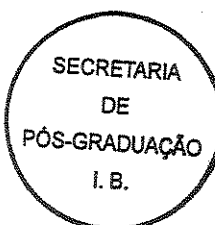


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Maria Betânia de Oliveira Garcia



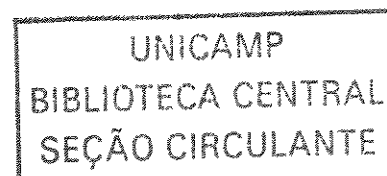
INFLUÊNCIA DA LECTINA DE *Crotalaria paulina*
E LECTINA DO VENENO DE SERPENTE
Bothrops jararacussu SOBRE A ATIVIDADE
PROTEOLÍTICA DA MICROBIOTA CARIOGÊNICA

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)
MARIA BETÂNIA DE OLIVEIRA GARCIA
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. José Camillo Novello

2002



2003/0925

UNIDADE SA
 Nº CHAMADA UNICAMP
G165i
 V SA
 TOMBO 53033
 PROC 16-124103
 C 0-2
 PREÇO R\$11,00
 DATA 08/04/03
 Nº CPD

CH00181379-B

BIB ID 287524

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

G165i

Garcia, Maria Betânia de Oliveira

Influência da lectina de *Crotalaria paulina* e lectina do veneno de serpente *Bothrops jararacussu* sobre a atividade proteolítica da microbiota cariogênica/Maria Betânia de Oliveira Garcia. -- Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: José Camillo Novello

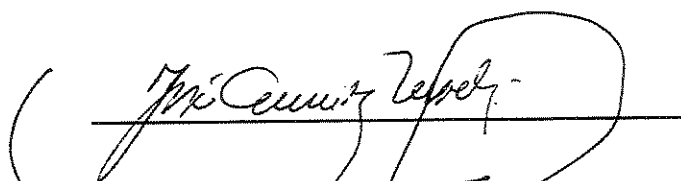
Tese(Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas . Instituto de Biologia.

1. Inibidores enzimáticos. 2. Caries. 3. Lectina. I. Novello, José Camillo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

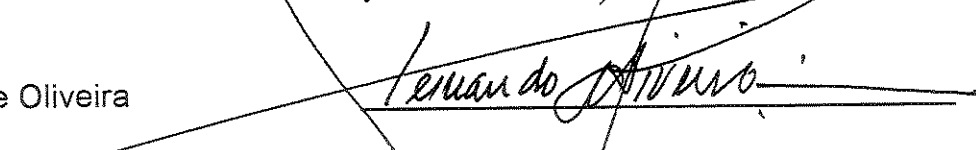
Data da Defesa: 26 de julho de 2002

Banca Examinadora:

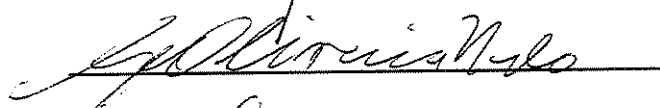
Prof. Dr. José Camillo Novello

Handwritten signature of Prof. Dr. José Camillo Novello in cursive script, written over a horizontal line.

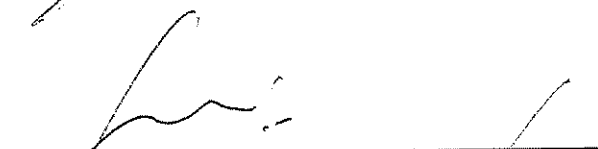
Prof. Dr. Fernando de Oliveira

Handwritten signature of Prof. Dr. Fernando de Oliveira in cursive script, written over a horizontal line.

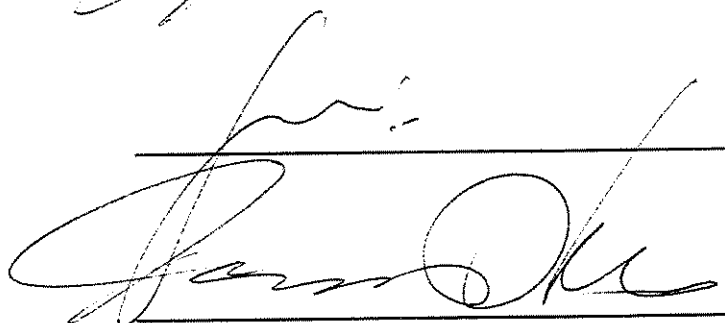
Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto

Handwritten signature of Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto in cursive script, written over a horizontal line.

Prof. Dr. Eduardo Saba Chujfi

Handwritten signature of Prof. Dr. Eduardo Saba Chujfi in cursive script, written over a horizontal line.

Prof. Dr. Tadaaki Ando

Handwritten signature of Prof. Dr. Tadaaki Ando in cursive script, written over a horizontal line.

Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

A blank horizontal line intended for the signature of Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf.

Profa. Dra. Nilce Correa Meirelles

A blank horizontal line intended for the signature of Profa. Dra. Nilce Correa Meirelles.

***“Se pensar lhe dá tristeza é porque só se sabe
marchar, como soldados em ordem unida.
Saltar sobre o vazio, pular de pico em pico...
Não ter medo da queda! Foi assim que se
construiu a ciência: pela ousadia dos que sonham.
Todo conhecimento começa com o sonho.”***

Rubem Alves

Aos meus pais.

***Ao meu esposo, Nilton e
meus filhos, Guilherme e Georgia.***

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. José Camillo Novello, pela confiança e orientação incansável na tese;

Ao Prof. Dr. Walter Bretz, University of Pyttsburgh, pela ajuda e disponibilidade;

Aos Profs. Drs. Nilce Corrêia Meirelles, Fernando de Oliveira e Tomamasa Yano, pelas sugestões na pré-banca;

Às amigas Luzia A. Pando e Daniela Diógenes, pela ajuda quanto ao material para utilização na parte clínica;

À Profa. Dra. Mércia Breda Stella, companheira e amiga na docência;

Aos funcionários do Instituto de Biologia – UNICAMP, que, direta ou indiretamente, auxiliaram neste trabalho.

Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas	xi
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1. Introdução Geral	1
1.1. Cárie Dental	1
1.1.1. Histórico	1
1.1.2. Placa Bacteriana	5
1.1.3. Mecanismo de destruição de Tecido Dentário mediado por Bactérias Orais	14
1.1.4. Lectinas	18
1.1.4.1. Lectinas e a Cavidade Bucal	22
2. Objetivos	24
3. Materiais e Métodos	25
3.1. Extração e Purificação da Lectina	25
3.2. Dosagem de Proteína	26
3.3. Determinação do conteúdo dos Carboidratos	27
3.4. Ensaio de Hemaglutinação	27
3.5. Ensaio de Agregação Plaquetária	30
3.6. Eletroforese em gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)	30
3.7. Eletroforese Bidimensional (2D-PAGE)	32
3.8. Determinação da Massa Molecular Relativa	32
3.9. Análise de Aminoácidos	33
3.10. Sequenciamento Amino Terminal	35
3.11. Purificação da Lectina de <i>Bothrops jararacussu</i>	38
3.12. Dosagem de Proteínas	39
3.13. Eletroforese em SDS-PAGE	40
3.14. Ensaio de Hemaglutinação	41
3.15. Lectinas	45

3.16. Determinação da influência da Lectina sobre a atividade proteolítica das bactérias orais	45
3.16.1. Seleção de pacientes	45
3.16.2. Coleta do Material Biológico	47
3.16.3. Estocagem da Amostra	48
3.16.4. Tratamento da Amostra	48
3.16.5. Avaliação dos Resultados	49
3.16.6. Análise Estatística	49
4. Resultados e Discussão.....	50
4.1. Efeito das Lectinas CrpL e BJcuL em Placa Bacteriana Supragengival	50
4.2. Efeito das Lectinas CrpL e BJcuL em Dentina Cariada Ativa	57
4.3. Efeito das Lectinas CrpL e BJcuL em Cimento Cariado	61
4.4. Efeito da Lectina sobre a atividade Proteolítica da Microbiota Oral	64
5. Conclusões	69
6. Perspectivas	70
7. Referências Bibliográficas	71
Apêndices	87
Abreviaturas para Aminoácidos.....	88
Comitê de Ética em Pesquisas – USF	89
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	90
Congresso Científico e Publicação	92
Artigo Científico	93

Figura 1 - Cárie de superfície radicular, exposta após doença periodontal (LASCALA, 1997)	3
Figura 2 - Presença de um estado inflamatório gengival, causada por placa bacteriana e cáries (LASCALA, 1997)	6
Figura 3 - Princípio da aderência seletiva da bactéria ao esmalte. Aderência bem sucedida é obtida quando as características da superfície de uma bactéria combinam com um componente da película (P) (THYLSTRUP & FEJERSKOV, 1995)	8
Figura 4 - Cárie de esmalte e dentina na superfície oclusal de molar inferior, destacando o socavamento do esmalte na junção amelodentinária (J) e a esclerose dentinária (E) caracterizada pelo tamponamento dos canlículos dentinários . Notam-se também os focos de liquefação na dentina (L), longitudinais e transversais, e os tratos mortos (corte pelo desgaste; aumento final de $\cong 40X$). (CONSOLARO, 1996)	46
Figura 5 - Cárie de cemento em pré-molar inferior com exposição da dentina; progressão preferencialmente horizontal do processo e socavação do esmalte. Notam-se áreas de esclerose dentinária (E) e cárie de esmalte (seta) (corte por desgaste; aumento final de $\cong 160X$). (CONSOLARO, 1996)	47
Figura 6 - Influência da lectina de CrpL e BJcuL sobre a placa bacteriana supragengival utilizando-se do teste BANA	57
Figura 7 - Influência da lectina de CrpL e BJcuL em dentina cariada utilizando-se do teste BANA	61
Figura 8 - Influência da lectina de CrpL e BJcuL em cemento cariado utilizando-se do teste BANA	64

Tabela 1 - Absorbâncias encontradas no efeito da Lectina de CrpL e BJcuL em placa bacteriana supragengival, utilizando-se do Teste BANA	56
Tabela 2 - Absorbâncias encontradas no efeito da Lectina de CrpL e BJcuL sobre a dentina cariada, utilizando-se do Teste BANA	60
Tabela 3 - Absorbâncias encontradas no efeito da Lectina de CrpL e BJcuL sobre cimento cariado, utilizando-se do Teste BANA	63

Lista de Abreviaturas

2D	Eletroforese bidimensional
ADP	Adenosina difosfato
AMBIC	Bicarbonato de amônio
BANA	N-Benzoil-DL-Arginina-2-Naftilamida
BDA	Maio de batata dextrose e ágar
BIS	N, N'-metileno biss acrilamida
BJcuL	Lectina isolada do veneno da serpente <i>Bothrops jararacussu</i>
BJL	Lectina isolada do veneno da serpente <i>Bothrops jararaca</i>
BML	Lectina isolada do veneno da serpente <i>Lachesis muta</i>
BvcTI	Inibidor de tripsina de <i>Bauhinia variegata var.candida</i>
CDR	domínio de reconhecimento de carboidratos
CjTI	Inibidor de tripsina de <i>Crotalaria juncea</i>
CLPs	Proteínas relacionadas com Lectina tipo C
CMI	Concentração mínima inibitória
CRD	Domínio de reconhecimento de carboidrato
CrpL	Lectina isolada de semente de <i>Crotalaria paulina</i>
CsTI	Inibidor de tripsina de <i>Crotalaria spectabilis</i>
CTBS	Salina tamponada com tris mais CaCl ₂
DMEM	Meio "eagle" modificado por dubelcco
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol tetracético
HPLC	High performeance liquid chromatography (CLAE-Cromatografia líquida de alta eficiência)
IPs	Inibidores de proteinases
JML	Lectina isolada do veneno da serpente <i>Dendroaspis jamesonii</i>
kDa	Kilodalton

LmsL	Lectina isolada do veneno da serpente <i>Lachesis muta stenophrys</i>
M	Molar
NA	Nutriente ágar
nm	Nanômetro
P/V	Percentagem peso/volume
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Salina tamponada com fosfato
PITC	Fenilisotiocianato
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
PTC	Feniltiocarbamil
PvTI	Inibidor de tripsina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
RSL	Lectina isolada do veneno da serpente <i>Crotalus atrox</i>
SBTI	Inibidor de tripsina de <i>Glycine max</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TBS	Salina tamponada com tris
TCA	Ácido tricloroacético
TDG	Tiodigalactosídeo
TEMED	N-N-N'-N'- Tetrametiletilenodiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
TL	Lectina isolada do veneno da serpente <i>Bothrops atrox</i>
TRIS	Tris-hidroximetil aminometano
V/V	Percentagem volume sobre volume

As lectinas constituem um grupo de proteínas que possuem a capacidade de se ligarem, específica e reversivelmente, a determinados carboidratos. Identificadas em vegetais e animais, são também encontradas em venenos ofídicos. O objetivo deste trabalho é analisar a influência da lectina de *Crotalaria paulina* e lectina do veneno de serpente *Bothrops jararacussu* sobre a atividade proteolítica da microbiota cariogênica em placa bacteriana supragengival, em cárie de dentina e cárie de cimento, fazendo uso do teste BANA. Uma colher de dentina (1 mg) foi usada para coleta de 90 amostras: 30 – placa bacteriana supragengival, 30 – cárie de dentina ativa e 30 – cárie de cimento. Estas amostras foram colocadas em 2 mL de uma solução tampão (pH 7.2), sendo agitadas por 30 segundos em 250 µL foram adicionados: A) 250 µL de lectina vegetal de *Crotalaria paulina* 0,12% + 250 µL BANA 1.67 mmol/L + 250 µL de água destilada; B) 250 µL de lectina do veneno de *Bothrops jararacussu* 0,12% + 250 µL BANA 1.67 mmol/L + 250 µL de água destilada; C) 250 µL de lectina vegetal de *Crotalaria paulina* 0,12% + 250 µL BANA 1.67 mmol/L + 250 µL de N-acetil D-galactosamina a 25mM; D) 250 µL de lectina do veneno da *Bothrops jararacussu* 0,12% + 250 µL BANA 1.67 mmol/L + 250 µL de lactose a 0,8 mM.

As misturas foram incubadas por 18 horas a 37 °C e a cor foi desenvolvida pela adição de 50 µL de Fast Garnet a 0,1%. A absorbância foi analisada espectrofotometricamente a 510 nm. Testes estatísticos (t-test) foram realizados para se determinar diferenças significativas entre as absorbâncias dos testes e controles. A absorbância média dos grupos de CrpL [0.375 (± 0.028)] e BJcuL [0.442 (± 0.057)] foi inferior a dos controles [0.860 (±0.056)] [0.753 (± 0.058)] em placa bacteriana supragengival ($p < 0.001$). A absorbância média dos grupos de CrpL [0.471 (± 0.044)] e BJcuL [0.563 (± 0.035)] foi inferior do que os controles em dentina cariada ($p < 0.001$). A absorbância média dos grupos de CrpL [0.684 (± 0.027)] e BJcuL [0.789 (± 0.046)] foi similar aos controles em cimento cariado, não apresentando diferença significativa.

Conclui-se que a CrpL e BJcuL pode inibir a atividade proteolítica presente em amostras humanas de placa bacteriana supragengival e cárie de dentina.

Lectins are polyvalent carbohydrate-binding proteins which agglutinate red blood cells. Identified in plants and animals, have also been found in snake venoms. The purpose of this study was to measure inhibition of proteolytic activity in supragingival plaque, coronal and root dentinal caries samples by CrpL e BJcuL. A standardized excavator (1 mg wet weight) was used to collect the samples (30 – supragingival plaque; 30 – coronal caries; 30 – root caries) which were placed in 2 mL of a buffering solution (pH 7,2). The samples were vortexed for 30 seconds and 250 μ L were added to: A) 250 μ L CrpL 0,12% + 250 μ L BANA 1.67 mmol/L + 250 μ L distilled water; B) 250 μ L BJcuL 0,12% + 250 μ L BANA 1.67 mmol/L + 250 μ L distilled water; C) 250 μ L CrpL 0,12% + 250 μ L BANA 1.67 mmol/L + 250 μ L N-acetil-D-galactosamine 25 mM; D) 250 μ L BJcuL 0,12% + 250 μ L BANA 1.67 mmol/L + 250 μ L lactose 0.8 mM.

The mixtures were incubated for 18 hours at 37 °C and color was developed by the addition of 50 μ L of 0,1% Fast Garnet. The absorbance at 510 nm was recorded spectrophotometrically. Independent t-tests were employed to determine differences between mean optical densities of the experimental groups and controls.

The mean absorbance of CrpL group [0.375 ($\pm$ 0.028)] and BJcuL group [0.442 ($\pm$ 0.057)] was significantly different than 0.860 ($\pm$ 0.056) and 0.753 ($\pm$ 0.058) control groups ($p < 0.001$) in supragingival plaque samples. The mean absorbance of CrpL group [0.471 ($\pm$ 0.044)] and BJcuL group [0.563 ($\pm$ 0.035)] was significantly different than 0.860 ($\pm$ 0.056) and 0.753 ($\pm$ 0.058) control group ($p < 0.001$) in coronal caries. The mean optical density of CrpL group [0.684 ($\pm$ 0.027)] and BJcuL [0.789 ($\pm$ 0.046)] wasn't significantly different than 0.742 ($\pm$ 0.030) and 0.753 ($\pm$ 0.058) control groups. It is concluded that CrpL and BJcuL can inhibit proteolytic activity present in human supragingival plaque and coronal caries.

1.1. CÁRIE DENTAL

1.1.1. HISTÓRICO

É de consenso geral, que a cárie dental é uma das pragas mais antigas, assim como a poluição e a chuva ácida, e hoje estamos pagando um alto preço pela vida adocicada com um incremento da atividade de cárie (EDELSTEIN, 2002). Em sentido quantitativo, isso obviamente é verdadeiro, pois os dados epidemiológicos demonstram que as dietas ricas em açúcar de muitas sociedades com tecnologia avançada, podem estar diretamente associados à incidência de cáries (SODERLING, 2001); mas de acordo com LEAKE (2001) a cárie é doença extremamente antiga, talvez com um milhão de anos, como evidenciam os registros esqueléticos. Antes da Idade do Ferro, provavelmente, não mais que 2-4% dos dentes examinados apresentavam cárie, mas sua presença era disseminada geograficamente. Durante a idade do Ferro e no período romano, a cárie aumentou modestamente para cerca de 10% dos dentes examinados. Os dados de ossadas de arcadas dentárias inglesas, que são os mais intactos, indicam que a incidência de cárie permaneceu relativamente constante durante o período anglo-saxão e medieval e a seguir, aumentou drasticamente até o fim do século XVII, segundo relatos de DJURIC (2001).

Desde a antigüidade até o fim do século XVI, a mais freqüente localização das cáries tem sido na dentição permanente na junção cimento-esmalte, em geral interproximalmente ou no ângulo da linha facial (DROP, 1999) muito similar à cárie radicular, observada atualmente, sendo uma doença de idade madura. Segundo DJURIC-SREJIC (1998), os maxilares dos índios Anasazi e dos Zunis no sudoeste americano exibiam cáries oclusais e interproximais de esmalte, semelhantes às observadas nas sociedades modernas.

SPEICH (1986) relata que uma das mais importantes lições do registro histórico é que, mesmo que o nível geral de cáries tenha sido muito baixo durante os períodos anteriores ao advento do açúcar, houve casos em que a prevalência foi muito alta, não só entre as pessoas que haviam descoberto as propriedades da amilase e a atração dos alimentos pré-mastigados, como também muito antes disso. Há relato de espécime de maxilar de um hominídeo primitivo que data de 200.000-500.000 anos que tinha lesões cariosas em 11 dos 13 dentes superiores.

Os maxilares de crianças do período medieval incluem casos com cáries extensas, aparentemente resultantes do uso de um pedaço de favo de mel embrulhado em um tecido, usado como chupeta – um predecessor primitivo da cárie de mamadeira. Segundo SHUSTERMAN (1994), não somos os primeiros de uma distribuição dicotômica de cárie, ou da polarização, como foi chamada por outros.

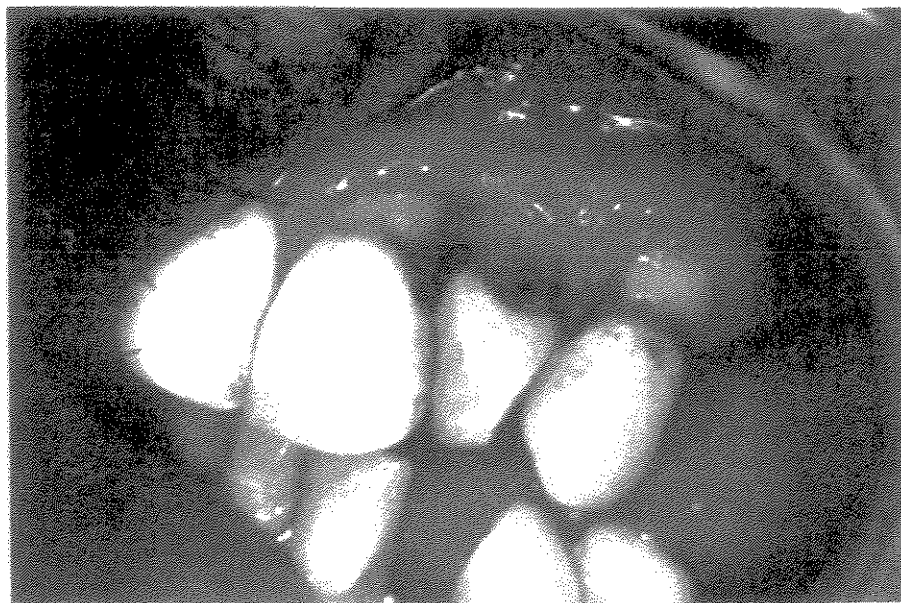


Figura 1 – Cárie de superfície radicular, exposta após doença periodontal.
(LASCALA, 1997)

Os padrões de saúde bucal no Brasil são balizados por dois grandes estudos epidemiológicos realizados ao alcance nacional e limitados à zona urbana. O primeiro foi realizado pelo Ministério da Saúde (1986) com o apoio direto do IPEA, e o segundo foi feito pelo SESI – Serviço Social da Indústria datado de 1996 e com recursos fomentados pelo Ministério da Saúde.

A maior parte das doenças da cavidade oral pode ser responsabilizada por bactérias e fungos, sendo que a transição entre a saúde e a doença está associada com as mudanças em composição e metabólicas das bactérias que formam biofilmes e que colonizam os tecidos duros e moles da cavidade oral. Mais especificadamente, o desenvolvimento da cárie dental está diretamente correlacionado com repetidos ciclos de acidificação da placa bacteriana, com a emergência de bactérias acidúricas às expensas das bactérias pouco acidogênicas e pouco ácido-tolerantes (SHORE et al., 2001).

Desde que o *Streptococcus mutans* é etiologicalamente o agente mais comum associado ao processo de cárie dental, ele passa a ser colocado como um paradigma. *Streptococcus mutans* adere a superfície dental e se acumula em um número suficiente para ocasionar a doença. Apesar das bactérias orais terem a habilidade de interagir com a superfície dentária através de uma variedade de mecanismos, a alta afinidade da adesão é acompanhada por uma adesão ancorada à superfície por adesinas, como a SpaP proteína (LI, 2001), com ligação facilitada da bactéria aos constituintes da película do esmalte. Também, os microrganismos produzem polímeros glicanos insolúveis, através da ação de glicosiltransferases (Gtfs), as quais, em conjunto com proteínas ligantes de glicanos distintas, facilitam a ligação inicial e catalisam a formação de biofilmes ricos em polissacarídeos na superfície dentária. (YAMASHITA, 1993; ELLEN; BURNE, 1996; ALDOSWORTH, 2001)

Uma vez estabelecidos, os microrganismos produzem ácidos que induzem a desmineralização do esmalte. Os *Streptococcus* do grupo **mutans** possuem múltiplos sistemas de alta afinidade em transporte de açúcar, um sistema glicolítico eficiente, e a habilidade de produzir polissacarídeos intra e extracelulares. Segundo HAMADA (1980), BENDER (1986), BURNE (1991), KURAMITSU (1993) e KURAMITSU (2001), relatam que o *Streptococcus* do grupo **mutans** têm a capacidade de crescer e levar o pH da placa bacteriana a níveis abaixo do crítico. De particular importância aqui é a forte evidência que o potencial cariogênico dos *Streptococcus* não é estático, devido a expressão e modulação da atividade e dos fatores envolvidos na patogênese da cárie dental.

O cerne para o início e progressão de todas as moléstias orais é a formação de biofilmes nas superfícies da cavidade oral, segundo MARSH (1995) e ROSAN

(2000). Evidências suportam a idéia que a placa dental patogênica não se forma espontaneamente, pois tem sido reconhecido o fato que a formação da placa é temporária e envolve um processo heterogêneo em relação à microbiota, na qual o crescimento desta estrutura e as mudanças ocorrem em decorrência da alteração do substrato e condições locais. (THEILADE, 1990; LI, 2000)

Diferentes locais na cavidade bucal são colonizados por populações distintas de bactérias. Todas as superfícies expostas da boca, inclusive os próprios dentes, tecidos periodontais e língua têm microrganismos específicos associados. A sensibilidade de uma espécie para um determinado nicho pode, em parte ser influenciada por especificidade de aderência a determinados substratos, especialmente no caso dos colonizadores iniciais da cavidade bucal. As bactérias que chegam posteriormente podem ser capazes de aderir não só às superfícies bucais, mas também a outras bactérias que já estão aderidas às superfícies. (WEN, 2002)

1.1.2. PLACA BACTERIANA

A placa dental ou placa bacteriana é um agregado estruturado e não calcificado de microrganismos, contidos numa matriz orgânica constituída por polímeros bacterianos e por substâncias da saliva e da dieta do hospedeiro (GIBBONS, 1975; LAIRD, 1983; FITZGERALD, 1985; BOWDEN, 1998; PETERSON, 2002). Decorre da adesão e da multiplicação de bactérias na superfície dental e, como qualquer ecossistema, é essencialmente dinâmica. Nela coexistem, basicamente, interações

entre microrganismos comensais entre si e com componentes abióticos, tais como dentes, saliva, sulco e fluido gengival. (ADDY & cols., 1992; MARSH & BRADSHAW 1995; GAO, 2001)



Figura 2 – Presença de estado inflamatório gengival, causada por placa bacteriana e cáries. (LASCALA, 1997)

A aderência bacteriana ao esmalte dental é mediada por uma fina camada orgânica acelular denominada película adquirida, formada pela adsorção seletiva de certos componentes salivares do esmalte (GIBBONS & cols., 1985; BOWEN & cols. 1991; BRAILSFORD, 2001); seus principais componentes são glicoproteínas, lisozima, amilase, imunoglobulinas, albumina, proteínas ricas em prolina, tirosina e histidina (SONJU, 1988; BURNE, 1997; PEARCE, 2002). Devido a sua natureza permanentemente seletiva limitar o transporte de íons para dentro e para fora dos tecidos duros do dente, a película pode ter uma função modificadora importante na lesão de cárie (THEILADE, 1990; NGUYEN, 2002). Desta forma, foi mostrado que :

presença de uma película inibe a desmineralização da superfície do esmalte *in vitro*. A composição da película recebeu muita atenção devido à sua função potencial determinante da microbiota inicial. Conseqüentemente têm-se questionado se as características da superfície dos materiais pode influenciar na composição dos aminoácidos da película, desta forma modificar o número de locais de adsorção potencial para diferentes espécies bacterianas. (ÖSTE, 1981; MARTINS, 2001)

Diversas interações físico químicas estão envolvidas no processo inicial da aderência bacteriana à película adquirida, com a presença de forças de diferentes magnitudes (ADDY & cols., 1992; ELLEN, 1997). As forças de repulsão e atração entre as superfícies que se aproximam variam com a distância da separação de tal maneira que as superfícies até uma certa distância se atraem e a outras distâncias se repelem. O nível de energia que promove interações de superfície a superfície ocorre a distâncias de mais ou menos 100 a 200 Angstroms, esta distância permite a estabilização inicial entre duas superfícies, mas as forças envolvidas podem não ser adequadas para manter um contato permanente. (DEMUTH & cols., 1990; XIE, 2000)

Se uma superfície bacteriana contendo átomos de hidrogênio ligados a um átomo eletronegativo (oxigênio ou nitrogênio), se aproxima de uma segunda superfície contendo um átomo eletronegativo, então pode ocorrer uma ligação de hidrogênio entre essas superfícies. Uma ligação única de hidrogênio é relativamente fraca, mas geralmente a natureza repetitiva das unidades que interagem, permite a formação de ligações múltiplas de hidrogênio, conferindo uma interação mais forte entre as duas superfícies. Os polissacarídeos sintetizados pelas bactérias orais podem se ligar

através de ligações de hidrogênio a qualquer radical de hidrogênio ou oxigênio da película adquirida. (PEARCE, 1991; AMANO, 1999)

As pontes de cálcio e hidrogênio podem ser responsáveis pelo contato inicial das várias bactérias orais com as superfícies dos dentes, mas existem outras interações adesivas específicas que explicam a teoria de formação da placa bacteriana: adesão célula-substrato, adesão homotípica célula-célula e adesão heterotípica célula-célula. (VAN HOUTE, 1994; KATO, 2002)

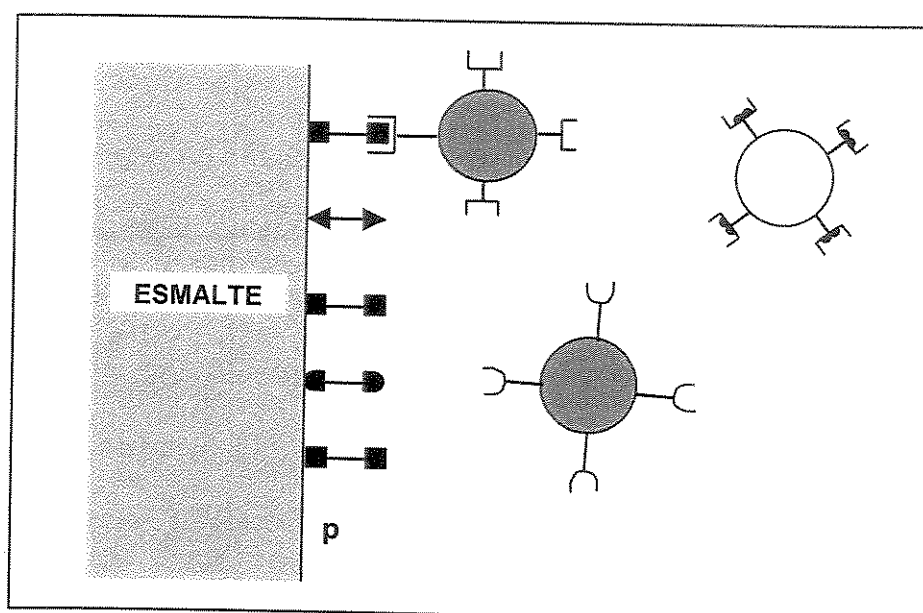


Figura 3 - Princípio da aderência seletiva da bactéria ao esmalte. Aderência bem sucedida é obtida quando as características da superfície de uma bactéria combinam com um componente da película (P). (THYLSTRUP & FEJERSKOV, 1995)

Neste sentido, a expressão e modulação dos fatores envolvendo a patogênese é fortemente dependente das condições ambientais. A diferente expressão desta virulência está centrada na habilidade dos microrganismos acumularem em significativo número da placa dental patogênica. (LI, 2001)

Um conceito crítico é que pode-se prever que a viabilidade dos receptores da placa mudam-se continuamente, assim como os constituintes da placa tornam-se enzimaticamente modificados. Isto poderia ser o resultado por exemplo de incorporação na película do dente de enzimas de síntese de glicanos capazes de produzir adesinas para os *Streptococcus mutans* e outras bactérias da placa (ROLLA et al., 1983; SHILLING and BOWEN, 1992; QUIVEY, 2001). Por sua vez, a modulação da apresentação de múltiplas adesinas por bactérias da placa madura pode ser ocorrência central no estabelecimento e persistência do biofilme oral.

HASHIZUME, SHINADA, YAMASHITA and KAWAGUCHI (2001), através de estudos da evolução morfológica da colonização do *Streptococcus mutans* na superfície do esmalte, sugeriram que os diferentes arranjos espaciais de formação de colônias pode influenciar os níveis de desmineralização neste tecido.

A alta afinidade do sistema de fosfotransferase (PTS) é estabelecida como o maior contribuinte na habilidade oral dos *Streptococcus* em metabolizar múltiplos açúcares em concentrações micromolares (VADEBONCOEUR and PELLETIER, 1997). Este sistema é central na aquisição de fonte de energia para os *Streptococcus mutans* durante limitação de nutrientes, e existem várias razões para suspeitar que PTS regula a modulação das características fenotípicas da placa com *Streptococcus*. Está bem estabelecido que a Enzima I, Hpr, e os componentes específicos PTS de açúcares da membrana e citoplasmáticos regulam a ligação entre as bactérias Gram positivas, incluindo *Streptococcus mutans*.

SPATAFORA et al. (1995) e BURNE et al. (1996) demonstraram que a acumulação de polissacarídeo intracelular, é um dos contribuintes para o mecanismo

de formação de cáries. WEXLER et. al. (1993) e VAN LOVEREN (2001) referiam-se à importância da fonte de carboidratos, pH como grandes influenciadores no mecanismo de transcrição dos genes *gtfBC*, *fff*, e *fruA*. BURNE et al. (1995) e GAO (2000) demonstraram o diferente controle genético entre a frutossiltransferase e produção de frutana hidrolase com diferentes formas de regulação.

Na virulência da placa bacteriana dois grandes aspectos são pertinentes: o primeiro que a placa bacteriana difere na capacidade constitucional de resistir ao ataque ácido bem como de providenciar diferentemente a queda de pH que provém do excesso de carboidratos, crescer em baixo pH, e fermentar em baixo pH. BENDER et al. (1986), BENDER & MARQUIS (1987) e PATEL (2000) demonstraram fortemente que espécies cariogênicas como *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei* podem chegar a valores terminais em culturas de pH abaixo de 4.0, enquanto microrganismos menos cariogênicos tem parada de crescimento em torno de 5.0.

GIBBONS & Van HOUTE (1980) e Van ROUTE (1983) postularam que algum sistema de reconhecimento, o qual opera no âmbito molecular, deve ser responsável pelo mecanismo de adesão entre as bactérias orais e a superfície dentária. Elas especularam que este fenômeno é proveniente de interações do tipo lectina, que envolve a ligação firme do resíduo de carboidrato em superfície, com a proteína complementar (adesina) numa segunda superfície. Ela é caracterizada por alto grau de especificidade, a qual reside primordialmente no resíduo de carboidrato.

Durante o desenvolvimento da placa bacteriana, a biomassa aumenta e as células tornam-se parte da matriz de biopolímeros, normalmente composta por carboidratos, ácido lipoteicoico e proteína. A natureza e o montante da matriz

extracelular e da biomassa poderia influenciar a retenção celular durante a maturação do biofilme. É de comum acordo que a matriz extracelular da placa dental contém alta quantidade de glucanos (BOWDEN & LI, 1997; YEUNG, 1999), sendo derivada predominantemente da atividade da glicosiltransferases e frutossiltransferases dos *Streptococcus mutans* em presença de sacarose. O significado da produção do polímero na colonização e retenção das células do biofilme é suportado por experimentos com sistemas de modelo animal e estudos com humanos que demonstraram intensa colonização em presença de sacarose. (BOWDEN, 1995; SWINBUM, 2001)

Os primeiros colonizadores da superfície dentária, conforme diversas observações, são os *Streptococcus*, particularmente *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Actinomyces spp*, *Neisseria spp*. (NYVAD, 1990; NYVAD, 1993; KIDD, 2002)

Subseqüentemente, bactérias dessas mesmas espécies ou de espécies diferentes são capazes de aderir não somente à película, mas também às pioneiras, constituindo as coagregações bacterianas. Posteriormente, as células se multiplicam sobre a superfície dental, formando microcolônias particularmente em regiões dentais mais protegidas das múltiplas pressões do meio ambiente, a colonização resulta em biomassa microbiana confluenta. Desta forma, a placa desenvolve-se de maneira ordenada, com concomitante aumento na diversidade da sua constituição bacteriana. (MARSH, 1992; MARCHANT, 2001)

A composição final da placa, em determinado sítio, é influenciada por condições ambientais tais como temperatura, pH, potencial de óxido redução, suprimento de nutrientes essenciais e relações intermicrobianas (MARSH, 1995;

CHOO, 2001). Uma vez estabelecida, a composição da placa bacteriana tende a permanecer relativamente estável, embora possam ocorrer variações em diferentes regiões da boca e da superfície dental. Em termos gerais, os dentes inferiores sofrem maior acúmulo de placa e as fissuras dentais são colonizadas predominantemente por *Streptococcus*, enquanto que os *Streptococcus* e *Actinomyces* são os mais numerosos nas regiões proximais. (Van HOUTE & cols., 1994; CASAMASSIMO, 2001)

O centro inicial e progressivo de todas as moléstias orais é a formação de biofilmes nas superfícies da cavidade oral (MARSH & BRADSHAW, 1995). Evidência corrente suporta a idéia de que a placa dental patogênica não se forma espontaneamente. Entretanto, tem sido reconhecido que a formação da placa é um processo temporariamente e espacialmente heterogêneo, no qual a placa cariogênica cresce e muda em função da resposta a uma pressão ambiente (THEILADE, 1990; BJORNDA, 2000). Macromoléculas são continuamente depositadas no biofilme e este produz as suas próprias macromoléculas. A atividade metabólica, especialmente proteases e glicosidades, indubitavelmente ditam a viabilidade dos receptores e então, poderiam governar o recrutamento de bactérias da placa, ou mediar a sucessão da microbiota. (SOUZA, 2001)

Na ausência de adequada higiene oral, a biomassa bacteriana evolui, em poucos dias, para o processo de maturação, do qual pode resultar ruptura da homeostase, aumentando o risco de doenças infecciosas endógenas orais, tais como a cárie, gengivite e periodontite. (NEWMAN, 1996; BELTZ, 1999)

Apesar da escovação dental ser método satisfatório para o controle da placa, existem condições que a tornam insuficiente, primariamente por depender da habilidade e da motivação individual como, também, da adequada posição dos dentes na arcada; além disso, certos sítios, como as fissuras oclusais e as áreas interproximais, são inacessíveis às cerdas da escova, mesmo quando adequadamente utilizada. (ADDY, 1992; IWETMAN, 2002)

Outros métodos autoaplicáveis empregados para auxiliar a remoção de placa em regiões interdentais incluem o fio dental e as escovas interdentais. No entanto sua eficiência também é limitada aos vários fatores apontados com relação ao uso da escova dental. Assim, a maior efetividade das práticas mecânicas de higiene oral depende mais da pesquisa de melhores condições para aprimorar o desempenho individual no aperfeiçoamento dos instrumentos empregados nessas técnicas. (MARSH & cols., 1997; HORNICK, 2002)

Devido a essas limitações, tem sido proposta a incorporação de agentes químicos com atividade antiplaca ou antimicrobiana, a produtos utilizados na higiene oral, como método profilático complementar. (MARSH, 1992; STOOKEY, 2000)

A adição de agentes quelantes, tais como o EDTA e o fitato, os quais se ligam especificadamente a cationes divalentes, causa desagregação da placa *in vitro* e *in vivo*. Este fenômeno tem sido melhor estudado utilizando-se sistemas de agregação salivar para *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguis*. A saliva contém glicoproteínas de alto peso molecular, as quais aglutinam tanto *Streptococcus mitis* quanto *Streptococcus sanguis in vitro*. A adição de EDTA inibe a agregação de qualquer um dos microrganismos neste sistema salivar. A adição de concentrações

similares de EDTA à placa promove sua dispersão e resulta na extração de uma glicoproteína. (NYVAD, 1989; WENNSTROM, 2002)

O conhecimento dos mecanismos de adesão inicial à superfície dental permitem afirmar que existe a possibilidade de que as doenças bucais mediadas por esta estrutura possam ser controladas por meio do bloqueio seletivo desse processo. Assim, segundo MARSH (1992) e SHEIHAM (2000), o controle da placa pode ser alcançado por agentes químicos que removam microrganismos aderidos ou previnam a sua colonização.

Não obstante a ampla discussão sobre a atividade antimicrobiana ou antiplaca de diversas substâncias químicas, poucas são as pesquisas que analisaram sua influência na aderência bacteriana a película adquirida e as alterações que poderiam induzir na ultraestrutura dos microrganismos envolvidos, além do que ainda são restritas as substâncias usadas para controle químico da placa. (Ten CATE, 1997 e MATTHIJI, 2002)

1.1.3. MECANISMO DE DESTRUIÇÃO DE TECIDO DENTÁRIO MEDIADO POR BACTÉRIAS ORAIS

Atenção considerável tem sido dada à caracterização de microrganismos que produzam enzimas ou produtos tóxicos que possam ser responsáveis pela destruição de tecido dentário. Estudos iniciais de toda a placa demonstram que várias enzimas são capazes de destruir os principais componentes do tecido conjuntivo principal e tecido dentário. Além disso, foram encontradas bactérias específicas que produzem uma variedade de outras substâncias (BERG, 2000). Essas enzimas ou outros produtos

potencialmente tóxicos podem ser divididos em toxinas, enzimas e produtos metabólicos. (LISTGARTEN, 1997)

As toxinas são, tradicionalmente, divididas em exotoxinas e endotoxinas. Exotoxinas são proteínas liberadas pelos microrganismo no meio ambiente, causando dano tecidual direto. Diferentes exotoxinas que têm por alvo células específicas de tecido, têm sido isoladas, como as epiteliotoxinas, diretamente contra células epiteliais e leucotoxinas, contra polimorfonucleares. Endotoxinas são lipopolissacarídeos, componentes estruturais de bactérias gram-negativas e são liberadas após a lise bacteriana. (KLEIN, 1999)

Muitas enzimas de origem bacteriana estão descritas e caracterizadas, principalmente as proteases (como a collagenase, hialuronidase e condroitinsulfatase). Essas proteases podem facilitar a penetração bacteriana no tecido dentário e periodontal, por meio da eliminação de barreiras estruturais importantes. Este processo invasivo também pode ser facilitado pela capacidade fibrinolítica de algumas bactérias. Outras enzimas que são relatadas, apresentam implicações patogênicas importantes, pois são fosfatases ácida e alcalina, fosfolipases e aminopeptidases. (RODRIGUES-MIRO, 1989)

Também considerados como contribuintes de destruição tecidual dentária estão incluídos os produtos finais do metabolismo bacteriano, como compostos sulfúricos voláteis, indol, ácidos graxos e poliaminas, além de produtos fermentativos. (KLETER, 1998)

Não há como deixar em segundo plano o relato de KENNEDY (1998), que afirma que a saliva é conhecida por conter inibidores de protease incluindo as

cistatinas, o que induz a considerar que, habitualmente, há equilíbrio entre a atividade das proteases e inibidores de proteases na cavidade oral.

O mecanismo de desmineralização tem sido amplamente estudado (ARENDS & CHRISTOFFERSEN, 1986; ARENDS, 1992; ZHANG, 2000). Parece consenso que a desmineralização é um processo de difusão, com a dissolução, passo a passo, da hidroxiapatita e dentina. (VOGEL, 1998; Ten CATE, 2001)

A degradação da matriz orgânica é facilitada pela atividade de proteinases extracelulares (SIMMER & FINCHAM, 1995) que apresentam uma faixa de pH ótimo de 6,0 a 7,5, segundo SIMMER (1998).

Com o crescimento de informações referentes aos perfis enzimáticos da placa bacteriana, metodologias para o diagnóstico enzimático foram desenvolvidas para identificação de culturas puras provenientes da placa. (FEITOSA, 1993)

Estes ensaios enzimáticos permitem uma rápida e segura identificação dos Bacteróides negro-pigmentados (BPB), porque somente o *B. gingivalis* dos BPB humano dá reação positiva semelhante à reação da tripsina (LOESCHE, 1986). Os ensaios enzimáticos podem também ser usados para distinguir o *A. actinomycetemcomitans* de outras espécies parecidas; o *B. forsythus* pode também ser distinguido de outros bastonetes anaeróbios Gram-negativos, quando possuidor de um perfil enzimático específico. O *B. forsythus*, *B. gingivalis* e a pequena espiroqueta *Treponema denticola* e as espécies *Capnocytophaga* têm em comum a enzima semelhantes à tripsina. A atividade desta enzima é medida com a hidrólise do substrato incolor N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida (BANA). Quando a hidrólise se realiza, libera o cromóforo betanaftilamida, que se torna laranja avermelhado quando uma gota de um corante chamado Fast Garnet é adicionada à solução. LOESCHE (1987) propôs a

utilização da reação de BANA nas amostras de placas subgengivais e supragengivais para detectar qualquer dos patógenos de placa e, assim, também poder ser um indicador de moléstia periodontal. Em relação às bolsas periodontais rasas, verifica-se que apresentam 10% das reações BANA positivas, enquanto que as bolsas profundas (7 mm) apresentam 90% de reações BANA positivas. (SANNER, 1986; LOESCHE, 1997)

Estes testes para diagnosticar são, geralmente, avaliados sob os aspectos da suscetibilidade e especificidade. Especificidade refere-se à capacidade de um teste ou observação em diferenciar claramente uma doença de outra. Um teste específico é aquele no qual um resultado positivo indica que a doença é provável. Este tipo de teste é útil na confirmação de uma moléstia dental (CARRANZA, 2000). A habilidade de um teste ou observação em detectar a doença dentária quando ela está presente é denominada de suscetibilidade. Um teste é sensível quando o resultado negativo significa que a doença é improvável. (BRETZ, 1987; CARRANZA, 2000)

A probabilidade em que o resultado do teste, ou seja, a proporção de verdadeiros resultados positivos e verdadeiros resultados negativos combinados, corresponda ao estado da doença é o valor de predicabilidade. Com a utilização de testes de diagnóstico com alto valor prognóstico pode-se determinar quais os pacientes com ótima saúde gengival. (CARRANZA, 2000)

Segundo LOESCHE & GIORDANO (1990), LOESCHE (1992), e DeBOEVER (1994), o teste BANA apresenta alta sensibilidade, de 90 – 96%, especificidade de 83 – 90% e valor de predicabilidade de 92 a 98%.

1.1.4. LECTINAS

BOYD & SHARPLEIGH (1954) designaram o termo LECTINA às proteínas que possuem capacidade de ligação seletiva ou de escolha de açúcares particulares. Inicialmente isoladas de plantas, em especial sementes, foram isoladas de vários organismos animais, sendo que algumas ocorrem na superfície das células estando envolvidas no reconhecimento célula-célula. Possuem a capacidade de aglutinação, precipitação de polissacarídeos e glicoproteínas. (SHARON & LIS, 1993)

Devido a capacidade de ligação reversível com carboidratos o uso das lectinas com interesse biológico têm aumentado. Segundo SINGH & cols. (1999), estas lectinas possuem uma ou mais regiões moleculares ligantes de carboidratos. Em laboratório clínico, lectinas purificadas são reagentes úteis para detectar e separar glicoproteínas com diferentes porções de oligossacarídeos.

Uma analogia de função destas lectinas permite perceber que o resíduo de ácido siálico (Neu5Ac) situado no fim da cadeia de oligossacarídeo de muitas glicoproteínas do plasma protege as proteínas de degradação no fígado. A ceruloplasmina, uma glicoproteína, possui muitas cadeias de oligossacarídeo finalizadas em ácido siálico. A remoção do resíduo de ácido siálico pela enzima sialidase é um caminho que o organismo usa para marcar velhas proteínas para destruição e renovação. A membrana plasmática dos hepatócitos tem moléculas de lectina que são denominadas de receptores de asialoglicoproteínas que de uma forma característica ligam cadeias de oligossacarídeos com resíduos de galactose (NELSON & COX, 2000). A remoção de eritrócitos velhos da circulação sanguínea também

obedece a sistemas de reconhecimento. Os eritrócitos jovens possuem uma quantidade de glicoproteínas com cadeias de oligossacarídeos e resíduos terminais de ácido siálico. Quando este resíduo é removido e este eritrócito é reintegrado à circulação sangüínea, este é rapidamente retirado para destruição. (APLIN, 1998)

Em plantas, as lectinas estão, geralmente, distribuídas por todo vegetal, onde têm sido purificadas de folhas, frutos, raízes, caules e flores, mas em maior concentração nas sementes das plantas (PUSZTAI, 1991). A síntese de lectinas, em muitas plantas, inicia-se logo após a florescência e são acumuladas como proteínas estoque nas sementes, onde localizam, via de regra, nos corpos protéicos. (GREENWOOD et al., 1986)

Uma ocorrência de forma ampla destas lectinas em diferentes espécies mostra o grau de importância na natureza, segundo PUSZTAI (1991).

A família que possui o maior número de lectinas isoladas é a família *Leguminosae*. Cerca de 80 lectinas distribuídas em diferentes sub-famílias e tribos já foram caracterizadas e purificadas. Uma vez que as lectinas das leguminosas compartilham de características estruturais, como seqüência de a.a., estrutura secundária e conformação tridimensional das unidades estruturais, sugere-se que esta família de lectinas tenha evoluído de um ancestral comum. (CAVADA, 1997)

A família *Leguminosae* compreende 650 gêneros e, aproximadamente, 18.000 espécies e é uma das três maiores famílias entre as angiospermas, depois das *Compositae* e *Orchiodaceae*. Pelo fato desta família prover ampla variedade de fontes de alimento, constitui-se numa das mais importantes do ponto de vista econômico.

Podem ser utilizadas, também, como plantas forrageiras e na produção de madeira em partes temperadas e tropicais do mundo. (HEYWOOD, 1971)

Esta família Leguminosae pode ser sub-dividida em três sub-famílias: *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* e *Papilionoideae* (DICKISON, 1981). Em especial, o gênero *Crotalaria* é composto por espécies que se distribuem amplamente pelos Continentes Asiático, Africano e Americano.

As lectinas também foram isoladas de organismos animais, desde invertebrados até vertebrados, sendo que algumas ocorrem na superfície celular, estando envolvidas no reconhecimento célula a célula. (SHARON & LIS, 1993)

As enterobactérias possuem lectinas essenciais para sua adesão ao epitélio intestinal, em invertebrados são encontradas na hemolinfa e contribuem na resistência a infecções. Em organismos mais complexos, as lectinas são produzidas na forma solúvel ou na forma ligada à membrana. (ZATTA & CUMMINGE, 1991)

Usualmente, as lectinas consistem de duas a quatro subunidades. Cada subunidade tem massa molecular variando entre 14 e 30 kDa e possui sítio de ligação para carboidratos. (SHARON, 1993)

Essa mistura complexa de peptídeos ativos e proteínas presentes no veneno das serpentes, três grupos se destacam: as proteases, as disintegrinas e as proteínas relacionadas com as lectinas tipo C (CLPe). (KINI & EVANS, 1992)

Os sítios para ligação de carboidratos reconhecem e ajustam-se de acordo com o modelo chave e fechadura, através de um complexo sistema de ligação de hidrogênio. QUIOCHO (1996) estabeleceu que a formação do complexo carboidrato-

proteína envolve o deslocamento da molécula de água associada com o grupo polar da proteína e em torno do carboidrato altamente polar, com o estabelecimento de novas pontes de hidrogênio; essas últimas ligações e forças de Van der Waals são dominantes na estabilização da ligação.

As lectinas isoladas de animais foram divididas em dois grupos principais quanto ao seu requerimento de cálcio para a atividade de ligação a carboidratos: lectinas tipo C, requerem íons Ca^{2+} para sua atividade, seus resíduos de cisteína estão ligados formando pontes dissulfeto, possuem solubilidade variável e são localizadas principalmente no ambiente extracelular; e as lectinas do tipo S, que não requerem Ca^{2+} para sua atividade, as cisteínas encontram-se como grupos tióis livres, são solúveis em tampão, sendo localizados tanto extracelularmente como intracelularmente e apresentam maior especificidade para açúcares que contenham β -galactorídeos. (DRICKAMER, 1988)

Nas lectinas tipo C, o CRD é caracterizado por domínio constituído de cerca de 100 a 130 resíduos de aminoácidos. Este CRD – tipo C foi identificado em várias proteínas ligantes de carboidratos, por meio de um grupo de resíduos invariantes que se localizam em posições distintas, dependendo da proteína, sendo que, em média, 15 resíduos são conservados e estão nas mesmas posições relativas. (DRICKAMER, 1988)

Em microbiologia, as lectinas têm assumido importante papel no estudo das superfícies celulares microbianas e glicoconjugadas capazes de servir como receptores para lectinas (SLIFKIN, 1990). Estes incluem peptidoglicanas, ácidos teicóicos, ácidos

lipoteicóicos, glicolipídeos, lipopolissacarídeos, sendo que teoricamente, qualquer glicoconjugado pode servir como receptor.

1.1.4.1. Lectinas e a Cavidade Oral

Segundo KOLENBRANDER (1993), praticamente todas as bactérias orais exibem coagregação, reconhecimento célula-célula de tipos geneticamente diferentes. Muitas das interações específicas de aderência entre bactérias da placa bacteriana oral humana aparentam ser mediadas por lectinas. Uma adesina lactose sensível têm sido isolada da *Prevotella loescheii* PK1295, e exibe propriedades de aderência em todas as células. Outras adesinas tem sido identificadas com conseqüente clonagem e seqüenciamento dos genes correspondentes. A adesina do *Streptococcus sanguis* é uma lipoproteína que parece ter dupla função de reconhecimento de ambos os receptores bacterianos e na saliva humana. A coagregação oferece explicação para a temporária agregação da placa bacteriana e reconhecimento de superfície de mucosa. Colonizadores precoces da superfície dentária coagregam-se, mas com muitas exceções os colonizadores precoces não reconhecem os colonizadores tardios indicando alto grau de especificidade de coagregação entre as diferentes populações bacterianas.

Segundo NYVAD (1987), a colonização microbiana da superfície dentária pelos *Streptococcus* do grupo *viridans* e *Actinomyces* é certa do envolvimento de lectinas mediando a adesão bacteriana. Têm sido observadas previamente coagregação lactose sensitivas entre certos *Streptococcus* e *Actinomyces naeslundii* e coagregações GalNAc (CISAR, 1986). Este tipo de coagregação é

mediada pelas interações de receptor de lectina envolvendo Gal- e adesinas GalNAc-reativas associadas com um tipo 2 de fímbria do *Actinomyces naeslundii*, GalNAc adesinas reativas de certos *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus gordonii*, e receptores complementares de muitos outros *Streptococcus* do grupo *viridans*. (HUS, 1994)

As interações mediadas pelas lectinas, entre alguns grupos de microrganismos orais (CISAR & cols., 1997), serve de importante papel na colonização da superfície dentária, sendo que JORGE (1998) afirma que alguns tipos de lectinas vegetais possuem a capacidade de inibir crescimento microbiano e atividade proteolítica.

GIBBONS & DANKERS (1981) e GIBBONS & DANKERS (1982) descreveram as interações do tipo lectina que alguns alimentos apresentam com soro de coelho, saliva humana e células de *Streptococcus mutans*. Verificou-se que os experimentos de adsorção indicavam que um componente do extrato da banana é responsável pela inibição estreptocócica. Um pré tratamento de saliva-hidroxiapatita com aglutinina de soja tem um pequeno efeito na inibição da adsorção das células de *Streptococcus mutans*.

A importância deste estudo decorre do fato que as pesquisas tentando analisar a influência das lectinas vegetais e ofídicas sobre a microbiota oral cariogênica e a atividade proteolítica serem escassos.

2. Objetivos

1. Analisar a influência da lectina de *Crotalaria paulina* sobre a atividade proteolítica da microbiota cariogênica em placa bacteriana supragengival, em cárie de dentina e cárie de cimento, fazendo uso do Teste BANA.
2. Analisar a influência da lectina do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* sobre a atividade proteolítica da microbiota cariogênica em placa bacteriana supragengival, em cárie de dentina e cárie de cimento, fazendo uso do Teste BANA.
3. Efetuar comparação entre a influência da lectina de *Crotalaria paulina* e a lectina do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* sobre a atividade proteolítica da microbiota cariogênica em placa bacteriana supragengival, em cárie de dentina e cárie de cimento, fazendo uso do Teste BANA.

3. Materiais e Métodos

Todos os reagentes foram de grau analítico ou HPLC. A resina para cromatografia de troca iônica foi adquirida da Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Sweden) e a coluna de fase reversa (sistema de HPLC) da Waters (EUA). Os reagentes utilizados na determinação da composição de aminoácidos foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA) e os do sequenciamento da região N-terminal da Applied Biosystems (Foster City, EUA). Os reagentes para eletroforese foram adquiridos da Bio-Rad Laboratories (Richmond, EUA) e os padrões de massas moleculares, da Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Sweden).

3.1. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA LECTINA

- **Extração da Lectina**

Sementes maduras de *Crotalaria paulina* (20 g) foram trituradas em um triturador de grãos até a obtenção de um material finamente pulverizado que foi homogeneizado em tampão glicina 0,1 M/NaCl 0,15 M, pH 2,6, permanecendo sob leve agitação por duas horas à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada a 3000 x g. por 20 minutos a 4 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi utilizado em ensaios de hemaglutinação para determinar a presença de lectinas nas sementes de *Crotalaria paulina* e na etapa seguinte do processo de extração protéica.

- **Cromatografia de troca iônica**

O material que apresentou atividade hemaglutinante foi submetido à cromatografia de troca iônica, realizada em uma coluna DEAE-Sepharose (1,8 x 27 cm), previamente equilibrada com tampão tris-HCl 0,05 M, pH 8,0. A lectina foi eluída da coluna com um gradiente linear de tris-HCl 0,05 M/0,5 M NaCl, pH 8,0, utilizando um fluxo de 24 ml/min., sendo as frações monitoradas a 280 nm. As frações obtidas foram dializadas contra água destilada, liofilizadas, utilizadas nos ensaios de hemaglutinação e submetidas à cromatografia de fase reversa.

- **Cromatografia de fase reversa (HPLC)**

O material proveniente da cromatografia de troca iônica, foi submetido a uma cromatografia de fase reversa, sistema HPLC modelo PDA/991, equipado com duas bombas Waters modelo 510. Foi usado injetor automático de amostra Waters modelo U6K e uma coluna μ -Bondapack C₁₈ (3,9 x 30 cm), equilibrada em solução de TFA 0,1% em água filtrada no sistema milli Q (solvente A). O material (500 μ g/200 μ L de TFA a 0,1%) aplicado à coluna foi eluído com gradiente de TFA 0,1% em acetonitrila (solvente B). A absorbância foi monitorada a 280 nm.

3.2. DOSAGEM DE PROTEÍNA

A concentração de proteína foi determinada de acordo com o método descrito por LOWRY et al. (1951), usando BSA como padrão. Também foram realizadas leituras a 280 nm para determinar o conteúdo de proteínas dos eluatos das colunas.

3.3. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DOS CARBOIDRATOS

O conteúdo de carboidrato da lectina purificada foi determinada pelo método do fenol-ácido sulfúrico de DUBOIS et al. (1956), usando galactose e manose como padrões.

3.4. ENSAIO DE HEMAGLUTINAÇÃO

- **Coleta e preparação dos eritrócitos**

O sangue foi coletado assepticamente e homogeneizado em igual volume de solução de Alsever (BUKANTZ et al., 1946) e centrifugado a 450 x g. por 10 minutos, à temperatura ambiente. Os eritrócitos foram lavados quatro vezes com solução NaCl 0,15 M (1:5 v/v). A tripsinização dos eritrócitos seguiu o método descrito por LIS & SHARON (1972), onde para cada 1 ml de eritrócitos lavados foram adicionados 25 ml de PBS (0,8 g de NaCl, 0,02 g de KCl, 0,17 g de Na₂HPO₄ e 0,02 g de KH₂PO₄, para 100 ml H₂O). A dez partes desta suspensão foi adicionada uma parte de solução de tripsina a 1% (p/v), deixou-se incubar a 37 °C por uma hora. Os eritrócitos tripsinizados foram, então, lavados cinco vezes com NaCl 0,15M para remoção da tripsina. Foi preparada uma suspensão a 2% (v/v) em CTBS para a realização do ensaio.

- **Determinação da atividade hemaglutinante**

Os testes de atividade hemaglutinante foram realizados em placas de microtitulação de 96 poços (Corning., USA), contendo oito fileiras de 12 poços cada, os quais foram preenchidos com 50 μ l de CTBS e, em seguida, acrescidos 100 μ l da amostra nos primeiros poços das fileiras. A amostra foi, então, diluída serialmente, com agitação e transferência de 50 μ l para o poço seguinte, até o penúltimo poço da fila. Terminadas as diluições, foram adicionados 50 μ l da suspensão de eritrócitos intactos ou tripsinados a 2% (v/v). Os últimos poços (coluna 12) continham somente suspensão e eritrócitos e foram considerados controles.

As leituras foram realizadas após uma hora de incubação da placa à temperatura ambiente e determinada a concentração mínima de CrpL que apresentava atividade hemaglutinante.

- **Ensaio de inibição por carboidrato**

Os testes para inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos foram realizados com: D-galactose, D-rafinose, D-glicose, D-sacarose, D-maltose, D-frutose, D-manose, D-galactosamina, D-lactose, L-fucose, N-acetil-D-glicosamina, D-rafinose, xylitol, manitol, L-rhaminose, xylose e as glicoproteínas asialofetúina e ovoalbumina.

Em placas de microtitulação foram adicionados aos primeiros poços das fileiras 50 μ l do carboidrato em concentrações iniciais de 100mM. As concentrações iniciais das glicoproteínas foram 250 μ g/ml. Estes foram diluídos serialmente com 50 μ l de CTBS já presente nos poços da placa. Logo após, 50 μ l da amostra foram adicionados em todos os poços para uma concentração final de 9,0 μ g/ml. As placas

foram mantidas à temperatura ambiente por 30 minutos e, em seguida, adicionou-se 50 µl de uma suspensão a 2% de eritrócitos humanos do tipo A tripsinizados. Após uma hora, à temperatura ambiente, foi determinada a menor concentração de cada carboidrato capaz de inibir a aglutinação dos eritrócitos. A coluna 12 foi considerada como controle, onde os controles negativos (sem hemaglutinação) constaram de 50 µl de solução de carboidrato e 50 µl de suspensão de eritrócitos, e os positivos (hemaglutinação) de 50 µl da lectina e 50 µl de suspensão dos eritrócitos.

- **Ensaio de Sensibilidade ao Agente Redutor**

Em placas de microtitulação, 50 µl de solução de DTT a 5 mM foi diluída de modo semelhante aos ensaios já descritos. Foram adicionados 50 µl da lectina e incubou-se por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionada à suspensão de eritrócitos humanos tipo A tripsinizados. Os controles não continham DTT.

- **Ensaio de Sensibilidade a Agentes Quelantes**

O requerimento de cátions divalentes para atividade da lectina foi investigado acrescentando-se EDTA ao sistema de hemaglutinação. Neste ensaio foi usado TBS.

Na placa de microtitulação, 50 µl de soluções de EDTA foram acrescentadas aos primeiros poços e diluídas serialmente em TBS, já presente nos poços. A lectina foi adicionada na concentração final de 9,0 µg/ml e, finalmente, foram acrescentados 50 µl de suspensão a 2% (v/v) de eritrócitos humanos tipo A tripsinizados. Os controles foram realizados com 50 µl da lectina e 50 µl de suspensão de eritrócitos, em TBS.

3.5. ENSAIO DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

Para o estudo de agregação plaquetária, células sangüíneas foram coletadas em citrato de sódio 3.8% (9:1v/v) como anticoagulante. As células vermelhas foram removidas por baixa centrifugação e o plasma rico em plaquetas foi coletado. Quando necessário, as plaquetas foram removidas e a ressuspensas em TBS, pH 7.4. A agregação plaquetária foi medida em agregômetro de dois canais (Payton Associates, Buffalo, NY). Para o PRP, o aparelho foi calibrado contra PPP, que representa 100% de agregação, determinando-se uma linha de base, com isso é possível determinar uma amplitude para o registro de agregações deste plasma. Uma suspensão de PRP (500 µl) foi mantida sob agitação constante (900 rpm) no agregômetro em cuvetas a 37 °C e, então, estimuladas com 10 µM de ADP. Após o registro da agregação estimulada por ADP, adicionou-se, a uma outra suspensão de plaquetas, 30 µg/ml da CrpL na ausência e presença de ADP.

3.6. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

O gel de poliacrilamida foi realizado segundo o método descrito por LAEMMLI (1970). Os géis de concentração e separação foram obtidos a partir de solução estoque de acrilamida a 30% e de N-N'-metileno bis-acrilamida 0,8%, preparada com água deionizada e mantida em refrigeração a 4 °C, em frasco âmbar.

O gel de concentração a 5% foi preparado em tampão Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, e o gel de separação 15%, em tampão Tris-HCl 0,3 M, pH 8,6, sendo acrescentado a ambos dodecil sulfato de sódio (SDS) a 20%. A polimerização foi conseguida pela adição de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED) e persulfato de amônio a 10% (PSA).

As amostras (10-50 µg) foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,08 M, pH 6,8, contendo 2% de SDS, 10% de glicerol e 0,1% de azul de bromofenol, sendo imersas em água em ebulição por um minuto. Como redutor foi utilizado DTT, a concentração final de 0,1 M. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,192 M e SDS 0,1%, a 100 volts durante duas horas.

Como marcadores de massa molecular foram utilizados: fosforiase (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e lactoalbumina (14,4 kDa) (Pharmacia Electrophoresis Calibration Kit LMW).

Os géis, depois de retirados das placas, foram corados com Coomassie Blue a 0,1% em ácido acético, metanol e água, na proporção de 1:4:5 (v/v/v), durante duas horas e, então, descorados em solução de ácido acético glacial, metanol e água, na proporção de 1:4:5 (v/v/v).

3.7. ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2D-PAGE)

O pré tratamento da amostra envolve solubilização, desnaturação e redução para quebrar completamente as interações. O tampão de solubilização utilizado foi: Uréia 8M, CHAPS 4%, DTT 0,05 M e Tris-HCl 0,004 M.

A 2D-PAGE envolve uma primeira separação baseada no pI das proteínas (focalização isoeletrica-IEF ou primeira dimensão) e uma segunda separação baseada na mobilidade relativa das proteínas (SDS-PAGE ou segunda dimensão).

A primeira dimensão foi feita em um gradiente não linear de pH 3-10 e a segunda dimensão foi feita em SDS-PAGE com concentração de acrilamida 12,5%. No final, as proteínas foram reveladas por coloração usando prata.

3.8. DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR RELATIVA

A massa molecular relativa de CrpL foi determinada por HPLC, utilizando uma coluna de gel filtração Protein Pak software-300, equilibrada com tampão fosfato de sódio 50 mM, 100 mM de NaCl pH 7.6, sob fluxo de 0,5 mL/min. Os seguintes marcadores de massa molecular foram utilizados: Blue Dextran (2.000 kDa), Ovalbumina (43 kDa), Anidrase carbônica (29 kDa), Tripsina Bovina (24 kDa) e Aprotinina (6,5 kDa).

3.9. ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS

O sistema utilizado foi o do Pico-Tag da Waters, onde a identificação dos aminoácidos das proteínas ou peptídeos foi feita por meio da cromatografia em HPLC do derivado fenitiocarbamil (PTC) do aminoácido, proveniente da derivatização com fenilisotiocianato dos aminoácidos, obtidos por meio da hidrólise ácida (HEINRIKSON & MEREDITH, 1984). Esta forma de cromóforo pode ser detectada a partir de 1 picomol.

- **Preparação da amostra**

Quantidades entre 0,5-10 µg de CrpL foram dissolvidas em água e acetonitrilo (1:1) (v/v) e transferidas para pequenos tubos de reação com volume máximo de 20 µl, o qual foi transferido para o frasco de reação, que possui tampa especial para a conexão com o sistema de vácuo e atmosfera de nitrogênio.

- **Hidrólise ácida**

As hidrólises foram efetuadas colocando-se no fundo do frasco de reação 100 µgI de uma solução de HCl 6 M, onde foi adicionado fenol (1 mg/ml), para evitar a formação de clorotirosina. Em seguida, foi feito vácuo próximo a 1-2 Torr até início do borbulhamento do HCl. O vácuo foi fechado e deixou-se entrar nitrogênio (SS-ultrapuro) durante cinco segundos. Estas etapas foram repetidas por três vezes, sendo, por último, feito vácuo até 1 Torr. O frasco foi fechado e removido para o forno de

hidrólise a 105 °C por 24 horas. Após esse período, os tubos de reação foram colocados a vácuo até 65 miliTorr, para a secagem das amostras hidrolisadas.

- **Derivatização**

As amostras hidrolisadas foram lavadas com 20 µl de uma solução de metanol: água: trielamina (2:2:1) (v/v). Cada tubo foi agitado, centrifugado e colocado a evaporar em vácuo até a leitura de 65 miliTorr. Este procedimento remove sais e solventes que possam estar adsorvidos nos aminoácidos.

Uma solução fresca de derivatização preparada com metanol: trielamina: água: fenilisotiocianato na relação 7:1:1:1 (v/v), foi adicionada (20 µl) a cada tubo de reação, e estes deixados à temperatura ambiente por um período de 30 minutos. Após a derivatização, as amostras foram secas a vácuo até a leitura de 50 miliTorr, para a remoção de todo o PITC. Cada amostra foi dissolvida em 50 µl de uma solução 0,4 mM de fosfato de sódio, cujo pH foi titulado a 7.4 com ácido fosfórico a 10%, sendo adicionado 5% de acetonitrila.

A análise dos PTC aminoácidos foi realizada em HPLC, usando coluna µ-Bondapak C₁₈ em cromatografia de fase reversa com um gradiente linear de 20,5 minutos de 0 a 100% de acetonitrila (60%). A identificação de cada aminoácido foi determinada em relação ao tempo de retenção e áreas dos picos de PTC aminoácidos do padrão.

3.10. SEQUENCIAMENTO AMINO TERMINAL

- **Digestão enzimática e purificação dos peptídeos**

1 mg de CrpL foi completamente reduzida com 5 mM de dithiothreitol (DTT) em tampão Tris 0,6 M, pH 8.2 (6M guanidina, 0,001 EDTA) por uma hora a 37 °C. Depois da redução, a proteína foi alquilada por uma hora à temperatura ambiente com ácido iodoacético na concentração de 11 mM. A proteína foi dessalificada sobre uma coluna de Sephadex G-25, previamente equilibrada com 1 M de ácido acético e, então, liofilizada. A proteína reduzida e carboximetilada foi digerida com tripsina (razão enzima-substrato 1:30) em 50 mM de tampão bicarbonato de amônio, pH 7.8, por quatro horas a 37 °C. A digestão foi interrompida por liofilização. Os peptídeos resultantes da digestão enzimática foram separados por fase reversa em HPLC.

- **Degradação Automática de Edman**

O sequenciador automático de proteínas e peptídeos usa a técnica de degradação de EDMAN & BEGG (1967) para remover e identificar aminoácidos a partir da porção N-terminal de um polipeptídeo. Após ativação de um filtro composto de papel e fibra de vidro, a proteína foi covalentemente unida a este suporte e, em seguida, colocado na câmara de reação. Depois de cada ciclo degradativo, o aminoácido N-terminal foi removido da cadeia polipeptídica na forma derivada de anilino-tiazolinona (ATZ). O ATZ-aminoácido foi automaticamente transferido para uma segunda câmara de reação, onde ocorreu a conversão para um derivado mais estável, na forma de feniltiohidantoína do correspondente aminoácido (PTH). O PTH-aminoácido foi

transferido para um sistema de cromatografia líquida de alta pressão, onde a identificação foi realizada em comparação a uma cromatografia de um padrão de PTH-aminoácidos. O sequenciador utilizado foi o modelo 477A, que utiliza, para a identificação dos PTH-aminoácidos, um sistema de HPLC modelo 120A, ambos da Applied Biosystem.

Reagentes e solventes são transferidos para a câmara de reação e conversão por controle automático, por meio de um micro processador, permitindo seqüências automáticas em alta sensibilidade entre 10-500 picomoles de proteína ou peptídeos. Os reagentes utilizados foram: R1, 5% fenilisotiocianato (PITC) em n-heptano; R2, 12,5% trimetilamina (TMA) em água; R3, ácido trifluoroacético (TFA), com 0.002% de ditioneitol (DTT); R4, 25% TFA em água com 0,01% DTT; R5, acetonitrila, com 0,001% DTT; S1, n-heptano; S2, etilacetato; S3, 1-clorobutano; S4, 20% acetonitrila em água.

- **Ativação do filtro**

Um filtro de fibra de vidro foi tratado com BioBrene. Esta ativação foi realizada na câmara de reação do sequenciador, onde estava programado a realizar dois ciclos de reação, para a completa ativação e eliminação do excesso de reagentes, que poderiam interferir durante as etapas da degradação de Edman. A amostra, quando adicionada ao filtro, ficou imobilizada e pronta para iniciar o sequenciamento. A capacidade máxima foi cerca de 30 µl; mas quando necessário, aplica-se maior volume e seca-se o filtro com nitrogênio após cada aplicação.

- **Ciclo de reação**

As etapas da degradação de Edman, denominadas de acoplamento, consiste na união de PITC com o aminoácido da cadeia polipeptídeo e a etapa de clivagem para a formação do ATZ aminoácido, ocorrem na câmara de reação, Que consiste de dois blocos de vidro, onde internamente está uma pequena câmara com o filtro ativado. Todas as etapas de reação ocorrem no ciclo chamado Normal-1, que tem um período de duração de 43 minutos e 32 segundos. O reagente R2 (TMA) proporciona o pH básico (9.0 – 9.5) para que o PITC acople ao aminoácido N-terminal do peptídeo. R3, que consiste de TFA, é usado para clivar o aminoácido unido ao PITC do resto da cadeia polipeptídica, produzindo o derivado anilintiazolinona (ATZ) do aminoácido. Após a etapa de clivagem a proteína foi deixada com um novo amino terminal, pronto para o próximo ciclo de degradação.

- **Ciclo de conversão**

Nessa etapa da degradação de Edman, o ATZ aminoácido é transferido da câmara de reação pelo solvente S3 para a câmara de conversão. O ATZ é um derivado instável, sendo desejável sua conversão para um isômero mais estável que é a fenitiohidantoína do correspondente aminoácido (PTH aminoácido). A câmara de conversão consiste em um tubo cônico com um volume interno de 1 ml, para onde são enviados os reagentes químicos necessários para o ciclo de conversão, sendo mantida a temperatura constante de 62 °C com período de duração de 44 minutos e 1 segundo.

- **Identificação dos PTH aminoácidos**

Após ter completado um ciclo de conversão, uma alíquota do PTH aminoácido foi transferida para o coletor de frações e pode ser monitorada para confirmar a presença de PTH-S-CMCYS (fenitioohidantoína-S-carboximetil cisteína). O restante da amostra foi injetado imediatamente no HPLC, para identificação e quantificação dos aminoácidos, que foi feita em comparação com uma análise padrão de PTH aminoácidos.

3.11. PURIFICAÇÃO DA LECTINA DE *BOTHROPS JARARACUSSU*

- **Cromatografia de Afinidade**

A lectina do veneno de *Bothrops jararacussu* (BJcuL) foi purificada por cromatografia de afinidade em galactose. Cem miligramas do veneno bruto de *Bothrops jararacussu* foram dissolvidos em 4,0 ml de tampão CTBS (Tris-Hcl 20 mM + NaCl 150 mM + CaCl₂ 5 mM, pH 7.5) e classificado por centrifugação, em centrífuga de bancada (Spin I – Incibrás) por um minuto. O veneno dissolvido e solubilizado foi aplicado em uma coluna de 2,5 ml (0,8 x 5 cm) de agarose complexada com D-galactose (Pierce, EUA), previamente equilibrada com tampão CTBS. A lectina foi eluída com lactose 0,1 M (Sigma) em CTBS. Frações de 1,5 ml foram coletadas e monitoradas a 280 nm no espectrofotômetro Shimadzu UV1201. As frações protéicas eluídas com lactose foram reunidas e dialisadas contra CTBS, TBS ou água. Após diálise, foram estocadas a -16 °C ou liofilizadas.

- **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência / Fase Reversa**

O equipamento Waters HPLC modelo PDA-991, equipado com duas bombas Waters modelo 510, injetor automático de amostra Waters modelo U6K e coluna C18 / μ -Bondapak (0,78 x 0,30 cm), foi usado para verificar a pureza do pico eluído com lactose na cromatografia de afinidade, após diálise deste com água. A cromatografia reversa usou um gradiente linear de 0 a 100% de uma solução de acetonitrila 66% em 0,1% de ácido trifluoroacético pH 2.5 (HEARN, 1987). As amostras aplicadas foram monitoradas a 280 nm e, em seguida, liofilizadas.

3.12. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A quantificação das frações protéicas foi feita de acordo com o método descrito por Lowry (LOWRY & cols., 1951; PETERSON, 1979). Uma amostra (200 μ l) de solução de proteína, convenientemente diluída, foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente com 1 ml do reagente cupro-alcalino chamado de Solução C. A Solução C é constituída de Solução A [carbonato de sódio 2% (p/v) em NaOH 0,1 N], solução B1 [sulfato de cobre 1% (p/v) em H₂O] e de Solução B2 [tartarato de sódio e potássio 2% (p/v) em H₂O] na proporção de 100:1:1(v/v), respectivamente.

À mistura acima adicionou-se 50 μ l do reagente Folin-fenol Ciocalteaus (Merck), deixou-se em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente, ao fim dos quais foi determinada a absorbância a 660 nm. A concentração de proteína foi determinada usando curva padrão de albumina bovina (Fraction V, Sigma, Co.) com concentrações variando de 0 a 400 μ g/ml.

3.13. ELETROFORESE EM SDS-PAGE

As placas de poliacrilamida foram preparadas de acordo com LAEMMLI (1970). Apresentaram gel de concentração de 5% e o gel de corrida de 15%. As placas foram preparadas utilizando-se uma solução de acrilamida estoque a 30% (Bio Rad Labs., Richmond, Cal.) e N-N-metileno-bisacrilamida a 0,8% (Bio Rad Labs. Richmond, Cal.), ambas dissolvidas em água deionizada pelo sistema Milli-Q (Millipore-Waters Co.), filtradas em papel de filtro (Whatman nº 1) e mantidas a 4 °C em frasco âmbar.

O gel de concentração a 5% foi preparado utilizando-se tampão Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, enquanto para o gel de corrida a 15% foi utilizado o tampão Tris-HCl 0,3 M, pH 8,8. A ambos os géis foram adicionados 0,1% (p/v) de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) e a polimerização concluída com 0,1% (v/v) de N-N-N-N-tetrametildiamina (TEMED) e 0,01% de persulfato de amônio. A eletroforese PAGE-SDS foi realizada em um sistema duplo de placas "SE 250 Might Small II", HOEFER.

As amostras aplicadas aos géis tiveram de 20 a 50 µg de proteínas e foram dissolvidas no tampão da amostra (Tris-HCl 0,08 M, pH 6,8, adicionando-se 2% SDS + 10% de glicerol e 1% de azul de bromofenol). Quando necessário, as amostras foram reduzidas com DTT (Sigma), numa concentração final de 0,1 M.

A eletroforese foi realizada no tampão de corrida (Tris-HCl 0,025 M; glicina 0,192 M com SDS a 0,1%, pH 8,3) à voltagem constante de 100 volts . Os seguintes marcadores de peso molecular (Pharmacia Electrophoresis Calibration Kit LMW) foram usados como padrão, fosforilase (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa),

ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e lactoalbumina (14,4 kDa).

O gel retirado do sistema de placas foi corado com solução de Coomassie Blue R-250 0,1% em ácido acético, metanol e água, na proporção de 1:4:5 (v/v), durante três horas. Em seguida, foi descorado em solução de ácido acético, metanol e água, na proporção de 1:4:5 (v/v).

Placas de SDS-PAGE contendo BJcuL foram também coradas para carboidratos com o método do ácido periódico – Reativo de Schiff (KORN& WRIGHT, 1973). Após a corrida eletroforética, o gel foi retirado do sistema de placas e fixado com ácido tricloroacético (TCA) 12,5% (v/v) por uma hora. Terminado o tempo, o gel foi lavado três vezes com água Milli Q e incubado por uma hora com ácido acético 3,0% (v/v), contendo ácido periódico 1,0% (p/v). O gel foi, então, lavado com água Milli Q e deixado descansar por uma noite, também em água. Depois desse período, o gel foi incubado em câmara fria com o reagente de Schiff por uma hora. Em seguida, foi lavado repetidamente com metabissulfito de sódio 0,5% (p/v) e mantido nesta solução.

3.14. ENSAIO DE HEMAGLUTINAÇÃO

A atividade hemaglutinante de BJcuL foi testada sobre eritrócitos intactos e sobre eritrócitos tripsinizados de porco, boi, carneiro, cavalo, rato e pato. O sangue destes animais foi colhido e mantido em solução de Alsever (2,05g de glicose, 0,80g de citrato de sódio e 0,42g de cloreto de sódio, para 100 ml de água destilada, pH 6,1 ajustado com ácido cítrico).

- **Tripsinização dos Eritrócitos**

A tripsinização dos eritrócitos seguiu o descrito por LIS & SHARON (1972). Os eritrócitos foram coletados do estoque de sangue por centrifugação a temperatura ambiente em centrífuga de mesa (Excelsa 3, Fanem S.A.) a 450 x 9 por 10 minutos. O sedimento de células (eritrócitos) foi lavado 3 a 4 vezes com NaCl 0,15 M, numa proporção de 5 ml de NaCl para cada ml de eritrócito sedimentado.

Para cada 4 ml de eritrócitos lavados foram adicionados 100 ml de PBS (0,8g de NaCl, 0,02g de KCl, 0,17g de Na_2HPO_4 e 0,02g de KH_2PO_4 , para 100 ml H_2O) resultando numa suspensão com absorvância 2,0 a 620 nm. A dez partes desta suspensão foi adicionada uma parte de solução de tripsina a 1% (p/v), deixou-se incubar a 37 °C por uma hora.

Os eritrócitos tripsinizados foram, então, lavados 4 a 5 vezes com NaCl 0,15 M para remoção da tripsina. Finalmente, foram ressuspensos em tampão (CTBS ou TBS) suficiente para uma suspensão padrão de eritrócitos a 3% (v/v). A quantidade de eritrócitos por ml na suspensão padrão foi estimada por meio de contagem em câmara de Neubauer.

- **Atividade Hemaglutinante**

Para determinação da atividade hemaglutinante da lectina do veneno de *Bothrops jararacussu* (BJcuL) foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços (Sigma Chemical Co., USA) (12 colunas, ↓, e 8 fileiras →). Primeiramente, foram adicionados aos poços 50 µl de CTBS, em seguida 50 µl da amostra (BJcuL) foram

colocados nos primeiros poços das fileiras. A amostra é então diluída serialmente, com agitação e transferência de 50 μ l para o poço seguinte até o penúltimo poço da fila. Os últimos poços não continham BJcuL, mas somente suspensão de eritrócitos e foram considerados os controles.

Terminadas as diluições, foram adicionados aos poços 50 μ l de suspensão de eritrócitos a 3% (v/v). As leituras foram realizadas após duas horas de incubação da placa à temperatura ambiente. A mínima concentração (ou maior diluição) de BJcuL que permite visualização dos eritrócitos aglutinados foi determinada.

- **Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante por Carboidratos**

Os testes para inibição da atividade hemaglutinante por diferentes carboidratos foram realizados com Lactose, Galactose, Glicose, Maltose, Frutose, Rafinose, Sacarose, Mano se, Galactosamina e Glicosamina, todos adquiridos da Sigra Co., USA. O restante dos reagentes utilizados foram todos de grau analítico.

Em placas de microtitulação (96 poços, Sigra,Co., USA) foram adicionados aos primeiros poços das fileiras 25 μ l do carboidrato em concentrações iniciais que variaram de 150 mM a 12,5 mM em CTBS. Estes foram diluídos serialmente com 25 μ l de CTBS já presente nos poços da placa. Logo após, 25 μ l de BJcuL foram adicionados em todos os poços para uma concentração final de 4,0 μ g/ml. As placas foram mantidas em repouso por cinco minutos e, em seguida, adicionou-se 50 μ l de uma suspensão a 3% (v/v) de eritrócitos tripsinizados de porco.

Após repouso das placas por duas horas à temperatura ambiente, foi determinada a menor concentração de cada carboidrato capaz de inibir a aglutinação

de eritrócitos tripsinizados de porco induzida por 4,0 µg/ml de BJcuL. Os controles negativos (sem hemaglutinação) constaram de 50 µl de solução de carboidrato e 50 µl de suspensão celular, e os positivos (hemaglutinação) de 50 µl de BJcuL e 50 µl de suspensão celular.

- **Ensaio de Requerimento de Cátions Divalentes**

O requerimento de cátions divalentes para atividade de BJcuL foi primeiramente investigada acrescentando-se EDTA ao sistema de hemaglutinação, em placas de microtitulação. Depois de verificado o requerimento, EGTA foi utilizado para verificar se a atividade de BJcuL é dependente de íons Ca^{2+} . O tampão usado nestes ensaios foi TBS.

Na placa de microtitulação 25 µl de soluções de EDTA ou EGTA foram acrescentadas aos primeiros poços e diluídas serialmente em TBS já presente nos poços. BJcuL foi adicionada para a concentração final de 4,0 µg/ml e, finalmente, foram acrescentados 50 µl de suspensão de eritrócitos tripsinizados de porco a 3% (v/v). Os controles foram realizados com 50 µl de BJcuL e 50 µl de suspensão celular, em TBS.

- **Ensaio de Sensibilidade a Agente Redutor**

Em placas de microtitulação 25 µl de solução de DTT foi diluída de modo semelhante aos ensaios já descritos. Adicionou-se, então, BJcuL para uma concentração final de 4,0 µg/ml e incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados aos poços a suspensão de eritrócitos tripsinizados de porco a 3% em CTBS. Os controles não continham DTT.

3.15. LECTINAS

As sementes de *Crotalaria Paulina* foram cedidas pelo Departamento de Plantas Fibrosas - Instituto Agronômico – Campinas. O processo descrito anteriormente de isolamento e purificação da lectina das sementes foi realizado pelo Laboratório de Química de Proteínas – Instituto de Biologia – UNICAMP.

O veneno total seco da serpente *Bothrops jararacussu* foi cedido pelo Instituto Butantã, São Paulo – SP, Brasil. O processo descrito anteriormente de isolamento e purificação da lectina da serpente foi realizado pelo Laboratório de Química de proteínas – Instituto de Biologia – UNICAMP.

3.16. DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA LECTINA SOBRE A ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DAS BACTÉRIAS ORAIS

A Metodologia (GARCIA, 1997) pode ser dividida nas seguintes fases:

3.16.1. Seleção de Pacientes

O Projeto de Pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Universidade São Francisco e todos os pacientes tomaram conhecimento da participação na pesquisa por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO).

Foram selecionados 90 pacientes para o estudo, todos com idade entre 21 a 50 anos, sendo:

- 30 pacientes com características de cavidade bucal semelhantes, ausência de cavidades de cárie, os quais foram orientados para permanecer por 48 horas sem realizar qualquer procedimento de higienização bucal, bem como evitar a ingestão de alimentos fibrosos;
- 30 pacientes com cárie ativa de dentina oclusal em segundo molar inferior, detectada visualmente e por meio de radiografias periapicais;

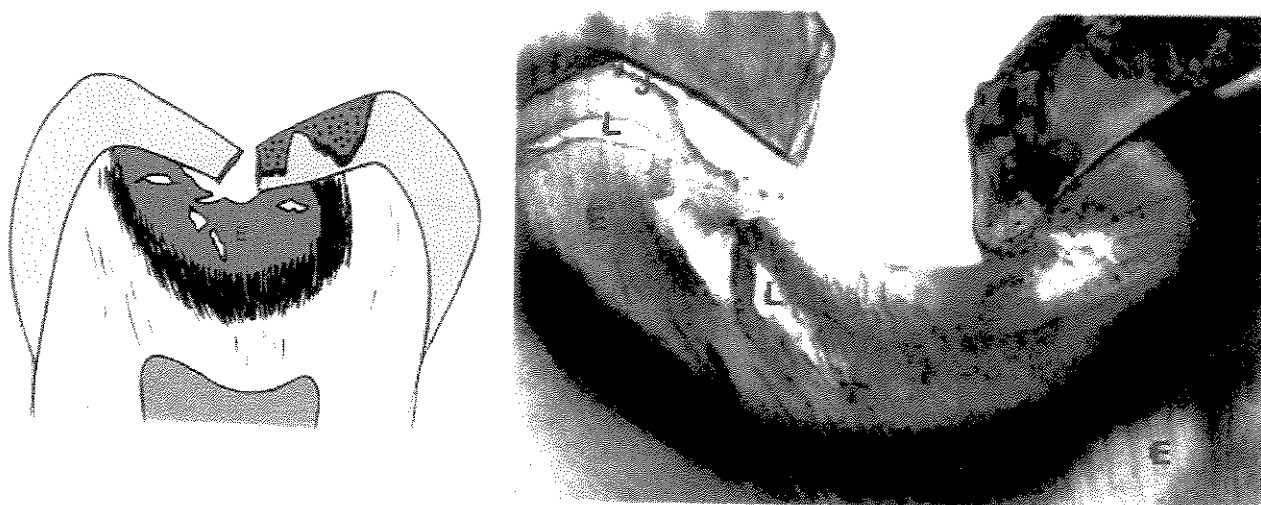


Figura 4 – Cárie de esmalte e dentina na superfície oclusal de molar inferior, destacando o socavamento do esmalte na junção amelodentinária (J) e a esclerose dentinária (E) caracterizada pelo tamponamento dos canículos dentinários. Notam-se também os focos de liquefação na dentina (L), longitudinais e transversais, e os tratos mortos (corte pelo desgaste; aumento final de $\cong 40X$). (CONSOLARO, 1996)

- 30 pacientes com cárie ativa de cimento em caninos, detectada visualmente e por meio de radiografias específicas.

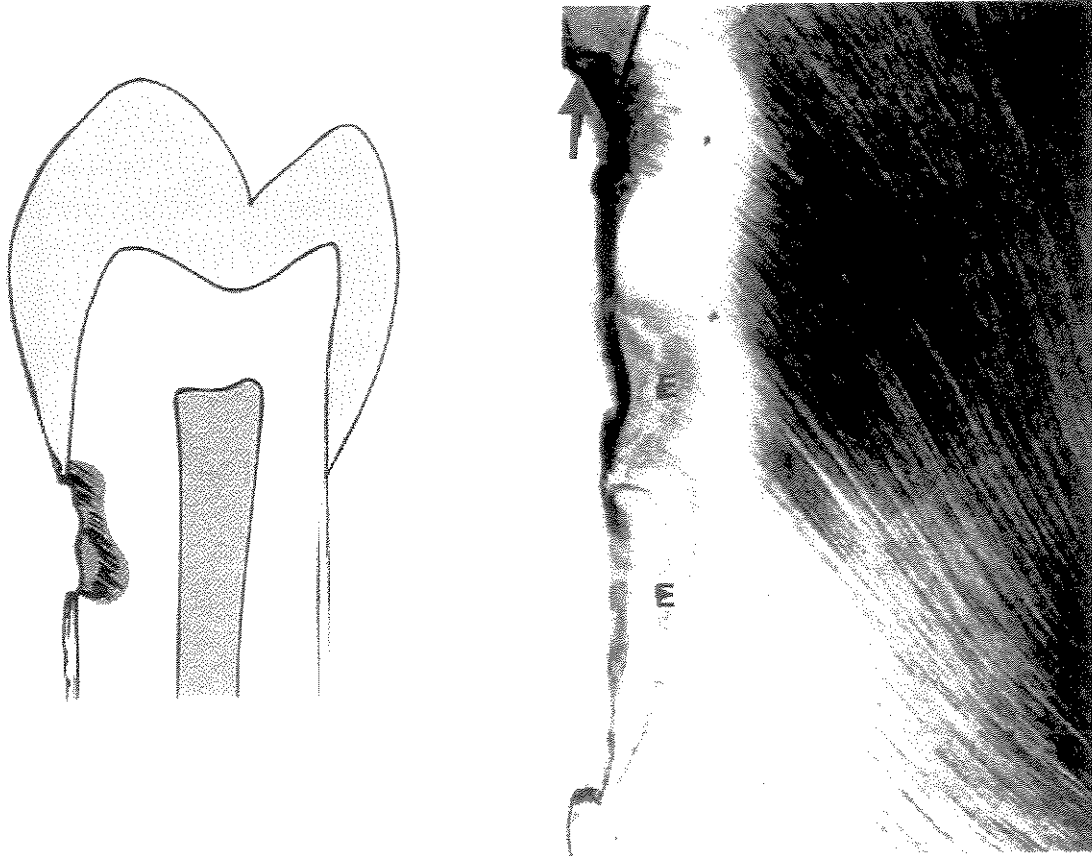


Figura 5 – Cárie de cimento em pré-molar inferior com exposição da dentina; progressão preferencialmente horizontal do processo e socavação do esmalte. Notam-se áreas de esclerose dentinária (E) e cárie de esmalte (seta) (corte por desgaste; aumento final de $\cong 160X$). (CONSOLARO, 1996)

3.16.2. Coleta do Material Biológico

Foram coletadas 30 amostras de placa bacteriana supragengival ao redor dos primeiros molares superiores com uma colher de dentina padronizada de pacientes da Clínica Odontológica – Faculdade de Odontologia – Universidade São Francisco, sendo que após a coleta os pacientes foram submetidos a uma profilaxia em toda a cavidade.

Foram coletadas 30 amostras de dentina cariada ativa do segundo molar inferior, sem envolvimento pulpar, com uma colher de dentina standartizada e 30 amostras de cárie de cimento ativa dos caninos. Após a coleta, os pacientes foram submetidos a restauração dentária com material específico para o caso.

3.16.3. Estocagem da Amostra

As amostras foram pesadas em balança analítica e conservadas em 2 ml de tampão Sorensen (pH 7.2), dispersada em vortex por 30 segundos.

3.16.4. Tratamento da Amostra

Para cada 250 μ L de amostra obtida (placa, dentina e cimento), foi desenvolvido o seguinte tratamento:

- a → Incubação em banho-maria com 250 μ L de lectina vegetal de *Crotalaria Paulina* (tampão tris-HCl 0,05 M) a 0,12% e 250 μ L de BANA 1,67 mmol/L e 250 μ L de água destilada a 37 °C por 18 horas.
- b → Incubação em banho-maria com 250 μ L de lectina do veneno da *Bothrops jararacussu* a 0,12% (tampão CTBS – tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM + CaCl₂ 5 mM, pH 7,2) e 250 μ L de BANA 1,67 mmol/L e 250 μ L de água destilada a 37 °C por 18 horas.

- c → Incubação em banho-maria com 250 μ L de lectina vegetal de *Crotalaria Paulina* (tampão tris-HCl 0,05 M) a 0,12% e 250 μ L de BANA 1,67 mmol/L e 250 μ L de N-acetil-D-galactosamina a 25 mM a 37 °C por 18 horas.
- d → Incubação em banho-maria com 250 μ L de lectina do veneno da *Bothrops jararacussu* a 0,12% (tampão CTBS – tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM + CaCl₂ 5 mM, pH 7,2) e 250 μ L de BANA 1,67 mmol/L e 250 μ L de lactose a 0,8 mM a 37 °C por 18 horas.

3.16.5. Avaliação dos Resultados

Os resultados foram avaliados a partir de parâmetros colorimétricos, pela adição de 50 μ L do Reagente Fast Garnet 0,1% após 18 horas (negativo – laranja e positivo – vermelho), sendo analisado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 510 nm.

3.16.6. Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada mediante a utilização do *software* GraphPad Prism, versão 3.02, e o teste t de student no intuito de efetuar análise comparativa entre os grupos testes e controles.

4. Resultados e Discussão

4.1. EFEITO DAS LECTINAS CrpL E BJcuL EM PLACA BACTERIANA SUPRAGENGIVAL

A absorbância média dos grupos CrpL [0.375 ($\pm$ 0.028)] e BJcuL [0.442 ($\pm$ 0.057)] foi inferior ao encontrado nos controles [0.860 ($\pm$ 0.056)] e [0.753 ($\pm$ 0.058)], respectivamente, em placa bacteriana supra gengival. Estes valores das amostras de ambas as lectinas indicam uma diferença significativa pelo teste estatístico aplicado ($p < 0.001$) (Tabela 1).

Estes resultados sugerem um efeito inibitório das lectinas BJcuL e CrpL na placa bacteriana supragengival. Uma análise comparativa quanto à eficiência média das duas lectinas não sugere diferença significativa (Figura 6).

O esmalte dental é um dos tecidos mais mineralizados conhecidos, consistindo de 96% de porção mineral e 4% de material orgânico e água. O conteúdo inorgânico do esmalte consiste de cristais de fosfato de cálcio conhecidos como hidroxiapatita, o qual é encontrado no osso, cartilagem calcificada, dentina e cimento. Vários íons como estrôncio, magnésio e fluoreto, se presentes durante a formação do esmalte, podem ser incorporados ou adsorvidos aos cristais de hidroxiapatita. A suscetibilidade destes cristais serem dissolvidos por ácido produz a teoria fundamental de formação de cárie dental. (EGLAND et al., 2001)

Apesar da maior parte do volume do esmalte ser ocupado por cristais de hidroxiapatita, uma pequena porção de material orgânico aparece entre os cristais. Este material orgânico pode ser observado cuidadosamente em secções desmineralizadas de esmalte dental. O cerne deste material consiste de uma sequência peptídica de proteína amelogenina rica em tirosina fortemente ligada ao cristal de hidroxiapatita assim como não amelogenina. Por causa do seu alto conteúdo mineral, o esmalte é considerado extremamente duro, uma propriedade necessária para suportar as forças que são aplicadas durante o seu funcionamento.(RUDNEY, 2000)

Quando uma superfície dentária é limpa apropriadamente, algum tempo depois proteínas de alta afinidade e glicoproteínas, assim como traços de produtos bacterianos, com alta afinidade pelo esmalte rapidamente adsorvem a superfície do esmalte e formam uma película muito fina.(STENUDD et al., 2001) A partir desta película envelhecida é possível estabelecer o estágio inicial de cárie, nem sempre com atividade proteolítica, uma vez que há necessidade de uma troca de microbiota para que este fenômeno se instale. (RODRIGUEZ, 1999)

A placa bacteriana é o termo aplicado para um depósito não calcificado da superfície dentária que são compostas por microrganismos embebidos em matriz formada por produtos bacterianos, constituintes salivares e componentes inorgânicos. A formação da placa bacteriana envolve uma complexa série de reações físico-químicas dependentes da adsorção dos componentes salivares e bactérias aos dentes e a acumulação de massas bacterianas através de interações coesivas e de crescimento. Apesar da deposição inicial e acumulação provavelmente ocorrer em tempo contínuo, várias fases de formação da placa bacteriana tem sido designadas para facilidade de

discussão: a) formação da película adquirida, b) ligação inicial da bactéria à película adquirida, c) acumulação de placa bacteriana em diferentes níveis.(SVENSATER, 2001)

A película adquirida é formada somente pelas proteínas que possuem a habilidade e afinidade de serem adsorvidas pelo esmalte dental. Somente as proteínas que possuem alta afinidade ou ligantes do tipo adesinas específicas para componentes da película adquirida que ocorrerão na saliva em número suficiente para serem adsorvidos. A massa de placa bacteriana cresce por deposição contínua de bactérias em um sistema altamente seletivo em relação aos nutrientes e potencial de oxigênio.(SEEMANN, 2001)

Diferentes locais na cavidade bucal são colonizados por populações distintas de bactérias. Todas as superfícies expostas da boca, inclusive os dentes, tecidos periodontais e língua, têm microrganismos específicos associados. A sensibilidade para um determinado nicho pode, em parte ser influenciada por especificidade de aderência a determinados substratos, especialmente no caso dos colonizadores iniciais da cavidade bucal. As bactérias que chegam posteriormente podem ser capazes de aderir não só às superfícies bucais, mas também a outras bactérias que já estão aderidas à superfície. A saliva habitualmente contém anticorpos IgA secretores que se ligam as bactérias na tentativa de impedir a aderência. Contudo, algumas espécies bacterianas possuem proteases IgA 1 capazes de clivar as moléculas IgA 1 para gerar fragmentos Fab e Fc. Estas proteases por si só realizam um grande papel na aderência destas bactérias. (AHL & REINHOLDT, 1991)

Os *Streptococcus salivarius* são chamados como colonizadores iniciais da cavidade bucal e são encontrados em maior quantidade no dorso da língua e no epitélio bucal. As cepas K+ normalmente possuem três classes de adesinas, sendo que o

primeiro grupo media a aderência relacionada ao hospedeiro e as reações de agregação, hemaglutinação e a aderência em células epiteliais bucais (WEERKAMP & JACOBS, 2002). A segunda adesina media a co-agregação com *Veillonella* e, portanto é conhecida como proteína de ligação de *Veillonella* (PLV) ou antígeno B, enquanto o grupo final media a co-agregação com *Fusobacterium nucleatum*.

Estes *Streptococcus salivarius* demonstram que as bactérias podem apresentar mais de uma adesina simultaneamente, cada uma com propriedades específicas de ligação. As adesinas de superfície celular mediam a ligação aos receptores, que podem estar localizados na superfície do hospedeiro, permitindo aderência, ou ainda, permitindo co-agregação, dando ao microrganismo uma oportunidade maior de ser incorporado aos vários nichos na cavidade bucal (HAMILTON and NG, 1993)

Segundo REVIS et al. (2002), os *Actinomyces viscosus* e os *Actinomyces naeslundii* são colonizadores iniciais das superfícies dentais limpas e estão entre as primeiras espécies isoladas na placa supragengival, sendo que possuem dois tipos de fímbrias envolvidas em aderência às superfícies bucais e co-agregação com outras espécies bacterianas. As diferentes propriedades de ligação das fímbrias podem explicar a distribuição dos *Actinomyces* na boca, sendo que as fímbrias do tipo 2, portanto, permitem a ligação a células epiteliais e a *Streptococos* da placa dental, enquanto as fímbrias do tipo 1 são responsáveis pela aderência à superfície dental.

Os *Streptococcus mutans* têm sido fortemente implicados como microrganismos causadores da cárie dental (HAMADA & SLADE, 2002). Essencial para o acúmulo de *Streptococcus* grupo mutans sobre os dentes e para o início das lesões cariosas é a presença de sacarose. Os *Streptococcus mutans* sintetizam grandes

quantidades de glicanos a partir de sacarose e possuem normalmente uma lectina de ligação de glicano (LLG) e glicosiltransferases capazes de se ligarem aos glicanos.

Os *Streptococcus sanguis* são uma das primeiras espécies bacterianas a colonizar a superfície dental e são uma das bactérias predominantes na placa coronária humana e nos sulcos gengivais (GIBBONS & van HOUTE, 1995). As cepas de *S. sanguis* precisam ter alta afinidade pela película salivar sobre os dentes. As películas têm um número pequeno de receptores de neuraminidase-sensíveis de alta afinidade e um número maior de receptores insensíveis à neuraminidase de baixa afinidade para os *S. sanguis*. (GIBBONS et al., 1993)

Numa fase inicial, de 3 a 8 horas após a limpeza adequada, o dente é colonizado por *Streptococcus* (*S. sanguis*, *S. mitior* e *S. milleri*) e por alguns bastonetes gram-positivos (*Actinomyces viscosus* e *A. naeslundii*), sendo necessárias pelo menos 24 horas sem limpeza para que haja formação de uma camada de placa clinicamente evidenciável. (MERIJOHN, 2001)

A multiplicação de microrganismos que se aderem inicialmente à placa é responsável pela maior parte do número crescente de bactérias coletadas no dente após 24 horas. O tempo que as bactérias bucais levam para dobrar de número (tempo de geração média) foi estimada em três horas. Isto significa que um microrganismo pode multiplicar-se atingindo um total de 256 microrganismos em 24 horas. Após 24 horas de crescimento, a microbiota torna-se significativamente mais complexa. A proporção de *Streptococcus* diminui para 45%, enquanto cocos anaeróbios gram negativos aumentam rapidamente para 20%. Espécies anaeróbias estritas e facultativas de *Actinomyces* também se tornam predominantes, constituindo cerca de 25% em dois dias (THEILADE et al., 1992). Esta composição nos leva a considerar o fato de que a

microbiota adquire a capacidade acidogênica e acidúrica, também de atuar em mecanismos de proteólise de material orgânico.(KRASSE, 2000) Verifica-se este fato analisando o efeito da CrpL - placa com CrpL- controle, onde a partir de uma placa bacteriana de 48 horas obteve-se uma inibição proteolítica significativa, assim como na comparação realizada com a BJcuL – placa com BJcuL – controle.(Fig. 6)

Tabela 1 – Absorbâncias encontradas no efeito da lectina de CrpL e BJcuL em placa bacteriana supragengival, utilizando-se do Teste BANA

#	CrpL	CrpL-Controle	BJcuL	BJcuL-Controle
1	0.342	0.725	0.432	0.753
2	0.375	0.762	0.378	0.821
3	0.352	0.743	0.479	0.782
4	0.354	0.731	0.462	0.843
5	0.321	0.727	0.375	0.864
6	0.378	0.748	0.427	0.795
7	0.386	0.713	0.348	0.643
8	0.397	0.734	0.425	0.754
9	0.367	0.714	0.573	0.711
10	0.398	0.721	0.453	0.872
11	0.328	0.767	0.356	0.723
12	0.399	0.754	0.487	0.734
13	0.375	0.740	0.347	0.784
14	0.309	0.730	0.456	0.739
15	0.387	0.761	0.492	0.702
16	0.376	0.768	0.412	0.732
17	0.401	0.735	0.378	0.638
18	0.406	0.758	0.452	0.742
19	0.358	0.765	0.364	0.793
20	0.397	0.759	0.492	0.762
21	0.354	0.720	0.475	0.769
22	0.385	0.723	0.502	0.801
23	0.389	0.738	0.536	0.769
24	0.376	0.763	0.428	0.723
25	0.359	0.756	0.404	0.654
26	0.368	0.764	0.429	0.673
27	0.421	0.761	0.374	0.738
28	0.309	0.724	0.478	0.753
29	0.349	0.729	0.465	0.798
30	0.384	0.743	0.496	0.742
Média	0.375 ($\pm$ 0.028)	0.741 ($\pm$ 0.017)	0.442 ($\pm$ 0.057)	0.753 ($\pm$ 0.058)

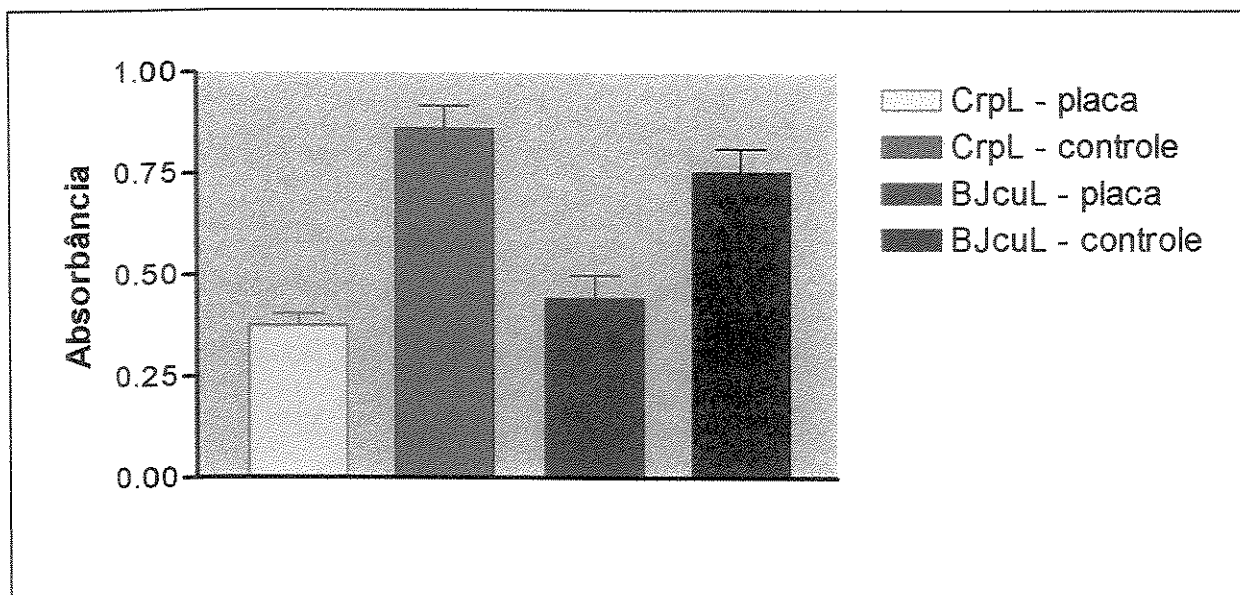


Figura 6 – Influência da lectina de CrpL e BJcuL sobre a placa bacteriana supragengival utilizando-se do teste BANA.

4.2. EFEITO DAS LECTINAS CrpL E BJcuL EM DENTINA CARIADA ATIVA

A absorbância média dos grupos CrpL [$0.471 (\pm 0.044)$] e BJcuL [$0.563 (\pm 0.035)$] foi inferior ao encontrado nos controles [$0.860 (\pm 0.056)$] e [$0.753 (\pm 0.058)$], respectivamente, em dentina cariada ativa. A comparação entre estes valores das amostras de lectinas CrpL e BJcuL indicam uma diferença significativa pelo teste t estatístico aplicado ($p < 0.001$) (Tabela 2).

Estes resultados sugerem um efeito inibitório proteolítico das lectinas CrpL e BJcuL em dentina cariada ativa. Uma análise comparativa quanto à eficiência média das duas lectinas não sugere diferença significativa (Figura 7).

Esta microbiota da placa dental coronária nos leva a reportar o fato de que a constituição da dentina que é um tecido mais resiliente que o esmalte e possui em sua composição de peso aproximadamente 70% de material inorgânico representado pelos cristais de hidroxiapatita e como componente orgânico uma proteína fibrosa colágeno. O cemento por sua vez é um tecido conectivo avascular que se assemelha em muito ao osso. Possui aproximadamente 50% de mineralização, junto aos cristais de hidroxiapatita, e sua matriz orgânica é o colágeno. (TEN CATE, 1994)

Dois estágios, microscopicamente, são normalmente distinguidos durante o fenômeno de cárie dental dentinária e de cemento. Primeiro, o mineral da dentina é dissolvido e a bactéria penetra nos túbulos dentinários. Segundo, a matriz dentinária desmineralizada é degradada, e as bactérias infiltram na área intertubular (SCHUPBACH et al., 1989). Esta seqüência de eventos pode indicar que a degradação da matriz dentinária ocorre depois que se tornou possível a remoção do material inorgânico. Num estudo *in vitro*, TEN CATE (1994) confirmou que a matriz dentinária somente é removida depois da desmineralização ácida.

A excreção de enzimas proteolíticas pelos microrganismos da placa, segundo SUIDO et al. (1996), ocorre através da atividade proteolítica observada em cárie de dentina e cemento. As proteases podem derivar do fluido crevicular (CIMASONI, 1997) ou de outras fontes. CLARKSON et al. (1996) concluem que as enzimas proteolíticas contribuem para formação de cárie de dentina e cemento. De acordo com KATZ et al. (1997), encontraram cavitação com perda de matriz ocorrendo em soluções ácidas somente em presença de proteases. A degradação da matriz promove a formação da lesão em dois estágios. Primeiro, a matriz forma uma barreira de difusão iônica, a qual é removida pela degradação. Segundo a degradação da matriz gera nutrientes, o qual

sustenta o crescimento de bactérias cariogênicas. (HOJO et al., 2001) Pode-se verificar, diante dos resultados obtidos, que há uma diferença significativa entre a inibição da dentina cariada nas amostras com BJcuL e CrpL em relação aos controles, sendo que o processo foi mais efetivo com a amostra CrpL-dentina.(Fig. 7)

Tabela 2 – Absorbâncias encontradas no efeito da lectina de CrpL e BJcuL sobre a dentina cariada, utilizando-se do Teste BANA

#	CrpL	CrpL-Controle	BJcuL	BJcuL-Controle
1	0.439	0.745	0.56	0.753
2	0.375	0.843	0.574	0.821
3	0.453	0.768	0.532	0.782
4	0.354	0.876	0.576	0.843
5	0.486	0.854	0.509	0.864
6	0.478	0.876	0.582	0.795
7	0.432	0.769	0.453	0.643
8	0.447	0.834	0.498	0.754
9	0.346	0.852	0.547	0.711
10	0.456	0.854	0.584	0.872
11	0.483	0.783	0.578	0.723
12	0.399	0.876	0.564	0.734
13	0.493	0.798	0.574	0.784
14	0.485	0.887	0.601	0.739
15	0.493	0.871	0.543	0.702
16	0.475	0.749	0.563	0.732
17	0.401	0.873	0.596	0.638
18	0.406	0.869	0.542	0.742
19	0.487	0.863	0.592	0.793
20	0.397	0.786	0.586	0.762
21	0.486	0.791	0.532	0.769
22	0.489	0.975	0.501	0.801
23	0.475	0.983	0.509	0.769
24	0.467	0.876	0.587	0.723
25	0.489	0.872	0.555	0.654
26	0.485	0.858	0.603	0.673
27	0.421	0.896	0.572	0.738
28	0.403	0.879	0.542	0.753
29	0.495	0.845	0.587	0.798
30	0.484	0.867	0.542	0.742
Média	0.471 ($\pm$ 0.044)	0.860 ($\pm$ 0.056)	0.563 ($\pm$ 0.035)	0.753 ($\pm$ 0.058)

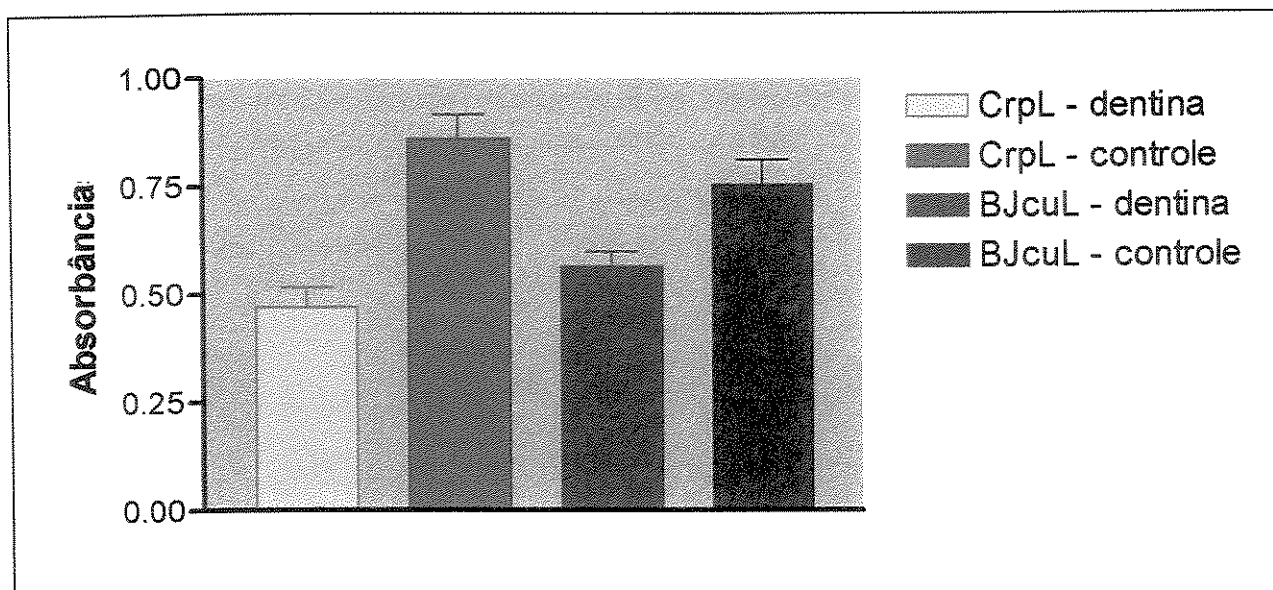


Figura 7 – Influência da lectina de CrpL e BJcuL em dentina cariada utilizando-se do teste BANA.

4.3. EFEITO DAS LECTINAS CrpL E BJcuL EM CIMENTO CARIADO

A absorbância média dos grupos CrpL [$0.684 (\pm 0.027)$] e BJcuL [$0.789 (\pm 0.046)$] não estabeleceu diferença significativa em relação aos controles [$0.742 (\pm 0.030)$] e [$0.753 (\pm 0.058)$], respectivamente

Uma análise comparativa entre os efeitos da lectina CrpL em placa bacteriana supragengival, dentina cariada e cimento indica um efeito inibitório na atividade proteolítica dos dois primeiros citados, sem diferenças significativas. No cimento, por sua vez, o efeito inibitório foi o menor.

Uma vez que KLETER, (1994) considerou o fato que a cárie de cimento e a proximidade com o sulco gengival induziam a uma concentração elevada de proteases bacterianas, associada a moléstia periodontal, fica claro o pobre rendimento em relação a inibição da atividade proteolítica tanto de CrpL-cimento quanto da BJcuL-

cimento.(Fig. 8) Uma alteração futura da concentração das lectinas, mais a associação de uma higienização adequada poderia favorecer um resultado mais positivo.

As enzimas proteolíticas são enzimas que catalisam a clivagem de ligações peptídicas em outras proteínas. Na literatura, os três termos, proteinase, protease e endopeptidase, são usados como sinônimos. O termo proteinase refere-se às enzimas que têm atividade endopeptidase, ou seja, habilidade em clivar ligações peptídicas internas em proteínas com a produção de peptídeos, e o termo peptidase refere-se às enzimas que não tem atividade endopeptidase mas liberam resíduos de aminoácidos C- ou N- terminal de peptídeos e proteínas.(BERG, 2001)

O efeito inibitório da atividade da CrpL com N-acetil D-galactosamina foi comprovado a partir dos controles realizados corroborando PANDO, (2001), que conseguiu uma inibição na hemaglutinação a partir da utilização deste composto.

O efeito inibitório da atividade da BJcuL com lactose foi comprovado a partir dos controles realizados corroborando CARVALHO, (2001), que conseguiu uma inibição na hemaglutinação a partir da utilização deste composto.

Tabela 3 – Absorbâncias encontradas no efeito da lectina de CrpL e BJcuL sobre cemento cariado, utilizando-se do Teste BANA

#	CrpL	CrpL-Controle	BJcuL	BJcuL-Controle
1	0.675	0.749	0.753	0.753
2	0.790	0.785	0.784	0.821
3	0.693	0.801	0.746	0.782
4	0.684	0.793	0.875	0.843
5	0.688	0.765	0.865	0.864
6	0.676	0.803	0.768	0.795
7	0.684	0.743	0.784	0.643
8	0.699	0.799	0.795	0.754
9	0.681	0.783	0.746	0.711
10	0.678	0.732	0.896	0.872
11	0.691	0.728	0.843	0.723
12	0.654	0.801	0.843	0.734
13	0.683	0.712	0.746	0.784
14	0.690	0.730	0.765	0.739
15	0.698	0.751	0.784	0.702
16	0.697	0.720	0.832	0.732
17	0.688	0.734	0.796	0.638
18	0.645	0.741	0.758	0.742
19	0.679	0.733	0.795	0.793
20	0.637	0.728	0.765	0.762
21	0.659	0.713	0.785	0.769
22	0.678	0.745	0.754	0.801
23	0.673	0.790	0.784	0.769
24	0.687	0.703	0.764	0.723
25	0.701	0.738	0.865	0.654
26	0.634	0.727	0.866	0.673
27	0.639	0.718	0.886	0.738
28	0.666	0.737	0.843	0.753
29	0.695	0.765	0.832	0.798
30	0.694	0.779	0.794	0.742
Média	0.684 (± 0.027)	0.789 (± 0.046)	0.742 (± 0.030)	0.753 (± 0.058)

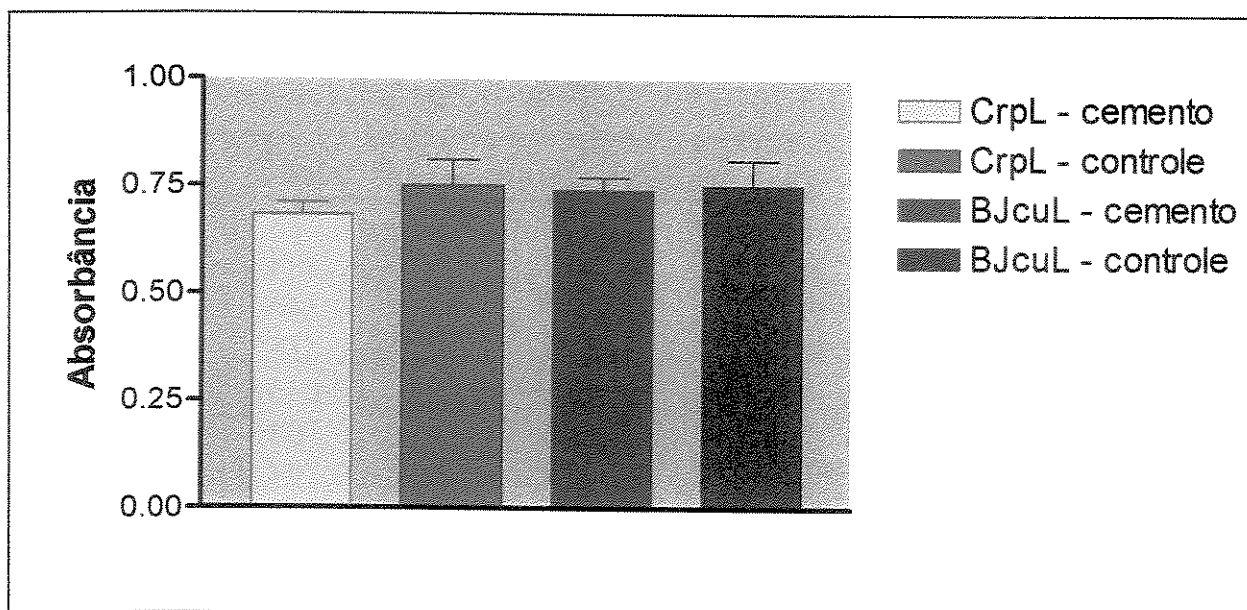


Figura 8 – Influência da lectina de CrpL e BJcuL em cimento cariado utilizando-se do teste BANA.

4.4. EFEITO DA LECTINA SOBRE A ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DA MICROBIOTA ORAL

A descoloração dentinária é um indicador comum de cárie e, mais especificamente, do estadiamento do processo carioso. A reação de Maillard entre carboidratos e proteínas tem sido implicada como a causa desta descoloração (ARMSTRONG, 1964). O produto inicial entre carboidrato e o amino grupo das proteínas pode iniciar uma cascata de reações, ultimando a formação de polímeros amarronzados, proteínas de ligação cruzadas. Na cárie dental, a reação tem sido implicada na causa da resistência do colágeno dentinário contra a atividade proteolítica bacteriana. (KLETER, 1998)

Como produtos desta reação sugere-se a formação de carboximetilisina e pentosidina. Pouca furosina é detectada, o que implica que os produtos da reação de

Maillard devem ser formados por meio de outras reações, além do que, a adição de carboidrato glicose a lisina; uma vez que há um aumento da glicosilação em matriz dentinária. (Dyer, 1991)

Sugere-se que carboidratos e glicoproteínas, assim como ácido ascórbico, podem ser oxidados a intermediários que podem interagir proporcionando aumento na carboximetil lisina e pentosidina. (WELLS-KNECHT, 1995)

Em outra instância, metabólitos aldeídicos do ciclo do glioxilato e glicólise podem induzir a uma lise de células microbianas. Muitos destes aldeídos são capazes de induzir ligações cruzadas em colágeno (POLLOCK, 1987). Duas reações opostas ocorrem, um decréscimo das ligações cruzadas fisiológicas e a neoformação de ligações cruzadas pela reação de Maillard.

Carboximetil lisina pode ser formada pelo glioxal e ácido glioxílico; dihidroxiacetona e gliceraldeído são precursores potenciais de pentosidinas. (GLOMB & MONNIER, 1995)

A Reação de Maillard da matriz orgânica pode influenciar a formação de lesão dentinária, por prolongar exposição de ácido, desnaturando o colágeno e produzindo segmentos moleculares resistentes às enzimas de degradação proteolítica (KLETER, 1994). Uma hipótese de ação seria estimulação da Reação de Maillard por CrpL e BJcuL, o que pode ser comprovado por experimentos específicos *in vitro*.

Em uma segunda hipótese, poderia ocorrer uma semelhança de ação, assim como a clorexidina, descrita por GARCIA (2001), que afirma que a inibição da atividade proteolítica ocorre por retenção de proteínas não colagenolíticas, como fosfoproteínas. As fosfoproteínas são normalmente encontradas na matriz orgânica dentinária e funciona como indutora da biomineralização. (CLARKSON, 1991)

A inibição da lectina sobre a atividade proteolítica da microbiota oral pode ser sugerida tal e qual o reconhecimento da BJcuL e, mais especificamente, da CrpL ao da lectina de amendoim na proliferação celular, com diferentes padrões de glicosilação nos fatores de crescimento β em compartimentos teciduais solúveis que ocorrem durante o fenômeno de cárie dental. (ROBERTS-CLARK, 2000)

Nas últimas décadas, estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem a existência de um sistema de defesa do hospedeiro baseado em carboidratos (SWANBORG ÉDEN, 1987). Estes estudos mostram que um uropatógeno *Escherichia coli* pode ligar-se à porção glicoconjugada do glicano no urotélio. Receptores solúveis análogos inibem esta ligação e subsequente desenvolvimento de infecção (SWANBORG ÉDEN et al., 1990). Este modelo pode ser aplicado para colonização das estruturas orais por patógenos como o cariogênico *S. mutans*. Consequentemente, a aparente redução dos padrões de glicosilação na saliva, pode sugerir alteração na suscetibilidade cariogênica. (STRÖMBERG, 1996)

Toda estrutura de oligossacarídeo simples na saliva representa um potencial ligante para a adesão bacteriana de tipos de lectina, se a especificidade de ligação da lectina corresponde ao dos oligossacarídeos. Também, a porção da IgA parece mostrar uma interação com bactérias orais inespecíficas. Assim, a utilização de lectinas animais ou vegetais que alterem o padrão de glicosilação na superfície bacteriana, impede as interações não desejáveis com imunoglobulinas específicas .

Neste parâmetro, SEEMANN (2001) demonstrou que os resíduos galactosil têm sido indicados pelo envolvimento com a ligação mediada por lectinas do *S. mutans* em substratos *in vitro*, assim como são capazes de bloquear a adesão *in vivo*, se

presentes em excesso nos glicoconjugados salivares. Consequentemente, a observação de uma alta viabilidade de resíduos galactosil, provenientes de glicosilação, em crianças resistentes à cárie pode ser, em parte, responsável por uma redução de colonização de bactérias e alteração de atividade proteolítica.

Estudos realizados por LOESCHE et al. (1987) têm demonstrado que a hidrólise de substrato de tripsina N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida (BANA) da placa subgengival e supragengival, cárie de dentina e cárie de cimento podem ser indicadores de atividade proteolítica. FEITOSA (1993) indica que a especificidade e sensibilidade do teste BANA alta para este tipo de procedimento. Este tipo de teste inclusive pode ser associado a condições de mal odor que são presentes em algumas cavidades bucais (KOZLOVSKY et al., 1994). GARCIA et al. (1997) demonstraram que há possibilidade de uma inibição proteolítica de placa supragengival pela utilização de substâncias químicas, sendo que a clorexidina possui esta atividade em solução de 0,12% em verniz sobre cárie de dentina e cárie de cimento. (GARCIA, 2000)

Embora tenha surgido nos últimos anos uma série de pesquisas visando o controle químico da placa bacteriana e substâncias com atividade cariostática para cárie de dentina e cimento, (AIANAMO, 2001), ainda não foi possível a obtenção de uma substância ideal. Levando-se em conta a via sistêmica de administração, uma substância ativa contra estes microrganismos da placa deveria agir somente no fluido da placa gengival. Neste particular, têm sido aventada a hipótese do uso de antibióticos como metronidazol e tetraciclina, segundo LOESCHE, (2001). No entanto estes medicamentos atuariam somente na vigência de sua administração; como tal as indicações são restritas aos casos específicos, devendo ser evitadas de forma rotineira.

As maiores esperanças estão assentadas na possibilidade de controle tópico; assim diversas substâncias vêm sendo observadas. Destaca-se em placa bacteriana sobretudo o digluconato de clorexidina, utilizado dentro da Odontologia a partir da década de 70 sob a forma de bochechos. Nas concentrações utilizadas é possível um controle completo da placa bacteriana e gengivite, apesar dos efeitos colaterais, o seu uso em condições especiais, como no caso de 'pacientes excepcionais ou em limitações transitórias de higiene bucal, como no caso de pacientes acidentados. (ADDY, 2001)

Na cárie dentina e cemento, ainda, a substância mais pronunciada é o diaminofluoreto de prata com o grande inconveniente do escurecimento dental e a possibilidade de necrose pulpar frente a proximidade da lesão com a polpa. (NAKAE et al., 1998). Os estudos de GARCIA, (2000) remetem a uma análise mais criteriosa da clorexidina em verniz para uma possível utilização com efeito cariostático.

Os fluoretos também têm sido objeto de muita atenção, a possibilidade destes diminuir a sensibilidade dentinária, atuarem junto a uma inibição da enolase da via glicolítica bacteriana e alterarem a permeabilidade da parede bacteriana induzindo a uma redução indireta da placa bacteriana, (CURI, 2001).

De qualquer maneira, as substâncias químicas, além dos efeitos adversos, apresentam o inconveniente de uma vez suspenso o seu uso, permitirem rapidamente a repopulação bacteriana e eventualmente mutações, mas se constituem de um grande meio para controle no Brasil do mecanismo de desenvolvimento da cárie dental. A realização de pesquisas que procurem compreender a atuação das lectinas com efeitos de inibição de atividade proteolítica em bactérias orais é fundamental para um controle mais preciso do fenômeno de cárie e moléstia periodontal.

5. Conclusões

O estudo envolvendo a CrpL permitiu concluir que:

- ♦ A CrpL apresenta um efeito de inibição de atividade proteolítica acentuado em relação à placa bacteriana supragengival e moderado na dentina cariada;
- ♦ A CrpL não apresenta um efeito significativo de inibição de atividade proteolítica em relação ao cimento em função da alta concentração de proteinases provenientes do sulco gengival e fluído crevicular.
- ♦ A atividade da CrpL foi inibida em função da presença de N-acetil-D-galactosamina.

O estudo envolvendo a BJcuL permitiu concluir que:

- ♦ A BJcuL apresenta um efeito de inibição de atividade proteolítica acentuado em relação à placa bacteriana supragengival e moderado na dentina cariada;
- ♦ A BJcuL não apresenta um efeito significativo de inibição de atividade proteolítica em relação ao cimento em função da alta concentração de proteinases provenientes do sulco gengival e fluído crevicular.
- ♦ A atividade da BJcuL foi inibida em função da presença de lactose.

A comparação dos dois estudos permite concluir que:

- ♦ Em todas as amostras ao efeito de inibição proteolítica foi superior em CrpL do que em BJcuL.

6. Perspectivas

Uma melhor compreensão sobre os mecanismos de ação das lectinas (*Crotalaria paulina* e *Bothrops jararacussu*) pode ser de relevância na Odontologia se este conhecimento puder ser um auxiliar em qualidade de saúde bucal. Existem evidências que alguns tipos de lectinas apresentam atividade antimicrobiana em bactérias cariogênicas. Uma inibição do processo cariogênico mediada por lectinas pode ser benéfica em pacientes de alto risco e que apresentam, temporariamente, inabilidade de receber tratamento convencional. Este prognóstico somente poderá ser realizado após estudos aprofundados de toxicidade e atuação direta em microbiota oral.

7. Referências Bibliográficas*

1. ADDY, M.; SLAYNE, M.A. ; WADE, W.G. (1992) The formation and control of dental plaque-and overview. **J. Appl. Bacteriol.**, 73:269-78.
2. AHL, T. & REINHOLDT, J. (1991) Detection of immunoglobulin a1 protease-induced Fab fragments on dental plaque bacteria. **Infect Immunol.** 59:563-569.
3. ALDSWORTH, T.G.; MacFARLANE, T.W. (2001) A novel in vitro model system to grow films of oral bacteria for the study of human tooth root surface caries. **J Appl Microbiol.** Jul; 91(1): 139-146.
4. AMANO, A.; NAKAGAWA, I.; HAMADA, S. (1999) Studying initial phase of biofilm formation molecular interaction of host proteins and bacterial surface components. **Methods Enzymol.** 310: 501-513.
5. APLIN, A.E.; HOWE, A.; ALAHARI, S.K. (1998) Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectin. **Pharmacol. Rev.** 50, 197-263.
6. ARENDS, J.; CHRISTOFFERSEN, J. (1986) The nature of early caries lesions in enamel. **J Dent Res.** 65: 2-11.
7. ARENDS, J.; ten BOSCH, J.J. (1992) Demineralization and remineralization evolution techniques. **J Dent Res.** 71: 924-928.
8. ARMSTRONG, W.G. (1964) Modification of properties and composition of the dentin matrix caused by dental caries. **Adv Oral Biol.** 1: 309-332.
9. BADET, M.C.; RICHARD, B.; DORIGNAC, G. (2001) An in vitro study of the pH lowering potential of salivary lactobacilli associated with dental caries. **J Appl Microbiol.** Jun; 90(6): 1015-1018.

* Associação Brasileira de Normas Técnicas. Agosto, 2000 – NBR 6023.

10. BECKER, M.R.; PASTER, B.J.; LEYS, E.J.; MOESCHBERGER, M.L.; KENYON, S.G.; GALVIN, J.L.; BOCHES, S.K.; DEWHIRST, F.E.; GRIFFEN, A.L. (2002) Molecular analyses of bacterial species associated with child hood caries. **J Clin Microbiol.** Mar; 40(3): 1001-1009.
11. BELTZ, R.E.; HERMANN, E.C.; NORDBO, H. (1999) Pro nase digestion of carious dentin. **Caries Res.** Nov-Dec; 33(6): 468-472.
12. BENDER, G.R.; MARQUIS, R.E. (1987) Membrane ATPases and acid tolerance of *Actinomyces viscosus* and *Lactobacillus casei*. **Appl Environ Microbiol**, 53:2124-2128.
13. BENDER, G.R.; SUTTON, S.V.; MARQUIS, R.E. (1986) Acid tolerance, proton permeabilities, membrane ATPases of oral *streptococci*. **Infect Immun**, 53:331-338.
14. BERG, C.H.; KALFAS, S.; MALMSTEN, M.; ARNEBRANT, T. (2001) Proteolytic degradation of oral biofilms *in vitro* and *in vivo*: potential of proteases originating from *Euphausia superba* for plaque control. **Eur J Oral Sci.** Oct. 1095: 316-324.
15. BJOINDA, CL; LARSEN, T. (2000) Changes in the cultivable flora in deep carious lesions following a stepwise excavation procedure. **Caries Res.** Nov-Dec; 34(6): 502-508.
16. BOWDEN, G.H. & HAMILTON, I.R. (1998) Survival of oral bacteria. **Oral Biol and Oral Med.** 9:54-85.
17. BOWDEN, G.H. (1995) The role of microbiology in models of dental caries: reaction paper. **Adv Dent Res.** 9:255-269.
18. BOWDEN, G.H.; LI, Y.H. (1997) Nutritional influences on biofilm development. **Adv Dent Res.** 11:81-99.
19. BOWDEN, G.H.; SCHILLING, K.; GIERTSEN, E.; LEE, S.F.; BLEIWEIS, A. (1991) Role of a cell surface associated protein in adherence and dental caries. **Infect Immun.** 59:4604-4609.
20. BOYD, W.C.; SHARPLEIGH, E. (1954) Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, 199:419.

21. BRAILSFORD, S.R.; SBAH, B.; SIMONS, D.; GILBERT, S.; CLARK, D.; INES, I.; ADAMS, S.E.; ALLISON, C.; BEIGHTON, D. (2001) The predominant aciduric microflora of root-caries lesions. **J Dent Res.** Sep; 80(9): 1828-1833.
22. BRETZ, W.A.; LOESCHE, W.J. (1987) Characteristics of trypsin like activity in subgingival plaque samples. **J Dent Res.** Nov. 66(11): 1668-1672.
23. BURNE, R.A. (1991) **Oral ecological disasters: the role of short-term extracellular storage polysaccharides.** In: Cariology for the nineties. Bowen WH, Tabak LA, editors. Rochester, NY: University of Rochester Press, p. 351-364.
24. BURNE, R.A. (1998) Oral *Streptococci*... Products of their environment. **J Dent Res.** 77(3): 445-52.
25. BURNE, R.A.; CHEN, Y.Y.; WEXLER, D.L.; KURAMITSU, H.; BOWEN, W.H. (1996) Cariogenicity of *Streptococcus mutans* strains with defects in fructan metabolism assessed in a program-fed specific-pathogen-free rat model. **J Dent Res.** 75:1572-1577.
26. BURNE, R.A.; PENDERS, J.E.; WEXLER, D.L.; JAYARAMAN, G.C.; CLANCY, K.A. (1995) Regulation of fructan degradation by *Streptococcus mutans*. **Dev Biol Std** 85:323-331.
27. CARRANZA, F.A.; GLICKMAN. (2000) **Periodontia Clínica.** 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
28. CASAMASSIMO, P.S. (2001) Maternal oral health. **Dent Clin North Am.** Jul; 45(3): 469-478.
29. CAVADA, B.S. (1997) **Lectinas uma visão geral.** In: Livro de resumos do 48º Congresso Nacional de Botânica. Crato-CE, Brasil.
30. CHOO, A.; DELAC, D.M.; MESSES, L.B. (2001) Oral hygiene measures and promotion: review and considerations. **Aust Dent J.** Sep; 46(3): 166-173.
31. CIMASONI, G.; ISHIKAWA, I.; JACCARD, F. (1977) **Enzyme activity in the gingival crevice.** In: The bordeland between caries and periodontal disease. Lehner T, editor, London. Academic Press, 13-41.
32. CISAR, J.O. (1986) **Fimbrial lectins of the oral actinomyces,** p.183-196. In D. Mirelman (ed.), Microbial lectins and agglutinins: properties and biological activity. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.

33. CISAR, O. J. ; SANDBERG, A. L.; REDDY, G. P. (1997) Structural and antigenic types of cell wall polyssaccharides from Viridans group *Streptococci* with receptors for oral Actinomyces and *Streptococcal* lectins. **Infect Immun.** 65: 5035 – 5041.
34. CLARKSON, B.H.; FEAGIN, F.F.; McCENDY, S.P. (1991) Effects of phosphoprotein mouties on the remineralization of human root caries. **Caries Res.** 25: 166-173.
35. CLARKSON, B.H.; HALL, P.L.; HEILMAN, J.R.; WEFEL, J.S. (1986) Effect of proteolytic enzymes on caries human dentine matrix. **Arch Oral Pathol.** 15:423-429.
36. CONSOLARO, A. (1996) **Cárie Dentária: histopatologia e correlações clínico-radiográficas.** Bauru: Consolaro .
37. De BOEVER, E.H.; De UZEDA, M.; LOESCHE, W.J. (1994) Relationship between volatile sulfur compounds BANA – hydrolyzing bacteria and gingival health in patients with and without complaints of oral malodor. **J Clin Dent.** 4(4): 114-119.
38. DEMUTH, D. R.; LAMMEY, M. S.; HUCK, M.; LALLY, E. T.; MALAMUD, D. (1990) Comparison of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* receptors for human salivary agglutinins. **Microb Pathog.** 9:199-211.
39. DICKISON, W.C. (1981) Evolutionary relationship of the Leguminosae. In: **Advances in legume systematics.** Polhill, R.M. and Raven, P.H. (eds.). Royal Botanic Garden, Kew, Richmond, Surrey, TW9 3AE, England, pp. 35-51.
40. DJURIC-SREFIC, M. (2001) Dental paleopathology in a Serbian Medieval population. **Anthrropol anz 2001.** Jun 59(2):113-122.
41. DJURIC-SREFIC, M.; STEFANOVIC, S. (1998) Tooth diseases in the medieval population of Gracanica near Valjevo. **Srp Arch Celok Lek.** Nov-Dec 126(11-12): 430-436.
42. DRICKAMER, K. (1988) Two distinct classes of carbohydrate – recognition domains in animal lectins. **J. Biol. Chem.,** 263:9557-9560.
43. DRICKAMER, K. (1993) Evolution of Ca²⁺ - dependent animal lectins. **Prog. Nucl. Acid Res.,** 45:207-232.
44. DROPS, B.; DROP-SZABELSKA, A. (1999) Historical aspects of dental caries and its treatment. Ann Univ Mariae Curie Skolodowska. **Med.** 54: 105-108.

45. DYER, A.G.; BLACKLEDGE, J.A.; KATZ, B.M. (1991) The Maillard reaction in vivo. **Z Ernährung swise**. 30: 29-45.
46. EDELSTEIN, B.L. (2002) Disparities in oral health and access to care: findings of national surveys. **Ambul Pediatr** . Mar-Apr 2(2): 141-147.
47. ELLEN, R.P.; LEPINE, G.; NGHEIM, P.M. (1997) In vitro models that support adhesion specificity in biofilms of oral bacteria. **Adv Dent Res**. Apr; 11(1): 33-42.
48. ELLEN, R.P.; BURNE, R.A. (1996) **Conceptual advances in oral microbial adhesion**. In: Bacterial adhesion: Molecular and ecologic diversity. Fletcher M, editor. New York: John Wiley and Sons, p. 201-248.
49. FEITOSA, A.C.; AMALFITANO, I.; LOESCHE, W.J. (1993) The effect of incubation temperature on the specificity of the BANA test. **Oral Microbiol Immunol**. Feb. 8(1):57-61.
50. FITZGERALD, R.J. (1985) Introduction: ecology, adhesion, and the indigenous flora. In: MERGENHAGEN, S.E. & ROSAN, B. ed. **Molecular basis of oral microbial adhesion**. Washington, American Society of Microbiology, P. 1-4.
51. GAO, X.I.; DENG, D.M.; GENG, Q.M. (2000) A Study of oral health condition in individuals with no oral hygiene and its association with plaque acidogenesis. **Clin J Dent Res**. Aug; 3(2): 44-48.
52. GAO, X.J.; FAN, Y.; KENT Jr, R.L.; VanHOUTE, J.; MARGOLIS, H.C. (2001) Association of caries activity with the composition of dental plaque fluid. **J Dent Res**. Sep; 80(9): 1834-1839.
53. GARCIA, M.B.; NOR, J.E.; SCHNEIDER, L.G.; BRETZ, W.A. (2001) A model for clinical evaluation of the effect of antimicrobial agents on carious dentin. **Am J Dent**. 14(2): 119-122.
54. GARCIA, M.B.O.; BRETZ, W.A. (1997) Inhibition of proteolytic activity by chlorhexidine. **J. Dent. Res**. 76(1):256.
55. GIBBONS, R.J.; DANKERS, I. (1981) Lectin like constituents of foods which react with components of serum, saliva and *Streptococcus mutans*. **App Envir Microb**. Apr; 880-888.

56. GIBBONS, R.J.; DANKERS, I. (1982) Inhibition of lectin-binding to saliva treated hydroxyapatite, to buccal epithelial cells, and to erythrocytes by salivary components. **The Am J Clin Nut.** Aug; 276-283.
57. GIBBONS, R.J. and van HOUTE, J. (1971) Selective bacterial adherence to oral epithelial surfaces and its role as an ecological determinant. **Infect Immun.** 3:567-573.
58. GIBBONS, R.J. & van HOUTE, J. (1980) Bacterial adherence and the formation of dental plaques. In: BEACHEY, E. H. ed. **Bacterial Adherence.** New York, Chapman and Hall, P. 61-104.
59. GIBBONS, R.J.; ETHERDEN, I.; MORENO, E.C. (1983) Association of neuraminidase sensitive receptors and putative hydrophobic interactions with high affinity binding sites for *Streptococcus sanguis* C5 in salivary pellicles. **Infect Immun.** 42:1006-1012.
60. GIBBONS, R.J.; ETHERDEN, I.; PEROS, W. (1985) Aspects of the attachment of oral *streptococci* to experimental pellicle. In: MERGENHAGEN, S.E. & ROSAN, B. ed. **Molecular basis of oral microbial adhesion.** Washington, American Society for Microbiology, p. 77-84.
61. GLOMB, M.A.; MONNIER, V.M. (1995) Mechanism of protein modification by glycolal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. **J Biol Chem.** 270: 10017-10026.
62. GREENWOOD, J.S., STINISSEN, H.M.; PEUMANS, W.J., CHRISPEELS, M. (1986) Sambucus nigra agglutinin is located in protein bodies in the phloem parenchyma of the bark. **Planta**, 167:257-258.
63. HAMADA, S. & SLADE, H.D. (1980) Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol Rev.** 44:331-384.
64. HAMADA, S.; SLADE, H.D. (1980) Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol Rev**, 44:331-384.
65. HAMILTON, I.R. and NG, S.K.C. (1983) Stimulation of glycolysis through lactate consumption in a resting cell mixture of *Streptococcus salivarius* and *Veillonella parvula*, **FEMS Microbial Lett.** 20:61-65.

66. HARDWICK, J.L. (1969) The incidence and distribution of caries throughout the ages in relation to the Englishmen's diet. **Brit Dent J**, 108:9-17.
67. HASHIZUME, L.N.; SHINADA, K.; YAMASHITA, Y.; KAWAGUCHI, Y. (2001) Morphological study of *Streptococcus mutans* in early colonization on enamel. **J Dent Res**, 80.
68. HE, G.; PEARCE, E.I.; SISSONS, C.H. (2002) Inhibitory effect of ZnCl₂ on glycolysis in human oral microbes. **Arch Oral Biol**. Feb; 47(2): 117-129.
69. HELMERHORST, E.J.; HOGSON, R.; van't HOF, W.; VEERMAN, E.C.I.; ALLISON, C.; NIEUW AMERONGEN, A.V. The effects of histatin-derived basic antimicrobial peptides on oral biofilms. **J. Dent. Res.** 78(6):1245-1250, 1999.
70. HEYWOOD, V.H. (1971) The Leguminosae – a systematic purview. In: **Chematoxonomy of the Leguminosae**. Harbone, J.B.; Boulter, D. and Turner, B.L. eds. Academic Press, London and New York, pp. 1-29.
71. HOJO, S.; TAKAHASHI, N. YAMADA, T. (1991) Acid profile in carious dentin. **J Dent Res**. 70:182-186.
72. HORNICK, B. (2002) Diet and nutrition implications for oral health. **J Dent Hyg**. 76(1): 67-78.
73. HUS, S.D.; CISAR, J.O.; SANDBERG, A.L.; KILIAN, M. (1994) Adhesive properties of viridans streptococcal species. **Microb. Ecol. Health Dis.** 7:125-137.
74. IWETMAN, S.; JOHANSSON, I.; BIRKHED, D.; NIDERFORS, T. (2002) Caries incidence in young type 1 diabetes mellitus patients in relation to metabolic control and caries associated risk factors. **Caries Res**. Jan-Feb; 36(1): 31-35.
75. JORGE, A.O.C. (1998) **Microbiologia Bucal**. São Paulo: Editora Santos, 2º ed. p. 59.
76. KATO, K.; NAKAGAKI, H.; ARAI, K.; PEARCE, E.I. (2002) The influence of salivary variables on fluoride retention in dental plaque exposed to a mineral-enriching solution. **Caries Res**. Jan-Feb; 36(1): 58-63.
77. KATZ, S.; PARK, K.K.; PALENIK, C.J. (1987) In vitro root surfaces caries studies. **J Oral Med**. 42:40-48.
78. KENNEDY, S.; DAVIS, C.; ABRAMS, W.R. (1998) Submandibular salivary proteases: lack of a role in anti-HIV activity. **J Dent Res**. Jul. 77(7): 1515-1519.

79. KIDD, A.S.; RADEMEYER, C.; ROBERTS, G.I. (2002) Dental disease indices and caries-related microflora in children with glycogen – storage disease. **Int J Paediatr Dent.** Jan; 12(1): 8-13.
80. KINI, R.N. & EVAN, H.J. (1992) Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and non enzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derivated by proteolysis from a common precursor. **Toxicon**, 30:265-293.
81. KLEIN, U.; KANELIS, M.J.; DRAKE, D. (1999) Effects of four anticaries agents on lesion depth progression in an in vitro caries model. **Pediatr Dent.** 21: 176-180.
82. KLETER, G.A.; DAMEN, J.J.M. (1998) Modification of amino acid residues in carious dentin matrix. **J Dent Res.** Mar. 77(3): 488-495.
83. KLETER, G.A.; DAMEN, J.J.M.; BUIGIS, M.J. (1998) Modification of amino acid residues in carious dentin matrix. **J Dent Res.** 77: 448-495.
84. KOLENBRANDER, P.E.; GANESHKUMAR, N.; CASSELS, F.J.; HUGHES, C.V. (1993) Coaggregation: specific adherence among human oral plaque bacteria. **FASEB J**, Mar, 7(5):406-13.
85. KOZLOVSKY, A.; GORDON, D.; GELERNTER, I.; LOESCHE, W.J. (1994) Correlation between the BANA test and oral malodor parameters. **J Dent Res.** 73(5):1036-1042.
86. KURAMITSU, H.K. (1993) Virulence factors of *mutans streptococci*: role of molecular genetics. **Crit Ver Oral Biol Med**, 4:159-176.
87. KURAMITSU, H.K. (2001) Virulence properties of oral bacteria impact of molecular biology. **Curr Tissues Mol Biol.** Apr; 3(2): 35-36.
88. LAIRD, W.R.E. & GRANT, A. A. (1983) Dental bacterial plaque. **Int J Biochem.**, 15:1095-102.
89. LASCALA, N.T. (1997) **Prevenção na clínica odontológica**: promoção de saúde bucal. São Paulo: Artes Médicas.
90. LEAKE, J.L. (2001) Clinical decision-making for caries management in root surfaces. **J Dent Educ.** Oct 65(10): 1147-1153.
91. LEIGH, R.W. (1925) Dental pathology of indian tribes of varied environmental and food conditions. **Am J Phys Anthropol (Spring)**, 147-185.

92. LI, Y.; BURNE, R.A. Regulation of the *gtfBC* and *fft* genes of *Streptococcus mutans* in biofilms in response to pH and carbohydrate. **Microbiology**. Oct; 147(10): 2841-2848.
93. LI, Y.H.; CHEN, Y.Y.; BURNE, P.A. (2000) Regulation of urease gene expression by *Streptococcus salivarius* growing in biofilms. **Environ Microbiol**. Apr; 2(2): 167-177.
94. LI, Y.H.; HANA, M.N.; SVENSATER, G.; ELLEN, R.P. (2001) Cell density modulates acid adaptation in *Streptococcus mutans*: implications for survival in biofilms. **J. Bacteriol**. De; 183(23): 6875-84.
95. LIM, J. K.; SMITH, S.; MC GLOTHLIN, J.; GERENCSE, V. F. (1982) Minimum inhibitory concentration of surfactants for plaque antiadherents. **Caries Res**. 16:440-2.
96. LISTGARTEN, M.A. (1997) Nature of periodontal diseases Pathogenic Mechanisms. **J Periodont Res**. 22: 172.
97. LOESCHE, W.J. (1986) The identification of bacteria associated with periodontal disease and dental caries by enzymatic methods. **Oral microbiol Immunol**. 1: 65.
98. LOESCHE, W.J.; GIORDANO, J.; HUGOEL, P.P. (1990) The utility of the BANA test for monitoring anaerobic infections due to spirochetes (*Treponema denticola*) in periodontal disease. **J Dent Res**. Oct. 69(10): 1696-1702.
99. LOESCHE, W.J.; KAZOR, C.E.; TAYLOR, G.W. (1997) The optimization of the BANA test as a screening instrument for gingivitis among subjects seeking dental treatment. **J Clin Periodontol**. Oct. 24(10): 718-726.
100. LOESCHE, W.J.; LOPATIN, D.E.; GIORDANO, J.; ALCOFORADO, G.; HUGOEL, P.P. (1992) Comparison of the benzoyl-DL-arginine-naphthylamide (BANA) test, DNA probes, and immunological reagents for ability to detect anaerobic periodontal infections due to *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Bacteroides forsythus*. **J Clin Microbiol**. Feb. 30(2): 427-433.
101. LOESCHE, W.J.; SYED, S.A.; STOLL, J. (1987) Trypsin-like activity in supragingival plaque - a diagnostic marker for Spirochetes and Periodontal disease? **J Periodontol**. 58:266-273.

102. MARCHANT, S.; BRASILSFORD, S.R.; SWOMEY, A.C. (2001) The predominant microflora of nursing caries lesions. **Caries Res.** Nov-Dec; 35(6): 397-406.
103. MARSH, P. D. (1992) Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. **J Dent Res.**, 71: 1431-8.
104. MARSH, P. D.; BRADSHAW, D. J. (1995) Dental plaque as a biofilm. **J Indust Microbiol.** 15: 169-175.
105. MARSH, P. D.; BRADSHAW, D. J. (1997) Physiological approaches to the control of oral biofilms. **Adv Dent Res.** 11:176-185.
106. MARTINS, L.; LEROY, R.; DECLERCK, D.; VANOBBERGEN, J.; LESAFFRE, E. (2001) Factors determining dental plaque and their relation to the assessment of caries among 7 years-old Flemish children. **Rev Belge Méd Dent.** 56(4): 270-280.
107. MATTHIJI, S.; ADRIANENS, P.A. (2002) Chlorhexidine varnishes: a review. **J Clin Periodontol.** Jan; 29(1): 1-8.
108. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Levantamento epidemiológico em saúde bucal:** Brasil, zona urbana, 1986. Divisão Nacional de Saúde Bucal & Fundação Serviços de Saúde Pública. Série C, Estudos e Projetos, 4. Brasília, 1988. 137 p.
109. MOORE, W.J.; CORBETT, M.E. (1973) The distribution of dental caries in ancient british populations 2. Iron Age, Romano, British and Mediaeval Periods. **Caries Res**, 7:139-153.
110. MOORE, W.J.; CORBETT, M.E. (1975) The distribution of dental caries in ancient british populations. **Caries Res**, 9:163-162.
111. NELSON, D.; COX, M. (2000) **Leningher Principles of Biochemistry.** Worth Publishers: New York, third edition, P.315-317.
112. NEWBRUN, E. (1982) Sugar and Dental Caries: A review of Human Studies. **Science**, 217:418-423.
113. NEWMAN, H.N. (1996) Discovery! Focal infection. **J Dent Res.** 75: 1912-1919.
114. NGUYEN, P.T.; ABRANCHES, I.; PHAN, T.N.; MARQUIS, R.E. (2002) Repressed respiration of oral *Streptococci* grown in biofilms. **Curr Microbiol.** Apr; 44(4): 262-266.

115. NYVAD, B. & KILIAN, M. (1990) Comparison of the initial *streptococcal* microflora on dental enamel in caries active and in caries inactive individuals. **Caries Res.**, 24:267-72.
116. NYVAD, B. (1993) Microbial colonization of human tooth surfaces. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.**, 101 (suppl. 32): 1 – 45.
117. NYVAD, B.; FEJERSKOV O. (1989) Structure of dental plaque and the plaque enamel interface in human experimental caries. **Caries Res.** 23:151-8.
118. NYVAD, B.; KILIAN, M. (1987) Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces *in vivo*. **Scand J. Dent. Res.** 95:369-380.
119. ÓSTE, R.; RÖNSTRÖM, A.; BIRKHED, D.; EDWARDSSON, S.; STENBERG, M. (1981) Gas liquid chromatographic analysis of amino acids in pellicle formed on tooth surfaces and plastic film *in vivo*. **Arch Oral Biol.** 26:335-41.
120. PATEL, M.; IAVFIK, H.; MYINT, Y. (2000) Factors affecting the ability of dental cements to alter the pH of lactic acid solutions. **J Oral Rehabil.** Dec; 27(12): 1030-1033.
121. PEARCE, E.I.; DONG, Y.M.; YUE, L.; GAO, X.L.; PUDIE, G.L.; WANG, J.D. (2002) Plaque minerals in the prediction of caries activity. **Community Dent Oral Epidemiol.** Feb; 30(1): 61-69.
122. PEARCE, E.I.F. (1991) Salivary inorganic and physical factors in the aetiology of dental caries, and their role prediction. In: Johnson N W, ed. Risk markers for oral diseases. **Dental Caries.** Vol. 1. Cambrige: Cambrige University Press, 358-81.
123. PETERSON, L.G.; ARVIDSSON, I.; LYNCH, E.; ERGSTROM, K.; TWETMAN, S. (2002) Fluoride concentrations in saliva and dental plaque in young children after in take of fluoridated milk. **Caries Res.** Jan-Feb; 36(1): 40-43.
124. POLLOCK, J.J.; LOTARDO, S.; GAVAI, R.; GROSSBARD, B.L. (1987) Lysozyme-protease-inorganic monovalent ionlysis of oral bacterial strains in buffers and whole stimulated saliva. **J Dent Res.** 66: 467-474.
125. PUSZTAI, A. (1991) **Plant lectin.** Cambridge: Cambridge University Press, UK.
126. QUIOCHO, F.A. (1986) Carbohydrate – binding proteins: tertiary structures and protein – sugar interations. **Ann. Rev. Biochem.**, 5s:287-315.

127. QUIVEY, R.G.; KUHNERT, W.L.; HAHN, K. (2001) Genetics of acid adaptation in oral streptococci. **Crit Rev Oral Biol Med**. 12(4): 301-314.
128. RAMOS-GOMEZ F.J.; WEINTRAUB J.A.; GANSKY A.S.; HOOVER C.I.; FEATHERSTONE, J.D. (2002) Bacterial, behavioral and environmental factors associated with early child hood caries. **J Clin Pediatr Dent**. Winter; 26(2): 167-173.
129. REVIS, G.J.; VATTER, A.E.; CROWLE, A.J. and CISAR, J.O. (1982) Antibodies against the Ag2 *fimbriae* of *Actinomyces viscosus* T14V inhibit lactose sensitive bacterial adherence. **Infect Immunol**. 35:1217-1222.
130. ROBERTS-CLARK, D.J.; SMITH, A.J. (2000) Angiogenic growth factors in human dentine matrix. **Arch Oral Biology**. 45: 1013-1016.
131. RODRIGUEZ-MIRO, M.J.; VEJA VALDEZ, D.; FONTE MARTINEZ, M. (1989) *Streptococcus mutans*: its relations to cariogenic activity. **Rev Cubana Estomatol**. Jul-Sept. 26(3): 191-206.
132. ROLLA, G.; CIARDI, J.E.; EGGEN, K.H.; BOWEN, W.H.; AFSHETH, J. (1983) Free glucosyl and fructosyltransferase in human saliva and adsorption of these enzymes to teeth *in vivo*. In: **Proceedings: glucosyltransferases, glucans, sucrose and dental caries**. Ciardi J.E., Doyle R.J., editors. Spec suppl, Chemical Senses. Washington, DC: Information Retrieval, Inc, p. 21-29.
133. ROSAN, B.; LAMONT, R.J. (2000) Dental plaque formations . **Microbes Infect**. Nov; 2(13): 1599-1607.
134. SCUPBACH, P.; GGGENHEIM, B.; LUTZ, F. (1989) Human root caries: histopathology of initial lesions in cementum and dentin. **J Oral Pathol Med**. 18:146-156.
135. SEEMANN, R.; ZIMMER, S.; BIZHANG, M. (2001) Differences in the salivary glycan pattern between children with high and low caries susceptibility. **Caries Res**. 35:156-161.
136. SESI – **Estudo epidemiológico sobre prevenção da cárie dental em crianças de 3 a 14 anos**. Serviço Social da Indústria, Departamento Nacional. Brasília, 1996.

-
137. SHARON, N. (1993) Lectin – carbohydrates complexes of plants and animals. An atomic view. **Trends Biochem Sci.**, 18:221-226.
138. SHARON, N.; LIS, H. (1990). Legumes lectins a large family of homologous proteins. **FASEB**, 4:3198-3208.
139. SHARON, N.; LIS, H. (1993) Carbohydrates in cell recognition. **Sci Am.** 74-81.
140. SHEIHAM, A. (2000) Is the chemical prevention of gingivitis necessary to prevent severe periodontitis? **Periodontol.** 15:15-24.
141. SHORE, R.C.; KIRKLAN, J.; DEVINE, D.; MARSH, P.; NATTRESS, B.; ROBINSON, C. (2001) Investigation to coaluate and validate the leeds in situ device for the study of enamel remineralization in vivo. **J Dent.** Aug 29(6): 415-419.
142. SHUSTERMAN, S. (1994) Pediatric dental update. **Pediatr Rev.** Aug 15(8): 311-318.
143. SIMMER, J.P.; FINCHAM, A.G. (1995) Molecular mechanisms of dental enamel formation. **Crit Rev Oral Biol Med.** 6: 84-108.
144. SIMMER, J.P.; FUKAE, M.; TANABE, T. (1998) Purification, characterization and cloning of enamel matrix serine proteinase-1. **J Dent Res.** Feb. 77(2): 377-386.
145. SINGH, R.S.; TIWARY, A.K.; KENNEDY, J.F. (1999) Lectins: sources, activities and applications. **Crit. Ver. Biotech.**, 19:145-178.
146. SLIFKIN, M.; DOYLE, R.J. (1990) Lectins and their application to clinical microbiology. **Clin Microbiol Rev.** 3: 197-218.
147. SODERLING, E. (2001) Nutrition, diet and oral health in the 21st century. **Int Dent J.** 51(6 Suppl 1): 389-391.
148. SONJU, T. (1988) Película-formação, composição e possível função. In: THYLSTRUP & FEJERSKOV, O. ed. **Tratado de Cariologia**. Rio de Janeiro, Cultura Médica, P. 33-42.
149. SOUZA, A.P.; GERLACH, R.F.; LINE, S.R. (2001) Inhibition of human gelatinases by metale released from dental amalgam. **Bio materials.** Jul; 22(14): 2025-2030.
150. SPATAFORA, G.; ROHRER, K.; BARNARD, D.; MICHALEK, S. (1995) A *Streptococcus mutans* mutant that synthesizes elevated levels of intracellular polyssaccharide is hypercariogenic *in vivo*. **Infect Immun.** 63:2556-2563.

151. SPEICH, M. (1986) Tooth care or oral hygiene? **Auintesseng J.** Sep 16(9): 867-872.
152. STOOKEY, G.K. (2000) Current status of caries prevention. **Compend Contin Educ Dent.** Oct; 21(10A): 862-867.
153. STRÖMBERG, N.; AHLFORE, S.; BOREN, T.; BRATT, P. (1996) Anti-adhesion and diagnostic strategies for uro-intestinal bacterial pathogens. **Adv Exp Med Biol.** 408: 9-24.
154. SUIDO, H.; NAKAMURA, M.; MASHIMO, P.A.; ZAMBON, J.J.; GENCO, R.J. (1986) Arylaminopeptidase activities of oral bacteria. **J Dent Res.** 65:1335-1340.
155. SVANBORG ÉDEN; ANDERSON, B. (1987) Glycoconjugate receptors for bacteria attaching to mucosal sites: examples for *Escherichia coli* and *Streptococcus pneumoniae*. **Adv Exp Med Biol.** 216: 931-939.
156. SVANBORG ÉDEN; ANDERSON, B. (1990) Inhibition of bacterial attachment: Examples from the urinary and respiratory tracts. **Curr Top Microbiol Immunol.** 151: 167-184.
157. SVANBORG ÉDEN; FRETER, R. (1996) Inhibition of experimental ascending urinary tract infection by an epithelial cell surface receptor analogue. **Nature.** 298: 560-562.
158. SWINBUM, B.A.; METCALF, P.A.; LEY, S.I. (2001) Long-term (5 years) effects of a reduced fat diet intervention in individuals with glucose intolerance. **Diabetes Care.** Apr; 24(4): 619-624.
159. TANNER, A.C.F. (1986) The identification of bacteria associated with periodontal disease and dental caries by enzymatic methods. **Oral microbiol Immunol.** 1: 71.
160. TEN CATE, J.M. (2001) Remineralization of caries lesions extending into dentin. **J Dent Res.** 80(5): 1407-1411.
161. TEN CATE, A.R. et al. (1994) **Oral Histology:** development, structure and function. Mosby: Toronto, Canada. Forth edition. 52-56.
162. TEN CATE, J.M. (1997) Review on fluoride, with especial emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. **Eur J Oral Sci.** 105: 461-465.

-
163. THEILADE, E. (1990) Factors controlling the microflora of the healthy human mouth. In: **Human microbial ecology**. Hill M. J., Marsh P. D., editors. Boca Raton, F. L.: CRC Press, p 1-56.
164. THORILD, I.; LINDAU-JONSON, B.; IWETMAN, S. (2002) Prevalence of salivary *Streptococcus mutans* in mother and in their preschool children. **Int J Paediatr Dent**. Jan; 12(1): 2-7.
165. THYLSTRUP, A. & FEJERSKOV, O. (1995) **Cariologia Clínica**. 2. ed. Trad. Sonia Regina de Lima Maíke. São Paulo: Santos Livraria Editora.
166. VADEBONCOUER, C.; PELLETIER, M. (1997) The phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system of oral *streptococci* and its role in the control of sugar metabolism. **FEMS Microbiol Rev**, 19:187-207.
167. Van HOUTE, I. (1983) Bacterial adherence in mouth. **Rev. Infect Dis**. Sep-Oct; 5:659-669.
168. Van HOUTE, J. (1994) Role of micro-organisms in caries etiology. **J Dent Res**. 73: 672-681.
169. Van HOUTE, J.; LOPMAN, J.; KENT, R. (1994) The predominant cultivable flora of sound and carious human root surfaces. **J Dent Res**. 73: 1727-1734.
170. Van LOVEREN, C. (2001) Antimicrobial activity of fluoride and its in vivo importance: identification of research questions. **Caries Res**. 35 (Suppl)1: 65-70.
171. VOGEL, G.L.; CAREY, C.M.; CLOU, L.C. (1998) Micro-analysis of mineral saturation within enamel during lact acid demineralization. **J Dent Res**. 67: 1172-1180.
172. WEERKAMP, A.H. & JACOBS, T. (1982) Cell wall associated protein antigens of *Streptococcus salivarius*: purification, properties and function in adherence. **Infect Immun**. 38:233-242.
173. WELLS-KNECHT, M.C.; THORPE, S.R.; BAYNER, H.W. (1995) Pathways of formation of glycoxidation products during glucation of collagen. **Biochemistry**. 34: 15134-15141.
174. WEN, Z.T.; BURNE, R.A. (2002) Functional Genomics Approach to identifying genes requires for Biofilm Development by *Streptococcus mutans*. **Appl Environ Microbiol**. Mar; 68(3): 1196-1203.

-
175. WENNSTROM, I.L.; LINDHE, I. (2002) Some effects of enamel matrix proteins on wound healing in the dento-gingival region. **J Clin Periodontol.** Jan; 29(1): 9-14.
 176. WINTER, G.B. (1990) Epidemiology of dental caries. **Arch Oral Biol**, 35 (Suppl):1S-7S.
 177. XIE, H.; COOK, G.S.; COSTERTON, I.W.; BURCE, G.; ROSER, T.M.; LAMONT, R.J. (2000) Intergeneric communication in dental plaque biofilms. **J Bacteriol.** Dec; 182(24):7067-7069.
 178. YAMASHITA, Y.; BOWEN, W.H.; BURNE, R.A.; KURAMITSU, H.K. (1993) Role of the *Streptococcus mutans* *gtf* genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. **Infect Immun**, 61:3811-3817.
 179. YEUNG, M.K. (1999) Molecular and genetic analyses of actinomyces spp. **Crit Rev Oral Biol Med.** 10(2): 120-138.
 180. ZHANG, Y.P.; KENT, R.L.; MARGOLIS, H.C. (2000) Enamel demineralization under driving forces found in dental plaque fluid. **Eur J Oral Sci.** 108: 207-213.

APÊNDICES

Abreviaturas para Aminoácidos¹

Aminoácidos	Abreviação	Símbolo
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido Aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido Glutâmico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

¹ Segundo nomenclatura do IUPAC

Bragança Paulista, 01 de março de 2.000.

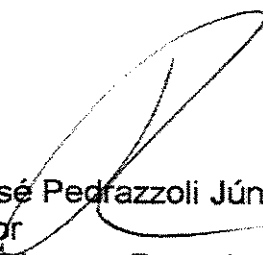
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – USF

Estudo: Estudo da influência da lectina vegetal sobre bactérias cariogênicas.

Autores: Prof.a Ms. Maria Betânia de Oliveira Garcia.

O CEP – USF, em sua reunião ordinária realizada em 01 de Março de 2000, analisou o projeto supra – citado, recomendando sua aprovação.

Parecer: o referido projeto está de acordo com as normas que regem a ética em pesquisa.



Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade São Francisco

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Área de Ciências Biológicas e da Saúde
CEP - USF

Título da Pesquisa: Influência da lectina de *Crotalaria paulina* e lectina do veneno de *Bothrops jararacussu* sobre a atividade proteolítica da microbiota cariogênica

Eu, _____, (nome, idade, RG, endereço) _____ abaixo assinado, (ou meu responsável legal _____ quando aplicável), dou meu consentimento livre e esclarecido para participar como voluntário do projeto de pesquisa supra citado, sob responsabilidade do(s) pesquisador(es) Dra. Maria Betânia de Oliveira Garcia - CRO 40941- Clínica Odontológica de Graduação - Curso de Odontologia - Unidade Acadêmica da Área de Ciências Biológicas e da Saúde - Universidade São Francisco e o Orientador do Projeto de Tese de Doutorado Prof. Dr. José Camilo Novello - Biologia Molecular e Funcional - Instituto de Biologia - UNICAMP.

Assinado este Termo de Consentimento estou ciente de que:

1. O objetivo desta pesquisa é verificar in vitro a influência da lectina vegetal de *Crotalaria paulina* e lectina do veneno de serpente *Bothrops jararacussu* sobre a atividade proteolítica exercida pelas bactérias da placa bacteriana supragengival, dentina e cimento cariados.
2. Durante o estudo, sendo pertencente ao grupo de doação de placa bacteriana, você deverá permanecer 48 horas sem realizar procedimentos de higiene oral e alimentar-se de alimentos fibrosos que podem remover esta placa bacteriana. Ao retornar à Clínica Odontológica, você será submetido a uma avaliação oral e remoção com uma colher de dentina standartizada de 1 mg de placa bacteriana que será utilizada para atividade de pesquisa supra citada. Após a coleta do material biológico será realizada uma profilaxia em todo a sua cavidade bucal.
3. Durante o estudo, sendo pertencente ao grupo de doação de material biológico dentina cariada ativa, você será submetido a um procedimento de coleta utilizando-se de uma colher de dentina standartizada de 1 mg de dentina cariada ativa. Após a coleta em um elemento dental, este será submetido a remoção de todo material cariado restauração com material restaurador compatível.
4. Durante o estudo, sendo pertencente ao grupo de doação de material biológico de cimento cariado ativo, você será submetido a um procedimento de coleta utilizando-se de uma colher de dentina standartizada de 1 mg de cimento cariado ativo. Após a coleta em um elemento dental, este será submetido a remoção de todo material cariado restauração com material restaurador compatível.
5. Minha participação neste estudo não me acarretará qualquer benefício terapêutico, além da profilaxia e restauração do elemento dental doador do material biológico.

6. Serei submetido a radiografias interproximais e periapicais para analisar o grau de extensão da cárie dental.
7. Obtive todas as informações necessárias para poder decidir conscientemente sobre a minha participação na referida pesquisa.
8. Estou livre para interromper a qualquer momento minha participação na pesquisa, a não ser que esta interrupção seja contra indicada por motivo médico.
9. A interrupção da minha participação não causará prejuízo ao meu eventual atendimento, cuidado e tratamento pela equipe responsável.
10. Meus dados pessoais serão mantidos sob sigilo e os resultados gerais obtidos através da pesquisa serão utilizados apenas para alcançar os objetivos do trabalho, expostos acima, incluída sua publicação na literatura científica especializada.
11. Caso surja alguma intercorrência, deverei contactar a Clínica Odontológica - USF e solicitar que o mesmo contate o responsável pelo ensaio clínico.
12. Poderei contactar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade São Francisco para apresentar qualquer recurso ou reclamação através do telefone 40348442.
13. Poderei entrar em contato com o responsável pelo estudo, Profa. Maria Betânia de Oliveira Garcia, sempre que julgar necessário pelo telefone 40348312.
14. Este Termo de Consentimento é feito em duas vias, sendo que uma permanecerá em meu poder e outra com o pesquisador responsável.

Bragança Paulista, _____ de 20 ____ .

Assinatura do Voluntário ou Responsável Legal. _____

Profa. Maria Betânia de Oliveira Garcia _____

Congresso Científico e Publicação

- Trabalho submetido ao Journal of Dental Research.
- Trabalho inscrito na 19ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica. 31 de agosto a 04 de setembro, 2002, Águas de Lindóia – SP.

Influence of *Crotalaria paulina* seed lectin and *Bothrops jararacussu* snake venom lectin in oral microbiology

Maria Betânia de Oliveira Garcia¹; Luzia Pando²; Daniela D.Carvalho²; Sérgio Marangoni²; Jose C. Novello^{2*}

1. Universidade São Francisco (USF), Unidade Acadêmica da Área de Ciências Biológicas e da Saúde, Curso de Odontologia, Bragança Paulista-SP, Brasil.
2. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Biologia, Departamento de Bioquímica, LAQUIP, Campinas-SP, Brasil.

To whom correspondence should be addressed: Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Cx Postal 6109, UNICAMP, Campinas-SP, 13083-970, Brazil. E-mail address jcn@unicamp.br Fax number 55-19-3788-6133.

Abstract:

Purpose: Lectins are polyvalent carbohydrate-binding proteins which agglutinate red blood cells. Identified in plants and animals, they have also been found in snake venoms. The purpose of this study was to investigate the effect of lectins from different origin on proteolytic activity in supragingival plaque, coronal and root dentinal caries samples by CrpL and BJcuL. **Materials and Methods:** The lectins used in this study were purified from the venom of the snake *Bothrops jararacussu* – BJcuL, and from seeds of the leguminosae *Crotalaria paulina*. An excavator (1 mg wet weight) was used to collect thirty supragingival plaque samples, thirty coronal caries samples and thirty root caries samples, which were placed in Sorensen's buffer pH 7.2. The samples were vortexed for 30 seconds and a aliquot of 250 μ L were added to 1.67 mmol/L aqueous solution of n-benzoyl-DL-arginine-naphthylamide (BANA^a) and then they were divided and introduced in CrpL group – CrpL 4 μ M, CrpL control – CrpL 4 μ M and N-acetyl-D-galactosamine 25mM, BJcuL group – BJcuL 6 μ M, BJcuL control – BJcuL 6 μ M and lactose 0.8 mM and Control – BSA 1mM. The mixtures were incubated for 18 hours at 37°C and colour was developed by the addition of Fast Garnet^a 0.1 M. The optical density at 510 nm was recorded spectrophotometrically. Independent t-tests were employed to determine differences between mean optical densities of the experimental groups and controls. **Results:** The mean optical density of CrpL group 0.375($\pm$ 0.028) and BJcuL group 0.442($\pm$ 0.057) was significantly different than 0.860($\pm$ 0.056) and 0.753($\pm$ 0.058) control groups ($p < 0.001$) in supragingival plaque samples. The mean optical density of CrpL group 0.471($\pm$ 0.044) and BJcuL group 0.563($\pm$ 0.035) was significantly different than 0.860($\pm$ 0.056) and 0.753($\pm$ 0.058) control group ($p < 0.001$) in coronal caries. The mean optical density of CrpL group 0.684($\pm$ 0.027) and BJcuL group 0.742($\pm$ 0.030) wasn't significantly different than 0.789($\pm$ 0.046) and 0.753 ($\pm$ 0.058) control group in root caries. The mean optical density of BSA control group was 0.798 ($\pm$ 0.043). **Clinical Significance:** This study demonstrated that CrpL and BJcuL can inhibit proteolytic activity present in human supragingival plaque and coronal caries.

Key words: *Bothrops jararacussu*, *Crotalaria paulina*, Proteolytic activity, plaque, caries

Introduction

Lectins are proteins or glycoproteins, found in a diverse array organisms. They consist in a large group of proteins with ability of binding specifically, reversibly, and non covalently carbohydrates (Kishore,1997). Some of these molecules may also contain a second binding site that interacts with a non carbohydrate ligand. As many as the numbers of lectins are, many are the different functions they have (Singh et al.,1999).

Many functions have been attributed to lectins from different origins, and studies of the effect of lectins on cancer have focused on the biological and biochemical characterization of endogenous lectins from tumor cells. Furthermore, lectins were also shown to affect the growth of anormal and cancer cells (Sanford & Harris-Hooker, 1990; Camby and cols, 1996; de Carvalho, 2001).

Reversal of incipient enamel lesions can be achieved with the use of chemical modalities treatments such as fluorides and xylitol chewing gum (Featherstone,1999). While recovery of structural integrity is not possible when caries progressed substantially into dentin, treatment strategies that arrest these lesions have been proposed based on promising results of clinical trials (Ten Cate,1998).

Hydroxiapatite crystals are the major component of dentin corresponding to approximately 80% of this volume (Nyvad, 1997). The remaining 20% are essentially water, collagen's and non collagen's proteins. Dental enamel of erupted teeth is almost completely mineral. Enamel is a product of ameloblasts, a specialized sheet of cells within the enamel organ epithelia (EOE) of developing teeth (Garcia,1997). Therapy strategies developed for arresting dentin caries commonly aim at the retention of dentin's organic matrix. An emerging alternative paradigm is based on inhibiting of degradation of dentin' s organic matrix (Klein, 1999).

Therefore, this study was designed to evaluate *in vitro* effect of *Crotalaria paulina* seed lectin and *Bothrops jararacus* venom snake lectin on proteolytic activity of supragingival plaque, coronal and root dentinal caries.

Materials and Methods

Lectin - The lectin from *Bothrops jararacussu* venom (BJcuL) was isolated by affinity chromatography on an immobilized D-galactose column as described by Carvalho et al., (1998). The lectin from the seeds of *Crotalaria paulina* (CrpL) was isolated by two chromatographic steps as described by Rego et al., (2002) The lectins were exhaustively dialyzed against distilled water and stored at - 4°C until used.

Patient and tooth selection – Ninety patients approved by the committee at the São Francisco, Brazil, were studied in subjects 21-50 years old. Patients received oral hygiene instructions and dietary counseling only at the completion of the study, when all carious lesions were properly restored.

Clinical characteristics of plaque and carious lesions - An experienced and independent clinician blindly evaluated supragingival plaque and caries lesions according the following criteria, tested by probing with a dental explorer: dentin caries soft and root caries soft.

.Specimen treatment - A standardized excavator (1 mg wet weight) was used to collect thirty supragingival plaque samples, thirty coronal caries samples and thirty root caries samples, which were placed in Sorensen's buffer pH 7.2.

Measurement of proteolytic activity – The measurement of proteolytic activity was realized as described by Garcia et al., (1997). The samples were vortexed for 30 seconds and a aliquot of 250 µL were added to 1.67 mmol/L aqueous solution of n-benzoyl-DL-arginine-naphthylamide (BANA^a), a substrate for proteolytic enzymes and then they were divided and introduced in CrpL group – CrpL 4µM, CrpL control – CrpL 4µM and N-acetyl-D-galactosamine 25mM, BJcuL group – BJcuL 6 µM, BJcuL control – BJcuL 6 µM and lactose 0.8 mM and Control – BSA 1mM. The mixtures were incubated for 18 hours at 37°C and colour was developed by the addition of Fast Garnet ^a 0.1 M. The optical density of the chromo-product was recorded spectrophotometrically at 510 nm (E 225 D-CELM).

Statistical analysis - Independent t-tests were employed to determine differences between mean optical densities of the experimental groups and controls.

Results

A decrease in proteolytic activity measured by the BANA assay was observed in supragingival plaque samples and in dentinal carious lesions using *Crotalaria paulina* seed lectin and *Bothrops jararacussu* venom snake lectin. The results are given as mean-SD and are expressed as the percentage compared to the control value arbitrarily defined as 100%. The inhibition of proteolytic activity (recorded as OD) was highly significant when supragingival plaque samples, CrpL 43.60% -BJcuL 58.69%, and dentinal carious lesions, CrpL 54.76% - BJcuL 74.76%, was compared to the root dentinal caries, CrpL 92.18% - .BJcuL 104.7%, *in vitro*.

The mean optical density of CrpL group $0.375(\pm 0.028)$ and BJcuL group $0.442(\pm 0.057)$ was significantly different than $0.860(\pm 0.056)$ and $0.753(\pm 0.058)$ control groups ($p < 0.001$) in supragingival plaque samples. The mean optical density of CrpL group $0.471(\pm 0.044)$ and BJcuL group $0.563(\pm 0.035)$ was significantly different than $0.860(\pm 0.056)$ and $0.753(\pm 0.058)$ control group ($p < 0.001$) in coronal caries. The mean optical density of CrpL group $0.684(\pm 0.027)$ and BJcuL group $0.742(\pm 0.030)$ wasn't significantly different than $0.789(\pm 0.046)$ and $0.753 (\pm 0.058)$ control group in root caries. The mean optical density of BSA control group was $0.798 (\pm 0.043)$.

Discussion

Caries progression through dentin involves both the removal of the inorganic components, hidroxyapatite, and the proteolytic degradation of dentin's organic matrix (Kleter, 1998). The degradation of dentin collagen potentially contributes to the acceleration of caries progression by allowing the release of mineral crystals from the dentin, i.e. by facilitating demineralization. Proteolytic enzymes dissolve the organic matrix and so bacteria can infiltrate with more facility in the intertubular area. The matrix forms a barrier to ionic diffusion, which is removed by degradation and this degradation of the matrix yields nutrients, which may sustain the growth of cariogenic bacteria.

The excretion of proteolytic enzymes by plaque microorganisms probably accounts for the proteolytic activity observed in carious dentin. Proteases may also derive from crevicular fluid, when root lesion is in contact with the sulcus. There are studies that purified, from human teeth, a collagenase which is activated upon acidic challenge. The root lesion may therefore contain proteases from different sources, this information support our results in root caries.

Recent evidence demonstrates that chemical substances penetrate deeply into dentin (Arends,1997). Therefore the dentin impregnated by chemical substances may function as slow-release devices for extended periods of time. Our study design does not allow for the long-term evaluation of chemical substances, like lectins, availability in dentin substrates, but shows that the proteolytic activity present in dentinal caries and supragengival plaque samples is inhibited. These findings agree with a previous study (Garcia, 2001) showing that chemical substances inhibits proteolytic activity present in coronal and root dentin caries samples in vivo.

Lectin's inhibitory effect on proteolytic activity may have an additional effect that contributes to the arrest of caries. We hypothesize that the inhibition of proteolytic activity mediated by lectin enhances retention of non-collagenous proteins, phosphoproteins, in dentin. Phosphoproteins are normally found in the organic matrix of dentin and function as inducers of biomineralization (Clarckson,1991). Therefore, if these proteins are retained in the carious dentin by the anti-proteolytic action of lectins, they may play a role in enhancing remineralization of the carious lesion. The effect of chemical substances on dentin calcium and phosphate in an experimental model of in vitro demineralization has been reported (Garcia, 1997), showing that

these substances inhibited precipitation of phosphate when the dentin was submitted to acidic challenges.

Interactions between bacterial adhesins of lectin type and the oligosaccharide part of immobilised glycoconjugates on the tooth surface are involved in the specific colonisation of teeth. The specificity of the adhesion process is determined by the carbohydrate specificity of the bacterial lectins and the availability of the corresponding glycosylation pattern. On the other hand the same glycoproteins and lectins structures can specifically prevent the binding of bacteria by competitively blocking their adhesion (Seemann, 2001).

Our understanding about the mechanisms of action of lectins (*Crotalaria paulina* lectin and *Bothrops jararacussu* venom snake lectin) can only be relevance to dentistry if this knowledge can be translated into enhanced quality of dental care. There is an evidence that some kind of lectin has antimicrobial activity against cariogenic bacteria. Parallel to its antimicrobial action, mounting evidence demonstrates that lectins also interacts with tooth structure and mediates remineralization arrestment of carious lesions. Rapid inhibition of the cariogenic challenge mediated by lectin may be beneficial for patients with high caries activity that are temporarily unable to receive comprehensive restorative treatment. This would allow enough time for proper restoration of existing cavities and perhaps prevent the development of pulp pathologies. The same rationale for the use of lectin (*Crotalaria paulina* lectin and *Bothrops jararacussu* venom snake lectin) can be applied to under privileged populations that have limited access to regular dental care. Very young children or mentalphysically-compromised patients waiting to receive proper treatment under general anesthesia may also benefit of the chemically-induced arresting of carious lesions mediated by lectin. In addition, lectin (*Crotalaria paulina* seed lectin and *Bothrops jararacussu* venom snake lectin) may be indicated for prevention of secondary caries. These issues require further study. In conclusion, *Crotalaria paulina* seed lectin and *Bothrops jararacussu* venom snake lectin can inhibit proteolytic activity in supragingival plaque and coronal dentinal caries *in vitro*.

References

1. Kishore, V; Eggleton, P. and Reid K. (1997) Molecular organization of carbohydrates recognition domains in animal lectins. **Matrix Biol.**15, 583-592.
2. Singh, R.S.; Tiwary, A.K.; Kennedy, J.F. (1999) Lectins: sources, activities and applications. **Crit Rev. Biotech.**19,145-178.
3. Sanford, G.L. and Harris-Hooker, S. (1990) Stimulation of vascular cell proliferation by β -galactoside specific lectins. **FASEB J.** 4:2912-2918.
4. Camby, I.; Janssen T.; Decker, R.; Petein, M.; Raviv, G.; Pasteels, J.L.; Kiss, R. and Danguy A. (1996) Lectin induced alterations on the proliferation of three human prostatic cancer cell lines. **In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal.** 32:633-639.
5. de Carvalho, D.D.; Schimaneier, S; Novello, J.C. and Markland, F.S. (2001) Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. **Toxicon.** 39:1471-1476.
6. Pereira-Bittencourt, M.; Carvalho, D.D.; Gagliardi, A.R.; Collins, D.C. The effect of a lectin from the venom of the snake, *Bothrops jararacussu*, on tumor cell proliferation. **Anticancer Res.**19, 4023-4026.
7. Featherstone, J.D. (1999) Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. **Community Dent Oral Epidemiol.** 27, 31-40.
8. Ten Cate, R. (1998) **Oral Histology:** development, structure and function. St. Louis: Mosby,150.
9. Nyvad, B.; Ten Cate, J.M.; Fejerskov, O.(1997) Arrest of root surface caries in situ. **J Dent Res.** 76,1845-1853.

10. Garcia, M.B.; Rodrigues, E.; Bretz, W.A. (1997) Inhibition of proteolytic activity in dentinal caries by chlorhexidine. **J Dent Res.** 76,93 (Abstr 637).
11. Klein, U.; Kanellis, M.J.; Drake, D. (1999) Effects of four anticaries agents on lesion depth progression in an in vitro caries model. **Pediatr Dent.** 21:176-80.
12. Carvalho, D.D.; Marangoni, S.; Oliveira, B. and Novello, J.C. (1998) Purification and characterization of a new lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Biochem Mol Biol Inter.** 44:933-938.
13. Rego, E.J.L.; de Carvalho, D.D.; Marangoni, S.; Oliveira, B. and Novello, J.C. (2002) Galactose-Specific Lectins from the Seeds of *Crotalaria paulina* (smooth rathebox). **Phytochemistry.** 60:441-446.
14. Kleter, G.A.; Damen, J.; Buijjs, M.J. (1998) Modification of amino acid residues in carious dentin matrix. **J Dent Res.** 77, 488-495.
15. Arends, J.; Duschner, H; Ruben, J.L. (1997) Penetration of varnishes into demineralized root dentine in vitro. **Caries Res.** 31, 201-205.
16. Garcia, M.B.; Nor, J.; Scheneider, L.; Bretz, W.A. (2001) A model for clinical evaluation of the effect of antimicrobial agents on carious dentin. **Am J Dent.** 14,119-122.
17. Clarckson, B.H.; Feagin, F.F.; McCurdy, S.P. (1991) Effects of phosphoprotein moieties on the remineralization of human root caries. **Caries Res.** 25,166-173.
18. Seemann, R.; Zimmer, S.; Bizhang, M.; Kage, A. (2001) Differences in the salivary glycan pattern between children with high and low caries susceptibility. **Caries Res.** 35,156-61.

Figure Legends

Figure 1- Effect of *Crotalaria paulina* seed lectin (CrpL) and *Bothrops jararacussu* venom snake lectin (BJcuL) on the proteolytic activity present in supragingival plaque samples (n=30). The results are given as mean-SD and are expressed as the percentage compared to the control value (non-treated plaque) arbitrarily defined as 100%.

Figure 2- Effect of *Crotalaria paulina* seed lectin (CrpL) and *Bothrops jararacussu* venom snake lectin (BJcuL) on the proteolytic activity present in dentinal caries samples (n=30). The results are given as mean-SD and are expressed as the percentage compared to the control value (non-treated dentinal caries) arbitrarily defined as 100%.

Figure 3 - Effect of *Crotalaria paulina* lectin (CrpL) and *Bothrops jararacussu* venom snake lectin (BJcuL) on the proteolytic activity present in root caries samples (n=30). The results are given as mean-SD and are expressed as the percentage compared to the control value (non-treated root caries) arbitrarily defined as 100%.

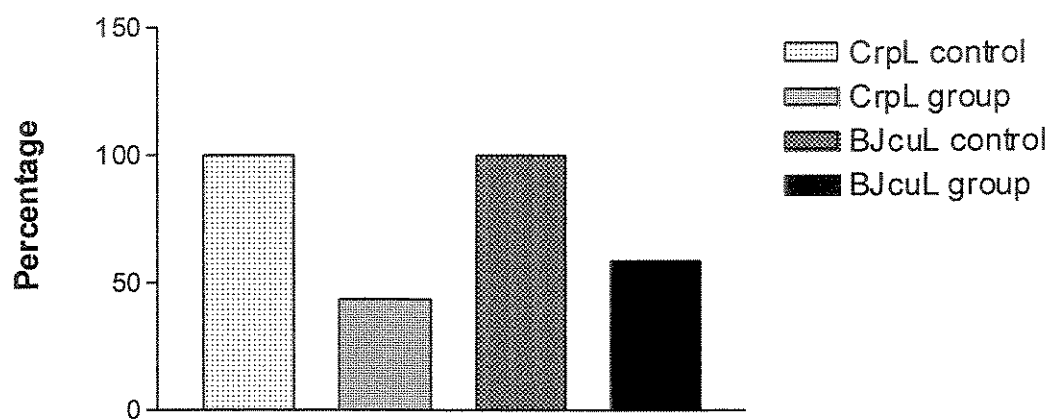


Figure 1

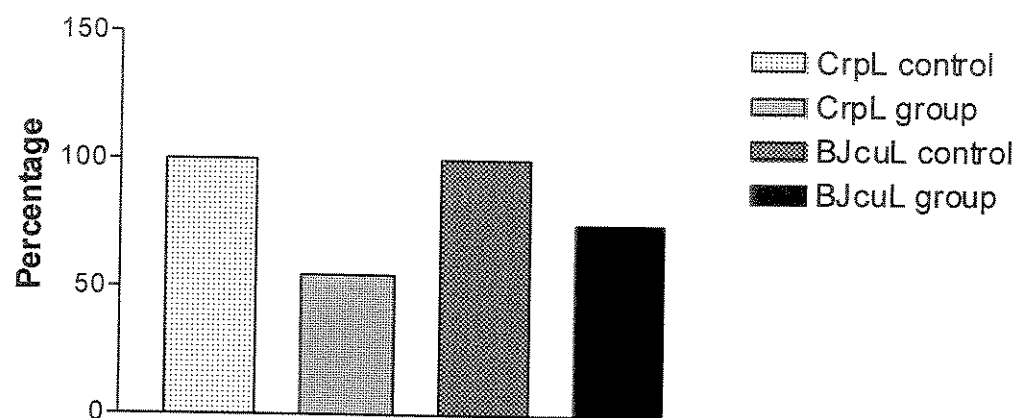


Figure 2

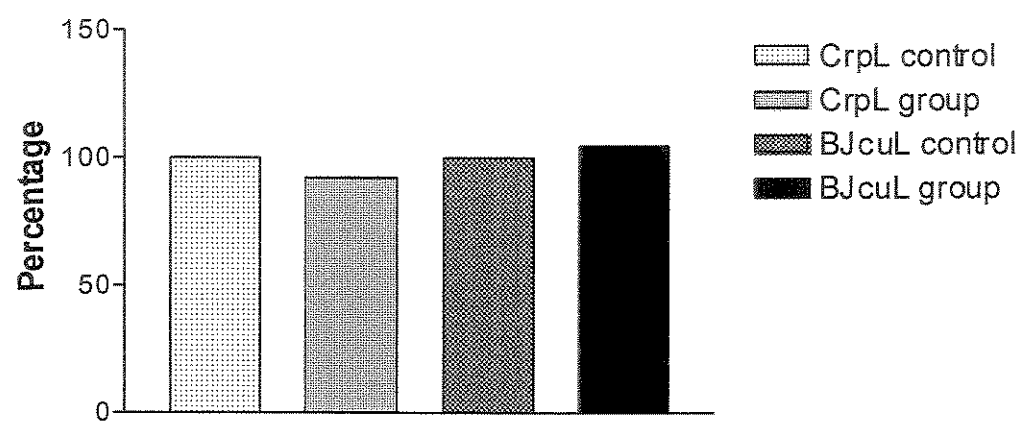


Figure 3