquisa bastante promissora. Além disso, os sistemas em nanoescala, devido ao seu tamanho ajustável, que aumentam as interações com sistemas biológicos em nível molecular, também contribuíram para a melhoria das terapias inovadoras das doenças relacionadas ao biofilme (IANNITELLI et al., 2011; MAHAPATRO e SINGH, 2011).

Outra abordagem considerada eficaz para o controle da cárie dentária seria a mudança na dieta, eliminando os açúcares refinados (sacarose e frutose) da alimentação e promovendo o consumo de proteínas, lipídios e carboidratos complexos (FEATHERSTONE, 2000). Todavia, não se espera que ocorra facilmente mudanças culturais na alimentação, em escala mundial, para prevenir a cárie dentária. Assim, abordagens inovadoras para o tratamento da cárie dentária são necessárias (MILGROM, ZERO e TANZER, 2009).

Dentre as possíveis novas abordagens, uma interessante seria bloquear ou prejudicar o sistema *Quorum Sensing*, um sistema de comunicação de microrganismos baseado na emissão de estímulos e respostas dependentes da densidade populacional. Muitos membros do gênero *Streptococcus*, que causam infecções em seres humanos, utilizam este sistema (CVITKOVITCH, LI e ELLEN, 2003). Outras abordagens seriam bloquear a capacidade do *S. mutans* de produzir ácidos e sobreviver neste ambiente extremo de acidez e/ou sua capacidade de interagir com outras células para formar o biofilme (LI et al., 2012).

Algumas pesquisas tem procurado uma maneira de prevenir a cárie dentária com auxílio da imunologia e resposta do hospedeiro, na busca de uma possível vacina anti-cárie (ROBINETTE et al., 2011; RUSSEL et al., 2004). Além disso, muitos estudos em nível molecular também têm sido realizados com objetivo de inibir o crescimento celular do *S. mutans* (LIU et al., 2011; SMITH et al., 2003).

O metabolismo do *S. mutans* também tem sido extensivamente estudado, principalmente a bioquímica e adaptações fisiológicas que permitem a esse microrganismo produzir ácidos e sobreviver a um pH baixo (LEN, HARTY e JACQUES, 2004; WANG, SONG, MINGMING e GUOPING, 2013). Pesquisas sugerem que a capacidade de tolerar o ácido é em parte devido a uma proteína ligada à membrana chamada F-ATPase, que faz a extrusão de prótons H<sup>+</sup> da célula, evitando uma diminuição do pH intracelular e conseqüente dano para enzimas

sensíveis ao ácido, o DNA e diversas proteínas (QUIVEY, KUHNERT e HAHN, 2011; DASHPER e REYNOLDS, 1992).

O desenvolvimento de resistência bacteriana em um grande número de microrganismos tem tornado os antimicrobianos atuais menos eficazes, o que justifica a necessidade de desenho e desenvolvimento de novas drogas. Algumas proteínas bacterianas essenciais tem sido identificadas como potenciais alvos de drogas, por serem essenciais para a sobrevivência da célula microbiana, altamente conservadas em um espectro de espécies clinicamente relevantes, ausentes ou radicalmente diferente em humanos, além de possuírem sua bioquímica elucidada (AMER, EL-BEHEDY e MOHTADY, 2008). No caso dos microrganismos inseridos nos biofilmes bucais, o mais adequado seria manter os *S. mutans* patogênicos vivos no biofilme, porém menos virulentos (WADE, 2010).

Várias estratégias têm sido usadas na predição de alvos de drogas, dentre as principais, destacam-se: 1) as que buscam analisar os alvos de drogas terapêuticas conhecidas, baseados no nível de homologia de sequências ou domínios nos proteomas (HOPKINS e GROOM, 2002; RUSS e LAMPEL, 2005), na busca de potenciais novos alvos de drogas em famílias protéicas e 2) as que se baseiam nas estruturas 3D de sítios de ligação nas superfícies protéicas, com o objetivo de identificar aqueles sítios que podem se ligar com afinidade razoável a determinados compostos (AN, TOTROV e ABAGYAN, 2004; HAJDUK, HUTH e TSE, 2005). Este último método é limitado devido a pouca disponibilidade de estruturas 3D, além do que não pode ser aplicado em escala genômica.

A qualidade dos dados sobre os alvos de drogas restringe o poder preditivo dos modelos, de forma que várias versões de listas de alvos de drogas tem sido propostos (RUSS e LAMPEL, 2005; DREWS, 2000; OVERINGTON, LA-LAZIKAIN e HOPKINS, 2006; BETZ, 2005) baseados em diferentes critérios para a sua seleção. As possíveis razões para muitas versões são: a definição do alvo da droga é difícil e arbitrário (IMMING, SINNING e MEYER, 2006); o pouco entendimento da farmacologia da droga dificulta a atribuição de um alvo a cada droga; alguns alvos são complexos multiméricos de proteínas onde as mesmas subunidades podem se unir em diferentes combinações pra formar diferentes alvos (RUSS e LAMPEL, 2005; OVERINGTON, LA-LAZIKAIN e HOPKINS, 2006).

A seleção errônea dos alvos, nos estágios pré-clínicos de pesquisa, pode ter como consequência o fracasso da droga recém-descoberta no mercado. Assim, a

predição de proteínas como alvos de drogas pode ser utilizada para direcionar novas terapias, reduzindo o tempo e o custo experimental durante o desenvolvimento dos fármacos, e tornando o tratamento da doença mais confiável (BUTCHER, 2003).

Ainda, as etapas de descoberta, desenvolvimento e registro de um fármaco requer tempo e investimento, sendo de grande interesse identificar o mais cedo possível os agentes que são provavelmente menos promissores, permitindo uma concentração de esforços nos compostos que têm maior probabilidade de chegar ao mercado. Na descoberta e planejamento de novos fármacos dentro da área de Desenho Racional de Fármacos Baseado em Estrutura (DRBE), a compreensão dos mecanismos de reconhecimento molecular receptor-ligante, além de ser um dos principais desafios da biologia molecular, é um dos aspectos centrais para seu sucesso (DE MAGALHÃES, 2006).

### **3.4 POTENCIAIS ALVOS MICROBIANOS E ALVOS ESTRATÉGICOS EM *S. mutans***

Recentes avanços das tecnologias na biologia molecular tem significativamente aumentado a habilidade para a descoberta de novos alvos antibacterianos e rapidamente predizer seu espectro e seletividade. A maioria dos alvos bacterianos avaliados para o desenvolvimento de drogas são: biossíntese de sensores de quorum; sistemas de transdução de sinal de dois componentes; maquinaria de divisão celular; a via do chiquimato; biossíntese de isoprenóides e biossíntese de ácidos graxos (AMER, EL-BEHEDY e MOHTADY, 2008).

Os sistemas *Quorum Sensing* são também importantes determinantes da morfologia e comunicação quando as bactérias crescem como agregados em biofilmes (VUONG et al., 2003). Quando há um aumento na densidade populacional de bactérias nos biofilmes, elas respondem induzindo ou suprimindo a expressão de alguns grupos de genes. Estes sistemas *Quorum Sensing* e desempenham um papel crítico no controle de muitos processos metabólicos na célula, incluindo a virulência bacteriana. Por este motivo, são considerados alvos atrativos para novas drogas antibacterianas (MILER e BASSLER, 2011).

Os sistemas de transdução de sinal de dois componentes são o principal meio para coordenar as respostas a mudanças do meio ambiente em bactérias como

também em algumas plantas, fungos, protozoários e arqueobactérias. Estes sistemas apresentam um excelente alvo para drogas devido a 1) homologia significativa compartilhada entre diferentes gêneros de bactérias, particularmente naquelas onde os resíduos de aminoácidos são localizados próximos aos sítios ativos; 2) as bactérias usam este sistema para regular a expressão de fatores de virulência requeridos para a sua sobrevivência in vivo e 3) as bactérias contêm muitos sistemas de dois componentes e, pelo menos um deles é importante para o crescimento in vitro (AMER, EL-BEHEDY e MOHTADY, 2008).

A maquinaria de divisão da bactéria compreende sete ou mais proteínas essenciais conservadas na maioria destes microrganismos. É considerada um alvo interessante devido ao seu essencial papel na divisão celular dos procariotos, sua conservação nas bactérias, sua ausência na mitocôndria de eucariotos, sua distância evolucionária da tubulina e sua estrutura atômica e atividade química conhecida (AMER, EL-BEHEDY e MOHTADY, 2008; STOKES et al., 2005).

Outro alvo bacteriano que pode ser utilizado é a via do ácido chiquímico (via biossintética aromática), devido sua conservação em bactérias, fungos, plantas e alguns parasitas, e ausência em mamíferos. Esta via afeta a conversão de dois produtos simples do metabolismo dos carboidratos: fosfoenolpiruvato e eritrose 4-fosfato em corismato, que é um precursor para a biossíntese de uma variedade de metabólitos aromáticos importantes. As enzimas da via do chiquimato constituem um alvo excelente para o desenho de novos agentes antibacterianos (DAUGHERY et al., 2011).

Os isoprenóides são conhecidos por terem um papel inestimável em vários processos biológicos como a biossíntese da parede celular, transporte de elétrons, captação da luz na fotossíntese, estrutura lipídica da membrana e sinalização. Isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero, dimetilalil difosfato (DMAPP), agem como um precursor universal para a biossíntese de isoprenóides. As reações IPP e DMAPP são catalizadas pela enzima isopentenil difosfato isomerase. A interrupção de um destes processos por bloqueio de enzimas relacionadas com a biossíntese e catabolismo de isoprenóides é essencial para o desenvolvimento racional de potenciais alvos terapêuticos (AMER, EL-BEHEDY e MOHTADY, 2008).

A síntese de ácidos graxos (FAS), requeridos para a construção dos fosfolipídeos da membrana em organismos vivos, compreende um ciclo repetido de reações envolvendo a condensação, redução, desidratação e subsequente redução

de ligações carbono-carbono. Eucariotos mais evoluídos executam estas reações por meio de uma proteína multifuncional (via tipo I). Enquanto que em bactérias, cloroplastos de plantas e *P. Falciparum*, cada reação é catalizada por enzimas discretas (via tipo II), permitindo a inibição seletiva (ZHANG, WHITE e ROCK, 2006). A maior parte destas enzimas são essenciais para a viabilidade bacteriana, tornando-se, conseqüentemente, alvos de pesquisas por novos antimicrobianos.

Apesar do pouco conhecimento sobre a expressão de genes durante a formação de biofilmes de *Streptococcus mutans*, as pesquisas têm empenhado esforço em comparar cepas laboratoriais plantônicas com as organizadas em biofilmes (WHITELEY et al., 2001); entretanto, há pouca informação a respeito da expressão diferencial de genes na formação de biofilme em cepas clínicas, pois estas cepas podem sobreviver em condições severas envolvendo várias agentes bacterianos, como é visto na cavidade oral, o que leva a expressão de vários genes envolvidos com a formação do biofilme. Em contraste, cepas laboratoriais podem não requerer estes mesmos genes quando são cultivadas em condições brandas e plantônicas, podendo perder a capacidade de expressá-los (MOTEGI et al., 2006).

Estudos prévios têm indicado o papel da sacarose e das glicosiltransferases na formação de biofilmes de *S. mutans* (YAMASHITA et al. 1993). Outros estudos relataram que existem vários genes associados com a competência genética (LI et al., 2002), com funções regulatórias, juntos com um ou mais genes, incluindo *ccpA* e *brpA* (*lytR*) (WEN e BURNE, 2002) e *luxS* (MERRIT et al., 2003). Estes genes tem também mostrado função como supostos reguladores do sistema de resposta de dois-componentes (LI et al., 2002), os quais são envolvidos na formação do biofilme. Micro-arranjos de DNA tem sido usados para monitorar os perfis de expressão global de genes em resposta a diferentes estímulos (WHITELEY et al., 2001), como choque térmico e outros estresses (HELMANN et al 2001), *Quorum Sensing* (DELISA et al., 2001), metabolismo anaeróbico (YE et al., 2000), esporulação (FAWCETT et al., 2000) e formação de biofilme (WHITELEY et al., 2001).

Devido ao sequenciamento completo do genoma do *S. mutans* UA159 (AJDIC et al., 2002), genes associados à virulência e/ou sobrevivência têm sido identificados, sendo suas expressões proteicas consideradas alvos microbianos ideais, preferencialmente proteínas importantes para a virulência da bactéria (exoenzimas, proteases, outras proteínas extracelulares e de superfície), evitando a atuação em alvos relacionados à sobrevivência deste microrganismo (mecanismos

de transporte, divisão celular, síntese da parede celular, vias metabólicas, e regulação e sinalização em elementos genéticos móveis). O objetivo seria manter a bactéria viva no biofilme, porém menos virulenta (MARSH, 2010).

Nos *S. mutans* organizados em biofilmes, as proteínas relacionadas ao seu metabolismo e importantes para a sua sobrevivência, não seriam bons alvos, uma vez que provocariam a morte das células, favorecendo o crescimento de outras talvez mais patogênicas. Os agentes antimicrobianos do futuro e que terão chance de sucesso seriam aqueles que possuem requisitos aparentemente contraditórios de manutenção do biofilme dental em níveis compatíveis com a saúde oral, mas sem romper as propriedades benéficas da microbiota oral residente (MARSH, 2010).

Um dos maiores desafios para o desenvolvimento de fármacos modernos direcionados a microrganismos residentes em biofilmes é manter o organismo vivo, porém menos virulento. Este intento seria possível por meio de uma abordagem probiótica, por uma interferência durante a formação do biofilme ou por perturbação de redes de comunicação bacteriana (WADE, 2010).

A adaptação da bactéria, enquanto modifica as condições no meio ambiente, ocorrem em diferentes níveis, incluindo o nível multicelular (agregação celular e formação de biofilme). Estes processos são modulados por vários reguladores de resposta, e os padrões de distribuição destes reguladores são geralmente conservados nas diversas linhagens microbianas (GALPERIN, 2010). Assim, compostos que podem interagir com estes reguladores de resposta são drogas candidatas ideais para reduzir os biofilmes multiespécies (AL-SOHAIBANI e MURUGAN, 2012).

Tem sido observado que a inativação de algum componente do sistema de comunicação intercelular *Quorum Sensing*, parece influenciar os estágios iniciais de formação do biofilme (LI et al., 2002). Estas vias podem ser selecionadas como alvos para o controle do biofilme cariogênico, de forma que o bloqueio dos genes que codificam os componentes protéicos deste sistema de sinalização resulta na formação de um biofilme anormal (KVITKOVITCH, LI e ELLEN, 2003).. A habilidade para prevenir ou confundir o sistema *Quorum Sensing* pode bloquear a expressão de genes de virulência e de formação do biofilme. Porém, até o momento, este conhecimento não foi aplicado para uso clínico (COOPER e OKHIRIA, 2006).

Os produtos de alguns genes do sistema de sinalização *Quorum Sensing* (comAB, comX e comCDE) são muito importantes para a comunicação dos *S.*

*mutans* em biofilmes, de forma que a perda de uma destas proteínas pode reduzir a formação do biofilme. Neste contexto, foi demonstrado, por meio de técnicas computacionais de modelagem e atracamento molecular, que um derivado do ácido quínico (quinic acid) pode agir como um inibidor da Com A (KUMAR et al., 2013).

Alguns agentes moleculares naturais e sintéticos mostraram moderada eficácia contra bactérias cariogênicas, porém nenhum estudo clínico foi realizado. De modo geral, as abordagens pré-clínicas e clínicas combinadas para o desenho racional de drogas são raras. Como os alvos dos agentes antimicrobianos são sítios ligantes de proteínas, a estrutura da proteína é requerida para o desenho racional dos fármacos (AQUERO et al., 2008; HORST et al 2012). A recente explosão da tecnologia do sequenciamento tornou disponível as sequências correspondentes a todos os genes do *S. mutans* e várias outras bactérias do biofilme dental. Assim, a predição de estruturas proteicas a partir de sua sequência apresentou uma nova oportunidade para o desenho racional de drogas com multi-alvos em multi-espécies (HORST et al., 2012).

O desenho computacional de drogas tem maiores chances de sucesso quando possui alvos múltiplos num microrganismo. Se um composto consegue inibir múltiplas proteínas, é provável que iniba, de certeza, pelo menos uma. Assim, a identificação de múltiplos alvos proteicos no *S. mutans* permitirá a criação de vias úteis para o desenvolvimento de novos tratamentos para a cárie dentária. Desta forma, apesar do conceito de ter como alvo apenas o *S. mutans* seja interessante, a terapia multiespécie é essencial, uma vez que as outras espécies presentes no biofilme também contribuem para a iniciação e desenvolvimento da cárie dentária (HORST et al., 2012).

### **3.5 DETECÇÃO COMPUTACIONAL DE ALVOS MOLECULARES PARA DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS**

As bactérias são organismos unicelulares com um genoma consideravelmente pequeno, que no entanto, apresentam variações marcantes em suas arquiteturas celulares, propriedades metabólicas e características fenotípicas. De modo a mostrar tamanha diversidade de características fenotípicas e ecológicas, as bactérias precisam ter genomas extremamente dinâmicos, que envolvam processos como aquisições, deleções e rearranjos de genes (DUTTA e PAN, 2002).

A habilidade das bactérias de aceitar e expressar material genético transmitido não apenas pela descendência direta, mas também através de fontes externas, é uma das áreas mais proeminentes nos últimos tempos dentro da genética molecular experimental e biotecnologia (SKIPINGTON e RAGAN, 2011).

As sequências de nucleotídeos originadas de outras espécies de organismos, que não de seus antecedentes, recebem o nome de ilhas genômicas e podem diferir daquelas do genoma como um todo, pois tais genes podem possuir características em sua sequência, como a quantidade de G+C, o uso de códons sinônimos, a frequência de dinucleotídeos e o uso de aminoácidos que fogem do padrão que aquele genoma possui (LANGILLE, HSIAO e BRINKMAN, 2010). Sabe-se ainda que ilhas genômicas também podem estar associadas com genes de tRNA e as chamadas repetições diretas e ainda com elementos genéticos móveis, como transposons e integrases, além de sequências de inserção. Embora não seja necessária a presença de todas essas características, um conjunto delas pode significar que ali existam genes que se originaram em um evento de transferência horizontal (LANGILLE, HSIAO e BRINKMAN, 2010).

As transferências horizontais de genes podem ser estudadas através de ferramentas da bioinformática baseadas em metodologias homologia independente e homologia dependente. A detecção dessas regiões genômicas pode colaborar no estudo sobre os benefícios da presença dessas regiões aos portadores das mais diversas formas possíveis, como em relação ao surgimento de novas vias metabólicas, desenvolvimento de virulência, resistência a antibióticos e fornecendo assim a capacidade de colonizar novos ambientes e ocupar outros nichos (GOGARTEN, DOOLITTLE e LAWRENCE, 2002).

Pesquisadores podem usar pesquisas acerca das ilhas genômicas ainda para explicar a patogenicidade de determinado microrganismo. Além disso, o desenvolvimento de fármacos, vacinas e antibióticos pelas companhias farmacêuticas já é influenciado pelas pesquisas de genes oriundos de transferência horizontal (HASAN et al., 2012)

Nan et al., (2009) fizeram uso de metodologia homologia dependente na busca de proteínas com funções desconhecidas que poderiam ser resultados de eventos de transferência gênica lateral e que pudessem estar envolvidas no processo de resistência a antibióticos em *S. mutans*. Foram detectadas, dessa forma, 500 das 1600 proteínas do organismo sem qualquer função descrita e uma



delas com muitos poucos homólogos em bancos de dados de proteínas já descritas, a SMU.440. A partir dos estudos de bioinformática estrutural, uma vez cristalizada a proteína e definida sua estrutura tridimensional, concluíram que a SMU.440 poderia estar de fato, envolvida na resistência a antibióticos.

### **3.6 FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA PARA ESTUDOS NO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS**

No trabalho de Nan et al., (2009) descrito anteriormente, apesar do desconhecimento a priori da função da proteína a partir da sua sequência linear, uma vez determinada a estrutura tridimensional experimentalmente e de estudos de sua estrutura, foi determinada sua importante função na resistência a antibióticos.

O conhecimento das estruturas de alvos macromoleculares ou de complexos do tipo ligante-receptor permite a aplicação de estratégias de planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD, do inglês structure-based drug design). Em contraste, quando a estrutura do alvo eleito não é conhecida, métodos de planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante (LBDD, do inglês ligand-based drug design) podem ser utilizados, explorando propriedades e características de séries de ligantes bioativos (GUIDO e ANDRICOPULO, 2008; ANDRICOPULO, SALUM e ABRAHAN, 2009).

Métodos baseados nas estratégias de planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor, envolvem a necessidade de usar modelagem por homologia que surge quando se precisa determinar a estrutura de uma proteína da qual apenas a sua sequência é conhecida, usando o seu alinhamento com um proteína homóloga a partir da qual a estrutura é conhecida (VENSELAR et al., 2010) ou docking molecular, que é uma das principais estratégias de SBDD, e que consiste na predição da conformação bioativa de uma pequena molécula (ligante) no sítio de ligação de uma proteína-alvo, seguido da avaliação e classificação do modo de ligação proposto (AQNIST e MERELIUS, 2001).

### **3.7 PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS BASEADO NA ESTRUTURA DO RECEPTOR**

Existem dois pontos-chave nos programas de docking molecular: a busca pela “melhor” conformação resultante da formação do complexo proteína-ligante e o cálculo de energia livre desta associação, ou sua constante de afinidade (AQNIST e MERELIUS, 2001).

O algoritmo de busca deve investigar a hypersuperfície de energia buscando o mínimo global de energia livre. Para isso, normalmente o receptor é considerado uma estrutura rígida, e o algoritmo de busca explora as diferentes posições para o ligante na região do sítio ativo, utilizando pra isso graus de liberdade translacionais, rotacionais e conformacionais (para ligantes flexíveis) (BROOIJMANS e KUNTZ, 2003).

No docking molecular, o tratamento da flexibilidade do ligante é algo corriqueiro nos atuais métodos, sendo que seu desempenho cai drasticamente com o aumento dos graus de liberdade conformacionais (i.e., aumento do número de ligações químicas torcionáveis) do ligante (ROBERTSON, 2005). Alguns métodos têm tentado incluir a flexibilidade do receptor levando em consideração os graus de liberdade torcionais das cadeias laterais dos aminoácidos no sítio ativo da proteína (LEACH, 2006), ou considerando diversas conformações da proteína obtidas de diferentes estruturas cristalográficas (i.e., onde a mesma proteína está complexada com distintos ligantes) ou obtidas de cálculos de dinâmica molecular (APOSTOLAKIS e CAFLISCH, 1999; TROSSET e SCHERAGA, 1998).

Simulações de Dinâmica molecular (MD) fornecem informações sobre o movimento molecular, possibilitando assim a detecção de movimentos biologicamente relevantes, durante o processo de atracamento molecular ou mesmo como no sítio ativo de uma proteína. É uma técnica ainda comumente usada após a determinação da estrutura tridimensional de moléculas pela modelagem molecular. Dessa forma, espera-se que ocorra uma adequação do sistema de moléculas no meio simulado no qual ele está inserido, buscando novamente o posicionamento dos átomos em um valor de energia livre mínimo (CASE et al., 2005).

A dinâmica molecular pode ser feita através da Mecânica Molecular que se baseia na Mecânica Clássica e considera as interações entre os núcleos das moléculas. Ou pode ser feita através do uso da Mecânica Quântica. Neste caso, utiliza-se o método *ab initio* e/ou o método semi-empírico. A escolha entre estas aproximações depende das propriedades que se deseja avaliar, da precisão

desejada e da capacidade computacional disponível para a realização dos cálculos (CASE et al., 2005).

Métodos que utilizam campos de força clássicos (também conhecidos como métodos de mecânica molecular) ignoram os movimentos dos elétrons e calculam a energia de um sistema como uma função apenas das posições dos núcleos. Mecânica molecular, portanto, é normalmente utilizada na execução de cálculos em sistemas contendo um grande número de átomos (LEACH, 2001).

Em alguns casos, campos de forças podem fornecer respostas que são tão acuradas quanto às obtidas realizando cálculos de alto nível de mecânica quântica, em um tempo computacional bastante reduzido. Entretanto, a mecânica molecular não pode, obviamente, determinar propriedades que dependam da distribuição eletrônica em uma molécula. Os campos de força clássicos são baseados em modelos simples de interações dentro de um sistema com contribuições do afastamento de ligações, a abertura e fechamento de ângulos e as rotações de ligações simples (LEACH, 2001).

Os campos de força comumente empregados em programas de atracamento molecular e mecânica/dinâmica molecular são o GROMOS (VAN GUNSTEREN e BERENDSEN, 1987) AMBER (WEINER, KOLLMAN e CASE, 1984; CORNEL et al., 1995), CHARMM (BROOKS et al., 1983) e MMFF94 (ALGREN, 1996; ALGREN, 1996; ALGREN, 1996; ALGREN, 1996) e são utilizados em programas de dinâmica molecular como GROMACS (VAN DER SPOEL et al., 2005), CHARMM (BROOKS et al., 2009) e AMBER (CASE et al., 2005). Já os programas Gaussian (FISCH, 1998), GAMESS (SCHMIDT et al., 1993) e SPARTAN (DEPPMEIER et al., 2000) realizam cálculos de mecânica quântica, apropriados comumente a pequenos sistemas.

Existem ainda programas que permitem a combinação dos métodos de mecânica quântica e mecânica molecular (QM/MM), sendo que o sítio ativo ou sítio de ligação é tratado por uma teoria de densidade funcional *ab initio* ou potenciais semiempíricos, enquanto o resto do sistema é calculado através de campos de força na mecânica molecular (CASE et al., 2005). Normalmente, os métodos que utilizam mecânica molecular, já oferecem a possibilidade de usar também essa combinação entre os métodos.

### **3.8 PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS BASEADO NA ESTRUTURA DO LIGANTE**

As modernas estratégias usadas no planejamento racional de novos compostos-protótipos se baseiam na abordagem fisiológica. Essa abordagem permite planejar a estrutura química de uma nova molécula com base na definição prévia do mecanismo de ação terapêutica, ou seja, a biomacromolécula à qual o novo fármaco irá se ligar para alterar um determinado processo bioquímico.

Conhecendo-se a estrutura molecular tridimensional do alvo terapêutico eleito, em particular a região responsável pela interação química, é possível identificar um composto capaz de se ligar àquele sítio ativo e alterar suas propriedades utilizando-se técnicas computacionais de modelagem molecular. O desenho racional dessa molécula é realizado utilizando-se técnicas de simplificação molecular (redução de complexidade estrutural de um composto), hibridação molecular (obtenção de nova estrutura química a partir de partes de duas ou mais substâncias bioativas distintas) e bioisosterismo (substituição de partes da estrutura de uma substância bioativa por outra ou outras com comportamento eletrônico similar), além do uso da intuição química de um pesquisador experiente para propor novas modificações.

Uma nova abordagem computacional vem sendo utilizada principalmente pelos laboratórios de pesquisas industriais, onde é feita a busca de compostos protótipos em bancos de dados que contêm a descrição de uma imensa variedade de compostos naturais e sintéticos, puros ou combinados para a realização de bioensaios. O objetivo é descobrir compostos-protótipos ativos que possam, ao serem avaliados experimentalmente, apresentar um nível de afinidade receptor-ligante em nível micromolar ( $\mu\text{M}$ ), ou seja, ativo em uma concentração de um milionésimo de mol por litro, ou nanomolar (nM), ativo em uma concentração de um bilionésimo de mol por litro.

Além desta metodologia de filtragem *in silico*, essa busca é realizada aplicando a "Regra dos Cinco", onde podem ser eliminadas moléculas que violam uma ou mais regras, são ainda aplicados um conjunto de regras empíricas e sistemas baseados em decisão. Estas filtragens podem ser utilizadas como seleção positiva e negativa e estão sendo cada vez mais complementados por algoritmos que predizem propriedades físico-químicas, habilidade para penetrar a barreira cérebro-sangue, toxicidade baixa, entre outras (SCHNEIDER e BOHM, 2002).

Ainda pode ser realizada a filtragem *in vivo*, onde a exclusão de determinadas moléculas acontece depois de aplicados alguns testes experimentais, como de

citotoxicidade ou de determinadas propriedades citocinéticos (WALUM, HEDANDER e GARBERG, 2005). Após a descoberta do composto-protótipo desejado, uma série congênere (compostos similares, com pequenas variações estruturais) deve ser construída e avaliada farmacologicamente, para orientar a otimização do futuro fármaco. Esta etapa é fundamental, pois representa a busca da melhor caracterização da eficácia terapêutica do candidato a fármaco.

Por fim, deve ser então realizada a etapa de testes para a validação do ligante selecionado, determinando se este é, de fato, a molécula ideal para a obtenção do resultado esperado com a avaliação das propriedades farmacocinéticas do ligante, relacionadas ao seu trajeto no organismo, desde a absorção, distribuição e eliminação.

### 3.9 CONCLUSÃO

Apesar da cárie dentária ser uma doença de simples prevenção, por meio de hábitos frequentes de higienização bucal, sua elevada prevalência na população mundial indica ainda a necessidade de desenvolvimento de métodos preventivos eficazes para o controle da doença. Como o *Streptococcus mutans* é considerado o principal agente etiológico da cárie, mais estudos serão necessários para uma melhor compreensão do funcionamento e atuação do *S. mutans* e seus mecanismos de virulência na formação do biofilme, para que seja possível encontrar, no futuro, alternativas inovadoras contra esse microrganismo e, conseqüentemente, contra esta patologia.

O controle químico do biofilme, por meio da redução da virulência ou mesmo a morte destes microrganismos, parece uma alternativa interessante neste intento; porém, é importante salientar que a utilização de antimicrobianos de amplo espectro acarreta o risco de inibir ou matar bactérias benéficas, modificando a microbiota normal, a qual pode criar problemas clínicos, como o desenvolvimento de patógenos oportunistas, especialmente em biofilmes dentais. Portanto, é válido mencionar que todos os esforços devem ser direcionados no sentido do uso apropriado destes agentes bacterianos.

Com o intuito de melhor entender e simular estes mecanismos, as metodologias computacionais tornaram-se componentes cruciais de muitos programas utilizados na produção de fármacos. Assim, esta abordagem

computacional possibilitará a realização de testes que agilizarão a descoberta e utilização de novas substâncias químicas que poderão diminuir a virulência dos microrganismos cariogênicos presentes nos biofilmes dentais.

### ***In Silico* Approach for the Identification of Potential Targets and Specific Antimicrobials for *Streptococcus mutans***

#### **ABSTRACT**

Tooth decay affects most of the population in developed countries. The multifactorial etiology of the disease includes multiple bacterial species, *S. mutans* is the main pathogen associated with the disease. This bacterium adheres to the tooth surface and allows the colonization of other microorganisms resulting in dental biofilm. Several therapeutic agents are available to treat or prevent tooth decay, but none, with the exception of fluoride, has significantly influenced the disease's global burden. Moreover, the probable development of resistance of microorganisms to existing antibacterial agents and the scarcity of good antimicrobial agents motivates this effort for innovation. The detailed knowledge obtained in recent years on the *S. mutans* allowed the identification of potential targets in this microorganism, enabling the development of specific drugs to combat tooth decay. Thus, the identification of potential targets in these pathogens is the first step in the discovery process of new therapeutic agents. Currently, the experimental assays used for this purpose are expensive and time consuming. In contrast, bioinformatics methods to predict drug targets are cheap, quick and workaday in the biotechnology. This article will review the potential drug targets in *S. mutans*, as well as the bioinformatics methods used to identify these targets and effective drugs for specific pharmacological treatment of dental caries.

**Key words:** Bioinformatics. Biotechnology. *Streptococcus mutans*.

## REFERÊNCIAS

- [1] BAGRAMIAN, R.A; GARCIA-GODOY, F; VOLPE, A.R. (2009) The global increase in dental caries. A pending public health crisis. *American Journal of Dentistry*, **21**, 1-6.
- [2] FEJERSKOV, O. (2004) Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res*, **38**, 182-191.
- [3] MARSH, P.D. (2003) Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*, **149**, 279-294.
- [4] NYVAD, B; CRIELAARD, W; MIR, A; TAKAHASHI, N; BEIGHTON, D. (2013) Dental caries from a molecular microbiological perspective. *Caries Res*, **47**, 89-102.
- [5] Xu, X., Zhou, X.D. and Wu, C.D. (2011) The Tea Catechin Epigallocatechin Gallate Suppresses Cariogenic Factors of *Streptococcus mutans*. *Antimicrob Agents Chemother*, **55**, 1229-1236. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01016-10>.
- [6] Smith, D.J. and Taubman, M.A. (1996) Experimental Immunization of Rats with a *Streptococcus Mutans* 59 Kda Glucan Binding Protein Protects against Dental Caries. *Infection and Immunity*, **64**, 3069-3073.
- [7] Fejerskov, O. and Kidd, E., Eds. (2003) *Dental Caries: The Disease and Its Clinical Management*. Blackwell Munksgaard, Copenhagen.
- [8] Loesche, W.J. (1986) Role of *Streptococcus mutans* in Human Dental Decay. *Microbiology Reviews*, **50**, 353-380.
- [9] Lewis, K. (2012) Persister Cells: Molecular Mechanisms Related to Antibiotic Tolerance. *Handbook of Experimental Pharmacology*, **211**, 121-133. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-28951-4\\_8](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-28951-4_8)
- [10] Zeshi, Z., Nadezhina, E. and Wilkinson, K.J. (2010) Quantifying Diffusion in a Biofilm of *Streptococcus mutans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **55**, 1075.
- [11] Featherstone, J.D.B. (1999) Prevention and Reversal of Dental Caries: Role of Low Level Fluoride. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, **27**, 31-40. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0528.1999.tb01989.x>
- [12] Levine, M., Owen, W.L. and Avery, K.T. (2005) Anybody Response to *Actinomyces* Antigen and Dental Caries Experience: Implications for Caries Susceptibility. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **12**, 764-769.
- [13] Balakrishman, M., Simmonds, R.S. and Tagg J. (2000) Dental Caries Is a Preventable Infectious Disease. *Australian Dental Journal*, **45**, 235-245. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1834-7819.2000.tb00257.x>

- [14] Russel, M.W., Childers, N.K., Michalek, S.M., Smith, D.J. and Taubman, M.A. (2004) A Caries Vaccine? The State of the Science of Immunization against Dental Caries. *Caries Research*, **38**, 230-235.
- [15] Guido, R.V.C. and Andricopulo, A.D. (2008) Modelagem Molecular de Fármacos. *Revista Processos Químicos*, **2**, 24-26. <http://www.rpqsenai.org.br/>
- [16] Andricopulo, A.D., Salum, L.B. and Abraham, D.J. (2009) Structure-Based Drug Design Strategies in Medicinal Chemistry. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **9**, 771-790. <http://dx.doi.org/10.2174/156802609789207127>
- [17] Marsh, P.D. (2004) Dental Plaque as a Microbial Biofilm. *Caries Research*, **38**, 204-211. <http://dx.doi.org/10.1159/000077756>
- [18] Marsh, P.D. (1994) Microbial Ecology of Dental Plaque and Its Significance in Health and Disease. *Advances in Dental Research*, **8**, 263-271.
- [19] Socransky, S.S. and Haffajee, A.D. (2002) Dental Biofilms: Difficult Therapeutic Targets. *Periodontology 2000*, **28**, 12-55. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0757.2002.280102.x>
- [20] Butcher, S.P. (2003) Target Discovery and Validation in the Post-Genomic era. *Neurochemical Research*, **28**, 367-371. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1022349805831>.
- [121] Da Silva, A.C.B. (2010) Effect of Chlorhexidine on the Gene Expression of Glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* in Planktonic and Biofilm in Vitro Organized. Thesis PhD in Biotechnology Course of Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba.
- [22] Koo, H., Xiao, J., Klein, M.I. and Jeon, J.G. (2010) Exopolysaccharides Produced by *Streptococcus mutans* Glucosyltransferases Modulate the Establishment of Microcolonies within Multispecies Biofilms. *Journal of Bacteriology*, **192**, 3024-3032. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01649-09>.
- [23] Romling, U. and Balsalobre, C. (2012) Biofilm Infections, Their Resilience to Therapy and Innovative Treatment Strategies. *Journal of Internal Medicine*, **272**, 541-561. <http://dx.doi.org/10.1111/joim.12004>.
- [24] Babpour, E., Angaji, S.A. and Angaji, S.M. (2009) Antimicrobial Effects of Four Medicinal Plants on Dental Plaque. *Journal of Medicinal Plants Research*, **3**, 132-137.
- [25] Michalek, S.M. and Childers, N.K. (1990) Developmental and Outlook for Caries Vaccine. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, **1**, 37-54.
- [26] Robinette, R.A., Oli, M.W., McArthur, W.P. and Brady, L.J. (2011) A Therapeutic Anti-*Streptococcus mutans* Monoclonal Antibody Used in Human passive Protection Trials Influences the Adaptive Immune Response. *Vaccine*, **29**, 6292-6300. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.06.027>.



- [27] Featherstone, J.D.B. (2000) The Science and Practice of Caries Prevention. The Journal of the American Dental Association, **131**, 887-899. <http://dx.doi.org/10.14219/jada.archive.2000.0307>.
- [28] Kubo, I., Muroi, H. and Himejima, M. (1993) Antimicrobial Activity against *Streptococcus mutans* of Mate Tea Flavor Components. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **41**, 107-111. <http://dx.doi.org/10.1021/jf00025a023>.
- [29] Tredwin, C.J., Scully, C. and Bagan-Sebastian, J.V. (2005) Drug-Induced Disorders of Teeth. Journal of Dental Research, **84**, 596-602. <http://dx.doi.org/10.1177/154405910508400703>.
- [30] Singh, J., Kumar, A., Budhijaraja, S. and Hooda, A. (2007) Ethnomedicine: Use in Dental Caries. Brazilian Journal of Oral Sciences, **6**, 1308-1312.
- [31] Adonizio, A., Kong, K.F. and Mathee, K. (2008) Inhibition of Quorum Sensing-Controlled Virulence Factor Production in *Pseudomonas aeruginosa* by South Florida Plant Extracts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **52**, 198-203. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00612-07>.
- [32] Hosseini, F., Adlgostar, A. and Sharifnia, F. (2013) Antibacterial Activity of *Pistacia atlantica* extracts on *Streptococcus mutans* Biofilm. *International Research Journal of Biological Sciences*, **2**, 1-7.
- [33] Al-Sohaibani, S. and Murugan, K. (2012) Anti-Biofilm Activity of *Salvadora persica* on Cariogenic Isolates of *Streptococcus mutans*: *In Vitro* and Molecular Docking Studies. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, **28**, 29-38.
- [34] Iannitelli, A., Grande, R., Di Stefano, A., Di Giulio, M., Sozio, P., Bessa, L.J., Laserra, S., Paoloni, C., Protasi, F. and Cellini, L. (2011) Potential Antibacterial Activity of Carvacrol-Loaded poly (DL-Lactide-co-Glycolide) (PLGA) Nanoparticles against Microbial Biofilm. *International Journal of Molecular Sciences*, **12**, 5039-5051. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms12085039>.
- [35] Mahapatro, A. and Singh, D.K. (2011) Biodegradable Nanoparticles Are Excellent Vehicle for Site Directed *in Vivo* Delivery of Drugs and Vaccines. *Journal of Nanobiotechnology*, **9**, 55. <http://dx.doi.org/10.1186/1477-3155-9-55>.
- [36] Milgrom, P., Zero, D.T. and Tanzer, J.M. (2009) An Examination of the Advances in Science and Technology of Prevention of Tooth Decay in Young Children since the Surgeon General's Report on Oral Health. *Academic Pediatrics*, **9**, 404-409. <http://dx.doi.org/10.1016/j.acap.2009.09.001>.
- [37] Cvitkovitch, D.G., Li, Y.H. and Ellen, R.P. (2003) Quorum Sensing and Biofilm Formation in Streptococcal Infections. *Journal of Clinical Investigation*, **112**, 1626-1632. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI200320430>.
- [38] Li, Y.H., Tang, N., Aspiras, M.B., Lau, P.C., Lee, J.H., Ellen, R.P. and Cvitkovitch, D.G. (2002) A Quorum-Sensing Signaling System Essential for Genetic

Competence in *Streptococcus mutans* Is Involved in Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology*, **184**, 2699-2708. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.184.10.2699-2708.2002>.

[39] Liu, C., Worthington, R.J., Melander, C. and Wu, H. (2011) A New Small Molecule Specifically Inhibits the Cariogenic Bacterium *Streptococcus mutans* in Multispecies Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **55**, 2679-2687. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01496-10>.

[40] Smith, D.J., King, W.F., Barnes, L.A., Peacock, Z. and Taubman, M.A. (2003) Immunogenicity and Protective Immunity Induced by Synthetic Peptides Associated with Putative Immunodominant Regions of *Streptococcus mutans* Glucan-Binding Protein B. *Infection and Immunity*, **71**, 1179-1184. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.71.3.1179-1184.2003>.

[41] Len, A.C.L., Harty, D.W.S. and Jacques, N.A. (2004) Proteome Analysis of *Streptococcus mutans* Metabolic Phenotype during Acid Tolerance. *Microbiology*, **150**, 1353-1366. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.26888-0>.

[42] Wang, P., Song, P., Mingming, J. and Guoping, Z. (2013) Isocitrate Dehydrogenase from *Streptococcus mutans*: Biochemical Properties and Evaluation of a Putative Phosphorylation Site at Ser102. *PLoS ONE*, **8**, e58918. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0058918>.

[43] Quivey, R.G., Kuhnert, W. and Hahn, K. (2011) Genetics of Acid Adaptation in Oral Streptococci. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, **12**, 301-314. <http://dx.doi.org/10.1177/10454411010120040201>.

[44] Dashper, S.G. and Reynolds, E.C. (1992) pH Regulation by *Streptococcus mutans*. *Journal of Dental Research*, **71**, 1159-1165. <http://dx.doi.org/10.1177/00220345920710050601>.

[45] Amer, F.A., El-Behedy, E.M. and Mohtady, H.A. (2008) New Targets for Antibacterial Agents. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, **3**, 46-57.

[46] Wade, W.G. (2010) New Aspects and New Concepts of Maintaining "Microbiological" Health. *Journal of Dentistry*, **38**, S21-S25. [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-5712\(10\)70007-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-5712(10)70007-5).

[47] Hopkins, A.L. and Groom, C.R. (2002) The Druggable Genome. *Nature Reviews Drug Discovery*, **1**, 727-730. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd892>.

[48] Russ, A.P. and Lampel, S. (2005) The Druggable Genome: An Update. *Drug Discovery Today*, **10**, 1607-1610. [http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03666-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03666-4).

[49] An, J., Totrov, M. and Abagyan, R. (2004) Comprehensive Identification of "Druggable" Protein Ligand Binding Sites. *Genome Informatics*, **15**, 31-41.

[50] Hajduk, P.J., Huth, J.R. and Tse, C. (2005) Predicting Protein Druggability. *Drug Discovery Today*, **10**, 1675-1682. [http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03624-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03624-X).

- [51] Drews, J. (2000) Drug Discovery: A Historical Perspective. *Science*, **287**, 1960-1964. <http://dx.doi.org/10.1126/science.287.5460.1960>.
- [52] Overington, J.P., Al-Lazikani, B. and Hopkins, A.L. (2006) How Many Drug Targets Are There? *Nature Reviews Drug Discovery*, **5**, 993-996. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2199>.
- [53] Betz, U.A. (2005) How Many Genomics Targets Can a Portfolio Afford? *Drug Discovery Today*, **10**, 1057-1063. [http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03498-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03498-7).
- [54] Imming, P., Sinning, C. and Meyer, A. (2006) Drugs, Their Targets and the Nature and Number of Drug Targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, **5**, 821-834. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2132>.
- [55] De Magalhães, C.S. (2006) Algoritmos Genéticos para o Problema de Docking Proteína-Ligante. Tese de Doutorado do Curso de Modelagem Computacional do Laboratório Nacional de Computação Científica, Petrópolis, Rio de Janeiro.
- [56] Vuong, C., Gerke, C., Somerville, G.A., Fischer, E.R. and Otto, M. (2003) Quorum-Sensing Control of Biofilm Factors in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Infectious Diseases*, **188**, 706-718. <http://dx.doi.org/10.1086/377239>.
- [57] Miller, M.B. and Bassler, B.L. (2001) Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, **55**, 165-199. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>.
- [58] Stokes, N.R., Sievers, J., Barker, S., Bennett, J.M., Brown, D.R., Collins, I., Errington, V.M., Foulger, D., Hall, M., Halsey, R., Johnson, H., Rose, V., Thomaidis, H.B., Haydon, D.J., Czaplewski, L.G. and Errington, J. (2005) Novel Inhibitors of Bacterial Cytokinesis Identified by a Cell-Based Antibiotic Screening Assay. *Journal of Biological Chemistry*, **48**, 39709-39715. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M506741200>.
- [59] Daughery, M., Vonstein, V., Overbeek, R. and Oserman, A. (2001) Archaeal Shikimate Kinase, a New Member of the GHMP-Kinase Family. *Journal of Bacteriology*, **183**, 292-300. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.1.292-300.2001>.
- [60] Zhang, Y.M., White, S.W. and Rock, C.O. (2006) Inhibiting Bacterial Fatty Acid Synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 17541-17544. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R600004200>.
- [61] Whiteley, M., Bangera, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S. and Greenberg, E.P. (2001) Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Nature*, **413**, 860-864. <http://dx.doi.org/10.1038/35101627>.
- [62] Motegi, M., Takagi, Y., Yonezawa, H., Hanada, N., Terajima, J., Watanabe, H. and Senpuku, H. (2006) Assessment of Genes Associated with *Streptococcus mutans* Biofilm Morphology. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 6277-6287. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00614-06>.

- [63] Yamashita, Y., Bowen, W.H., Burne, R.A. and Kuramitsu, H.K. (1993) Role of the *Streptococcus mutans* gtf Genes in Caries Induction in the Specific-Pathogen-Free Rat Model. *Infection and Immunity*, **61**, 3811-3817.
- [64] Wen, Z.T. and Burne, R.A. (2002) Functional Genomics Approach to Identifying Genes Required for Biofilm Development by *Streptococcus mutans*. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 1196-1203. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.3.1196-1203.2002>.
- [65] Merritt, J., Qi, F., Goodman, S.D., Anderson, M.H. and Shi, W. (2003) Mutation of *luxS* Affects Biofilm Formation in *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity*, **71**, 1972-1979. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.71.4.1972-1979.2003>.
- [66] Helmann, J.D., Wu, M.F.W., Kobel, P.A., Gamo, F.J., Wilson, M., Morshedi, M.M., Navre, M. and Paddon, C. (2001) Global Transcriptional Response of *Bacillus subtilis* to Heat Shock. *Journal of Bacteriology*, **183**, 7318-7328. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.24.7318-7328.2001>.
- [67] DeLisa, M.P., Wu, C.F., Wang, L., Valdes, J.J. and Bentley, W.E. (2001) DNA Microarray-Based Identification of Genes Controlled by Autoinducer 2-Stimulated Quorum Sensing in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **183**, 5239-5247. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.18.5239-5247.2001>.
- [68] Ye, R.W., Tao, W., Bedzyk, L., Young, T., Chen, M. and Li, L. (2000) Global Gene Expression Profiles of *Bacillus subtilis* Grown under Anaerobic Conditions. *Journal of Bacteriology*, **182**, 4458-4465. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.182.16.4458-4465.2000>.
- [69] Fawcett, P., Eichenberger, P., Losick, R. and Youngman, P. (2000) The Transcriptional Profile of Early to Middle Sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 8063-8068. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.140209597>.
- [70] Ajdic, D., McShan, W.M., McLaughlin, R.E., Savić, G., Chang, J., Carson, M.B., Primeaux, C., Tian, R.Y., Kenton, S., Jia, H.G., Lin, S.P., Qian, Y.D., Li, S.L., Zhu, H., Najar, F., Lai, H.S., White, J. and Roe, B.A. (2002) Genome Sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a Cariogenic Dental Pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 14434-14439. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.172501299>.
- [71] Marsh, P.D. (2010) Controlling the Oral Biofilm with Antimicrobials. *Journal of Dentistry*, **38**, S11-S15. [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-5712\(10\)70005-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-5712(10)70005-1).
- [72] Galperin, M.Y. (2010) Diversity of Structure and Function of Response Regulator Output Domains. *Current Opinion in Microbiology*, **13**, 150-159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.005>.
- [73] Al-Sohaibani, S. and Murugan, K. (2012) Anti-Biofilm Activity of *Salvadora persica* on Cariogenic Isolates of *Streptococcus mutans*: *In Vitro* and Molecular

Docking Studies. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, **28**, 29-38.

[74] Cooper, R. and Okhiria, O. (2006) Biofilms, Wound Infection and the Issue of Control. *Wounds*, **2**, 48-57.

[75] Kumar, C., *et al.* (2013) An *in Silico* Study of Quinic Acid Derivatives as Inhibitors of Com A, the Quorum Sensing Protein of *Streptococcus mutans* Responsible for the Pathogenesis in Dental Caries. *International Journal of Biotechnology and Allied Fields*, **1**, 76-84. <http://www.ijbaf.com/>.

[76] Agüero, F., Al-Lazikani, B., Aslett, M., Berriman, M., Buckner, F.S., Campbell, R.K., Carmona, S., Carruthers, I.M., Edith Chan, A.W., Chen, F., Crowther, G.J., Doyle, M.A., Hertz-Fowler, C., Hopkins, A.L., McAllister, G., Nwaka, S., Overington, J.P., Pain, A., Paolini, G.V., Pieper, U., Ralph, S.A., Riechers, A., Roos, D.S., Sali, A., Shanmugam, D., Suzuki, T., Van Voorhis, W.C. and Verlinde, C.L.M.J. (2008) Genomic-Scale Prioritization of Drug Targets: The TDR Targets Database. *Nature Reviews Drug Discovery*, **7**, 900-907. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2684>.

[77] Horst, J.A., Laurenzi, A., Bernard, B. and Samudrala, R. (2012) Computational Multitarget Drug Discovery. In: Peters, J.E., Ed., *Polypharmacology*, John Wiley and Sons Publishing Co., Hoboken, 236-302.

[78] Dutta, C. and Pan, A. (2002) Horizontal Gene Transfer and Bacterial Diversity. *Journal of Biosciences*, **27**, 27-33. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02703681>.

[79] Skippington, E. and Ragan, M.A. (2011) Lateral Genetic Transfer and the Construction of Genetic Exchange Communities. *FEMS Microbiology Reviews*, **35**, 707-735. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00261.x>.

[80] Langille, M.G., Hsiao, W.W. and Brinkman, F.S. (2010) Detecting Genomic Islands Using Bioinformatics Approaches. *Nature Reviews Microbiology*, **8**, 373-382. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2350>.

[81] Gogarten, J.P., Doolittle, W.F. and Lawrence, J.G. (2002) Prokaryotic Evolution in Light of Gene Transfer. *Molecular Biology and Evolution*, **19**, 2226-2238. <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004046>.

[82] Hasan, M.S., Liu, Q., Wang, H., Fazekas, J., Chen, B. and Che, D. (2012) GIST: Genomic Island Suite of Tools for Predicting Genomic Islands in Genomic Sequences. *Bioinformatics*, **8**, 203-205. <http://dx.doi.org/10.6026/97320630008203>.

[83] Nan, J., Brostromer, E., Liu, X., Kristensen, O. and Su, X. (2009) Bioinformatics and Structural Characterization of a Hypothetical Protein from *Streptococcus mutans*: Implication of Antibiotic Resistance. *PLoS ONE*, **4**, e7245. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0007245>.

[84] Venselaar, H., Joosten, R.P., Vrolijk, B., Baakman, C.A., Hekkelman, M.L., Krieger, E. and Vriend, G. (2010) Homology Modelling and Spectroscopy, a Never-

Ending Love Story. *European Biophysics Journal*, **39**, 551-563. <http://dx.doi.org/10.1007/s00249-009-0531-0>.

[85] Aqvist, J. and Marelus, J. (2001) The Linear Interaction Energy Method for Predicting Ligand Binding Free Energies. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, **4**, 613-626. <http://dx.doi.org/10.2174/1386207013330661>.

[86] Brooijmans, N. and Kuntz, I.D. (2003) Molecular Recognition and Docking Algorithms. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, **32**, 335-373. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.142532>.

[87] Robertson, J.G. (2005) Mechanistic Basis of Enzyme-Targeted Drugs. *Biochemistry*, **44**, 5561-5571. <http://dx.doi.org/10.1021/bi050247e>.

[88] Leach, A.R., Shoichet, B.K. and Peishoff, C.E. (2006) Docking and Scoring-Perspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, **49**, 5851-5855. <http://dx.doi.org/10.1021/jm060999m>.

[89] Apostolakis, J. and Caflisch, A. (1999) Computational Ligand Design. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, **2**, 91-104.

[90] Trosset, J.Y. and Scheraga, H.A. (1998) Reaching the Global Minimum in Docking Simulations: A Monte Carlo Energy Minimization Approach Using Bezier Splines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 8011-8015. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.14.8011>.

[91] Case, D.A., Cheatham III, T.E., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz Jr., K.M., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B. and Woods, R.J. (2005) The Amber Biomolecular Simulation Programs. *Journal of Computational Chemistry*, **26**, 1668-1688. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20290>.

[92] Leach, A.R. (2001) *Molecular Modeling: Principles and Applications*. 2nd Edition, Pearson Education Ltd, Upper Saddle River.

[93] van Gunsteren, W.F. and Berendsen, H.J.C. (1987) GROMOS-87 Manual. Biomos BV Nijenborgh 4, 9747 AG, Groningen.

[94] Weiner, S.J., Kollman, P.A., Case, D.A., Chandra Singh, U., Ghio, C., Alagona, G., Profeta, S. and Weiner, P. (1984) A New Force Field for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic Acids and Proteins. *Journal of American Chemical Society*, **106**, 765-784. <http://dx.doi.org/10.1021/ja00315a051>.

[95] Cornell, W.D., Cieplak, P., Bayly, C.I., Gould, I.R., Merz Jr., K.M., Ferguson, D.M., Spellmeyer, D.C., Fox, T., Caldwell, J.W. and Kollman, P.A. (1995) A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids and Organic Molecules. *Journal of the American Chemical Society*, **117**, 5179-5197. <http://dx.doi.org/10.1021/ja00124a002>.

[96] Brooks, B.R., Bruccoreli, R.E., Olafson, B.D., States, D.J., Swaminathan, S. and Karplus, M. (1983) CHARMM: A Program for Macromolecular Energy Minimization

and Dynamics Calculation. *Journal of Computational Chemistry*, **4**, 187-217.  
<http://dx.doi.org/10.1002/jcc.540040211>.

[97] Halgren, T.A. (1996) Merck Molecular Force Field. I. Basis, Form, Scope, Parameterization, and Performance of MMFF94. *Journal of Computational Chemistry*, **17**, 490-519. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199604\)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P).

[98] Halgren T.A. (1996) Merck Molecular Force Field. II. MMFF94 van der Waals and Electrostatic Parameters for Intermolecular Interactions. *Journal of Computational Chemistry*, **17**, 520-552. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199604\)17:5/6<520::AID-JCC2>3.0.CO;2-W](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<520::AID-JCC2>3.0.CO;2-W).

[99] Halgren, T.A. (1996) Merck Molecular Force Field. III. Molecular Geometries and Vibrational Frequencies for MMFF94. *Journal of Computational Chemistry*, **17**, 553-586. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199604\)17:5/6<553::AID-JCC3>3.0.CO;2-T](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<553::AID-JCC3>3.0.CO;2-T).

[100] Halgren, T.A. (1996) Merck Molecular Force Field. IV. Conformational Energies and Geometries for MMFF94. *Journal of Computational Chemistry*, **17**, 587-615. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199604\)17:5/6<587::AID-JCC4>3.0.CO;2-Q](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<587::AID-JCC4>3.0.CO;2-Q).

[101] Halgren, T.A. (1996) Merck Molecular Force Field. V. Extension of MMFF94 Using Experimental Data, Additional Computational Data and Empirical Rules. *Journal of Computational Chemistry*, **17**, 616-641. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199604\)17:5/6<616::AID-JCC5>3.0.CO;2-X](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<616::AID-JCC5>3.0.CO;2-X).

[102] Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A.E. and Berendsen, H.J. (2005) GROMACS: Fast, Flexible, and Free. *Journal of Computational Chemistry*, **26**, 1701-1718. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20291>.

[103] Brooks, B.R., Brooks III, C.L., Mackerell Jr., A.D., Nilsson, L., Petrella, R.J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caflisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A.R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoscek, M., Im, W. and Kuczer, K. (2009) CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. *Journal of Computational Chemistry*, **30**, 1545-1614. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21287>.

[104] Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., *et al.* (1998) Gaussian 98. Gaussian Inc., Pittsburgh.

[105] Schmidt, M.W., Baldridge, K.K., Boatz, J.A., Elbert, S.T., Gordon, M.S., Jensen, J.H., Koseki, S., Matsunaga, N., Nguyen, K.A., Su, S.J., Windus, T.L., Dupuis, M. and Montgomery Jr., J.A. (1993) General Atomic and Molecular Electronic Structure System. *Journal of Computational Chemistry*, **14**, 1347-1363. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.540141112>.

[106] Deppmeier, B., Driesse, A.J., *et al.* (2000) Wavefunction Inc., Irvine.

[107] Schneider, G. and Böhm, H.J. (2002) Virtual Screening and Fast Automated Docking Methods. *Drug Discovery Today*, **7**, 64-70. [http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446\(01\)02091-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446(01)02091-8).

[108]Walum, E., Hedander, J. and Garberg, P. (2005) On the Relevance of Cytotoxicity Measurements, Barrier Passage Determinations and High Throughput Screening *in Vitro* to Select Potentially Hazardous Compounds in Large Sets of Chemicals. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **207**, 393-397.



## **ANEXO 1 - REGRAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGO NA REVISTA ADVANCES IN BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY**

**To expedite the review process, please format the manuscript in ways as follow:**

### **Article type:**

One Column

### **Manuscript organization:**

1. All manuscripts are expected to be prepared as a single PDF or MS Word document with the complete text, references, tables and figures included. Any revised manuscripts prepared for publication should be sent as a single editable Word document. LaTeX paper is also acceptable for publication, but it should be in PDF for review first.

2. Manuscripts should be written in English. Title, author(s), and affiliations should all be included on a title page as the first page of the manuscript file, followed by a 100-300 word abstract and 3-5 keywords. The order they follow is: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Introduction.

### **Figure and table requirement:**

3. All figures or photographs must be submitted as jpg or tif files with distinct characters and symbols at 500 dpi (dots per inch). Test your figures by printing them from a personal computer. The online version should look relatively similar to the personal-printer copy. Tables and equations should be in an editable rather than image version. Tables must be edited with Word/Excel. Equations must be edited with Equation Editor. Figures, tables and equations should be numbered and cited as Figure 1, Figure 2, Figure 3, etc. in sequence.

### **How to count page numbers:**

4. Before submission or after acceptance, type your manuscript single spaced, and make all the characters in the text, tables, figure legends, footnotes and references in a single typeface and point size as 10 pt Times New Roman. This will save space, make it easier for reviewers and editors to process the submitted work, and contributes to slowing down global warming by using less paper.

5. All references should be numbered in square brackets in the text and listed in the REFERENCES section in the order they appear in the text. Below are some examples:

Journal Articles:

[1] García, J.I., Sepúlveda, S. and Noriega-Hoces, L. (2010) Beneficial Effect of Reduced Oxygen Concentration with Transfer of Blastocysts in IVF Patients Older than 40 Years Old. *Health*, 2, 1010-1017.

[2] Maganioti, A.E., Chrissanthi, H.D., Charalabos, P.C., Andreas, R.D., George, P.N. and Christos, C.N. (2010) Cointegration of Event-Related Potential (ERP)

Signals in Experiments with Different Electromagnetic Field (EMF) Conditions. Health, 2, 400-406.

[3] Botorabi, F., Haapasalo, J., Smith, E., Haapasalo, H. and Parkkila, S. (2011) Carbonic Anhydrase VII—A Potential Prognostic Marker in Gliomas. Health, 3, 6-12.

E-JJournal Articles:

[4] Bharti, V.K. and Srivastava, R.S. (2009) Protective Role of Buffalo Pineal Proteins on Arsenic-Induced Oxidative Stress in Blood and Kidney of Rats. Health, 1, 167-172.

[http://www.scirp.org/fileOperation/download.aspx?path=Health20090100017\\_97188589.pdf&type=journal](http://www.scirp.org/fileOperation/download.aspx?path=Health20090100017_97188589.pdf&type=journal)

Books:

[5] Verdu, S. (1998) Multi-User Detection. Cambridge University Press, Cambridge.

Edited Book:

[6] Prasad, A.S. (1982) Clinical and Biochemical Spectrum of Zinc Deficiency in Human Subjects. In: Prasad, A.S., Ed., Clinical, Biochemical and Nutritional Aspects of Trace Elements, Alan R. Liss, Inc., New York, 5-15.

Conference Proceedings:

[7] Clare, L., Pottie, G. and Agre, J. (1999) Self-Organizing Distributed Sensor Networks. Proceedings SPIE Conference Unattended Ground Sensor Technologies and Applications, Orlando, 3713, 229-237.

Thesis:

[8] Heinzelman, W. (2000) Application-Specific Protocol Architectures for Wireless Networks. Ph.D. Dissertation, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge.

Internet:

[9] Honeycutt, L. (1998) Communication and Design Course.

<http://dcr.rpi.edu/commdesign/class1.html>

# *In Silico* Approach for the Identification of Potential Targets and Specific Antimicrobials for *Streptococcus mutans*

Andréa Cristina Barbosa da Silva<sup>1</sup>, Diego Romário da Silva<sup>1</sup>,  
Sabrina Avelar de Macêdo Ferreira<sup>1</sup>, Gustavo Gomes Agripino<sup>1</sup>,  
Allan Reis Albuquerque<sup>2</sup>, Thaís Gaudencio do Rêgo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Center for Science, Technology and Health, State University of Paraíba, Araruna, Brazil

<sup>2</sup>Center for Health Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

<sup>3</sup>Center for Informatics, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

Email: [andreacbsilva@gmail.com](mailto:andreacbsilva@gmail.com)

Received 11 December 2013; revised 9 February 2014; accepted 6 March 2014

Copyright © 2014 by authors and Scientific Research Publishing Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

---

## Abstract

Tooth decay affects most of the population in developed countries. The multifactorial etiology of the disease includes multiple bacterial species, *S. mutans* is the main pathogen associated with the disease. This bacterium adheres to the tooth surface and allows the colonization of other microorganisms resulting in dental biofilm. Several therapeutic agents are available to treat or prevent tooth decay, but none, with the exception of fluoride, has significantly influenced the disease's global burden. Moreover, the probable development of resistance of microorganisms to existing antibacterial agents and the scarcity of good antimicrobial agents motivates this effort for innovation. The detailed knowledge obtained in recent years on the *S. mutans* allowed the identification of potential targets in this microorganism, enabling the development of specific drugs to combat tooth decay. Thus, the identification of potential targets in these pathogens is the first step in the discovery process of new therapeutic agents. Currently, the experimental assays used for this purpose are expensive and time consuming. In contrast, bioinformatics methods to predict drug targets are cheap, quick and workaday in the biotechnology. This article will review the potential drug targets in *S. mutans*, as well as the bioinformatics methods used to identify these targets and effective drugs for specific pharmacological treatment of dental caries.

## Keywords

Bioinformatics; Antimicrobial Targets; *S. mutans*

---

## 1. Introduction

Dental caries still has high prevalence and incidence in the world population [1]. It is an irreversible microbial disease of hard dental tissues, characterized by demineralization of the inorganic portion and destruction of the tooth organic material, which often leads to cavitation. [2] Bacteria in the biofilm produce acids from the metabolism of carbohydrates from the host diet [3].

*Streptococcus mutans* is a Gram-positive, aciduric and acidogenic bacteria, being considered the most frequent microorganism associated with tooth decay [4]. This bacterium is able to organize itself in bacterial communities through cell-cell interaction and connection with other components present in the medium, such as polysaccharides, proteins and DNA, forming the biofilm. The bacteria included in this system are more resistant and sessile than those planktonic [5], forming an effective barrier against the penetration of antimicrobial agents capable of providing them with a high level of antibiotic resistance [6].

In addition to traditional measures that are routinely used in the control of caries, such as oral care products of mechanical action (toothbrushes and dental floss) and methods of population prevention (water fluoridation) [7] [8], the products of chemical action (toothpastes and mouthrinses) have been considered an interesting alternative to control biofilm and thus dental caries. However, these antimicrobial dental use should be able to significantly inhibit the cell growth of cariogenic pathogens without causing adverse effects to the host [9] [10] effects. In this context, modern strategies have been used for the rational design of new compound-prototypes allowing

to plan the chemical structure of a new molecule based on the previous definition of the therapeutic action mechanism, *i.e.* the biomacromolecule to which the new drug will bind to change a particular biochemical process. Knowing the three-dimensional molecular structure of the elected therapeutic target, *i.e.*, from the region responsible for chemical interaction, it is possible to identify a compound capable of binding that active site and changing its properties through computational molecular modeling techniques [11] [12]. For dentistry, the understanding of mechanisms involved in the formation, virulence and drug resistance of dental biofilms is vital and it has necessary support in computer science to obtain greater precision in the development of substances capable of destabilizing the structure of the biofilm formed specially by *S. mutans*. This paper will highlight the potential molecular targets in *S. mutans* as the main computational methods used to detect these targets and specific drugs for treatment of dental caries.

## 2. Dental Caries, Biofilms and *Streptococcus mutans*

Dental caries is a localized multifactorial disease, dependent on diet, oral microbiota and host response [1]. The reduced pH caused by acid production by cariogenic microorganisms embedded in the biofilm by means of carbohydrates metabolism causes dissolution of dental enamel ions into the medium, thereby causing cavitation in the tissue. [2] *Streptococcus mutans*, a Gram-positive bacterium, is considered the most frequent microorganism associated with dental caries [4].

The biofilm can be defined as a diverse community of microorganisms present on the tooth surface as a biofilm embedded in a polymer matrix of microbial origin and from the host. This microbial organization system has been extensively studied in recent years, particularly in studies on antimicrobials, since it presents particular characteristics that allow the microorganisms residing on it better resist to drugs than planktonic forms [13].

Imbalance in these dental microbial biofilms can allow the development of dental caries, since it is caused by microorganisms belonging to the resident oral flora. Before the establishment of the carious lesion, an environment with low pH caused by microbial fermentation of dietary carbohydrates selects a population of producer and resistant strains to acids such as streptococci from the mutans group and lactobacilli. These species increase the acid formation which can cause demineralization [14].

Biofilms have a more tolerant phenotype to antimicrobial agents, stress and host defenses than planktonic cultures, making them difficult to handle [15]. This means that the effectiveness of products used in the prevention of dental caries should be evaluated in biofilms and not in traditional liquid cultures [16]. Patterns of gene expression in biofilms are also distinguished from those of planktonic cells [17], justifying the need to perform laboratory tests under both conditions to better understand the effect of antimicrobials in these cells.

*Streptococcus mutans* can develop by forming biofilm on dental tissues [6]. The initial phase of colonization depends on the specific interaction between *S. mutans* and proteins/glycoproteins of salivary and microbial origin adsorbed on the acquired pellicle that coats the tooth enamel [18]. During the biofilm formation, bacteria aggregate to each other, surrounded by a network of extracellular polysaccharides producing, within the sessile

bacterial populations, new conditions that increase antibiotic tolerance, making these microorganisms more organized and resistant if compared to planktonic bacteria [5] [19] [20].

These microorganisms have developed some defense systems so they could establish a microbial ecosystem, with three of these systems deemed essential for biofilm formation and development of caries: the capacity of 1) adhering to the tooth surface, 2) producing acids and 3) withstanding this environment without damage [21]. Regarding the adhesion process, three major groups of antigens (Ags) associated with the surface of these microorganisms participate in the process of adhesion and accumulation of *S. mutans* biofilm: the adhesin antigen I/II (Ag I/II), glycosyltransferases (GTFs) and glucan-binding proteins (GBP) [22].

The glycosyltransferases produced by *S. mutans* are able to synthesize extracellular (ECPs) and intracellular (ICPs) polysaccharides from sucrose from the diet. In the absence of carbohydrates, these ICPs are metabolized to produce energy. The ECPs allow the aggregation of *S. mutans* to other oral streptococci, which seems to occur through interaction with glucan-binding proteins associated with cell surface. Four Gtfs have been identified in *S. mutans*, GtfA, GtfB, GtfC and GtfD. Some of these proteins may be secreted or attached to cell surfaces (GtfA, GtfB and GtfD) or covalently bind to the cell wall (GtfC) [22].

The *S. mutans* also have a number of sugar transport systems, including high-affinity phosphoenolpyruvate-phosphotransferase systems (PEP-PTS), capable of capturing sugar when present in low concentrations in the oral environment. This property makes *S. mutans* an extremely resistant bacteria, able to adapt to environments scarce in carbohydrates [1].

### 3. Caries Control and Search for New Antimicrobials

Currently, the best means of preventing the initiation and controlling caries progression and, consequently the loss of hard dental tissue, is still the use of mechanical forms (toothbrushes and dental floss) to disrupt the biofilm of the dental surfaces and chemical substances (mouthwash and toothpaste) to kill the bacteria embedded in the biofilm [23] array.

Effective antimicrobials against microorganisms responsible for development of caries can play a significant role in disease prevention [24]. However, they are not prescribed and used on a large scale for this purpose at risk of developing adverse effects, selecting bacteria resistant to certain antibiotics and causing teeth staining [25].

Attention in recent years have turned to research on natural antimicrobials that may be effective against oral bacteria, but without being detrimental to the host [26]. Some studies conducted trials to evaluate the antimicrobial activity of extracts from various plants against pathogens related to caries aimed at developing an effective natural antimicrobial [27] [28].

Natural products with antibiofilm effect [29] are also a promising line of research. In addition, nanoscale systems, due to their adjustable size, that increase interactions with biological systems at molecular level, also contributed to the improvement of innovative therapies related to the biofilm diseases [30] [31].

Another approach considered effective in controlling dental caries would be the change in diet, eliminating refined sugars (sucrose and fructose) of food and promoting the consumption of protein, complex carbohydrates and lipids [23]. However, it is not expected to occur easily cultural changes in the diet worldwide to prevent tooth decay. Thus, innovative approaches to the treatment of dental caries are required [32].

Among the possible new approaches, an interesting one would be blocking or impairing the Quorum Sensing system, a communication system of microorganisms based on the emission of stimuli and responses dependent on population density. Many members of the genus *Streptococcus* that cause infections in humans use this system [33]. Other approaches would be blocking the ability of *S. mutans* to produce acid and survive in this extreme environment of acidity and/or its ability to interact with other cells to form biofilms [34].

Some research has sought a way to prevent tooth decay with the aid of immunology and host response in the search for a possible anti-caries vaccine [10] [22]. Furthermore, many studies on the molecular level have also been conducted in order to inhibit cell growth of *S. mutans* [35] [36].

The metabolism of *S. mutans* has also been extensively studied, mainly biochemical and physiological adaptations that allow this microorganism to produce acids and survive at low pH [37] [38]. Research suggests that the ability to tolerate the acid is due in part to a membrane-bound protein called F-ATPase that extrudes proton H<sup>+</sup> from the cell, preventing decreased intracellular pH and consequent damage to sensitive enzymes to the acid, DNA and various proteins [39] [40].

The development of bacterial resistance in a large number of microorganisms has become the least effective

current antimicrobial, which justifies the need for design and development of new drugs. Some essential bacterial proteins have been identified as potential drug targets because they are essential for survival of microbial cell, highly conserved in a spectrum of clinically relevant, missing, or radically different species in humans, besides having their biochemistry elucidated [41]. In the case of microorganisms embedded in oral biofilms, the most appropriate would keep pathogenic *S. mutans* living in the biofilm, but less virulent [42].

Various strategies have been used to predict drug targets, among the main ones are highlighted: 1) those that seek to analyze the targets of known therapeutic drugs, based on the level of sequence homology or domains in proteomes [43] [44], in search of potential new drug targets in protein families, and 2) those based on the 3D structures of binding sites on protein surfaces, with the aim of identifying those sites which can bind with reasonable affinity to certain compounds [45] [46]. This latter method is limited due to the little availability of 3D structures, besides it can not be applied to genomic scale.

The data quality on drug targets restricts the predictive power of the models, so that multiple versions of lists of drug targets have been proposed [44] [47]-[49] based on different criteria for their selection. Possible reasons for many versions include: the definition of the drug target is difficult and arbitrary [50]; poor understanding of the drug pharmacology hinders the assignment of each drug to a target; some targets are multimeric protein complexes where the same subunits can come unite in different combinations to form different targets [44] [48].

The wrong selection of targets in preclinical research stages may result in the failure of the newfound drug in the market. Thus, prediction of proteins as drug targets can be used to direct novel therapies, reducing the experimental time and cost during development of drugs and making more reliable the disease treatment [16].

Still, the steps of discovery, development and registration of a drug requires time and investment, being of great interest to identify as early as possible the agents that are probably less promising, allowing a concentrated effort into compounds that are more likely to hit the market. The discovery and planning of new drugs within the area of Rational Drug Design Based on Structure (RDBS), the understanding of molecular mechanisms of receptor-ligand recognition, besides being one of the major challenges in molecular biology, it is one of the central aspects for its success [51].

#### 4. Potential Microbial Targets and Strategic Targets in *S. mutans*

Recent advances in molecular biology technologies have significantly increased the ability for discovery of new antibacterial targets and quickly predict their spectrum and selectivity. Most bacterial targets evaluated to develop drugs include: quorum sensing biosynthesis; signal transduction systems of two components; cell division machinery; the shikimate pathway; biosynthesis of isoprenoid and biosynthesis of fatty acids [41].

The *Quorum Sensing* systems are also important determinants of morphology and communication when the bacteria grow as aggregates in biofilms [52]. When there is increased density of bacteria in biofilms, they respond by inducing or suppressing the expression of groups of genes. These *Quorum Sensing* systems play a critical role in the control of many metabolic processes in the cell, including bacterial virulence. For this reason, they are considered attractive targets for new antibacterial drugs [53].

The signal transduction systems of two components are the primary means to coordinate bacterial responses to environmental changes as well as in some plants, fungi, protozoa, archaea. These systems have an excellent target for drugs due to the 1) significant homology shared among different genera of bacteria, particularly those where amino acid residues are located close to the active sites, 2) bacteria use this system to regulate the expression of virulence factors required for their survival *in vivo*, and 3) bacteria contain many two-component systems, and at least one of them is important for *in vitro* growth [41].

The bacterium division machinery comprises seven or more essential proteins conserved in the majority of microorganisms. It is considered an attractive target due to its essential role in cell division of prokaryotes, its conservation in bacteria, its absence in the mitochondria of eukaryotes, its evolutionary distance of tubulin and its atomic structure and chemical activity known [41] [54].

Other bacterial target that can be used is the shikimic acid pathway (aromatic biosynthetic pathway), due to its preservation in bacteria, fungi, plants and some parasites, and absence in mammals. This pathway affects the conversion of two simple products of carbohydrate metabolism: phosphoenolpyruvate and erythrose 4-phosphate in chorismate, which is a precursor for biosynthesis of a variety of important aromatic metabolites. The enzymes of the shikimate pathway are an excellent target for the design of new antibacterial agents [55].

Isoprenoids are known to have an invaluable role in various biological processes such as cell wall biosynthe-



sis, electron transport, light capture in photosynthesis, membrane's lipid structure and signaling. Isopentenyl diphosphate (IPP) and its isomer, dimethylallyl diphosphate (DMAPP) act as a universal precursor for the biosynthesis of isoprenoids. IPP and DMAPP reactions are catalyzed by the enzyme isopentenyl diphosphate isomerase. The disruption of these processes by blocking of enzymes related to isoprenoid biosynthesis and catabolism is essential for the rational development of potential therapeutic targets [41].

The fatty acid synthesis (FAS), required for construction of membrane phospholipids in living organisms, comprises a repeating cycle of reactions involving condensation, reduction, dehydration and subsequent reduction of carbon-carbon bonds. More evolved eukaryotes perform these reactions through a multifunctional protein (type I pathway). Whereas in bacteria, plant chloroplasts and *P. falciparum*, each reaction is catalyzed by discrete enzymes (type II pathway), allowing selective inhibition [56]. Most of these enzymes are essential for bacterial viability, making it therefore targets for research for new antimicrobials.

Despite little knowledge about the expression of genes during biofilm formation of *Streptococcus mutans*, research has committed effort in comparing laboratory planktonic strains with those organized in biofilms [57]; however, there is little information about the differential gene expression in biofilm formation in clinical strains, since these strains can survive under severe conditions involving multiple bacterial agents, as seen in the oral cavity, leading to expression of several genes involved in biofilm formation. In contrast, laboratory strains may not require these same genes when cultured under mild and planktonic conditions and may lose the ability to express them [58].

Previous studies have indicated the role of sucrose and glucosyltransferases in the biofilm formation of *S. mutans* [59]. Other studies reported the existence of several genes associated with genetic competence [34], regulatory functions, combined with one or more genes, including *ccpA* and *brpA* [60] and *luxS* [61]. These genes have also been shown function as putative regulators of the two-component response system [34], which are involved in biofilm formation. DNA microarrays have been used to monitor the global expression profiles of genes in response to different stimuli [57], such as heat shock and other stresses [62], *Quorum Sensing* [63], anaerobic metabolism [64], sporulation [65] and biofilm formation [57].

Due to the complete genome sequencing of *S. mutans* UA159 [66], genes associated with virulence and/or survival have been identified, and their protein expression considered ideal microbial targets, preferably important proteins for bacteria virulence (exo-enzymes, proteases, other extracellular and surface proteins); avoiding the performance on targets related to this microorganism survival (transport mechanisms, cell division, cell wall synthesis, metabolic pathways, and regulation and signaling in mobile genetic elements). The goal would be to keep the bacteria alive in the biofilm, but less virulent [67].

In *S. mutans* organized in biofilms, proteins related to its metabolism and important for its survival would not be good targets once they would cause cell death, favoring the growth of other perhaps more pathogenic. Future antimicrobial agents that will have a chance of success would be those with seemingly conflicting requirements of maintaining the biofilm in compatible levels with the oral health, but without disrupting the beneficial properties of the resident oral microbiota [67].

One of the biggest challenges for development of modern drugs directed at resident microorganisms in biofilms is to keep the organism alive, but less virulent. This purpose would be possible by means of a probiotic approach, interference during the biofilm formation or disruption of bacterial communication networks [42].

The bacterial adaptation, while modifying the environmental conditions, occurs at different levels, including the multicellular level (cell aggregation and biofilm formation). These processes are modulated by several response regulators, and the distribution patterns of these regulators are generally conserved in the different microbial strains [68]. Thus, compounds that could interact with these response regulators are ideal candidate drugs to reduce the multi-species biofilm [69].

It has been observed that the inactivation of any component of the *Quorum Sensing* intercellular communication system seems to influence the early stages of biofilm formation [34]. These pathways can be selected as targets for controlling the cariogenic biofilms, so that the blocking of genes that encode protein components of this signaling system results in the formation of an abnormal biofilm [33]. The ability to prevent or confuse the *Quorum Sensing* system can block the expression of virulence genes and biofilm formation. However, this knowledge was not applied for clinical use so far [70].

The products of some genes of *Quorum Sensing* signaling system (*comAB*, *comX* and *comCDE*) are very important for communication of *S. mutans* in biofilm, so that the loss of these proteins can reduce biofilm formation. In this context, it was demonstrated by means of computer modeling techniques and molecular docking that

a derivative of quinic acid (quinic acid) can act as ComA inhibitor [71].

Some natural and synthetic molecular agents showed moderate efficacy against cariogenic bacteria, but no clinical trial was conducted. Overall, combined preclinical and clinical approaches to the rational design of drugs are rare. Since the targets of antimicrobial agents are protein binding sites, the protein structure is required for the rational design of drugs [72] [73]. The recent explosion of sequencing technology has made available the corresponding sequences for all genes of *S. mutans* and several other biofilm bacteria. Thus, the prediction of protein structures from its sequence presented a new opportunity for rational drug design with multi-targets in multi-species [73].

The computational drug design has greater chances of success when it has multiple targets in a microorganism. If a compound can inhibit multiple proteins, it is likely that it inhibits definitely at least one. The identification of multiple protein targets in *S. mutans* will allow the creation of useful pathways for development of new treatments for tooth decay pathways. Thus, despite being interesting the concept of having *S. mutans* as target, the multispecies therapy is essential, since other species present in the biofilm also contribute to the initiation and development of dental caries [73].

## 5. Computational Detection of Molecular Targets for Drug Development

Bacteria are single-celled organisms with a pretty small genome; however, they show marked variations in their cell architectures, metabolic properties and phenotypic characteristics. In order to show such diversity of phenotypic and ecological characteristics, the bacteria need to have extremely dynamic genomes, involving processes such as acquisitions, deletions and rearrangements of genes [74]. The ability of bacteria to accept and express genetic material transmitted not only by direct descent, but also through external sources, is one of the most prominent areas in recent times within the experimental molecular genetics and biotechnology [75].

The nucleotide sequences originated from other species of organisms that no antecedents are called genomic islands and may differ from the genome as a whole, because such genes may have their features in sequence, as the number of G + C, the use of synonymous codons, frequency of dinucleotides and use of amino acids that are beyond the pattern that genome has [76]. It is known that genomic islands may also be associated with tRNA genes and the so-called direct repetitions and even with mobile genetic elements such as transposons and integrase, besides the insertion sequences. Although the presence of all these features is required, a set of them can mean that there exist genes that originate in the event of horizontal transfer [76].

The horizontal transfers of genes can be studied using tools of bioinformatics based on independent- and dependent-homology methodologies. Detection of these genomic regions can collaborate in the study on the benefits of the presence of these regions to the holders of the various possible forms, such as regarding the emergence of new metabolic pathways, development of virulence, antibiotic resistance and providing the ability to colonize new environments and occupying other niches [77].

Researchers can use surveys about the genomic islands still to explain the pathogenicity of a particular microorganism. Furthermore, the development of drugs, vaccines and antibiotics by pharmaceutical companies is already influenced by the research of genes derived from horizontal transfer [78].

[79] made use of dependent homology methodology when searching proteins of unknown functions that could be the result of events of side gene transfer and could be involved in antibiotic resistance in *S. mutans*. Thus, 500 of the 1600 proteins of the organism were detected without any function described and one of them with very few homologs in the protein data banks already described, the SMU.440. From the studies on structural bioinformatics, once crystallized the protein and defined its three-dimensional structure, it was concluded that SMU.440 could be indeed involved in antibiotic resistance.

### 5.1. Bioinformatics Tools for Studies on Drug Development

In the work of [79] described above, although the *a priori* lack of protein function from its linear sequence, once determined experimentally the three-dimensional structure and studies on its structure, it was determined its important role in resistance to antibiotics.

The knowledge of the structures of macromolecular targets or ligand-receptor complexes allows the use of strategies for drug design based on the receptor structure (SBDD, *structure-based drug design*). In contrast, when the chosen target structure is not known, methods of drug design based on ligand structure (LBDD, *ligand-based drug design*) may be used, exploring the properties and characteristics of bioactive ligands series



[11] [12].

Methods based on strategies for drug design and receptor structure involve the need of using homology modeling that arises when one has to determine the structure of a protein of which only its sequence is known by using its alignment with a homologous protein from which the structure is known [80] or molecular docking, which is one of the major SBDD strategies, consisting of predicting the bioactive conformation of a small molecule (ligand) in the binding site of a target protein, followed by the assessment and classification of the binding mode proposed [81].

## 5.2. Drug Design Based on the Receiver Structure

There are two key points in molecular docking programs: the search for the “best” conformation resulting from the formation of the protein-ligand complex and the calculation of the energy free from this association, or its affinity constant [81].

The search algorithm should investigate the energy hyper surface seeking the global minimum free energy. To do so, the receiver is usually considered a rigid structure, and the search algorithm explores the different positions for the ligand in the active site region by using for that translational, rotational and conformational degrees of freedom (for flexible ligands) [82].

At the molecular docking, the ligand’s flexibility treatment is commonplace in current methods, and its performance drops drastically with increased conformational degrees of freedom (ie, increased number of torsional chemical bonds) of the ligand [83]. Some methods have tried to add flexibility to the receiver taking into account the torsional degrees of freedom of the amino acids side chains in the protein active site [84], or considering various conformations of protein obtained from different crystal structures (*i.e.* where the same protein is complexed with different ligands) or obtained from molecular dynamics calculations [85] [86].

Simulations of molecular dynamics (MD) provide information about the molecular motion, thus enabling the detection of biologically relevant movements, during the process of molecular docking or even as in the active site of a protein. It is a technique commonly used after the determination of the three-dimensional structure of molecules by molecular modeling. Thus, it is expected an adequation of the molecules system to the simulated environment in which it is inserted, seeking the position of atoms in a minimum amount of free energy [87].

Molecular dynamics can be carried out by Molecular Mechanics that is based on classical mechanics and considers the interactions among the cores of molecules. Or it can be performed through the use of Quantum Mechanics. In this case, the *ab initio* and/or semi-empirical methods are used. The choice between these approaches depends on the properties that one aims at evaluating, the desired accuracy and computational capacity available for calculations [87].

Methods using classical force fields (also known as molecular mechanics methods) ignore the movements of electrons and calculate the energy of the system as a function only of nuclei positions. Molecular mechanics is therefore normally used for performing calculations in systems containing a large number of atoms [88].

In some cases, force fields can provide answers that are as accurate as those obtained by performing high-level quantum mechanics calculations at a greatly reduced computational time. However, molecular mechanics cannot obviously determine properties that depend on the electron distribution in a molecule. The classical force fields are based on simple models of interactions within a system with contributions from the removal of bonds, opening and closing angles and rotations of simple bonds [88].

The force fields commonly used in molecular docking programs and molecular dynamics/mechanics are GROMOS [89], AMBER [90] [91], CHARMM [92] and MMFF94 [93]-[97] and used in molecular dynamics programs like GROMACS [98], CHARMM [99] and AMBER [87]. The Gaussian [100] GAMESS [101] and SPARTAN [102] programs perform quantum mechanical calculations, commonly suitable for small systems.

There are also programs that allow the combination of methods of quantum mechanics and molecular mechanics (QM/MM), and the active site or binding site is treated by an *ab initio* density functional theory and semi-empirical potentials, while the rest of the system is calculated using force fields in molecular mechanics [87]. Typically, methods that use molecular mechanics already offer the possibility to also use this combination of methods.

## 5.3. Drug Design Based on the Ligand Structure

Modern strategies used in the rational design of new compounds-prototypes are based on the physiological ap-

proach. This approach enables to design a chemical structure of the new molecule based on the previous definition of therapeutic action mechanism, *i.e.* the biomacromolecule to which the new drug will bind to change a particular biochemical pathway.

Knowing the three-dimensional molecular structure of the chosen therapeutic target, particularly the region responsible for chemical interaction, it is possible to identify a compound capable of binding to that active site and changing its properties by using computational molecular modeling techniques. The rational design of this molecule is carried out by using molecular simplification techniques (reduction of a compound structural complexity), molecular hybridization (obtaining new chemical structure from parts of two or more different bioactive substances) and bioisosterism (replacement of structure parts of a bioactive substance by another or others with similar electronic behavior), besides the use of chemical intuition of an experienced researcher to propose new changes.

A new computational approach has been mainly used by industrial research laboratories, where there is the search for compounds prototypes in databases containing the description of a wide variety of natural and synthetic compounds, pure or combined, for performing bioassays. The goal is to discover active compounds prototypes that can, when assessed experimentally, present a micromolar receptor-ligand affinity ( $\mu\text{M}$ ), *i.e.* active at a concentration of one millionth of a mole per liter, or nanomolar (nM), active in a concentration of one billionth of a mole per liter.

In addition to this filtering methodology *in silico*, this search is carried out by applying the “Rule of Five”, where molecules that violate one or more rules can be eliminated; a set of empirical rules and decision-based systems are also applied. This filtering can be used as positive and negative selection and it has been increasingly complemented by algorithms that predict physicochemical properties, ability to penetrate the blood-brain barrier, low toxicity, among others [103].

Still, for being performed *in vivo* filtering, where the exclusion of certain molecules happens after applied some experimental tests such as cytotoxicity or certain cytokinetic properties [104]. After the discovery of compound-prototype desired, a congener series (similar compounds with small structural variations) should be built and evaluated pharmacologically to guide the optimization of the future drug. This step is critical because it represents the pursuit of better characterization of the therapeutic efficacy of the drug candidate.

Finally, it should be then performed step tests for the validation of the selected ligand, determining whether this is indeed the ideal molecule for obtaining the expected result with the evaluation of ligand’s pharmacokinetic properties related to its path in the body since its absorption, distribution and elimination.

## 6. Conclusions

Despite dental caries being a simple prevention disease through frequent oral hygiene habits, its high prevalence in the global population still indicates the need for developing effective preventive methods to control the disease. Since *Streptococcus mutans* is considered as the main etiological agent of dental caries, more studies are needed to better understand its functioning and performance and, its virulence mechanisms in biofilm formation, in order to find new alternatives against this microorganism in the ear future and therefore, against this pathology.

Chemical control of biofilm by reducing the virulence or even death of these micro-organisms seems an interesting alternative in this endeavor; but it is important to note that the use of broad-spectrum antimicrobials results in the risk of inhibiting or killing beneficial bacteria and modifying the normal microbiota, which may create clinical problems such as the development of opportunistic pathogens, especially in dental biofilm. Therefore, it is worth mentioning that all efforts should be directed towards the appropriate use of these bacterial agents.

In order to better understand and simulate these mechanisms, computational methodologies have become crucial components of many programs used in pharmaceutical production. Thus, this computational approach will allow the testing to expedite the discovery and use of new chemicals that may decrease virulence of cariogenic microorganisms present in dental biofilms.

## References

- [1] Xu, X., Zhou, X.D. and Wu, C.D. (2011) The Tea Catechin Epigallocatechin Gallate Suppresses Cariogenic Factors of *Streptococcus mutans*. *Antimicrob Agents Chemother*, **55**, 1229-1236. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01016-10>

- [2] Smith, D.J. and Taubman, M.A. (1996) Experimental Immunization of Rats with a *Streptococcus Mutans* 59 Kda Glucan Binding Protein Protects against Dental Caries. *Infection and Immunity*, **64**,3069-3073.
- [3] Fejerskov, O. and Kidd, E., Eds. (2003) Dental Caries: The Disease and Its Clinical Management. Blackwell Monksgaard, Copenhagen.
- [4] Loesche, W.J. (1986) Role of *Streptococcus mutans* in Human Dental Decay. *Microbiology Reviews*, **50**, 353-380.
- [5] Lewis, K. (2012) Persister Cells: Molecular Mechanisms Related to Antibiotic Tolerance. *Handbook of Experimental Pharmacology*, **211**, 121-133. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-28951-4\\_8](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-28951-4_8)
- [6] Zeshi, Z., Nadezhina, E. and Wilkinson, K.J. (2010) Quantifying Diffusion in a Biofilm of *Streptococcus mutans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **55**, 1075.
- [7] Featherstone, J.D.B. (1999) Prevention and Reversal of Dental Caries: Role of Low Level Fluoride. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, **27**, 31-40. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0528.1999.tb01989.x>
- [8] Levine, M., Owen, W.L. and Avery, K.T. (2005) Anybody Response to *Actinomyces* Antigen and Dental Caries Experience: Implications for Caries Susceptibility. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **12**, 764-769.
- [9] Balakrishnan, M., Simmonds, R.S. and Tagg J. (2000) Dental Caries Is a Preventable Infectious Disease. *Australian Dental Journal*, **45**, 235-245. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1834-7819.2000.tb00257.x>
- [10] Russel, M.W., Childers, N.K., Michalek, S.M., Smith, D.J. and Taubman, M.A. (2004) A Caries Vaccine? The State of the Science of Immunization against Dental Caries. *Caries Research*, **38**,230-235.
- [11] Guido, R.V.C. and Andricopulo, A.D. (2008) Modelagem Molecular de Fármacos. *Revista Processos Químicos*, **2**, 24-26. <http://www.rpqsenai.org.br/>
- [12] Andricopulo, A.D., Salum, L.B. and Abraham, D.J. (2009) Structure-Based Drug Design Strategies in Medicinal Chemistry. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **9**, 771-790. <http://dx.doi.org/10.2174/156802609789207127>
- [13] Marsh, P.D. (2004) Dental Plaque as a Microbial Biofilm. *Caries Research*, **38**, 204-211. <http://dx.doi.org/10.1159/000077756>
- [14] Marsh, P.D. (1994) Microbial Ecology of Dental Plaque and Its Significance in Health and Disease. *Advances in Dental Research*, **8**, 263-271.
- [15] Socransky, S.S. and Haffajee, A.D. (2002) Dental Biofilms: Difficult Therapeutic Targets. *Periodontology* 2000, **28**, 12-55. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0757.2002.280102.x>
- [16] Butcher, S.P. (2003) Target Discovery and Validation in the Post-Genomic era. *Neurochemical Research*, **28**, 367-371. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1022349805831>
- [17] Da Silva, A.C.B. (2010) Effect of Chlorhexidine on the Gene Expression of Glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* in Planktonic and Biofilm *in Vitro* Organized. Thesis PhD in Biotechnology Course of Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba.
- [18] Koo, H., Xiao, J., Klein, M.I. and Jeon, J.G. (2010) Exopolysaccharides Produced by *Streptococcus mutans* Glucosyltransferases Modulate the Establishment of Microcolonies within Multispecies Biofilms. *Journal of Bacteriology*, **192**, 3024-3032. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01649-09>
- [19] Romling, U. and Balsalobre, C. (2012) Biofilm Infections, Their Resilience to Therapy and Innovative Treatment Strategies. *Journal of Internal Medicine*, **272**, 541-561. <http://dx.doi.org/10.1111/joim.12004>
- [20] Babbour, E., Angaji, S.A. and Angaji, S.M. (2009) Antimicrobial Effects of Four Medicinal Plants on Dental Plaque. *Journal of Medicinal Plants Research*, **3**, 132-137.
- [21] Michalek, S.M. and Childers, N.K. (1990) Developmental and Outlook for Caries Vaccine. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, **1**, 37-54.
- [22] Robinette, R.A., Oli, M.W., McArthur, W.P. and Brady, L.J. (2011) A Therapeutic Anti-*Streptococcus mutans* Monoclonal Antibody Used in Humanpassive Protection Trials Influences the Adaptive Immune Response. *Vaccine*, **29**, 6292-6300. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.06.027>
- [23] Featherstone, J.D.B. (2000) The Science and Practice of Caries Prevention. *The Journal of the American Dental Association*, **131**, 887-899. <http://dx.doi.org/10.14219/jada.archive.2000.0307>
- [24] Kubo, I., Muroi, H. and Himejima, M. (1993) Antimicrobial Activity against *Streptococcus mutans* of Mate Tea Flavor Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **41**, 107-111. <http://dx.doi.org/10.1021/jf00025a023>
- [25] Tredwin, C.J., Scully, C. and Bagan-Sebastian, J.V. (2005) Drug-Induced Disorders of Teeth. *Journal of Dental Research*, **84**, 596-602. <http://dx.doi.org/10.1177/154405910508400703>
- [26] Singh, J., Kumar, A., Budhijaraja, S. and Hooda, A. (2007) Ethnomedicine: Use in Dental Caries. *Brazilian Journal of Oral Sciences*, **6**, 1308-1312.
- [27] Adonizio, A., Kong, K.F. and Mathee, K. (2008) Inhibition of Quorum Sensing-Controlled Virulence Factor Produc-

- tion in *Pseudomonas aeruginosa* by South Florida Plant Extracts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **52**, 198-203. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00612-07>
- [28] Hosseini, F., Adlgostar, A. and Sharifnia, F. (2013) Antibacterial Activity of *Pistacia atlantica* extracts on *Streptococcus mutans* Biofilm. *International Research Journal of Biological Sciences*, **2**, 1-7.
- [29] Al-Sohaibani, S. and Murugan, K. (2012) Anti-Biofilm Activity of *Salvadora persica* on Cariogenic Isolates of *Streptococcus mutans*: *In Vitro* and Molecular Docking Studies. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, **28**, 29-38.
- [30] Iannitelli, A., Grande, R., Di Stefano, A., Di Giulio, M., Sozio, P., Bessa, L.J., Laserra, S., Paoloni, C., Protasi, F. and Cellini, L. (2011) Potential Antibacterial Activity of Carvacrol-Loaded poly (DL-Lactide-co-Glycolide) (PLGA) Nanoparticles against Microbial Biofilm. *International Journal of Molecular Sciences*, **12**, 5039-5051. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms12085039>
- [31] Mahapatro, A. and Singh, D.K. (2011) Biodegradable Nanoparticles Are Excellent Vehicle for Site Directed *in Vivo* Delivery of Drugs and Vaccines. *Journal of Nanobiotechnology*, **9**, 55. <http://dx.doi.org/10.1186/1477-3155-9-55>
- [32] Milgrom, P., Zero, D.T. and Tanzer, J.M. (2009) An Examination of the Advances in Science and Technology of Prevention of Tooth Decay in Young Children since the Surgeon General's Report on Oral Health. *Academic Pediatrics*, **9**, 404-409. <http://dx.doi.org/10.1016/j.acap.2009.09.001>
- [33] Cvitkovitch, D.G., Li, Y.H. and Ellen, R.P. (2003) Quorum Sensing and Biofilm Formation in Streptococcal Infections. *Journal of Clinical Investigation*, **112**, 1626-1632. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI200320430>
- [34] Li, Y.H., Tang, N., Aspiras, M.B., Lau, P.C., Lee, J.H., Ellen, R.P. and Cvitkovitch, D.G. (2002) A Quorum-Sensing Signaling System Essential for Genetic Competence in *Streptococcus mutans* Is Involved in Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology*, **184**, 2699-2708. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.184.10.2699-2708.2002>
- [35] Liu, C., Worthington, R.J., Melander, C. and Wu, H. (2011) A New Small Molecule Specifically Inhibits the Cariogenic Bacterium *Streptococcus mutans* in Multispecies Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **55**, 2679-2687. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01496-10>
- [36] Smith, D.J., King, W.F., Barnes, L.A., Peacock, Z. and Taubman, M.A. (2003) Immunogenicity and Protective Immunity Induced by Synthetic Peptides Associated with Putative Immunodominant Regions of *Streptococcus mutans* Glucan-Binding Protein B. *Infection and Immunity*, **71**, 1179-1184. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.71.3.1179-1184.2003>
- [37] Len, A.C.L., Harty, D.W.S. and Jacques, N.A. (2004) Proteome Analysis of *Streptococcus mutans* Metabolic Phenotype during Acid Tolerance. *Microbiology*, **150**, 1353-1366. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.26888-0>
- [38] Wang, P., Song, P., Mingming, J. and Guoping, Z. (2013) Isocitrate Dehydrogenase from *Streptococcus mutans*: Biochemical Properties and Evaluation of a Putative Phosphorylation Site at Ser102. *PloS ONE*, **8**, e58918. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0058918>
- [39] Quivey, R.G., Kuhnert, W. and Hahn, K. (2011) Genetics of Acid Adaptation in Oral Streptococci. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, **12**, 301-314. <http://dx.doi.org/10.1177/10454411010120040201>
- [40] Dashper, S.G. and Reynolds, E.C. (1992) pH Regulation by *Streptococcus mutans*. *Journal of Dental Research*, **71**, 1159-1165. <http://dx.doi.org/10.1177/00220345920710050601>
- [41] Amer, F.A., El-Behedy, E.M. and Mohtady, H.A. (2008) New Targets for Antibacterial Agents. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, **3**, 46-57.
- [42] Wade, W.G. (2010) New Aspects and New Concepts of Maintaining "Microbiological" Health. *Journal of Dentistry*, **38**, S21-S25. [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-5712\(10\)70007-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-5712(10)70007-5)
- [43] Hopkins, A.L. and Groom, C.R. (2002) The Druggable Genome. *Nature Reviews Drug Discovery*, **1**, 727-730. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd892>
- [44] Russ, A.P. and Lampel, S. (2005) The Druggable Genome: An Update. *Drug Discovery Today*, **10**, 1607-1610. [http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03666-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03666-4)
- [45] An, J., Totrov, M. and Abagyan, R. (2004) Comprehensive Identification of "Druggable" Protein Ligand Binding Sites. *Genome Informatics*, **15**, 31-41.
- [46] Hajduk, P.J., Huth, J.R. and Tse, C. (2005) Predicting Protein Druggability. *Drug Discovery Today*, **10**, 1675-1682. [http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03624-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03624-X)
- [47] Drews, J. (2000) Drug Discovery: A Historical Perspective. *Science*, **287**, 1960-1964. <http://dx.doi.org/10.1126/science.287.5460.1960>
- [48] Overington, J.P., Al-Lazikani, B. and Hopkins, A.L. (2006) How Many Drug Targets Are There? *Nature Reviews Drug Discovery*, **5**, 993-996. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2199>
- [49] Betz, U.A. (2005) How Many Genomics Targets Can a Portfolio Afford? *Drug Discovery Today*, **10**, 1057-1063. [http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03498-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03498-7)



- [50] Imming, P., Sinning, C. and Meyer, A. (2006) Drugs, Their Targets and the Nature and Number of Drug Targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, **5**, 821-834. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2132>
- [51] De Magalhães, C.S. (2006) Algoritmos Genéticos para o Problema de Docking Proteína-Ligante. Tese de Doutorado do Curso de Modelagem Computacional do Laboratório Nacional de Computação Científica, Petrópolis, Rio de Janeiro.
- [52] Vuong, C., Gerke, C., Somerville, G.A., Fischer, E.R. and Otto, M. (2003) Quorum-Sensing Control of Biofilm Factors in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Infectious Diseases*, **188**, 706-718. <http://dx.doi.org/10.1086/377239>
- [53] Miller, M.B. and Bassler, B.L. (2001) Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, **55**, 165-199. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.165>
- [54] Stokes, N.R., Sievers, J., Barker, S., Bennett, J.M., Brown, D.R., Collins, I., Errington, V.M., Foulger, D., Hall, M., Halsey, R., Johnson, H., Rose, V., Thomaidis, H.B., Haydon, D.J., Czaplewski, L.G. and Errington, J. (2005) Novel Inhibitors of Bacterial Cytokinesis Identified by a Cell-Based Antibiotic Screening Assay. *Journal of Biological Chemistry*, **48**, 39709-39715. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M506741200>
- [55] Daughery, M., Vonstein, V., Overbeek, R. and Oserman, A. (2001) Archaeal Shikimate Kinase, a New Member of the GHMP-Kinase Family. *Journal of Bacteriology*, **183**, 292-300. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.1.292-300.2001>
- [56] Zhang, Y.M., White, S.W. and Rock, C.O. (2006) Inhibiting Bacterial Fatty Acid Synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 17541-17544. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R600004200>
- [57] Whiteley, M., Bangera, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S. and Greenberg, E.P. (2001) Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Nature*, **413**, 860-864. <http://dx.doi.org/10.1038/35101627>
- [58] Motegi, M., Takagi, Y., Yonezawa, H., Hanada, N., Terajima, J., Watanabe, H. and Senpuku, H. (2006) Assessment of Genes Associated with *Streptococcus mutans* Biofilm Morphology. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 6277-6287. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00614-06>
- [59] Yamashita, Y., Bowen, W.H., Burne, R.A. and Kuramitsu, H.K. (1993) Role of the *Streptococcus mutans* *gtf* Genes in Caries Induction in the Specific-Pathogen-Free Rat Model. *Infection and Immunity*, **61**, 3811-3817.
- [60] Wen, Z.T. and Burne, R.A. (2002) Functional Genomics Approach to Identifying Genes Required for Biofilm Development by *Streptococcus mutans*. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 1196-1203. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.3.1196-1203.2002>
- [61] Merritt, J., Qi, F., Goodman, S.D., Anderson, M.H. and Shi, W. (2003) Mutation of *luxS* Affects Biofilm Formation in *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity*, **71**, 1972-1979. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.71.4.1972-1979.2003>
- [62] Helmann, J.D., Wu, M.F.W., Kobel, P.A., Gamo, F.J., Wilson, M., Morshedi, M.M., Navre, M. and Paddon, C. (2001) Global Transcriptional Response of *Bacillus subtilis* to Heat Shock. *Journal of Bacteriology*, **183**, 7318-7328. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.24.7318-7328.2001>
- [63] DeLisa, M.P., Wu, C.F., Wang, L., Valdes, J.J. and Bentley, W.E. (2001) DNA Microarray-Based Identification of Genes Controlled by Autoinducer 2-Stimulated Quorum Sensing in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **183**, 5239-5247. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.18.5239-5247.2001>
- [64] Ye, R.W., Tao, W., Bedzyk, L., Young, T., Chen, M. and Li, L. (2000) Global Gene Expression Profiles of *Bacillus subtilis* Grown under Anaerobic Conditions. *Journal of Bacteriology*, **182**, 4458-4465. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.182.16.4458-4465.2000>
- [65] Fawcett, P., Eichenberger, P., Losick, R. and Youngman, P. (2000) The Transcriptional Profile of Early to Middle Sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 8063-8068. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.140209597>
- [66] Ajdic, D., McShan, W.M., McLaughlin, R.E., Savić, G., Chang, J., Carson, M.B., Primeaux, C., Tian, R.Y., Kenton, S., Jia, H.G., Lin, S.P., Qian, Y.D., Li, S.L., Zhu, H., Najar, F., Lai, H.S., White, J. and Roe, B.A. (2002) Genome Sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a Cariogenic Dental Pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 14434-14439. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.172501299>
- [67] Marsh, P.D. (2010) Controlling the Oral Biofilm with Antimicrobials. *Journal of Dentistry*, **38**, S11-S15. [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-5712\(10\)70005-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-5712(10)70005-1)
- [68] Galperin, M.Y. (2010) Diversity of Structure and Function of Response Regulator Output Domains. *Current Opinion in Microbiology*, **13**, 150-159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.005>
- [69] Al-Sohaibani, S. and Murugan, K. (2012) Anti-Biofilm Activity of *Salvadora persica* on Cariogenic Isolates of *Streptococcus mutans*: *In Vitro* and Molecular Docking Studies. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, **28**, 29-38.
- [70] Cooper, R. and Okhiria, O. (2006) Biofilms, Wound Infection and the Issue of Control. *Wounds*, **2**, 48-57.
- [71] Kumar, C., *et al.* (2013) An *in Silico* Study of Quinic Acid Derivatives as Inhibitors of Com A, the Quorum Sensing

- Protein of *Streptococcus mutans* Responsible for the Pathogenesis in Dental Caries. *International Journal of Biotechnology and Allied Fields*, **1**, 76-84. <http://www.ijbaf.com/>
- [72] Agüero, F., Al-Lazikani, B., Aslett, M., Berriman, M., Buckner, F.S., Campbell, R.K., Carmona, S., Carruthers, I.M., Edith Chan, A.W., Chen, F., Crowther, G.J., Doyle, M.A., Hertz-Fowler, C., Hopkins, A.L., McAllister, G., Nwaka, S., Overington, J.P., Pain, A., Paolini, G.V., Pieper, U., Ralph, S.A., Riechers, A., Roos, D.S., Sali, A., Shanmugam, D., Suzuki, T., Van Voorhis, W.C. and Verlinde, C.L.M.J. (2008) Genomic-Scale Prioritization of Drug Targets: The TDR Targets Database. *Nature Reviews Drug Discovery*, **7**, 900-907. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2684>
- [73] Horst, J.A., Laurenzi, A., Bernard, B. and Samudrala, R. (2012) Computational Multitarget Drug Discovery. In: Peters, J.E., Ed., *Polypharmacology*, John Wiley and Sons Publishing Co., Hoboken, 236-302.
- [74] Dutta, C. and Pan, A. (2002) Horizontal Gene Transfer and Bacterial Diversity. *Journal of Biosciences*, **27**, 27-33. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02703681>
- [75] Skippington, E. and Ragan, M.A. (2011) Lateral Genetic Transfer and the Construction of Genetic Exchange Communities. *FEMS Microbiology Reviews*, **35**, 707-735. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00261.x>
- [76] Langille, M.G., Hsiao, W.W. and Brinkman, F.S. (2010) Detecting Genomic Islands Using Bioinformatics Approaches. *Nature Reviews Microbiology*, **8**, 373-382. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2350>
- [77] Gogarten, J.P., Doolittle, W.F. and Lawrence, J.G. (2002) Prokaryotic Evolution in Light of Gene Transfer. *Molecular Biology and Evolution*, **19**, 2226-2238. <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004046>
- [78] Hasan, M.S., Liu, Q., Wang, H., Fazekas, J., Chen, B. and Che, D. (2012) GIST: Genomic Island Suite of Tools for Predicting Genomic Islands in Genomic Sequences. *Bioinformatics*, **8**, 203-205. <http://dx.doi.org/10.6026/97320630008203>
- [79] Nan, J., Brostromer, E., Liu, X., Kristensen, O. and Su, X. (2009) Bioinformatics and Structural Characterization of a Hypothetical Protein from *Streptococcus mutans*: Implication of Antibiotic Resistance. *PLoS ONE*, **4**, e7245. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0007245>
- [80] Venselaar, H., Joosten, R.P., Vrolijk, B., Baakman, C.A., Hekkelman, M.L., Krieger, E. and Vriend, G. (2010) Homology Modelling and Spectroscopy, a Never-Ending Love Story. *European Biophysics Journal*, **39**, 551-563. <http://dx.doi.org/10.1007/s00249-009-0531-0>
- [81] Aqvist, J. and Marelis, J. (2001) The Linear Interaction Energy Method for Predicting Ligand Binding Free Energies. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, **4**, 613-626. <http://dx.doi.org/10.2174/1386207013330661>
- [82] Brooijmans, N. and Kuntz, I.D. (2003) Molecular Recognition and Docking Algorithms. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, **32**, 335-373. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.142532>
- [83] Robertson, J.G. (2005) Mechanistic Basis of Enzyme-Targeted Drugs. *Biochemistry*, **44**, 5561-5571. <http://dx.doi.org/10.1021/bi050247e>
- [84] Leach, A.R., Shoichet, B.K. and Peishoff, C.E. (2006) Docking and Scoring-Perspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, **49**, 5851-5855. <http://dx.doi.org/10.1021/jm060999m>
- [85] Apostolakis, J. and Caflisch, A. (1999) Computational Ligand Design. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, **2**, 91-104.
- [86] Trosset, J.Y. and Scheraga, H.A. (1998) Reaching the Global Minimum in Docking Simulations: A Monte Carlo Energy Minimization Approach Using Bezier Splines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 8011-8015. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.14.8011>
- [87] Case, D.A., Cheatham III, T.E., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz Jr., K.M., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B. and Woods, R.J. (2005) The Amber Biomolecular Simulation Programs. *Journal of Computational Chemistry*, **26**, 1668-1688. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20290>
- [88] Leach, A.R. (2001) *Molecular Modeling: Principles and Applications*. 2nd Edition, Pearson Education Ltda, Upper Saddle River.
- [89] van Gunsteren, W.F. and Berendsen, H.J.C. (1987) GROMOS-87 Manual. Biomos BV Nijenborgh 4, 9747 AG, Groningen.
- [90] Weiner, S.J., Kollman, P.A., Case, D.A., Chandra Singh, U., Ghio, C., Alagona, G., Profeta, S. and Weiner, P. (1984) A New Force Field for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic Acids and Proteins. *Journal of American Chemical Society*, **106**, 765-784. <http://dx.doi.org/10.1021/ja00315a051>
- [91] Cornell, W.D., Cieplak, P., Bayly, C.I., Gould, I.R., Merz Jr., K.M., Ferguson, D.M., Spellmeyer, D.C., Fox, T., Caldwell, J.W. and Kollman, P.A. (1995) A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids and Organic Molecules. *Journal of the American Chemical Society*, **117**, 5179-5197. <http://dx.doi.org/10.1021/ja00124a002>
- [92] Brooks, B.R., Brucoreli, R.E., Olafson, B.D., States, D.J., Swaminathan, S. and Karplus, M. (1983) CHARMM: A

- Program for Macromolecular Energy Minimization and Dynamics Calculation. *Journal of Computational Chemistry*, **4**, 187-217. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.540040211>
- [93] Halgren, T.A. (1996) Merck Molecular Force Field. I. Basis, Form, Scope, Parameterization, and Performance of MMFF94. *Journal of Computational Chemistry*, **17**, 490-519. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199604\)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P)
- [94] Halgren T.A. (1996) Merck Molecular Force Field. II. MMFF94 van der Waals and Electrostatic Parameters for Intermolecular Interactions. *Journal of Computational Chemistry*, **17**, 520-552. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199604\)17:5/6<520::AID-JCC2>3.0.CO;2-W](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<520::AID-JCC2>3.0.CO;2-W)
- [95] Halgren, T.A. (1996) Merck Molecular Force Field. III. Molecular Geometries and Vibrational Frequencies for MMFF94. *Journal of Computational Chemistry*, **17**, 553-586. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199604\)17:5/6<553::AID-JCC3>3.0.CO;2-T](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<553::AID-JCC3>3.0.CO;2-T)
- [96] Halgren, T.A. (1996) Merck Molecular Force Field. IV. Conformational Energies and Geometries for MMFF94. *Journal of Computational Chemistry*, **17**, 587-615. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199604\)17:5/6<587::AID-JCC4>3.0.CO;2-Q](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<587::AID-JCC4>3.0.CO;2-Q)
- [97] Halgren, T.A. (1996) Merck Molecular Force Field. V. Extension of MMFF94 Using Experimental Data, Additional Computational Data and Empirical Rules. *Journal of Computational Chemistry*, **17**, 616-641. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199604\)17:5/6<616::AID-JCC5>3.0.CO;2-X](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<616::AID-JCC5>3.0.CO;2-X)
- [98] Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A.E. and Berendsen, H.J. (2005) GROMACS: Fast, Flexible, and Free. *Journal of Computational Chemistry*, **26**, 1701-1718. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20291>
- [99] Brooks, B.R., Brooks III, C.L., Mackerell Jr., A.D., Nilsson, L., Petrella, R.J., Roux, B., Won, Y., Archontis, G., Bartels, C., Boresch, S., Caflisch, A., Caves, L., Cui, Q., Dinner, A.R., Feig, M., Fischer, S., Gao, J., Hodoscek, M., Im, W. and Kuczer, K. (2009) CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. *Journal of Computational Chemistry*, **30**, 1545-1614. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21287>
- [100] Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., *et al.* (1998) Gaussian 98. Gaussian Inc., Pittsburgh.
- [101] Schmidt, M.W., Baldridge, K.K., Boatz, J.A., Elbert, S.T., Gordon, M.S., Jensen, J.H., Koseki, S., Matsunaga, N., Nguyen, K.A., Su, S.J., Windus, T.L., Dupuis, M. and Montgomery Jr., J.A. (1993) General Atomic and Molecular Electronic Structure System. *Journal of Computational Chemistry*, **14**, 1347-1363. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.540141112>
- [102] Deppmeier, B., Driesse, A.J., *et al.* (2000) Wavefunction Inc., Irvine.
- [103] Schneider, G. and Böhm, H.J. (2002) Virtual Screening and Fast Automated Docking Methods. *Drug Discovery Today*, **7**, 64-70. [http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446\(01\)02091-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446(01)02091-8)
- [104] Walum, E., Hedander, J. and Garberg, P. (2005) On the Relevance of Cytotoxicity Measurements, Barrier Passage Determinations and High Throughput Screening *in Vitro* to Select Potentially Hazardous Compounds in Large Sets of Chemicals. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **207**, 393-397.