

Este exemplar
foi devidamente corrigido
conforme resolução 0086/036/83
Biblioteca, 06/12/94

Alto Laurino J. Costa

NILSON JOSÉ MORAL

INTERAÇÃO ENTRE LECTINAS DE SEMENTE DE JACA
Artocarpus integrifolia E GLICOPROTEINAS SALIVARES QUE POSSUEM
AFINIDADE PELA HIDROXIAPATITA *IN VITRO*

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Grau de Mestre em Ciências, na Área de Biologia e Patologia Buco Dental.

PIRACICABA - SP

= 1993 =

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Orientador: Prof. Dr. CELSO PAULINO DA COSTA

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. JAIME APARECIDO CURY, pela valiosa colaboração durante a minha formação e execução deste trabalho e pelo exemplo de integridade científica.

Ao Prof. Dr. CELSO PAULINO DA COSTA, orientador deste trabalho, acima de tudo um grande amigo, a minha gratidão pela orientação também para a vida.

Ao Prof. Dr. OSLEI PAES DE ALMEIDA pelas importantes observações críticas.

Ao Prof. Dr. JOSÉ FRANCISCO HOFLING, pelo apoio e presteza.

A meus pais pelos sacrifícios de suas vidas pessoais para a formação deste filho e pelos exemplos de humildade, lealdade e união familiar.

A minha esposa KATIA pela compreensão, estímulo e companheirismo.

A WALDOMIRO VIEIRA FILHO e MARISA DE JESUS CARLOS SOARES, técnicos do Laboratório de Bioquímica Oral, pelo apoio e amizade.

Ao aluno REGINALDO B. GONÇALVES, pela colaboração.

A PREVLAB LABORATÓRIO CLÍNICO, pelo apoio na realização das imunoeletroforeses.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação, pela convivência.

A Sra. SUELI DUARTE DE OLIVEIRA SOLIANI, pela revisão da bibliografia.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, os meus agradecimentos.

A UMA FORÇA MAIOR QUE ME PERMITIU VIVER ESTE MOMENTO

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DA LITERATURA.	4
MATERIAIS E MÉTODOS.	26
RESULTADOS	31
DISCUSSÃO	39
CONCLUSÃO.	44
RESUMO	45
SUMMARY.	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1 - INTRODUÇÃO

A saliva é um fluido que tem como função básica a proteção dos tecidos orais contra microorganismos e fatores do meio ambiente. A maneira pela qual se dá esta proteção é extremamente complexa e envolve mecanismos físicos, químicos e biológicos, sendo estes últimos divididos em imunes e não imunes, segundo a sua natureza.

A IgA secretora apresenta importante papel na defesa contra microorganismos na cavidade oral, inibindo a capacidade desses microorganismos em aderir e colonizar determinada superfície (McNABBI e TOMASSI, 1981).

As proteínas salivares que compõe a chamada película adquirida tem por função a formação de um filme protetor entre a superfície do dente e o meio externo, agindo este, como uma barreira natural de permeabilidade seletiva, modulando a flora microbótica da boca, regulando o processo de mineralização/desmineralização e servindo como reservatório natural para íons protetores. As mucinas salivares, também presentes nessa película, tem importante papel na manutenção da integridade das superfícies mucosas e lisas (esmalte dental) da cavidade oral (SONJU, 1986).

A existência na natureza de substâncias que têm a propriedade de aglutinar hemácias é conhecida desde o século passado (STILLMARK, 1888). Essas substâncias, posteriormente identificadas como sendo glicoproteínas, foram denominadas de lectinas por

BOYD e SHAPLEIG (1954), recebendo, desde então, a atenção de muitos pesquisadores e, consequência deste fato, sabe-se hoje das mais diversas propriedades biológicas das lectinas, além da hemaglutinação, como por exemplo: aglutinação de leucócitos, bactérias, protozoários, atividade mitogênica para linfócitos e reação de precipitação de glicoproteínas humanas e de outros animais (SHARON e LIS, 1972). Outra aplicação prática das lectinas é a sua utilização em métodos histoquímicos e em métodos de purificação de proteínas como a cromatografia de afinidade (MIURA e cols. 1989).

Muitos alimentos contém lectinas e várias observações sugerem que estas interferem nas relações parasita-hospedeiro na boca. GIBBONS (1981), mostrou que extratos brutos de várias sementes, frutos e outros alimentos, bem como suas lectinas purificadas tem a habilidade de se ligarem a bactérias causando a sua aglutinação, fato este, extremamente importante na modulação do processo de colonização bacteriana das superfícies bucais.

A atividade biológica das lectinas se deve ao fato de que estas reconhecem e reagem especificamente com açúcares (YAMAMOTO e cols., 1991).

A lectina de semente de jaca (*Artocarpus integrifolia*) reage com resíduos de galactose (PEREIRA e cols., 1980), e precipita a IgA do soro e colostro (ROQUE-BARREIRA e CAMPOS NETO, 1984), reagindo também com várias outras glicoproteínas séricas e salivares (PAULINO DA COSTA, 1989).

O estudo da interação entre glicoproteínas salivares e lectinas, embora quase nulo na literatura pesquisada, é importante para o perfeito conhecimento dos eventos biológicos que ocorrem na cavidade oral.

No presente trabalho, se estudou a interação entre lectina de semente de jaca e glicoproteínas salivares que possuem afinidade pela hidroxiapatita *in vitro*.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - SALIVA

A saliva é um fluido complexo que contém um grande número de constituintes que têm por função promover meios efetivos de proteção das superfícies da cavidade oral contra microorganismos e a ação irritante de fatores do meio ambiente. A saliva protege os tecidos bucais contra dissecação, penetração, ulceração e fatores carcinogênicos, estimulando a reparação dos tecidos da mucosa oral. A principal função protetora da saliva está baseada na sua habilidade em manter um apropriado equilíbrio ecológico na boca, através de diversos mecanismos como, debridamento/lavagem, agregação e redução da aderência bacteriana utilizando-se de uma combinação de sistemas imunes e não-imunes e de uma atividade antibacteriana direta através de vários outros fatores que funcionam individual ou conjuntamente. A saliva também possui sistemas antifúngicos e antivirais; tem papel importante na manutenção do pH e auxilia a neutralização do refluxo ácido no esôfago (MANDEL, 1989).

2.1.1 - Aspectos históricos

Antes do final do século XVII e das publicações de Thomas Whanton e Niels Stenson, as glândulas salivares eram tidas

como emulsionadoras, e organelas excretoras com função de peneira para substâncias a serem eliminadas do sangue, especialmente os espíritos malignos do cérebro (GARRET, 1975). Segundo esse tipo de conceito, no início do século XIX era comum a prática de sangrias, expurgações e salivação como técnicas terapêuticas. Muitos médicos prescreviam doses maciças de certos medicamentos para causar salivação com o objetivo terapêutico de limpar o sistema. Foi uma era em que apenas os mais fortes sobreviveram à doença e às medidas terapêuticas, onde a medicina preventiva estava longe das mãos dos médicos e pesquisadores (MANDEL, 1987).

Até recentemente, muitos estudos foram dirigidos para as funções digestivas da saliva, sendo ela própria descrita como um dos sucos digestivos, composta de água, sais, amilase e mucinas (MANDEL, 1989).

No início da década de 60, com o surgimento de novas técnicas de coleta e novos métodos de eletroforese, tornou-se evidente com a observação de aproximadamente sessenta bandas proteicas, de que a saliva era um fluido extremamente complexo (MANDEL, 1977).

Estudos realizados nas duas últimas décadas tem salientado a importância da saliva em manter a integridade dos tecidos da cavidade oral (LEVINE, 1987; MANDEL, 1980).

2.1.2 - Composição da saliva

2.1.2.1 - Componentes inorgânicos

Dentre as suas várias funções, a saliva é basicamente um tampão. Os sistemas bicarbonato e fosfato controlam efetivamente o pH salivar, ficando as proteínas como coadjuvantes neste processo, o que a difere do sangue, onde o principal meio controlador do pH é formado por proteínas em solução. Além desta função tamponante, os componentes inorgânicos da saliva (eletrólitos) possuem importante papel nos fenômenos de remineralização (cálcio, fósforo, flúor), mecanismos de defesa do hospedeiro (iodo, cloro), ativação enzimática (cloro), manutenção da estabilidade enzimática (cálcio) entre outros. Os íons sódio e potássio, também presentes na saliva, possuem função idêntica a do plasma, ou seja, são íons osmorreguladores e participam do mecanismo de transporte ativo da membrana. Cálcio e fosfatos salivares desempenham papel importantíssimo na formação inicial da película adquirida. (ERICSON e MAKINEN, 1986).

2.1.2.2 - Proteínas salivares

O papel da saliva em manter a integridade dos tecidos orais pode ser atribuído em sua grande maioria às proteínas presentes neste fluido (LEVINE, 1987).

MANDEL, em 1989, em um artigo de revisão publicado no Journal of American Dental Association daquele ano, descreveu como estando presentes na saliva as seguintes proteínas: proteínas ricas em prolina, proteínas ricas em histidina, proteínas ricas em cisteína (Cistatina), proteínas ricas em tirosina (Estaterina), amilase, mucinas, peroxidase salivar, lactoferrina, lisozima, glicosiltransferases, IgA secretora, calicreina, fibronectina, fosfatases, esterases entre outras.

2.1.3 - Propriedades e Funções da saliva

2.1.3.1 - Viscosidade

Glicoproteínas de alto peso molecular contribuem para a viscosidade das secreções. Essa viscosidade é induzida pela intensa hidrofilia das mucinas salivares, cujos carboidratos reagem avidamente com moléculas de água (SONJU, 1986). Até hoje não está definido se a viscosidade da saliva está ou não relacionada com o desenvolvimento da cárie porém, THOMAS SIMONSSON e PER-OLOF GLANTZ (1988), sugerem que a velocidade individual de formação da placa dental pode estar parcialmente relacionada com propriedades coloidais e químicas das bactérias e da saliva.

2.1.3.2 - Lubrificação

A mais antiga função salivar conhecida é suprir, não só para cobrir os alimentos mas também todos os tecidos orais, de moléculas com função lubrificante (YOUNG e VAN LENNEP, 1978). Esse filme lubrificador facilita a passagem dos alimentos pelo trato digestivo e diminui a intensidade da fricção entre os dentes. É bem conhecido o papel das mucinas na função lubrificadora da saliva e, recentemente tem sido demonstrado que as proteínas ricas em prolina quando formam complexos com a albumina podem ser extremamente efetivas como lubrificantes (HATTON e cols., 1985).

2.1.3.3 - Manutenção da integridade das membranas mucosas

As mucinas salivares possuem várias propriedades que incluem baixa solubilidade, alta viscosidade, elasticidade e adesividade, que as habilitam a se concentrar nas superfícies mucosas promovendo barreiras efetivas contra a dissecação e agressão de fatores ambientais (TABAK e cols., 1982), tendo papel importante no controle da permeabilidade destas superfícies (ADAMS, 1975). Estudos em animais têm sugerido que esse filme mucoso ajuda a retardar a penetração e dissolução de agentes carcinogênicos lipotróficos (TABAK e cols., 1982). Entretanto não há dados comparáveis em humanos.

As proteínas salivares também têm efeito em outros órgãos como por exemplo, a hipótese postulada por WARNER e AZEM (1988), de que as proteínas ricas em prolina da saliva tem efeito anticarcinogênico à medida em que reagem com taninos da dieta. Alimentos ricos em tanino, especialmente o sorgo, são consumidos em grandes quantidades por populações com alto risco de cancer do esôfago.

2.1.3.4 - Reparação dos tecidos mucosos

HUTSON e cols. (1979), demonstraram em camundongos que o processo de cicatrização era bastante afetado pela saliva, após a verificação experimental de que nos animais em que foram removidas as glândulas submandibulares, o fechamento das feridas era mais lento que nos animais controle. STARKEY e ORTH (1977) descreveram a presença de um fator de crescimento epitelial na saliva de humanos, porém em níveis muito menores que em camundongos e outras espécies. O papel da saliva no processo de reparação dos tecidos orais ainda está por ser estabelecido.

2.1.3.5 - Manutenção do equilíbrio ecológico

A colonização das superfícies orais, em outras palavras, a aderência bacteriana, é ponto crítico para a sobrevivência de muitos microorganismos na cavidade oral e, a interferência

neste processo, a limpeza da boca através de meios mecânicos, imunológicos e não imunológicos é uma das maiores funções do sistema salivar de defesa. A habilidade da saliva em manter um apropriado balanço ecológico na cavidade oral, tem sido papel extremamente importante, em termos evolucionários, durante o longo período de existência humana antes do surgimento do controle da placa dental (MANDEL, 1989).

2.1.3.6 - Debridamento/lavagem

O fluxo salivar fisiológico, aumentado por ação muscular dos lábios e língua, efetivamente remove um grande número de bactérias potencialmente prejudiciais para os dentes e superfícies mucosas. Esse mecanismo de limpeza da boca é tido como natural e semelhante a outros como lacrimejamento, tosse, expectoração, etc. (MANDEL, 1989).

2.1.3.7 - Agregação bacteriana

Além dos meios físicos, a saliva interfere no processo de aderência bacteriana através de mecanismos mais específicos e que dependem de interações a nível molecular. A habilidade de inibir a aderência bacteriana é uma das mais importantes funções da IgA salivar (McNABB e TOMASI, 1981). WILLIAMS e GIBBONS (1972) demonstraram que cepas de *S.salivarius* que foram aglutinados por

IgA não aderiam mais às células do epitélio bucal humano. Os dados sobre os efeitos inibidores da IgA sobre a aderência bacteriana à hidroxiapatita *in vitro* são controversos (KILLIAN e cols., 1981), porém, existem muitas variáveis metodológicas interferindo significativamente na determinação segura e confiável da IgA salivar, levando a resultados discrepantes e conseqüentemente interpretações diferentes no que diz respeito aos níveis salivares de IgA e cárie dental (BRANDTZAEG, 1983). Entretanto, a validade deste mecanismo é comprovada em estudos de vacinação anti-cárie em roedores, nos quais o desenvolvimento de anticorpos IgA anti-*S. mutans* inibem a aderência deste microorganismo à superfície dental, resultando em significativa diminuição do nível de cárie (TAUBMAN e SMITH, 1973). Em humanos os dados são ainda limitados, embora alguns estudos preliminares apontem forte aplicação prática de anticorpos IgA anti-*S. mutans* (GREGORY, 1985).

A função da saliva de agregar bactérias é mediada também por um complexo grupo de substâncias de natureza não imune como por exemplo, as mucinas (TABAK e cols., 1982). Recentemente, uma proteína de aproximadamente 60.000 Daltons descrita por BABU e cols. (1986), mostrou ser muito eficiente em aglutinar bactérias e finalmente, mecanismos mais simples como pontes de cálcio em cargas negativas da parede celular bacteriana, também parecem impedir esse fenômeno (POLLOCK, 1976).

2.1.3.8 - Atividade antibacteriana

O grupo de moléculas composto por lisozima, lactoferri-
na e lactoperoxidase, agindo em conjunto com outros componentes
salivares tem efeito imediato sobre os microorganismos orais, in-
terferindo no processo de reprodução bacteriana ou causando a mor-
te destas (MANDEL, 1987).

2.1.3.9 - Atividade antifúngica

Tem sido demonstrado recentemente que a saliva secreta-
da pela glândula parótida possui atividade antifúngica, através
das propriedades dos peptídeos ricos em histidina básicos e neu-
tros. POLLOCK e cols. (1984), demonstraram que os peptídeos ricos
em histidina básicos provocam uma diminuição da viabilidade da *C.*
albicans de 99%, enquanto que os peptídeos ricos em histidina neu-
tros são potentes inibidores da germinação da *C. albicans* (OPPE-
NHEIM, 1986).

2.1.3.10 - Atividade antiviral

A saliva possui influência sobre algumas viroses atra-
vés da IgA secretora, como pode ser observado pelo sucesso da va-
cinação oral contra a poliomielite, por exemplo (MANDEL, 1987).
Anticorpos da mucosa oral têm se mostrado efetivos contra rhino-
virus e poliovirus e podem talvez inibir a transmissão do HIV via

saliva (ARCHIBALD, 1986). HEINEMAN e GREEMBERG (1980), sugerem a proteção da mucosa oral contra o Herpes simplex vírus pelas mucinas salivares.

2.1.3.11 - Manutenção do pH

A saliva é um sistema tampão efetivo e mantém relativamente neutro o pH da cavidade oral, da placa bacteriana e do esôfago, através da deglutição. O sistema bicarbonato é o responsável pelo controle do pH da cavidade oral e do esôfago (HELM e cols., 1982), sendo que na placa dental, onde há a produção de ácidos pelas bactérias, os mecanismos de controle do pH são mais complexos, participando destes os sistemas bicarbonato, fosfatos e proteínas ricas em histidina, entre outros (MANDEL, 1987).

2.1.3.12 - Manutenção da integridade do dente

Além de interferir com o processo de desmineralização, através do controle do pH da placa dental, a saliva protege os dentes de diversas outras formas, como por exemplo:

- Eliminação dos açúcares da dieta através do fluxo salivar (DAWES, 1983).
- Proteção bioquímica da superfície do dente logo após a sua erupção e promoção da maturação dental pós-eruptiva (WOLTGENS, 1981).

Proteínas que tem grande afinidade à hidroxiapatita formam uma fina camada envolvendo os dentes, a película adquirida, que age como barreira protetora contra o desgaste excessivo, penetração de ácidos e perda de minerais (ZHRADNIK e cols., 1977). A película adquirida também tem ação protetora contra a erosão dos dentes (MEURMAN e FRANK, 1991).

A saliva é supersaturada de íons cálcio e fosfato e esse fato é fundamental na manutenção no processo de remineralização de lesões cariogênicas superficiais e na proteção das superfícies do esmalte dental (MANDEL, 1989).

2.1.3.13 - Outras funções da saliva

A saliva, através da amilase salivar tem importante função digestiva (ROBERTS e WHELAN, 1960) e além disso possui papel importante como meio de excreção de medicamentos, balanço hídrico (MANDEL, 1989) e muitos estudos tem demonstrado que a saliva também possui ação hormonal; estudos esses que mostram a presença de vários hormônios na saliva e sugerem suas ações específicas (OLSEN e cols., 1984). MARCHETTI (1988), sugeriu a possibilidade de dosagem de insulina na saliva de pacientes diabéticos e, considerando ainda as aplicações clínicas da saliva, a Etiope Inc. of Beaverton, Oregon, desenvolveu uma técnica de detecção de anticorpos anti-HIV na saliva, com o intuito de facilitar a realização deste tipo de exame para uma grande faixa da população (NATURE, 1990).

2.2 - PELÍCULA ADQUIRIDA

O esmalte dental humano é coberto por uma fina camada orgânica, acelular e livre de bactérias, a qual foi denominada de película adquirida, indicando a sua ocorrência após a erupção dos dentes (SÖNJU e RÖLLA, 1973). Muitos estudos tem sido conduzidos no sentido de se conhecer a composição, mecanismos de formação e fonte desta película (MAYALL, 1977). Dentre esses estudos, duas técnicas merecem destaque: a remoção da película diretamente do dente, *in vitro* e *in vivo* e subsequente análise bioquímica e, a outra, o estudo das proteínas salivares que têm afinidade à hidroxiapatita *in vitro*. As proteínas que exibem tal característica são consideradas como possuidoras de afinidade ao esmalte dental e, portanto, participantes da película adquirida *in vivo* (EGGEN e RÖLLA, 1983).

2.2.1 - Formação da película adquirida

Os mecanismos pelos quais as proteínas são absorvidas a hidroxiapatita estão bem estabelecidos. Esse fenômeno acontece basicamente em dois processos: as proteínas básicas se adsorvem a grupos fosfatos enquanto que as proteínas ácidas são adsorvidas pelos íons cálcio da superfície da hidroxiapatita. Tem sido adotado que no esmalte dental *in vivo* também ocorram estes mecanismos (EGGEN e RÖLLA, 1983). MAYALL (1977), em estudo comparativo de pe

lículas formadas *in vivo* e *in vitro* chegou à conclusão de que, em relação à composição dos aminoácidos não há diferenças significativas entre ambas, confirmando experimentalmente hipóteses anteriores. Utilizando técnicas sofisticadas de fluorografia específica, AL-HASHIMI e LEVINE (1989), na tentativa de identificar quais membros das famílias de glicoproteínas salivares que participam da formação da película adquirida, chegaram à conclusões semelhantes às de outros autores, embora em níveis de sensibilidade e detalhamento muito mais elevados.

Sendo a afinidade das proteínas salivares à hidroxiapatita mediada pelas cargas dessas proteínas, muitos estudos tem sido realizados demonstrando a influência de íons nesse processo, destacando entre eles o íon flúor (RÖLLA e MELSDN, 1975).

RYKKE e SONJU (1991) demonstraram diferenças entre a película formada em condições de jejum e a película em condições normais de alimentação, indicando a influência da dieta na formação desta película.

2.2.2 - Composição da película adquirida

As proteínas ricas em prolina ácidas são o principal componente da película jovem (BENNICK e CANNON, 1978). Muitas proteínas entretanto, são também detectáveis nessa chamada película jovem (até duas horas de formação) como por exemplo; a albumina, lisozima, fosfoproteínas que contém cistina, IgA secretora, lacto

ferrina, amilase e mucinas (EGGEN e RÖLLA, 1983; LEVINE e cols., 1985).

Com o tempo, a composição da película sofre alterações. BENNICK (1982) demonstrou que a contribuição das proteínas ricas em prolina diminui de 40% para 0,1% depois de 24 horas de formação da película, entretanto, a quantidade de glicoproteínas de alto peso molecular, as mucinas, aumenta (EMBERY e cols., 1986). RATHMAN (1989), descreveu na película jovem uma proteína da família das cistatinas e uma glicoproteína de peso molecular de aproximadamente 20kD ainda não identificada. Nesse mesmo ano, AL-HASHIMI e LEVINE demonstraram que o processo de adsorção das proteínas salivares a hidroxiapatita tem especificidade a nível de membros de famílias dessas proteínas, mostrando que na película adquirida de 2 horas apenas a mucina de alto peso molecular (MG1) foi encontrada, enquanto que a MG2 (mucina de baixo peso molecular) não. Esses autores sugerem a partir deste fato, que membros individuais de uma mesma família de proteínas salivares, têm diferentes funções na boca, corroborando com os trabalhos anteriores de LEVINE e cols. (1987).

2.2.3 - Funções da película adquirida

Um dos maiores papéis da saliva é a formação da película adquirida, a qual promove uma interface protetora entre a superfície do dente e o meio externo (LEVINE e cols., 1985). Essa

película age como uma barreira de permeabilidade seletiva, regula o processo de mineralização/desmineralização do esmalte dental e tem função moduladora da microbiota bucal. A película adquirida é também um importante reservatório para os chamados ions protetores como o flúor, cálcio e fosfatos (SÖNJU, 1986).

2.4 - LECTINAS

2.4.1 - História

Lectinas são proteínas que se ligam especificamente a açúcares e que possuem a singular habilidade de aglutinar eritrócitos entre outras propriedades biológicas, estando amplamente distribuídas na natureza. São encontradas predominantemente em sementes de plantas, em particular das leguminosas, podendo estar presentes também em raízes, folhas e cascas. Essas proteínas também podem ser encontradas no reino animal, como por exemplo em bactérias, lesmas, peixes, algumas espécies de caranguejos e camarões e, finalmente, em mamíferos (SHARON e LIS, 1972).

Inicialmente encontradas em vegetais, essas proteínas foram chamadas de fitohemaglutininas, porém com relatos posteriores da sua ocorrência em invertebrados, o termo foi alvo de discussões até que BOYD (1954) sugeriu o termo lectina, do latim, *legere* que significa escolher, sendo essas proteínas assim chamadas desde então.

O estudo das lectinas iniciou-se em 1888, quando STILL-MARK, pela primeira vez descreveu o fenómeno de hemaglutinação por extratos de plantas, quando estudava a toxicidade de extratos de *Ricinus communis* (ricina). Ele demonstrou que esta planta continha uma proteína de alta toxicidade, a qual ele chamou de ricina e que, esta aglutinava hemácias humanas e de outros animais.

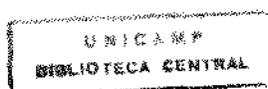
Algum tempo depois desta descoberta, outra lectina foi descrita, a abrina, extraída da planta *Abrus precatorius* (abrina). Essas duas lectinas atraíram a atenção de Paul Ehrlich, que optou por trabalhar com este tipo de material no estudo da imunologia ao invés de usar toxinas bacterianas, como era popular entre os bacteriologistas da época (SHARON e LIS, 1972).

Usando ricina e abrina, mesmo em preparações não purificadas, Ehrlich demonstrou, durante a década de 1890 alguns dos princípios básicos da imunologia. Por exemplo, através do soro imune anti-ricina, obtido da atividade aglutinante do extrato de ricina, ele demonstrou que existia uma relação quantitativa entre a concentração de antissoro e antígeno, realizando a primeira determinação quantitativa de anticorpos *in vitro*. Ehrlich mostrou também que camundongos foram protegidos contra uma dose letal de ricina, quando submetidos previamente a injeções subcutâneas de pequenas doses desse extrato tóxico. Entretanto, soro anti-ricina não protegeu os animais contra os efeitos tóxicos do extrato da abrina e vice-versa. Esse experimento evidenciou a especificidade da resposta imune. Uma outra observação importante desse pesqui-

sador, foi a de que a imunidade às toxinas era transferida da mãe para a prole, durante a gestação e através do leite, após o nascimento (PAULINO DA COSTA, 1989).

Em 1908, LANDSTEINER e RAUBITSCHKEK estabeleceram que a atividade hemaglutinante de vários extratos de sementes era diferente quando testados com eritrócitos de animais diferentes, evidenciando assim a ação seletiva das aglutininas vegetais. Entretanto, por várias décadas se pensou que a atividade hemaglutinante das lectinas era inespecífica, até que em fins da década de 40 em estudos independentes, RENKONER, em 1948 e BOYD e REGUERA, em 1949, demonstraram que extratos de *Phaseolus vulgaris* e *Vicia graca* aglutinavam somente hemácias do tipo sanguíneo A, enquanto que extratos de *Lotus tetraglobosus* aglutinavam hemácias do tipo O. Estes conhecimentos contribuíram de forma relevante para o estabelecimento da base química das substâncias grupo sanguíneo específicas do sistema ABO.

Os estudos citados até agora foram conduzidos com extrato bruto proteico das plantas de origem. A primeira lectina purificada foi descrita por SUMMER (1919), quando obteve a *Concanavalina A* (*Canavalia ensiformis*), através de precipitação salina e cristalização. SUMMER e HOWELL (1936), relataram que além de aglutinar hemácias, a concanavalina A também precipitava o glicogênio em solução e a sua atividade hemaglutinante era inibida por açúcar de cana, sugerindo que a reação das lectinas ocorria com carboidratos da superfície das hemácias.



Vários métodos de purificação de lectinas foram então desenvolvidos, sendo que a primeira publicação foi de AGRAWAL e GOLDSTEIN, em 1965. Esses autores se basearam no fato de que a concanavalina A, com especificidade para D-glucose, reage com dextram e desenvolveram uma técnica simples para o isolamento desta lectina a partir do extrato bruto, por meio de adsorção em coluna de Serhadex-Dextran seguida de eluição com D-glucose. Foi um dos primeiros modelos de cromatografia de afinidade descritos.

A partir da purificação das lectinas, estudos bioquímicos mais sofisticados surgiram até que EDELMAN e cols., em 1972, sequenciaram os aminoácidos da concanavalina A e estabeleceram sua estrutura tridimensional ao mesmo tempo em que outro grupo, HARDMAN e AINSWORTH, chegava aos mesmos resultados.

A participação de lectinas na aderência bacteriana foi demonstrada por OFEK e cols., em 1977, que notaram a presença de lectinas específicas para D-manose em fimbrias, na superfície de microorganismos como a *Escherichia coli* (SHARON e LIS, 1972).

Em 1981, GIBBONS e DANKERS demonstraram que extratos de vários alimentos de origem vegetal aglutinavam cepas de *S. mutans*, sugerindo a importância das lectinas na interação parasita-hospedeiro na boca e possivelmente no trato gastrointestinal.

2.4.2 - Especificidade e aplicações das lectinas

Algumas lectinas são específicas em reagir com eritrócitos humanos dos sistemas ABO e MN, inclusive com os subgrupos ABO e conseqüentemente, são utilizadas em tipagem sanguínea e investigações sobre as bases químicas da especificidade dos grupos sanguíneos (SHARON e LIS, 1972). Outras lectinas têm atividade mitogénica (BUNN-MORENO e CAMPOS NETO, 1981) e são muito úteis para a compreensão dos eventos bioquímicos que envolvem a conversão de uma célula em descanso em uma célula com atividade mitótica intensa ou mesmo a produção de clones celulares.

A aplicação das lectinas em métodos histoquímicos está muito bem documentada e recentes observações de que há lectinas específicas para células tumorais levaram ao surgimento de grande interesse na aplicação prática destas lectinas como método diagnóstico. Por exemplo, há lectinas que só aglutinam células cancerosas do epitélio mamário e não as normais. À luz deste fato, há a sugestão de que ocorrem alterações na superfície celular das células malignas e, as lectinas, reconhecendo esta mudança, certamente contribuiriam para uma melhor compreensão dos processos que levam ao surgimento do câncer (SHARON e LIS, 1972).

Lectinas também se ligam a mono e oligossacarídeos e precipitam especificamente polissacarídeos e glicoproteínas, atividades estas que podem ser inibidas por açúcares. Esta propriedade das lectinas foi usada para o isolamento e purificação de po-

límeros contendo carboidratos, o que levou ao desenvolvimento da chamada cromatografia de afinidade.

Através desta técnica foram descritas, por exemplo, purificações de antígenos associados a tumores (YAZAWA e cols., 1970), hormônio tireotrófico humano (MIURA e cols., 1989), IgA humana (BIEWENGA e cols., 1989), alguns componentes do sistema complemento, como o C1 (PILATTE e cols., 1989) entre outros. CHING E RHODES (1988) purificaram uma glicoproteína pancreática relacionada ao câncer em humanos utilizando técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida e "Lectin Blotting".

A interação de lectinas com proteínas salivares também tem sido alvo de estudos dentro do contexto atual.

GIBBONS e DANKERS (1982) sugeriram que uma das funções da saliva seria a de reduzir a interação das lectinas da dieta com as superfícies mucosas da boca, demonstrando também que as lectinas reagem com glicoproteínas salivares. Outra conclusão importante desses autores, agora em 1986 é a de que o sistema imune deve contribuir para a redução da interação entre lectinas da dieta e superfícies da boca, tendo a IgA salivar papel importante neste processo à medida em que ela também reage com lectinas. As mucinas salivares, que têm papel basicamente protetor e lubrificador das superfícies bucais, também reagem com lectinas, como foi demonstrado por KOMIS e cols. (1987).

2.4.3 - Lectina de semente de jaca (*Artocarpus integrifolia*) - Jacalina

MOREIRA e AIMOZ (1978) descreveram a atividade hemaglutinante em extratos de semente de jaca (*Artocarpus integrifolia*) sugerindo a existência de lectina nesta fruta, a qual foi posteriormente chamada Jacalina. Essa lectina é um forte ativador mitogênico em linfócitos T humanos e potente ativador policlonal da produção de imunoglobulinas pelos linfócitos B (BUNN-MORENO e CAMPOS NETO, 1981); outros (SAXON e cols., 1987), em contraste, reportam efeito inibitório na produção de imunoglobulinas pelos linfócitos B e uma ativação de linfócitos T supressores. CRANE e cols. (1984), usaram a jacalina para produzir linfócitos T híbridos com atividade de produção de gama interferon.

A habilidade da jacalina em reagir com a IgA humana foi primeiramente reportada por ROQUE-BARREIRA e CAMPOS NETO (1986), não reagindo esta lectina porém com IgG e IgM. Esta propriedade foi inicialmente usada para a quantificação da IgA no colostro por esses pesquisadores.

Sendo a jacalina uma lectina que reage seletivamente com D-galactose, sua purificação do extrato bruto de sementes de jaca foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de agarose D-galactose (ROQUE-BARREIRA e cols., 1986). A purificação desta lectina deu-se também por outros métodos, como por exemplo cromatografia de troca iônica (MOREIRA e AINOZ, 1981) e cromato-

grafia de afinidade através de meios diferentes, tais como, goma de guar (SURESHKUMAR e cols., 1982), estroma de hemácias humanas AB (MOREIRA e OLIVEIRA, 1983), IgA-Sepharose (ROQUE-BARREIRA e CAMPOS NETO, 1984).

Outras publicações demonstraram que a jacalina reage com IgA1 humana, porém não reconhece a IgA2 (HAGIWARA, 1988).

PILAJTE (1989) relatou a interação desta lectina com a proteína C1 do sistema complementar humano.

A interação entre jacalina e glicoproteínas salivares foi observada por PAULINO DA COSTA (1989), demonstrando que a saliva de indivíduos normais e portadores de deficiência congênita de IgA reagem com a jacalina, sugerindo que esta lectina reage com mais de uma glicoproteína salivar. Nenhum outro trabalho a respeito dessa interação foi encontrado neste levantamento bibliográfico.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - SEMENTE DE JACA (*Artocarpus integrifolia*)

As sementes de jaca foram obtidas de frutas da região de Piracicaba, SP. Após remoção mecânica das duas películas externas, as sementes foram conservadas a -10°C .

3.2 - SALIVA

Saliva não estimulada, de 10 doadores saudáveis, foi coletada durante 30 minutos em Becker imerso em banho de gelo, sendo chamada de saliva humana inicial. A saliva foi então misturada e centrifugada a 10.000g , durante 15 min, a 4°C . O teor proteico foi determinado.

3.3 - SORO ANTI-IgA

O soro de cabra anti-IgA humano foi cedido pelo Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia-UNICAMP.

3.4 - HIDROXIAPATITA

Hidroxiapatita Biorad foi cedida pelo Laboratório de Bioquímica Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.

3.5 - PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO PROTEICO (EB)

O extrato bruto proteico (EB) foi preparado de acordo com PAULINO DA COSTA (1989). As sementes foram trituradas em liquidificador por 10 min, na proporção de 1g de semente para 2 ml de solução salina de NaCl 0,15M em tampão fosfato 0,01M pH 7,2, contendo NaN_3 0,01% (solução PBS) a qual foi usada em todos os experimentos.

A extração se processou em geladeira à 4°C por 24 hs com agitação constante. Após filtração em funil de Buckner, com papel de filtro Watman nº 1, o extrato foi centrifugado à 10.000g por 20 min à 4°C. O sobrenadante foi dializado contra 10 volumes de PBS por 24 hs à 4°C e após dosagem de proteínas, o extrato foi distribuído em alíquotas e conservado à -10°C.

3.6 - DOSAGEM DE PROTEINAS

As dosagens proteicas foram feitas segundo o método de LOWRY e cols. (1951), usando albumina bovina sérica como padrão.

3.7 - ADSORÇÃO DE PROTEINAS SALIVARES A HIDROXIAPATITA

Este experimento foi conduzido segundo a metodologia descrita por RATHMAN e cols. (1989), com algumas modificações.

1g de hidroxiapatita previamente lavada em tampão fosfato 5mM pH 6,8 foi incubado com 10 ml de saliva humana inicial, previamente dialisada no mesmo tampão durante duas horas, à temperatura ambiente e sob agitação constante. Em seguida, o material foi centrifugado à 2.000g por 30 min e lavado três vezes com 5ml cada vez de tampão fosfato 5mM pH 6,8. As proteínas ligadas à hidroxiapatita foram inicialmente eluídas 3 vezes em 5ml de tampão fosfato 0,2M pH 6,8 e subsequentemente com tampão fosfato 1M pH 6,8 em igual número de vezes e volume. O tempo de cada eluição foi de 10 minutos.

O sobrenadante foi alíquotado e guardado à -10°C e os eluatos concentrados em liofilizador. O teor proteico das amostras obtidas foi então determinado como descrito em 3.6.

3.8 - REAÇÃO DE PRECIPITAÇÃO EM MEIO SEMI-SÓLIDO. DUPLA DIFUSÃO EM GEL DE AGAROSE

3,5 ml de agarose a 1% em PBS foram colocados sobre lâminas de microscopia e, após completa solidificação, orifícios circulares de aproximadamente 4mm de diâmetro foram imprimidos no gel com o auxílio de furador manual. Nos orifícios foram aplicados 20 μ l de saliva, EB e soro anti-IgA em concentrações proteicas previamente igualadas. A difusão ocorreu em câmara úmida por 24 hs à 4°C. As lâminas foram lavadas em solução salina isotônica (NaCl 0,15M, contendo NaN_3 0,01%) por 48 hs sob agitação cons-

tante. Em seguida, as lâminas foram secas à temperatura ambiente e coradas com Comassie Blue 0,05% em metanol (7ml), ácido acético (25ml), água (68ml), por 12 hs. O excesso de corante foi retirado com a mesma solução, sem o corante.

3.9 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Todas as eletroforeses foram feitas segundo DAVIS (1964). O tampão de corrida foi Tris-glicina 0,005M pH 8,3 e azul de bromofenol 0,001% como indicador de corrida. O tempo de corrida foi acompanhado pela migração do corante, durante cerca de 120 minutos.

Inicialmente e até que o corante penetrasse no gel a amperagem era de 1mA por tubo, passando, a seguir, para 4mA por tubo. Após a corrida, os geis foram corados, como descrito no item 3.8.

3.10 - INDICE DE MOBILIDADE RELATIVA (RM)

Os índices de mobilidade relativa foram calculados em cada caso pela relação entre a distância percorrida por determinada proteína (A) e a percorrida pelo corante indicador (B):

$$RM = \frac{A}{B}$$

3.11 - ELETROFORESE EM AGAROSE

A eletroforese foi realizada em placa CELM onde foram aplicados 1 μ l de saliva e EB (10 mg/ml). A corrida foi feita à temperatura ambiente, durante 60 min em cuba eletroforética CDR-NING, usando 24 mA por placa e tampão barbital 0,05 M pH 8,6. Após a corrida, metade da placa foi corada em negro de amido 1% em ácido acético 5%. A outra metade foi usada para imunoeletroforese.

3.12 - IMUNOELETROFORESE EM AGAROSE

Após a eletroforese (item 3.9), foram aplicados nas canaletas aproximadamente 40 μ l de EB (25 mg/ml) e soro anti-IgA. O período de incubação foi de 24 h à 4°C em câmara úmida. Em seguida, a placa foi lavada em PBS por 24 h sob agitação constante. Após a secagem em estufa à 37°C, a placa foi corada como descrito em 3.11.

4 - RESULTADOS

4.1 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA SALIVA INICIAL, SOBRENADANTE E DAS PROTEÍNAS ADSORVIDAS À HIDROXIAPATITA

O perfil eletroforético em acrilamida das proteínas salivares apresenta seis bandas proteicas, como pode ser visto na Fig. 1. Após incubação com hidroxiapatita, verifica-se que a maioria dessas proteínas são adsorvidas, restando no sobrenadante apenas duas bandas (Fig. 2).

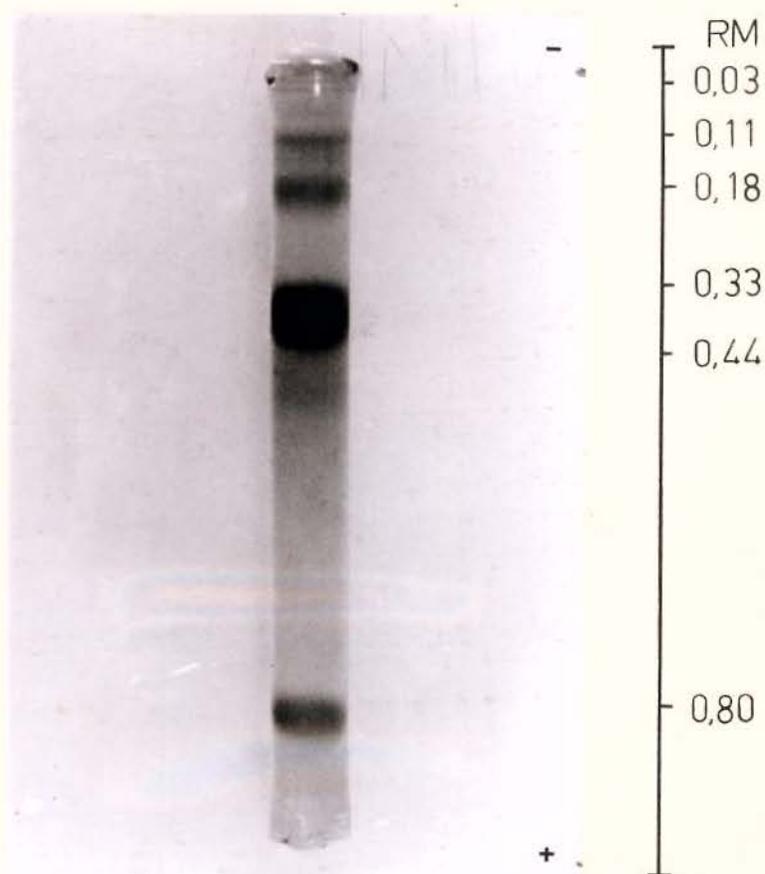


Figura 1 - Eletroforese em acrilamida e RM médios das bandas proteicas da saliva humana inicial. Foram aplicados 100 μ g de proteína no gel.

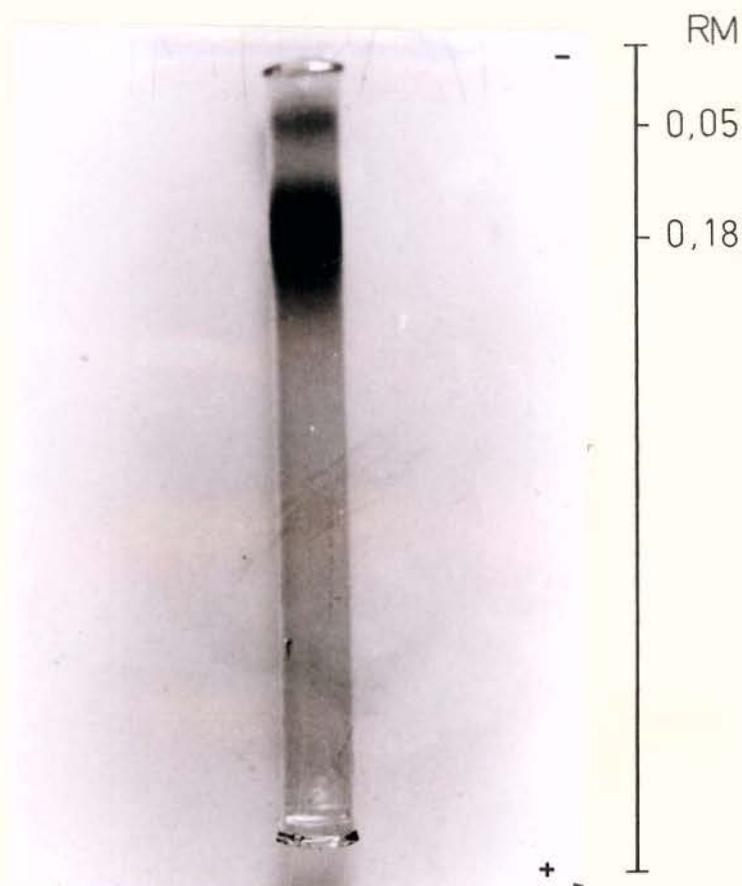


Figura 2 - Perfil eletroforético em acrilamida e RM médios das proteínas salivares que não se ligaram à hidroxiapatita durante o processo de adsorção-sobrenadante, relativo a um período de 2 horas de incubação. Foram aplicados 100 μ g de proteína no gel.

A eluição das glicoproteínas adsorvidas a hidroxiapatita feita com tampão fosfato 0,2M pH 6,8 mostra um perfil eletroforético com quatro bandas proteicas (Fig. 3), enquanto que a eluição subsequente das proteínas salivares em tampão fosfato 1,0M pH 6,8 revela a presença de três bandas de proteínas (Fig. 4).

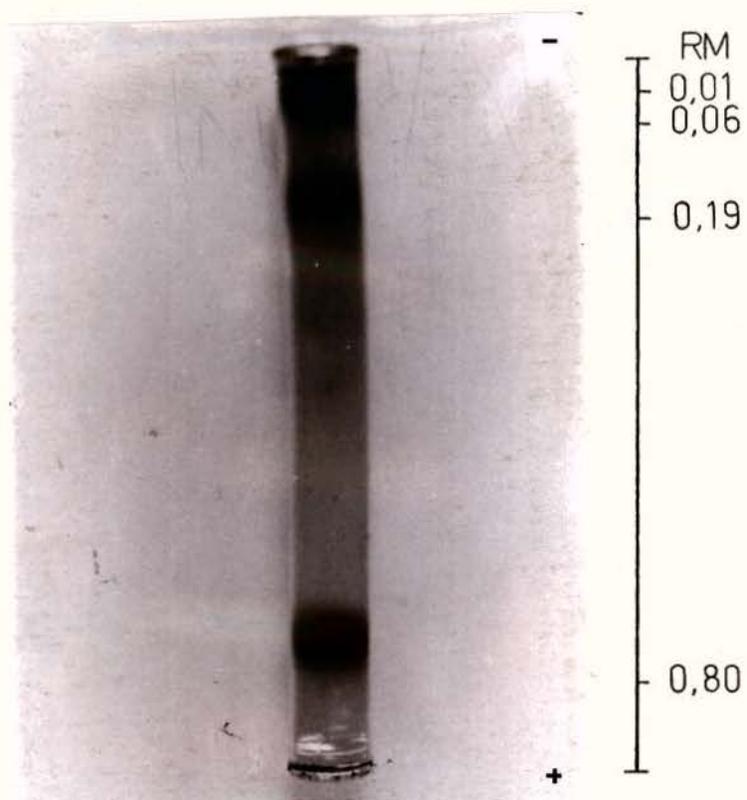


Figura 3 - Eletroforese em acrilamida e RM médios das proteínas salivares adsorvidos à Hidroxiapatita, eluidas em tampão fosfato 0,2M pH 6,8 (1a. eluição) período de 2 horas de incubação). Foram aplicados 100 μ g de proteína no gel.

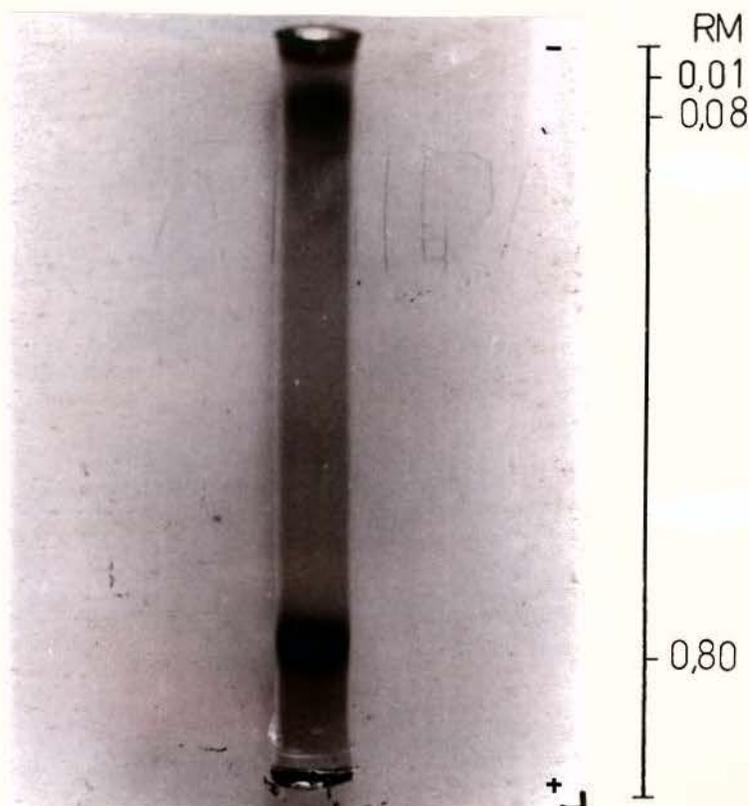


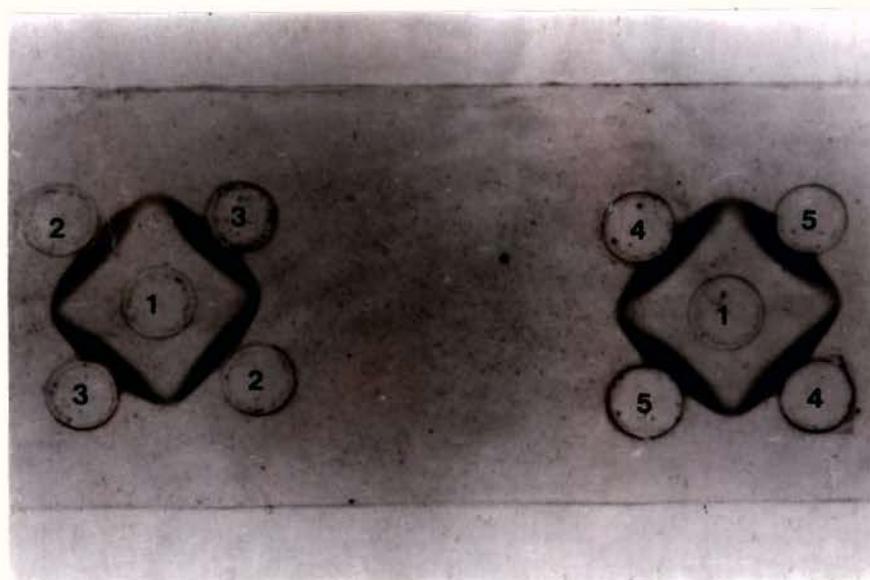
Figura 4 - Eletroforese em acrilamida e RM neutros das proteínas salivares adsorvidas à Hidroxiapatita (período de 2 horas de incubação), eluídas em tampão fosfato 1,0M pH 6,8 (2ª. eluição). Foram aplicados 100 μ g de proteína no gel.

4.2 - DUPLA DIFUSÃO EM AGAROSE

A Fig. 5 mostra que linhas de precipitação ocorreram entre lectina de jaca e glicoproteínas presentes na saliva humana

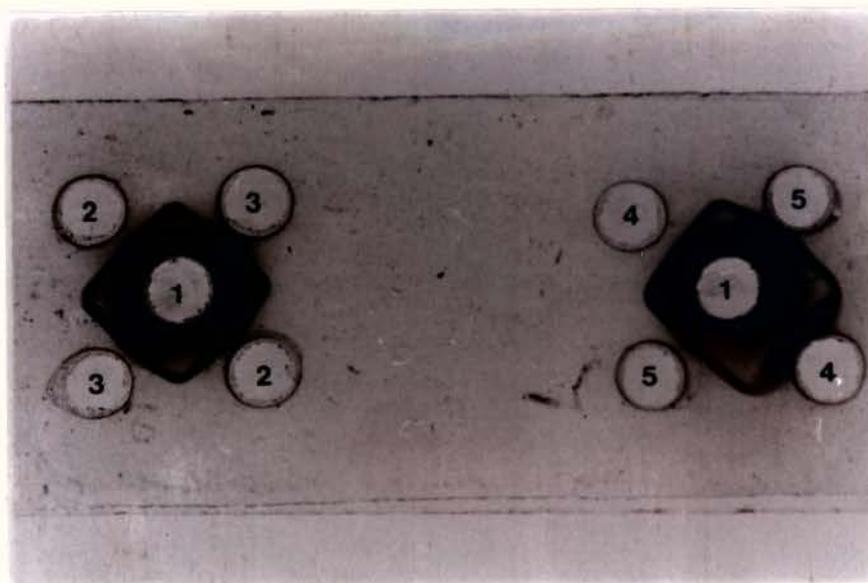
inicial, sobrenadante, primeira e segunda eluições.

Padrão de reação semelhante pode ser observado na Fig. 6 onde soro anti-IgA reagiu e precipitou com amostras de saliva inicial, do sobrenadante e das eluições.



- 1-EB de jaca 1mg/ml 2-Saliva inicial 1mg/ml
3-Sobrenadante 1mg/ml 4-1ª eluição 1mg/ml
5-2ª eluição 1mg/ml

Figura 5 - Reação da dupla difusão em agarose entre EB de jaca, saliva inicial, sobrenadante, 1ª. e 2ª. eluições. Foram aplicados 20 μ l de proteína no orifício.



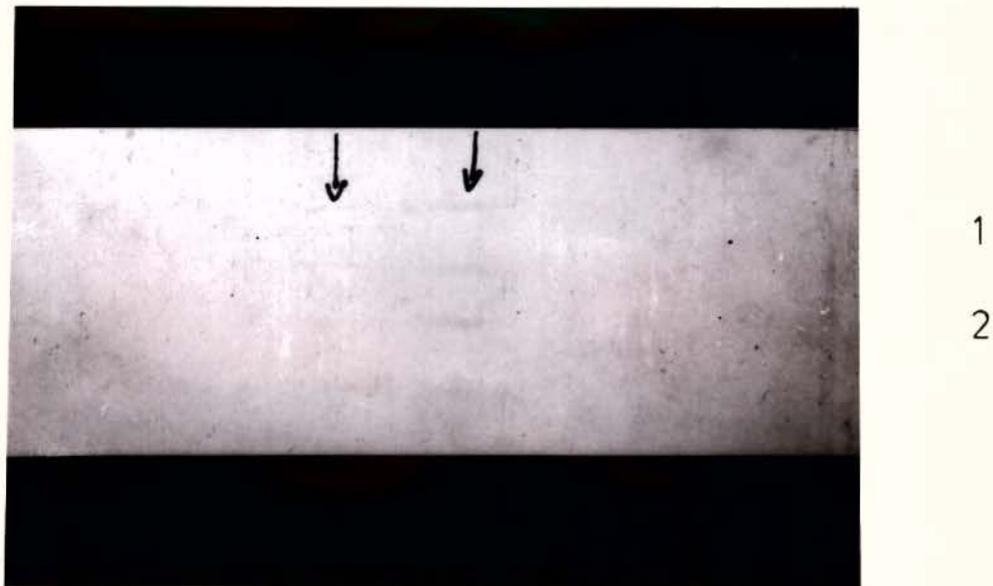
- | | |
|------------------------|--------------------------|
| 1-Soro anti IgA 1mg/ml | 2- Saliva inicial 1mg/ml |
| 3-Sobrenadante 1mg/ml | 4- Eluato1 1mg/ml |
| | 5-Eluato 2 1mg/ml |

Figura 6 - Reação de dupla difusão em agarose entre soro anti IgA e saliva humana inicial, sobrenadante, 1ª. e 2ª. eluições.
Foram aplicados 20 μ g de proteína no orifício.

4.3 - IMUNOELETOFORESE EM AGAROSE

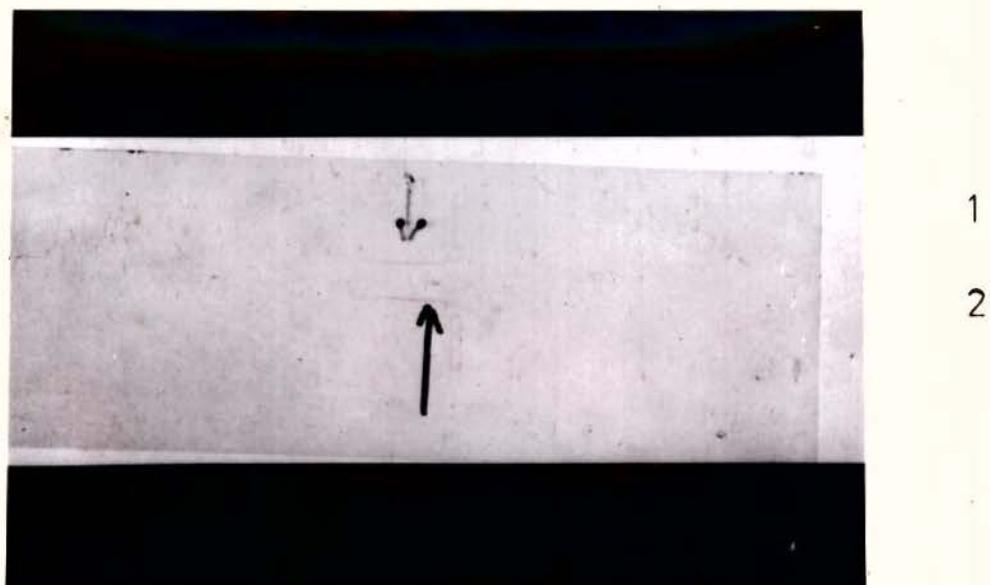
A eletroforese da saliva seguida de incubação com lectina de jaca e soro anti-IgA, revela que o extrato bruto de sementes de jaca reage com duas bandas de glicoproteínas salivares,

sendo uma coincidente com a região da linha de precipitação ocorrida com o soro anti-IgA e outra com mobilidade eletroforética mais anódica (Figs. 7 e 8).



1- Saliva Humana Inicial 10mg/ml
2- Saliva Humana Inicial 10mg/ml

Figura 7 - Imunoeletroforese em agarose entre saliva humana inicial e EB de jaca. Foram aplicados 10 μ g de proteína no gel. Após a separação eletroforética das proteínas da saliva, foram aplicados nas canaletas 40 μ l de EB de jaca 10 mg/ml.



1-Saliva Humana Inicial 10mg/ml
2-Saliva Humana Inicial 10mg/ml

Figura 8 - Imunoeletroforese em agarose entre saliva humana inicial e soro anti-IgA humana. Foram aplicados 10 μ g de proteína no gel. Após a separação eletroforética das proteínas salivares, foram aplicados nas canaletas 40 μ l de soro anti-IgA.

5 - DISCUSSÃO

Muitos métodos têm sido usados para caracterizar a composição química da película adquirida, como por exemplo, os histoquímicos, imunológicos, a eletroforese em acrilamida e a análise de aminoácidos. A análise de aminoácidos, apesar de fornecer dados e informações limitadas sobre as proteínas que compõem a película adquirida, parece ser a mais utilizada pelos pesquisadores da área (EGGEM e RÖLLA, 1983), o que nos dificultou uma comparação mais ampla entre os resultados deste trabalho e as observações citadas pela literatura; embora o conhecimento de que as lectinas reagem especificamente com resíduos de açúcares possa também contribuir para o estudo das proteínas que compõem a película adquirida *in vitro*, uma vez que a composição dos açúcares nas proteínas é bem conhecida.

A análise dos coeficientes médios de mobilidade eletroforética (RM) mostra que o perfil eletroforético das proteínas do sobrenadante da saliva tratada com hidroxiapatita apresenta duas bandas proteicas, todas com baixo RM médio (Fig. 2).

A banda proteica de RM 0,80 encontrada no padrão eletroforético da saliva inicial (Fig. 1) desapareceu completamente do sobrenadante, fato este contrário às observações feitas por HAY, em 1967 onde aparecem três bandas de alto RM no sobrenadante da saliva tratada com hidroxiapatita. Deve-se ressaltar aqui que ambos os experimentos foram realizados sob diferentes condições téc

nicas, o que, certamente contribuiu para explicar, em parte, as diferentes observações citadas.

O perfil eletroforético das proteínas adsorvidas à hidroxiapatita, eluídas em tampão fosfato 0,2M (Fig. 3) é semelhante ao padrão eletroforético da saliva inicial (Fig. 1), como já havia observado HAY em 1967, embora note-se que ocorrem mudanças em termos de mobilidade eletroforética e nitidez das bandas, havendo uma maior concentração de proteínas no início do gel, ou seja, no ponto de aplicação, sugerindo a existência de um processo de desnaturação proteica durante o experimento.

A banda de RM médio 0,80 que havia desaparecido do sobrenadante, aparece aqui, mostrando a grande afinidade que exhibe esta proteína à hidroxiapatita (Fig. 3), o que está em concordância com HAY (1967) que, embora em seu experimento houvessem três bandas proteicas de alta mobilidade eletroforética, concluiu que as bandas de RM elevado são adsorvidas mais seletivamente à hidroxiapatita. A presença de bandas de baixo RM fortemente coradas se deve provavelmente a questões de concentração, desnaturação proteica ou ambos, e não de afinidade, pois estas aparecem tanto no sobrenadante quanto nos eluatos, sugerindo que essas proteínas são eluídas apenas parcialmente durante o período de incubação e eluição estudados.

Comparando os RM médios das bandas proteicas nos diferentes eluatos, observa-se a ausência da banda de RM 0,19 do perfil eletroforético das glicoproteínas salivares eluídas em tampão

fosfato 1,0M (Fig. 4), sugerindo que esta proteína tenha sido totalmente eluída previamente com tampão fosfato 0,2M. A banda de alta mobilidade eletroforética ainda pode ser evidenciada confirmando a grande afinidade desta proteína pela hidroxiapatita.

Segundo HAY (1967), mudanças parecem ocorrer nas proteínas após os processos de adsorção, sendo muito difícil e às vezes impossível de eluir determinadas proteínas após um período superior a 4 horas de incubação. Isso talvez ocorra em função da insolubilidade da película adquirida. Em nosso experimento, nas condições empregadas, não nos foi possível confrontar essas afirmações, embora haja diferenças entre as proteínas eluídas em tampão fosfato 0,2M e 1,0M.

A análise dos perfis eletroforéticos do sobrenadante, dos diferentes eluatos e da saliva inicial, mostra claramente a presença de um processo de desnaturação proteica que pode ser melhor visualizado na região de proteínas de baixo RM, embora nos faltasse aqui um controle, ou seja, saliva total incubada no mesmo intervalo de tempo e temperatura sob agitação constante e em contato com superfícies sólidas que não a hidroxiapatita, o que implicaria na elaboração de novos estudos.

Existem várias evidências da interação entre lectinas e glicoproteínas séricas (SHARON e LIS, 1972; YAZAWA e cols., 1990, entre outros), porém há muito pouco documentado sobre esta ação no que diz respeito as proteínas salivares. GIBBONS e DANKERS mostraram que extratos de várias lectinas reagem com saliva tratada

com hidroxiapatita, sugerindo que uma das funções salivares possa ser a de reduzir a interação de lectinas da dieta com as superfícies mucosas da boca.

PAULINO DA COSTA, em 1989, demonstrou que a jacalina reage com pelo menos duas glicoproteínas salivares, uma delas sendo a IgA e este é o único trabalho encontrado na literatura pesquisada a este respeito.

As figuras 5 e 6 mostram respectivamente que o EB de jaca e soro anti IgA reagem com o sobrenadante e com as proteínas adsorvidas a hidroxiapatita, sugerindo que esta lectina reage com glicoproteínas salivares que participam do processo de formação da película adquirida *in vitro* e que a IgA está presente na película adquirida.

ROLLA e cols. (1983) já haviam demonstrado a presença de IgA na composição da película adquirida, porém, em nosso experimento podemos inquirir que esta imunoglobulina possui grande afinidade pela hidroxiapatita já que ela não foi totalmente eluída em tampão fosfato 0,2M, sugerindo a necessidade de novos estudos no sentido de melhor elucidar este fato à luz das funções da IgA na boca.

A lectina presente no EB de jaca reage com pelo menos duas glicoproteínas da saliva (Fig. 7), uma na região próxima ao ponto de aplicação, indicando ser esta proteína de baixo RM e que é coincidente com a linha de precipitação do soro anti IgA e saliva (Fig. 8), porém, não podemos afirmar ser esta proteína reco-

rehecida pelo EB como sendo a IgA pois sabe-se que a reação tipo lectina se dá a nível de resíduos de açúcares e não com a molécula proteica em si.

A presença de uma outra linha de precipitação na imunoeletroforese de EB de jaca e saliva em região mais anódica, confirma as observações feitas por PAULINO DA COSTA (1989), que sugeriu reagir a jacalina com pelo menos duas glicoproteínas salivares (Fig. 7).

6 - CONCLUSÃO

EB de jaca reage *in vitro* com glicoproteínas que se adsorvem à hidroxiapatita, sugerindo que isto pode ter *in vivo* implicações na ecologia da cavidade bucal.

7 - RESUMO

A interação entre lectina de jaca e glicoproteínas que compõem a película adquirida *in vitro* foi estudada através de eletroforese em acrilamida, dupla difusão em agarose e imunoeletroforese em agarose. Saliva humana inicial foi incubada com hidroxiapatita por duas horas à temperatura ambiente e sob agitação constante, sendo, em seguida, eluída primeiramente em tampão fosfato 0,2M pH 6,8 e em seguida em tampão fosfato 1,0M pH 6,8. O sobrenadante e os eluatos foram analisados eletroforéticamente e testados em dupla difusão contra lectina de jaca e soro de cabra anti-IgA humana. Paralelamente a estes experimentos foi conduzida a imunoeletroforese das proteínas salivares contra lectina de jaca e soro anti-IgA humana. Os resultados mostraram que a IgA está presente na composição da película adquirida *in vitro* e que a lectina de jaca reage com as glicoproteínas salivares que possuem afinidade pela hidroxiapatita *in vitro*.

8 - SUMMARY

The interaction between lectin from jackfruit and glycoproteins that compose the acquired pellicle in vitro was studied by polyacrilamide gel electrophoresis, double-difusion in agarose and immunoelectrophoresis. Human saliva was incubated with hydroxyapatite for 2 hours at room temperature under continuous agitation and then eluted in 0,2M phosphate buffer pH 6,8 and in the same buffer at 1,0M. The supernatant and the eluted proteins were analysed electrophoretically and tested by double difusion against lectin from jackfruit and anti-IgA goat serum. At the same time immunoelectrophoresis of human saliva anti-IgA serum and lectin from jackfruit were performed. The results showed that IgA is present in the proteins that compose the acquired pellicle in vitro and that the lectin from jackfruit reacts with salivary glycoproteins that have affinity for the hydroxiapatite in vitro.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ADAMS, D. The mucins barrier and adsorption through the oral mucosa. J. dent. Res., 54: 1319-26, 1975.
- AL-HASHIMI, I. & LEVINE, M.J. Characterization of in vivo salivary-derived enamel pellicle. Archs oral Biol., 34(4): 289- 95, 1989.
- ARCHIBALD, D.W. Salivary antibodies as means of detecting human T-cell lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus infection. J. clin. Microbiol., 24: 873-5, 1986.
- BABU, J.P. & DADDOUS, M.K. Interaction of salivary fibronectin with oral streptococci. J. dent. Res., 65: 1094-100, 1986.
- BENNICK, A. Salivary proline rich proteins. Mol. cell Biochem., 45: 83-99, 1982.
- & CANNON, M. Quantitative study of the interaction of salivary acidic PRP with hydroxyapatite. Caries Res., 12: 159-69, 1978.
- BIEWENGA, J.; HIEMSTRA, P.S.; STENEKER, I; & DAHA, R.M. Binding of human IgA1 and IgA1 fragments to jacalin. Immunology, 26(3): 257-81, 1989.
- BOYD, W.C. Vox sang B 1 1963. Ann. N.Y. Acad. Sci., 169: 168, 1970.

*Referências: NB-66 de 1968 da Associação Brasileira de Normas Técnicas. Abreviaturas de periódicos: World List of Scientific Periodicals.

- BRANDTZAEG, P. Role of antibodies in saliva: facts and extrapolations. Cariol. Today, pp.79-89, 1983.
- BUNN-MORENO, M.M. & CAMPOS NETO, A. Lectins extrated from seeds of artocarpus integrifolia (Jack Fruit): potent and seletive stimulators of distinct human T of cells functions. J. Immun., 127(2): 427-9, Aug. 1981.
- CHING, C.K. & RHODES, S.H. Identification and partial characterization of a new pancreatic cancer-related serum glycoprotein by SDS PAGE and lectin-blotting. Gastroenterology, 95(1): 137-42, 1988.
- CRANE, I.; LEUNG, H.; BARWICH, S.; PARTI, S; & MEAGER, A. The preparation of interferon gamma-producing T-cell hybridomas from Jacalin stimulated T lymphocytes and SH9 T cell line. Immunology, 53: 855-9, 1984.
- DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. II. Method and applications to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121:407-27, 1964.
- DAWES, C. A mathematical model of salivary clearence of sugar from oral cavity. Caries Res., 17: 321-6, 1983.
- EGGEN, K.H. & RÖLLA, G. Further information on the composition of the acquired enamel pelicle. Cariol. Today, 109-1B, 1983.
- EMBERLY, G.; HEAVEY, T.G; & STAMBURY, J.B. Studies on the organic polyanionic constituents of human acquired dental pellicle. Archs oral Biol., 31: 623-5, 1986.
- ERICSON, T. and MAKINEN, K.K. Saliva, formation, composition and possible role. In: TYLSTRUP, M. and FEJERSKOV, D., ed. Text-book of cariology. Copenhagen, Munksgaard, cap.3, p.28-32.

- GARRET, K.R. Changing on salivary secretions - a short history on spit. Proc. R. Soc. Med., 68: 553-60, 1975.
- GREGORY, R.L. Prevention of *S.mutans* colonization by salivary IgA antibodies. J. clin. Immun., 5: 55-62, 1985.
- GIBBONS, R.J. & DANKERS, I. Immunosorbent assay of interaction between human paroti IgA and dietary lectins. Archs oral Biol., 31(7):477-81, 1986.
- & ————. Inhibition of lectin binding to saliva treated hydroxyapatite to bucal epithelial cell and to erythrocytes by salivary components. Am. J. clin. Nutr., 36: 276-83, 1982.
- & ————. Lectin-like constituents of foods with react wich components of serum, saliva and *S.mutans*. Appl. environ Microbiol., 41(4): 880-8, 1981.
- HAGIWARA, K. Jacalin. Isolation, characterization and influence of various factors on its interaction with human IgA1; as asse sed by precipitation and latex agglutination. Molec. Immun., 25(1): 69-83, 1989.
- HATTON, M.N. Mastigatory lubricification. Biochem. J., 230: 817-20, 1985.
- HAY, D.I. The absorption of salivary proteins by hydroxyapatite and enamel. Archs oral Biol., 12: 937-46, 1967.
- .; SCHLESINGER, D.H. & MORENO, E.C. Phosphoprotein inhibitors of calcium phosphate precipitation from human salivary secretions. Inorg. Perspect. Biol. Med., 2: 271-85, 1979.

- HEINEMANN, H.S. & GREENBERG, M.S. Cell protective effect of human saliva specific for herpes simplex virus. Archs oral Biol., 25: 257-61, 1980.
- HELM, J.R.; DODDS, W.J.; HOGAN, W.J.; SUERGEL, J.H. EGIDE, M.S. & WOOD, C.M. Acid neutralizing capacity of human saliva. Gastroenterology, 83: 69-74, 1982.
- HUSTON M.; ROLAND, A. & MESTECKY, J. Interference of secretory IgA with sorption of oral bacteria to hydroxyapatite. Infect. Immun., 31: 942-51, 1981.
- KILLIAN, M.; ROLAND, A; & MESTECKY, J. Interference of secretory IgA with, sorption of oral bacteria to hydroxyapatite. Infect. Immun., 31: 942-51, 1981.
- LASTER, L.L. & LOBENE, R.R. New perspectives on sanguinaria clinicals individual tooth paste and oral rinse testing. J. Can. R. Ass., 56 (suppl.)(7): 19-30, 1990.
- LEVINE, M.J.; REDDY, M.S.; TABAK, L.A.; LOOMIS, R.E.; BERGEY, E.J.; JONES, P.C.; COHEN, R.E.; SINSON, M.W.; & AL-HASHIMI, I. Structural aspects of salivary glycoproteins. J. dent. Res., 66(2): 436-441, 1987.
- LOOMIS, R.E.; PRAKOBPHOL, A.; LEVINE, J.M.; REDDY, M.S. & JONES, P.C. Biochemical and biophysical comparison of two mucins from Human Submandibular - Sublingual saliva. Archs of Biochem Biophys, 258(2): 452-464, 1987.
- LOWRY, O.M.; ROSEBRENGH, N.J.; FAAR, L.A.,; & RANDAL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. biol. Chem. 193: 265-75, 1951.

- McNABB, P.C. and TOMASI, T.B. Host defense mechanisms of mucosal surfaces. Ann. Rev. Microbiol., 35: 477-97, 1981.
- MANDEL, I.D. The functions of saliva. J. dent. Res., 66 (special issue): 623-7, 1987.
- MANDEL, I.D. Human submaxillary, sublingual and parotid glycoproteins and enamel pellicle. In: HOROWITZ, M.I. & PIGMAN, W., eds. The glycoconjugates. New York, Academic 153-79, 1977, p.153-79..
- . The role of saliva in maintaining oral homeostasis. J. Am. dent. Ass., 119: 298-304, 1989.
- . Sialochemistry in diseases and clinical situations affecting salivary glands. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 12: 321-66, 1980.
- MARCHETTI, P. Salivary immunoreactive insulin: a new entry in clinical chemistry? Clin. Chem., 34(7): 1478-80, 1988.
- MAYHALL, C.W. Aminoacid composition of experimental salivary pellicles. J. Periodont., 48(2): 78-91, Feb. 1977.
- MEURMAN, J.H. & FRANK, R.M. Scanning electronmicroscopic study of the effect of salivary pellicle on enamel erosion. Caries Res., 25: 1-6, 1991.
- MIURA, Y. Con A. lectin and ricin lectin affinity binding characteristics of human thyreotropin. J.clin. Endocr. Metab., 120: 37-43, 1989.

- MOREIRA, R.A. & AINDUZ, I.C. Isolectins from jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) seeds. Pl. Physiol., 61(suppl):. 118, 1978.
- & —————. Lectins from seeds of jackfruit (*artocarpus integrifolia*): isolation and purification of two isolectins from the albumin fractions. Biol. Pl., 23(3): 186-92, 1981.
- MOREIRA, R.A. & OLIVEIRA, J.T.A. Lectins from the genus *Artocarpus*. Biol. Pl., 25(5): 343-8, 1983.
- OLSEN, P.S.; POULSEN, S.S.; KIRKEGAARD, P.; & NEXO, E. Role of submandibular saliva and epidermal growth factor in gastric cytoprotection. Gastroenterology, 87: 103-8, 1984.
- OPPENHEIM, F. The primary structure and functional characterization of the neutral histidine-rich polypeptide from human parotid secretions. J. Biol. Chem., 261: 1177-84, 1986.
- PAULINO DA COSTA, C. Interação de lectinas de semente de jaca (*Artocarpus integrifolia*) com glicoproteínas da saliva e soro humanos. Piracicaba, 1989. 91p. [Tese(Doutoramento) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP].
- PILATTE, Y. A new simplified method for Ci inhibitor purification. A novel use for Jacalin-agarose. J. Immun. Met., 120: 37-43, 1989.
- POLLOCK, J.J. The binding, aggregation and lytic properties of lysozyme. In: STILES, H.M.; LOESCH, W.J.; O'BRIEN, T.C. eds. Microbial aspects of dental caries. Washington, Information Retrieval Inc., 1976. p.325-52.

- POLLOCK, J.J.; DENEPITIVA, L.; MACKAY, B.J. & JACONO, V.J. Fungis-
tatic and fungicidal activity of the human parotid salivary his-
tidinerich polypeptides on *Candida Albicans*. Infect. Immun.,
44: 702-7, 1984.
- RATHMAN, W.N.; VANZEYL, M.J.; VAN DEN KEYBUS, P.A.M.; BANK, R.A.;
VEERMAN, E.C.I.; NIEUW AMERONGEN, A.U. Isolation and charac-
terization of three non-mucinous human salivary proteins with
affinity for hydroxyapatite. J. Biol. Buccale, 17: 199-208,
1989.
- ROBERTS, D.J.P. & WHELAN, W.J. The mechanism of carbohydrate
action. Biochem. J., 76: 246-53, 1960.
- ROQUE-BARREIRA, M.C. Jacalin: an IgA-binding lectin. J. Immun.,
134(3): 1740-3, Mar. 1985.
- ; COSTA, J.C.; CAMPOS NETO, A. Determinations of
secretory IgA levels in human colostrum and milk by radial
precipitation with Jacalin. Braz. J. Med. Biol. Res., 19(4-5):
646A, 1986.
- RYKHE, M. & SÖNJU, T. Aminoacid composition of acquired enamel
pellicle collected in vivo after 2 hours and after 24 hours.
Scand. J. dent. Res., 99: 463-9, 1991
- SCHAEFER, E. Trial approved for salive test. Nature, 346: 687,
1990.
- SHARON, N. & LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-
specific proteins. Science, 177(4053): 949-50, 1972.

- SIMONSSON, T. & GLANTZ, P.O. Influence of saliva from "heavy" and "light" plaque formers on the colloidal stability of bacterial suspension. Acta Odontol. Scand., 46: 195-7, 1988.
- SONJU, T. Pellicle. Formation, composition and possible role. In: TYLSTRUP, A. and FEJERSKOV, O., ed. Textbook of cariology. Copenhagen, Munksgaard, 1986. cap.4, p.46-53.
- & ROLLA, S. Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two-hours on cleaned human teeth in vivo. Caries Res., 7: 30-8, 1973.
- STARKEY, R.H. & ORTH, D. Radioimmunoassay of human epidermal growth factor (urogastrone). Clin. Endocr. Metab., 45: 1144-53, 1977.
- SURESHKUMAR, G.; APPUKUTAN, P.S.; BASU, D. Alfa-D-galactose-specific lectin from jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) seeds. J. biol. Sci., 4: 257-61, 1982.
- TABAK, L.A.; LEVINE, M.J.; MANDEL, I.D. & ELLISON, S.A. Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. J. Oral Pathol., 11: 1-17, 1982.
- TAUBMAN, M.A. & SMITH, D.J. Effect of local immunization with glucosyltransferase fractions from *S.mutans* on dental caries in rats and hamsters. J. Immun., 118: 710-20, 1973.
- WARNER, T.F. & AZEN, E.A. Tanins, salivary proline-rich proteins and oesophageal cancer. Med. Hypoth., 26: 99-102, 1988.
- WILLIAMS, R.C. & GIBBONS, R.J. Inhibition of bacterial adherence by secretory IgA: a mechanism of antigen disposal. Science, 77: 697-9, 1972.

- YAMAMOTO, K.; KONAMI, Y.; KUSUI, K. & OSAWA, T. Purification and characterization of a carbohydrate-binding peptide "Bauhinia pupurea" lectin. FEBS, 281(1,2): 258-62, 1991.
- YAZAWA, S. A simple procedure for isolation of tumor-associated antigens by affinity chromatography usin fucose-specific Aleuria aurantia lectin. Immun. Invest., 19(4): 319-27, 1990.
- ZAHARADMIK, R.T.; PROTAS, D. & MORENO, E.C. In vitro enamel demineralization by S.mutans in the presence of salivary pellicle. J. dent. Res., 56: 1103-10, 1977.