

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

FÁBIO SOLON TAJRA

**AVALIAÇÃO DAS POTENCIALIDADES BIOTECNOLÓGICAS DA LECTINA DE
ALGA MARINHA DA ESPÉCIE *Hypnea musciformis* (HML) NO DIAGNÓSTICO E
PREVENÇÃO DE CÁRIE DENTÁRIA**

SOBRAL
2010

FÁBIO SOLON TAJRA

**AVALIAÇÃO DAS POTENCIALIDADES BIOTECNOLÓGICAS DA LECTINA DE
ALGA MARINHA DA ESPÉCIE *Hypnea musciformis* (HML) NO DIAGNÓSTICO E
PREVENÇÃO DE CÁRIE DENTÁRIA**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biotecnologia, Área de Concentração: Macromoléculas

Orientador: Edson Holanda Teixeira

Co-orientadores: Victor Alves Carneiro
Andréa Silvia Walter de Aguiar

SOBRAL
2010

FÁBIO SOLON TAJRA

**AVALIAÇÃO DAS POTENCIALIDADES BIOTECNOLÓGICAS DA LECTINA DE
ALGA MARINHA DA ESPÉCIE *Hypnea musciformis* (HML) NO DIAGNÓSTICO E
PREVENÇÃO DE CÁRIE DENTÁRIA**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biotecnologia, Área de Concentração: Macromoléculas

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral

Prof. Dra. Andrea Silvia Walter de Aguiar
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Euclides Gomes Parente Filho
Universidade Estadual do Vale do Acaraú

AGRADECIMENTOS

A Deus, força sempre.

A minha família e, em especial, minha mãe. Admiro teu respeito, tua fé, coragem, e principalmente tua atenção. Obrigado por ser minha mãe de verdade!

Meu agradecimento especial ao Prof. Edson Holanda Teixeira pela disponibilidade, paciência, atenção e amizade, por terem compartilhado comigo suas experiências e conhecimentos, que foram, sem dúvida, essenciais a este trabalho.

À Prof^a. Dra. Andrea Silvia Walter de Aguiar, pelo apoio, disponibilidade, conhecimentos e amizade que foram de grande contribuição a este trabalho.

Ao Mayron, pela sua preciosa ajuda em laboratório, pelas excelentes sugestões e pela sua boa disposição e companheirismo.

Ao Victor, Vavá e Theodora, não somente pelos momentos de ajuda no laboratório e conversas, mas também pela grande amizade que nasceu entre nós.

Aos meus companheiros de laboratório: Luiz, Mauro, Thiago, Levy, Érica, Rafaela e Denise pela colaboração e amizade.

A minha amiga de sempre Cinara, por sua verdadeira amizade, por estar sempre me incentivando e apoiando.

Ao Santhiago pelas aulas de inglês e textos transcritos, além da paciência e compreensão.

À FUNCAP, pela bolsa de estudo concedida.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram, mesmo de longe, com uma palavra, um incentivo ou um simples sorriso, agradeço de coração.

Se a aparência coincidissem com a essência,
não seria necessário, Ciência.

(Karl Marx)

RESUMO

A cárie é uma doença infecciosa de natureza multifatorial que se inicia na infância, podendo aumentar de intensidade e prevalência de acordo com as condições do ambiente bucal de cada hospedeiro. O risco do paciente em desenvolver, em algum período de seu ciclo de vida, lesões cáries pode ser medido através de uma análise complexa que utiliza os fatores determinantes da saúde e outros fatores específicos do processo saúde-doença. A partir do diagnóstico precoce da doença cárie, assim como análise dos fatores determinantes auxiliares da avaliação do risco de cárie, o tratamento torna-se mais simples, menos invasivo e de menor custo. Tem sido bastante difundida ultimamente a utilização de lectinas para diagnóstico e prevenção de algumas doenças. Em se tratando da doença cárie, ao longo de muitos anos, essa estratégia tem sido explorada ainda de forma incipiente. Nesta perspectiva, o objetivo deste trabalho foi investigar as potencialidades biotecnológicas da lectina de alga marinha da espécie de *Hypnea musciformis* (HML) aplicadas à odontologia. Trata-se de um estudo explicativo-experimental de abordagem quantitativa através de questionário de saúde e análises estatísticas de dados. A pesquisa faz referência à uma análise comparativa de testes salivares e atividade cariogênica em escolares de 12 anos de idade e a busca avaliar as potencialidades biotecnológicas da lectina de alga marinha da espécie de *Hypnea musciformis* (HML) no diagnóstico e prevenção de cárie dentária. A área de concentração deste estudo Macromolétulas / Aplicação Biotecnológica de Lectinas. No presente estudo, foram comparados os resultados obtidos através da aplicação de exame clínico convencional para cárie e testes salivares de atividade cariogênica apontados pelo programa CARIOGRAM[®] em associação com análises laboratoriais com a utilização de lectinas específicas. A partir deste estudo, concluiu-se que, em se tratando do uso de lectinas como potencial biotecnológico para a prevenção e diagnóstico de cárie dentária, percebeu-se que há reconhecimento de glicoconjugados presentes na saliva de pacientes de alto e baixo risco observados em padrão de fluorescência. Os resultados demonstram que a lectina testada tem a capacidade de interferir no crescimento bacteriano de forma negativa, sendo estatisticamente significativa ($p < 0,01$) em relação aos grupos controle de salina e BSA. Entretanto estudos de inibição da formação de biofilmes microbianos utilizando a HML estão sendo programados, para assim avaliar a possibilidade de utilização dessas proteínas como insumos biotecnológicos a ser utilizados para prevenção da cárie dentária. Pode-se ainda afirmar que os resultados obtidos pelo uso de HML na atividade antibacteriana foram promissores, mostrando que esta lectina apresentou atividade antibacteriana mesmo em quantidades muito pequenas. Quanto ao uso destas proteínas na formação e desenvolvimento de biofilmes, não houve padrão característico.

PALAVRAS-CHAVE: Cárie Dentária, Lectinas, Potencial Biotecnológico.

ABSTRACT

Dental Caries is an infectious disease naturally multi-factorial that begins in the childhood, able to spread its intensity and prevalence according to the mouth ambient conditions of each host. The risk of the patients to develop, in some time of their lives, carious lesions can be measured through a complex analysis using health determinant factors and other specific factors of the health-disease process. Since the dental caries forward diagnostic as well as the review of the auxiliary determinant factors of the dental caries danger evaluation, the treatment becomes simpler, less invasive and costing lower. It has been quite broad-casted lately the use of lectins to diagnose and to prevent some diseases. When dealing with dental caries disease, through many years this strategy has been explored still inceptively. Looking through this perspective, the goal of this trial was to investigate the biotechnological potential of the red marine alga *Hypnea musciformis* (HML) applied to Dentistry. It is about an explanatory-experimental study of quantitative approach through the health questionnaire and data statistics analysis. The research makes reference to some comparative analysis of salivary tests and the cariogenic activity in twelve year-old students and it searches to evaluate the biotechnological potentialities of the lectin from the red marine alga *Hypnea musciformis* (HML) in the diagnose and prevention of the dental caries. The concentration area of this trial was the macromolecules/ lectin biotechnological application. In the present trial were compared obtained results through the application of the conventional clinical exams to dental caries and salivary tests of dental caries activity pointed by the CARIOGRAM[®] program in association with lab analysis using specific lectins. From this trial, it has been concluded that, about lectins as a biotechnological potential to prevention and diagnose of the dental caries, it has been noticed that there is recognition of resident glycoconjugate on pacifier saliva of high and low risk observed in immunofluorescence pattern. The results showed that the tested lectin has the capacity to intervene on the bacterial growth in a negative way, it is being distinguished statistically ($p < 0,01$) in relation to control group of saline and BSA. However, inhibition studies of the microbial biofilms using the HML are being programmed to evaluate the using possibility of these protein as biotech input to be used for dental caries prevention. It could be said also that the obtained results by the use of HML in the antimicrobial activity were promising, showing that this lectin has presented antimicrobial activity even on very small amounts. As to the use of these protein in the biofilm formation and developing there was no characteristic pattern.

KEY-WORDS: Dental Caries, lectins, biotechnological potentialities.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema demonstrador da classificação de lectinas segundo Peumans e Van Damme (1995a) e Van Damme et al. (1998).	36
Quadro 1 - Lectina, sua especificidade por carboidratos, matriz cromatográfica usada no isolamento e referência metodológica utilizada na pesquisa.	40
Quadro 2 - Espécie e cepa dos microorganismo utilizado na pesquisa.	40
Quadro 3 – Médias de escores por paciente atribuídos para cada face, utilizando-se índice de Greene & Vermillion, para quantificação de placa bacteriana (Guedes-Pinto, 2000).	46
Quadro 4 – Atribuição de escores seguindo a interpretação da contagem de estreptococos do grupo mutans, pelo método de Köhler e Bratthall (1979 apud...).	47
Quadro 5 – Apresentação de critérios clínicos a serem utilizados para obtenção dos índices CPOD/S e ceod/s.	49
Quadro 6 - Escores atribuídos, considerando-se a prevalência de cárie e a meta da Organização Mundial de Saúde para crianças até 12 anos.	50
Quadro 7 - Escores atribuídos para quantidade de saliva obtida na determinação do fluxo salivar.	50
Quadro 8 - Escores atribuídos para o valor de pH obtido na verificação da capacidade tampão da saliva.	50
Quadro 9 – Escores atribuídos às Informações sobre a utilização de flúor pelas crianças, obtidas junto aos pais ou responsáveis.	50
Quadro 10 - Escores atribuídos para o conteúdo de açúcar presente na dieta de cada participante, segundo pais e responsáveis.	51
Quadro 11 - Escores atribuídos para a frequência no consumo de açúcar presente na dieta, segundo pais e responsáveis.	51
Quadro 12 - Escores atribuídos para a presença de doenças sistêmicas relacionadas à cárie, segundo pais ou responsáveis.	51
Figura 2 – Distribuição da prevalência de cárie através do CPOD em escolares de 12 anos de idade na Escola de Ensino Fundamental Padre Osvaldo Chaves, em Sobral, Ceará, 2009.	57
Figura 3 – Distribuição da susceptibilidade à cárie dentária pelo Cariogram®, em escolares de 12 anos de idade na Escola de Ensino Fundamental Padre Osvaldo Chaves, em Sobral, Ceará, 2009.	57
Figura 4 – Distribuição da classificação de risco à cárie dentária pelo Cariogram®, em escolares de 12 anos de idade na Escola de Ensino Fundamental Padre Osvaldo Chaves, em Sobral, Ceará, 2009.	58
Figura 5 – Distribuição da possibilidade de evitar novas cáries à cárie dentária pelo Cariogram®, em escolares de 12 anos de idade na Escola de Ensino Fundamental Padre Osvaldo Chaves, em Sobral, Ceará, 2009.	58
Figura 6 - Visualização do Controle Negativo (FITC) do ensaio de marcação de película adquirida em microscópio de Fluorescência no aumento de 40x.	59
Figura 7 - Visualização do Controle Negativo (FITC) do ensaio de marcação de película adquirida em microscópio de Fluorescência no aumento de 100x.	60
Figura 8 - Imagem por microscopia de fluorescência mostrando a interação entre a lectina de algas marinhas da espécie de <i>Hypnea musciformis</i> (HML)/FITC e a superfície da Película Adquirida ao Esmalte (PAE) simuladas em pérolas de	60

hidroxiapatita. Aumento de 40x.

Figura 9 - Imagem por microscopia de fluorescência mostrando a interação entre a lectina de algas marinhas da espécie de *Hypnea musciformis* (HML)/FITC e a superfície da Película Adquirida ao Esmalte (PAE) simuladas em pérolas de hidroxiapatita. Aumento de 100x. 61

Figuras 10 e 11 - Imagem por microscopia de fluorescência mostrando a interação entre a lectina de algas marinhas da espécie de *Hypnea musciformis* (HML)/FITC e a superfície da Película Adquirida ao Esmalte (PAE) de pacientes de baixo (Figura 10) e alto risco (Figura 11) à cárie dentária simuladas em pérolas de hidroxiapatita. Aumento de 40x. 61

Figuras 12 e 13 - Imagem por microscopia de fluorescência mostrando a interação entre a lectina de algas marinhas da espécie de *Hypnea musciformis* (HML)/FITC e a superfície da Película Adquirida ao Esmalte (PAE) de pacientes de baixo (Figura 12) e alto risco (Figura 13) à cárie dentária simuladas em pérolas de hidroxiapatita. Aumento de 100x. 62

Figura 14 - Gráfico de barra do crescimento *Streptococcus mutans* (620nm) em diferentes tempos (6, 12, 18 e 24 horas) sob o efeitos das lectinas do gênero *Hypnea musciformis* (HML) na concentração de 500 µg/ml. (a) *S. mutans* x HML e (b) Controle Negativo utilizando Albumina Sérica Bovina (BSA). * Lectina x BSA. $p < 0.01$. 63

Figura 15 - Gráfico de barra do crescimento *Streptococcus mutans* (620nm) em diferentes tempos (6, 12, 18 e 24 horas) sob o efeitos das lectinas do gênero *Hypnea musciformis* (HML) na concentração de 500 µg/ml. (a) *S. mutans* x HML e (b) Salina. * Lectina x Salina. $p < 0.01$. 63

Figura 16 - Gráfico em barra do crescimento de biofilme em diferentes tempos (6, 12, 18 e 24 horas) na presença da lectina do gênero de *Hypnea musciformis* (HML) na concentração de 100 µg/ml. Para controle utilizou-se solução salina e BSA (Bovine Serum Albumine). (a) *S. mutans* x HML 100 µg/ml, (b) *S. mutans* x BSA 100 µg/ml, (c) Controle. * $p < 0.01$. 64

Figura 17 - Gráfico em barra do crescimento de biofilme em diferentes tempos (6, 12, 18 e 24 horas) na presença da lectina do gênero de *Hypnea musciformis* (HML) na concentração de 200 µg/ml. Para controle utilizou-se solução salina e BSA (Bovine Serum Albumine). (a) *S. mutans* x HML 200 µg/ml, (b) *S. mutans* x BSA 200 µg/ml, (c) Controle. * $p < 0.01$. 65

LISTA ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	“ATP-Binding Cassette”
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	“American Type Culture Collection”
ATP	Trifosfato de Adenosina
BCR	Receptores para Antígenos das Células Linfócitos B
BHI	“Brain Heart Infusion” (Infusão de Cérebro e Coração)
BSA	“Bovine Serum Albumin” (Albumina de Soro Bovino)
CONEP	Comissão Nacional de Ética e Pesquisa
CTS	Capacidade de Tamponamento Salivar
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Gbp	“Glucan binding proteins”
Gtf	Glicosiltransferase
HA	Hidroxiapatita
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
HML	Lectina de Alga Marinha da Espécie <i>Hypnea musciformis</i>
HSV	Vírus Herpes Simples
IADR	“International Association for Dental Research”
IgA	Imunoglobulina A
IgM	Imunoglobulina M
MIC	Concentração Inibitória Mínima
MSM	“Multiple Sugar Metabolism”
NaCl	Cloreto de Sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAE	Película Adquirida de Esmalte
PBS	“Phosphate Buffer Solution” (Tampão Fosfato)
PEC	Polipeptídeos Extracelulares
pH	Potencial de Hidrogênio
PIC	Polipeptídeos Intracelulares
PTS	“Phosphotransferase System”
SIA	Sistema Imune Adaptativo
SIS	Sistema Imune Inato
RNA	Ácido RiboNucléico
TCR	Receptores para Antígenos de Células Linfócitos T
S	Streptococcus
WDF	“World Dental Federation”
WHO	“World Health Organization”

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
Da	Dalton
g	força da gravidade
L	litros
M	molar
min	minutos
mL	mililitro
mM	milimolar
nm	nanômetro
rpm	Rotações por Minuto
s	segundos
ufc	Unidade Formadora de Colônia
x	vezes
%	percentagem
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
µM	micromolar

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
LISTA DE SÍMBOLOS	12
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo Geral	18
2.2. Objetivos Específicos	18
3. REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1. Doença Cárie Dentária	19
3.1.1. Aspectos Epidemiológicos	19
3.1.2. Multifatoriedade da Doença Cárie Dentária	22
3.1.3. Fatores Microbiológicos	23
3.1.3.1. Crescimento e Desenvolvimento Bacteriano relacionado à doença cárie dentária	24
3.1.3.2. Formação do Biofilme	27
3.1.4. Propriedades Salivares	29
a) Aspectos Gerais	29
b) Constituintes Salivares e funções	30
c) Mecanismos de Defesa	31
3.2. Uso de lectinas para identificação e prevenção de doenças em Odontologia	33
3.2.1. Breve histórico	33
3.2.2. Classificação	35
3.2.3. Propriedades Biológicas	37
3.2.4. Lectina de alga marinha da espécie de <i>Hypnea musciformis</i> (HML)	38
3.2.5. Uso de lectinas em Odontologia	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1. Lectinas	41
4.2. Bactéria	41
4.3. Saliva	42
4.4. Pérolas de Hidroxiapatita	43
4.5. Tipo de Estudo	44
4.6. Desenho do Estudo	44
4.7. CARIOGRAM®	45
4.8. Marcação de lectina com FITC (Isotiocianato de fluoresceína)	53
4.9. Formação de Película Adquirida ao Esmalte (PAE) em pérolas de Hidroxiapatita (HA) para ensaio de marcação de película através de lectinas associadas ao FITC	53
4.10. Ensaio de marcação de PAE com lectinas associadas ao FITC	54
4.11. Determinação da Concentração Inibitória Mínima / Ensaio de Atividade Antibacteriana	54
4.12. Ensaio da formação do biofilme bacteriano em diferentes meios de cultura	55
4.13. Análise Estatística	55
5. RESULTADOS	57

6. DISCUSSÃO	67
7. CONCLUSÕES/PERSPECTIVAS	73
8. EQUIPE EXECUTORA	74
REFERÊNCIAS	75
APÊNDICES	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 Importância do Tema em Estudo

Tem sido bastante difundida ultimamente a utilização de lectinas para diagnóstico e prevenção de algumas doenças (BEUTH *et al.*, 1995). Em se tratando da doença cárie, ao longo de muitos anos, essa estratégia tem sido explorada ainda de forma incipiente.

A cárie é uma doença infecciosa de natureza multifatorial que se inicia na infância, podendo aumentar de intensidade e prevalência de acordo com as condições do ambiente bucal de cada hospedeiro (LOESCHE, 1993). O risco do paciente em desenvolver, em algum período de seu ciclo de vida, lesões cariosas pode ser medido através de uma análise complexa que utiliza os fatores determinantes da saúde e outros fatores específicos do processo saúde-doença cárie (REICH, LUSSI, NEWBRUN, 1999).

A partir do diagnóstico precoce da doença cárie, assim como análise dos fatores determinantes auxiliares da avaliação do risco de cárie, o tratamento torna-se mais simples, menos invasivo e de menor custo. Neste sentido, a verificação do risco de cárie aliado a levantamentos epidemiológicos torna-se cada vez mais importante para a adequação de uma política pública de impacto para a saúde bucal (SOUZA, 2004).

Segundo Koga *et al.* (1995), a identificação de pacientes de alto risco de cárie é bastante relevante e tem aplicação direta em Saúde Pública, já que a partir disso podem ser adotadas estratégias de ação ou medidas preventivas mais intensas e específicas, diminuindo o custo e aumentando a eficiência de programas de prevenção.

O objetivo da determinação do risco de cárie, segundo Buischi (1998), é investigar as possíveis estratégias de promoção, manutenção da saúde bucal e prevenção de agravos a serem adotadas pelos indivíduos e grupos mais suscetíveis à doença. Neste sentido, mesmo em pessoas que já manifestam sintomas da doença, essa avaliação é importante, já que propicia a determinação do tipo e intensidade do tratamento a ser desenvolvido.

Na perspectiva de avaliação do risco de cárie em pacientes, várias ferramentas já foram idealizadas e testadas. Vale acrescentar que a evolução do conceito da doença cárie foi

indispensável para que fossem elaborados métodos específicos de registro e avaliação. Dentre eles, foi desenvolvido um programa de computador interativo para avaliar o risco de doença cárie em pacientes com fins educativos, preventivos e clínicos, o CARIOGRAM[®]. O programa foi desenvolvido por Bratthall (1996), como um novo modelo para o entendimento da interação de vários fatores etiológicos da cárie e ilustra o risco que o paciente tem de desenvolver a cárie no futuro (BRATTHALL et al., 1999).

Segundo Ribeiro (1999), com a aplicação do método sugerido pelo CARIOGRAM[®] é possível prever a probabilidade de uma pessoa desenvolver a doença cárie no período de um ano com grandes percentuais de acerto. Este método determina o risco à doença cárie e a possibilidade da pessoa ter ou não cárie no futuro.

O programa CARIOGRAM[®] apresenta, como instrumento de avaliação, uma ilustração gráfica interativa do risco que o paciente tem de desenvolver cáries no futuro. Vale ressaltar, ainda, que esta ferramenta trata de um programa educacional interativo desenvolvido para melhor entendimento dos aspectos multifatoriais da cárie dentária. Não podemos esquecer que o CARIOGRAM[®] também tem o objetivo de estimular a introdução de medidas preventivas, antes que novas lesões de cárie possam se estabelecer.

1.2 Questões de Pesquisa

O uso da saliva como método de diagnóstico avançou significativamente nos últimos anos. Foram mais de 2.000 artigos escritos referentes a testes salivares realizados desde 1982, descrevendo o uso de saliva no monitoramento de doenças sistêmicas e bucais (STRECKFUS; BIGLER, 2002).

Uma das vantagens na utilização deste fluido para o diagnóstico em substituição ao sangue é o acesso fácil à boca, com coleta não-invasiva. Diante desta explicação, a saliva tem sido apontada como um líquido biológico potencial para testes diagnósticos.

Sabe-se que a avaliação dos níveis salivares da bactéria constitui ferramenta realmente importante na identificação precoce de indivíduos com alto risco biológico para o desenvolvimento da cárie dental. Aliada a isso, a atividade da doença cárie pode ser avaliada de

maneira complementar através dos índices CPO-D (Índice de Dentes Permanentes Cariados, Perdidos por Cárie ou Obturados), investigação da dieta alimentar.

Assim, testes salivares para a identificação de elementos intimamente relacionados com o risco de cárie estão sendo propostos, buscando alcançar a praticidade necessária para a saúde bucal.

Diante deste contexto, este estudo propõe o seguinte questionamento: qual são as potencialidades biotecnológicas de lectinas vegetais no diagnóstico de pacientes de alto risco e prevenção de cárie dentária?

1.3 Hipótese da Pesquisa

A adoção de um método específico e adequado para a identificação de pacientes de alto risco de desenvolvimento da cárie através da saliva poderia ser aplicável e efetiva tanto para a diminuição do custo quanto para o aumento da eficiência dos programas de prevenção. Dessa forma, muitos municípios que apresentam sua população com alto índice de cárie (medidos pelos índices ceo ou CPOD) poderiam lançar mão destas ferramentas visando direcionar os serviços odontológicos para essa população, interrompendo a história natural da doença.

Se as lectinas têm a propriedade de se ligar a glicoconjugados e, uma vez que, existe este tipo de interação no processo de formação do biofilme bacteriano, sugere-se que estas proteínas podem desempenhar papel significativo diante da avaliação de pacientes de alto e baixo risco à cárie.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Investigar as potencialidades biotecnológicas da lectina de alga marinha da espécie de *Hypnea musciformis* (*HML*) aplicadas à odontologia.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar o perfil epidemiológico de escolares aos 12 anos de idade e a susceptibilidade deste grupo à cárie dentária;
- Identificar grupos de alto e baixo risco de cárie em escolares aos 12 anos de idade a partir da aplicação do teste CARIOGRAM[®];
- Identificar através da lectina de alga marinha da espécie de *Hypnea musciformis* (*HML*) um biomarcador de risco de cárie dental na saliva humana;
- Avaliar a atividade da lectina isolada da alga marinha *Hypnea musciformis* sobre biofilmes de cepas bacterianas da espécie *Streptococcus mutans*;
- Avaliar a atividade da lectina isolada da alga marinha *Hypnea musciformis* sobre o crescimento de cepas bacterianas da espécie *Streptococcus mutans*, através da metodologia “*in vitro*” de microdiluição em placas de poliestireno.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3. 1 Doença Cárie Dentária

3.1.1 Aspectos Epidemiológicos

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a cárie dentária é um processo patológico de origem externa, que se inicia depois da erupção dentária, originando um amolecimento do tecido duro do dente e evoluindo para a formação de uma cavidade (WHO, 1997).

Alguns autores têm colaborado significativamente com a discussão acerca da definição e etiologia da cárie dentária. A exemplo disso, Pereira (1993) descreveu a cárie dentária como uma doença infecciosa, pós-eruptiva, transmissível, influenciada pela dieta e que é, quase sempre, caracterizada por uma destruição progressiva e centrípeta dos tecidos mineralizados dos dentes. Fejerskov (1997) definiu a cárie dentária como uma doença cumulativa, complexa, dependente do balanço no equilíbrio fisiológico entre os minerais do dente e o fluído do biofilme. No ponto de vista técnico, tais definições continuam sendo fortemente exploradas, uma vez que incorporam faces diferentes deste processo saúde-doença cárie.

Em se tratando de Saúde Coletiva, a cárie dentária tem se mostrado como uma doença com alta prevalência, que atinge a quase totalidade das pessoas, independentemente da raça, sexo, idade ou condição social. Esta patologia influencia desfavoravelmente a saúde geral do indivíduo podendo implicar na diminuição da função mastigatória, alteração do desenvolvimento e da estética facial, além de provocar perturbações fonéticas, causar dor e originar complicações infecciosas com repercussões locais e gerais (MELO, DOMINGUES, TEIXEIRA, 2006; PEREIRA, 1990; WHO, 1987).

Os problemas de saúde provocados pela cárie dentária implicam não somente em comprometimentos individuais, mas também em grandes repercussões sócio-econômicas, pelo elevado custo do seu tratamento, pelas suas seqüelas e pelo absenteísmo no trabalho e na escola.

Em se tratando de exposição dos elementos dentários aos fatores etiológicos da doença cárie durante certo período de tempo, a avaliação do risco da doença é relevante para prever se um indivíduo desenvolverá ou não algum tipo de lesão. A importância desta avaliação está fortemente relacionada com a obtenção de conhecimentos precoces da doença cárie, além da adoção de critérios para prevenção, escolha adequada do tratamento a ser executado, melhor uso dos recursos disponíveis e para estudos de epidemiologia (MALTZ & CARVALHO, 1997).

Um componente relevante para subsidiar esta análise é a experiência anterior de cárie dentária de um indivíduo ou um grupo deles. Em se tratando de aspectos epidemiológicos e no que diz respeito a dados comparativos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o índice CPO-D para medir e comparar a experiência de cárie dentária em populações. O valor obtido por este índice expressa a média de dentes Cariados (C), Perdidos (P) e Obturados (O) em um grupo de indivíduos (OMS, 1997).

Este índice foi originalmente formulado por Klein e Palmer em 1937 e, ainda, tem sido utilizado como referência para o diagnóstico das condições dentais e para formulação e avaliação de programas de saúde bucal. Tendo em vista o caráter cumulativo da cárie dentária o índice CPO-D deve ser expresso por idade ou por grupo etário, pois quanto mais avançada a idade, mais alto é o CPO-D (PINTO, 2000).

Alguns estudos revelam que, em 1986, o CPO-D observado em crianças brasileiras com 12 anos de idade mostrava valores entre 6 e 7. Estes índices eram considerados dos mais elevados no mundo (BRASIL, 1986). Já em 1996, pode-se perceber uma redução significativa neste índice (3,1) para crianças da mesma idade. Tais valores mostravam-se próximos ao ideal estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para o ano 2000 (BRASIL, 1996; FEDERATION DENTAIRE INTERNACIONALE, 1982).

As razões para a diminuição do índice de cárie dental, no Brasil, neste período, podem ser apresentadas pela incorporação e consumo de água fluoretada, aliada ao estabelecimento de programas de atendimento odontológico aos escolares da rede pública e pela maior conscientização da população para programas preventivos.

A cárie dentária ainda constitui um grave problema de Saúde Pública, afetando 60-90% das crianças em idade escolar (BRASIL, 2004; PETERSEN e LENNON, 2004). Dados obtidos neste mesmo estudo puderam registrar que, no ano 2000, 68% dos 184 países analisados

apresentavam um índice CPOD inferior a 3 aos 12 anos de idade (WHO, 2005). Contudo, estes valores são variáveis de região para região.

Quantos aos valores epidemiológicos, estudos desenvolvidos em Portugal, em 1999, revelaram que o índice CPOD aos 12 anos de idade era de 3,1 categorizando este país como um território de experiência de cárie moderada. Tal situação de saúde colocava Portugal bem distante dos países mais desenvolvidos (MELO, DOMINGUES, TEIXEIRA, 2006).

É bem verdade que, em Portugal, ao contrário da política desenvolvida no Brasil, a saúde bucal não tem sido valorizada e não há qualquer estratégia de saúde que incorpore esta temática de maneira universal. Não há sequer um departamento que pense no problema de forma sistematizada e com objetivos claros. Vale ressaltar que o Plano Nacional de Saúde 2004-2010 de Portugal aborda o assunto de uma forma incipiente, mesmo apresentando tais referências epidemiológicas (MELO, DOMINGUES, TEIXEIRA, 2006).

No Brasil, a situação atual de cuidados com a saúde bucal difere daquela apresentada em outros países, uma vez que esta temática faz parte de uma Política Nacional intitulada Brasil Sorridente. Assim, mesmo diante de índices epidemiológicos semelhantes, acredita-se que já houve uma evolução significativa no que diz respeito ao nível de saúde bucal da população e grandes esforços, ainda estão sendo desenvolvidos para a efetivação e controle da doença cárie no país.

Até o ano 2000, a OMS recomendou o índice CPOD no máximo igual a 3 para crianças de 12 anos (PINTO, 2000). Contudo, de acordo com o relatório do levantamento das condições de saúde bucal, promovido em âmbito nacional pelo Ministério da Saúde, o CPOD da região Nordeste já apontava 3,19, enquanto que para a mesma faixa etária, a média nacional foi de 2,78 (BRASIL, 2004).

Considerando as metas anteriores e a heterogeneidade no grau de resposta a elas nas diversas populações do mundo, novas metas para 2020 foram propostas, para adaptação, em termos de percentuais de redução do CPO-D aos 12 anos, com especial ênfase no componente “C” (HOBDELL et al., 2003).

Para o ano 2020, a OMS, a World Dental Federation (WDF) e a International Association for Dental Research (IADR) propuseram os objetivos específicos para a saúde bucal, partindo da seguinte premissa: Pensar globalmente, agir localmente. Os objetivos apresentavam como destaque o desenvolvimento da Saúde Bucal a nível nacional, regional e local em diferentes

níveis de atenção. Ao contrário daquilo que foi proposto em 1981, não houve atribuição de valores absolutos a nenhum tipo de objetivo proposto. Estes valores, a partir de agora, deverão ser estabelecidos com base nas circunstâncias, na prevalência e gravidade da doença e condições sócio-ambientais locais (HOBDELL et al., 2003).

Em se tratando da doença cárie dentária, os objetivos propostos por estas instituições para o ano 2020, serão:

- aumentar a proporção de crianças sem cárie aos 6 anos de idade em X%;
- reduzir o CPOD, particularmente o componente C, aos 12 anos de idade em X%, com especial atenção aos grupos de risco;
- reduzir o número de dentes extraídos devido à cárie dentária nas idades de 18, 35-44 e 65-74 em X%;
- sendo, X adaptado a cada realidade.

3.1.2 Multifatoriedade da Doença Cárie Dentária

A cárie dentária é uma doença de origem bacteriana e de caráter multifatorial. Significa dizer que, para o desenvolvimento de um processo patológico de cárie dentária, é necessária a interação de vários fatores, em condições críticas, durante certo período de tempo, para que ela se expresse clinicamente (PEREIRA, 1993; FARGE, 1998 apud MELO et al, 2008; BARATIERI, 2001).

Diante disso, o caráter de desenvolvimento da doença cárie dentária deve ser encarado numa perspectiva dinâmica, em que o nível de acometimento ao indivíduo será determinado pela relação entre os múltiplos fatores etiológicos (PEREIRA, 1993). Estes fatores podem ser agrupados em duas grandes categorias: Fatores Primários Essenciais, indispensáveis à ocorrência da doença, e Fatores Secundários, que influenciam mais ou menos significativamente a evolução das lesões (PEREIRA, 1993; WEYNE, 2000).

Quanto aos Fatores Primários, consideram-se três categorias (FEJERSKOV, 1997; FARGE, 1998 apud MELO et al, 2008; SEOW, 1998; WEYNE, 2000):

- Relacionada com o hospedeiro - tecidos dentários susceptíveis à dissolução ácida e a saliva;
- Relacionada com o agente - abrangem os microorganismos cariogênicos;
- Relacionada com o ambiente - envolvem o substrato adequado à satisfação das necessidades energéticas das bactérias cariogênicas.

É importante salientar que a inter-relação favorável destes três fatores principais, exercendo-se durante certo tempo, é condição *sine qua non* à ocorrência das lesões de cárie e seu posterior desenvolvimento (FEJERSKOV, 1997; FARGE, 1998 apud MELO et al, 2008; SEOW, 1998; WEYNE, 2000).

Fatores Secundários atuando isoladamente ou em combinação influenciam de modo significativo cada um destes fatores anteriormente citados. Dentre estes fatores, pode-se citar: a presença de flúor na cavidade oral, a higiene oral, o perfil sócio-econômico, o estado de saúde geral e a predisposição genética. Diante disso, a atividade da cárie em um indivíduo pode se expressar como resultado de todas estas interações, dinâmicas e complexas, decorrente do aumento ou diminuição da resistência do hospedeiro, da cariogenicidade do substrato (dieta) e do potencial cariogênico da microbiota (PEREIRA, 1993; WEYNE, 2000).

De acordo com este contexto, observa-se que além de fatores microbiológicos, propriedades salivares e variáveis clínicas, outras características como aspectos socioeconômicos e demográficos, história médica, uso de serviços odontológicos, hábitos comportamentais e dietéticos, também são variáveis utilizadas para identificar os indivíduos com risco de cárie futura. A seguir, estão relacionados alguns destes aspectos.

3.1.3 Fatores Microbiológicos

No ponto de vista microbiológico, a cavidade bucal de humanos é palco de uma microbiota mista e inespecífica numa rede dinâmica de mais de 700 espécies de microorganismos, entre bactérias, fungos, protozoários e micoplasmas (AAS et al., 2005; PEREA, 2004; SAKAMOTO et al., 2005). Em geral, a saliva pode abrigar mais de 10^8 microorganismos/mL (MARSH e MARTIN, 2005).

É importante ressaltar que a colonização destas bactérias ocorre em diferentes sítios. Neste sentido, vale reforçar a idéia de que para toda superfície exposta da boca (dentes, sulco gengival, mucosa oral e língua) existem microorganismos específicos associados.

Segundo LOESCHE (1997), MARSH e MARTIN (2005), as bactérias predominantes da microbiota oral são anaeróbias ou anaeróbias facultativas, dos seguintes gêneros: *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Micrococcus*, *Peptostreptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* e *Leptotriquia*. Alguns estudos evidenciam que, em diferentes espécies animais, há variação da microbiota residente, uma vez que existem diferenças fisiológicas e anatômicas existentes entre cada uma delas.

Para cada um dos nichos, existe, ainda, uma sensibilidade específica a agentes nocivos de uma espécie. Isto pode ser influenciado, sobretudo, por especificidade de aderência a determinados substratos, especialmente no caso dos colonizadores iniciais da cavidade bucal (WEN e BURNE, 2002).

Outras bactérias envolvidas em estágios posteriores a este processo podem ser capazes de aderir não só as superfícies bucais, mas também as outras bactérias que já estão aderidas às superfícies e, assim contribuir na formação do biofilme (WEN e BURNE, 2002).

3.1.3.1 Crescimento e desenvolvimento bacteriano relacionado à doença cárie dentária

A etiologia da doença cárie está relacionada com microorganismos específicos, particularmente, o *Streptococcus mutans*. Este microorganismo apresenta alta similaridade fenotípica e sua transmissibilidade tem sido alvo de extensiva investigação epidemiológica e levado vários grupos de pesquisadores a conclusões diversas e contrastantes (BOWDEN, 1996).

O *Streptococcus mutans* é uma espécie de bactéria Gram-positiva considerada a mais cariogênica dos *Streptococcus* orais. Uma avaliação quantitativa destes microorganismos no biofilme dentário e na saliva, por exemplo, pode ser útil como auxiliar no diagnóstico de cárie (WIATER et al, 1999).

Estudos anteriores têm relacionado *Streptococcus mutans* como os microrganismos colonizadores dos dentes ao início das lesões cáries (AHMADY, MARSH, NEWMAN e BULMAN, 1993). Tais estudos vêm demonstrando a interação entre a necessidade prévia de formação do biofilme bacteriano e o início da patologia (JORDAN, KEYES, 1966 apud BORGES, CASTILHO, PEREIRA, 2008). Neste sentido, faz-se necessário investigar o potencial antibacteriano de lectinas sobre estes microrganismos.

A associação deste microrganismo à cárie dentária se dá devido à produção de ácidos e à capacidade de produzir polissacarídeos extracelulares que apresentam função importante no processo de adesão bacteriana às estruturas dentárias (WENNERHOLM, BIRKHED e EMILSON, 1995).

Estreptococos do grupo mutans incluem as espécies *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*. A espécie *S. mutans* é a mais prevalente e a mais amplamente estudada e, a espécie *S. Sobrinus*, a segunda espécie mais comum (MATEE et al., 1993).

O genoma de *S. mutans* foi descrito por Ajdic e colaboradores em 2002 em um único cromossomo circular que consiste de aproximadamente 2,03 milhões de pares de base (Mb). Neste cromossomo, foram identificados um total de 1.960 genes que codificam proteínas e 80 genes que codificam RNA ribossômicos e RNA transportadores (AJDIC et al., 2002).

Diversos fatores de virulência são necessários para o início do processo de cárie. Vale destacar que são estes fatores que tornam os *S. mutans* capazes de colonizar e de aumentar em proporção na placa dental cariogênica. Além disso, estes microrganismos atuam produzindo e tolerando grandes quantidades de ácidos, os quais promovem a desmineralização progressiva dos tecidos dentários, e conseqüentemente, a perda irreversível de tecido dentário.

A partir destas informações, é válido descrever os principais fatores de virulência apresentados por esta espécie bacteriana. Dentre os diversos fatores de virulência, descritos para este tipo de microrganismo podemos citar:

- **Acidogenicidade** - consiste na capacidade de produção de ácidos a partir da fermentação de carboidratos. Até o momento, dentre todas as espécies de bactérias Gram-positivas sequenciadas, a espécie *S. mutans* é capaz de metabolizar a maior variedade de carboidratos. Este microrganismo apresenta um complexo enzimático encarregado pelo transporte de diferentes açúcares para o interior da célula, onde sofrem processo de fermentação e são produzidos ácidos, principalmente o ácido

lático. Esta espécie bacteriana apresenta pelo menos 14 sistemas de transporte fosfotransferases (PTS, de *phosphotransferase system*) específicos para diferentes açúcares, além de 5 sistemas de transporte do tipo ABC (de *ATP-binding cassette*), incluindo-se o sistema de metabolismo de múltiplos açúcares (*MSM*, de *multiple sugar metabolism*) (AJDIC et al., 2002) (LOESCHE, 1986).

- **Aciduricidade** - definida como a capacidade de tolerar e proliferar em meios com pH ácidos. A acidificação do biofilme, decorrente da fermentação de diversos carboidratos, inibe o crescimento de diversos microrganismos comensais competidores do biofilme e favorece o crescimento de *S. mutans* devido à esta tolerância a ácidos. Isto se dá, principalmente, porque o *S. mutans* apresenta uma bomba translocadora de prótons H⁺ na sua membrana celular, denominada F₀F₁ ATPase, que funciona para manter o pH intracelular em torno de 7,5 (NASCIMENTO et al., 2004).
- **Produção de Polissacarídeos Extracelulares (PEC)** - *Streptococcus mutans* produzem e secretam enzimas (exoenzimas) denominadas glucosiltransferases (Gtf), as quais hidrolisam a sacarose em glicose e frutose e polimerizam as moléculas de glicose liberadas, formando Polissacarídeos Extracelulares (PEC) denominados glucanos. Diversos tipos de glucano são produzidos, variando sua solubilidade em água e dependendo do tipo e proporção das ligações entre as moléculas de glicose que podem ser do tipo α -(1-3) ou do tipo α -(1-6). Os glucanos insolúveis em água são aqueles em que prevalecem as ligações do tipo α -(1-3), e são os mais importantes na formação de uma matriz extracelular “pegajosa” insolúvel, essencial para o acúmulo de *S. mutans* no biofilme dentário (TAUBMAN, SMITH, 2005).

Segundo TAUBMAN e SMITH (2005), *S. mutans* produzem três tipos de Gtf:

- (1) GtfB: catalisa a síntese de glucanos ricos em ligações do tipo α -(1-3) (insolúvel em água, também chamados de mutanos).
- (2) GtfC: catalisa a síntese de glucanos com os dois tipos de ligações, α -(1-3) e α -(1-6), mas ainda insolúveis em água.
- (3) GtfD: catalisa a síntese de glucanos com ligações α -(1-6), solúveis em água (também chamados de dextranos).

- **Síntese de proteínas ligantes de glucano (Gbp de *Glucan-binding proteins*)** - *S. mutans* produzem pelos menos quatro tipos distintos de Gbp, a saber: GbpA, GbpB, GbpC e GbpD. Estas proteínas apresentam-se diferentes entre si, porém com o destaque da afinidade por glucanos como uma característica comum. Acredita-se que as Gbp sejam importantes para o acúmulo de *S. mutans* na presença de sacarose e na agregação de *S. mutans* na presença de glucanos (BANAS e VICKERMAN, 2003).
- **Produção de Polissacarídeos Intracelulares (PIC)** - *S. mutans* também é capaz de sintetizar polissacarídeos intracelulares que funcionam como uma reserva interna de carboidratos. Tal característica torna esta espécie ainda mais acidogênica, uma vez que permite a fermentação de açúcares e conseqüente produção de ácidos durante os períodos em que não há disponibilidade de substratos da dieta (HARRIS, MICHALEK e CURTISS, 1992).
- **Adesinas** - *S. mutans* apresenta algumas adesinas de superfície que se ligam especificamente aos componentes da película adquirida. Assim, em condições normais, *S. mutans* coloniza mais facilmente superfícies dentárias retentivas, como as áreas de sulcos, cicatrículas e fissuras dos dentes.
- **Bacteriocinas** – *S. mutans* produzem diversas bacteriocinas, também chamadas de mutacinas, que apresentam a capacidade de inibir o crescimento de outras espécies relacionadas, compreendendo um mecanismo de competição microbiana (GRONROOS et al., 1998).

3.1.3.2 Formação do Biofilme

A formação de biofilme está intimamente relacionada com a colonização de microorganismos na superfície do dente, uma vez que em outros sítios existe a possibilidade de descamação e, renovação do biofilme periodicamente possivelmente ocasionada por forças mecânicas. Numa fase inicial, entre 3 a 4 horas após a limpeza adequada, o dente é colonizado por estreptococos, particularmente *S. sanguinis*, *S. oralis* e *S. mitis*, e por alguns bastonetes gram-

positivos como *Actinomyces viscosus* e *A. naeslundii*. Estes são considerados colonizadores iniciais, sendo necessário um determinado intervalo de tempo, pelo menos 24 horas, sem remoção mecânica adequada para que haja formação de uma camada de biofilme clinicamente evidenciável (MERIJOHN, 2001).

É importante frisar que a presença do componente sacarose constitui um dos elementos essenciais para o acúmulo destes microorganismos sobre os dentes e para o início da atividade da cárie. Estes microorganismos são responsáveis pela síntese de grandes quantidades de polissacarídeo extracelular a partir da sacarose. Isso se dá através das enzimas glicosiltransferases, para as glicanas, e frutossiltransferase, para as frutanas, essenciais para a expressão da virulência (HAMADA & SLADE, 1980; YAMASHITA et al, 1993).

Vale destacar que a colonização microbiana é um processo dinâmico. São relacionadas diferentes etapas de colonização, sendo a aderência da bactéria à superfície um dos pontos iniciais neste processo (NYVAD & FEJERKOV, 1995). A adesão inicial ocorre através da película adquirida, por meio de receptores que estabelecem ligações específicas com adesinas da superfície bacteriana (MARSH, 1992).

Entende-se por película adquirida, uma camada acelular que se deposita no esmalte superficial dos dentes. É constituído por proteínas, glicoproteínas e lipídios, além de componentes bacterianos, como as glicosiltransferases (MARCOTTE & LAVOIE, 1998).

Neste processo de colonização são observadas algumas características bastante significativas como a especificidade. Aquelas bactérias com pouca ou nenhuma afinidade à película, caracterizadas como inespecíficas, são eliminadas pelo fluxo salivar. Neste sentido, vale ressaltar que estas interações bactéria/película são a chave dos estágios iniciais de formação do biofilme dental (GIBBONS et al, 1984).

Após a colonização inicial, o desenvolvimento rápido do biofilme segue através de relações interbacterianas, como co-agregação, produção de bacteriocinas e interações nutricionais. Estas relações interbacterianas contribuem para a diversidade da colonização bacteriana. A etapa de clímax acontece após 3 ou 4 semanas com o aumento da diversidade microbiana (NYVAD & FEJERSKOV, 1995).

É o desequilíbrio no ecossistema do biofilme oral que ocasiona as diversas doenças neste ambiente. Neste sentido, o processo patológico se desenvolve em decorrência da alteração do substrato e das condições locais (THEILADE, 1990).

Nesta perspectiva é que se aconselha o desordenamento desta formação bacteriana através do controle adequado do biofilme oral que é de suma importância para prevenção tanto da cárie, quanto da doença periodontal (THYLSTRUP & FEJERSKOV, 1995).

Vale destacar que o biofilme localizado em sítios específicos dos dentes é capaz de produzir uma variedade de irritantes locais após maturar-se, os quais, com o tempo, invariavelmente dissolvem o dente. Sabendo-se que o acúmulo de biofilme maduro é responsável por essa variação de saúde-doença, é razoável ver o grau de perturbação o qual dita a possibilidade de desenvolvimento das comunidades bacterianas com potencial cariogênico, capaz de causar os primeiros indícios de dissolução no esmalte em pacientes clinicamente saudáveis (THYLSTRUP, 1998).

3.1.4 Propriedades Salivares

a) Aspectos Gerais

A secreção salivar é um fluido de origem glandular, constituído basicamente de água, eletrólitos, muco e enzimas, que reveste os tecidos da mucosa bucal, ajudando na manutenção de uma barreira efetiva contra injúrias externas (MANDEL, 1989).

Possui propriedades físico-químicas extremamente variadas e é induzida por estímulos psíquicos, mecânicos, físicos, químicos e biológicos. É produzida e secretada pelas glândulas salivares (parótida, submandibular e sublingual) e quando estimulado, o fluxo salivar varia de 1,0 a 1,5 mL/min (KHOCHT, 1996).

Entre as funções da saliva, destaca-se, ainda, a manutenção do pH bucal, denominada de Capacidade de Tamponamento Salivar (CTS). Essa função é responsável pela manutenção do pH bucal em 6,8. Neste sentido, qualquer alteração nos níveis de pH é prontamente neutralizada pelos sistemas de tamponamento salivares (EPSTEIN, SCULLY, 1992).

Sua composição e fluxo salivar constante permitem o desempenho de outras funções importantes, como a solubilização do alimento seco, a lubrificação da cavidade bucal e esôfago além de atuar na higiene bucal, protegendo assim seus tecidos (TABAK, 1995).

b) Constituintes Salivares e funções

Os constituintes salivares muito diferenciados auxiliam na manutenção da integridade da mucosa pela hidratação dos tecidos orais, contribuindo assim com a lubrificação, limpeza mecânica, formação do bolo alimentar, função comunicativa, atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral, neutralização de ácidos e bases fortes, higidez dentária, através de maturação pós-eruptiva e de processos de des-remineralização (ZUMAËTA, 1999).

Dentre os componentes orgânicos, as proteínas salivares são importantes para a proteção das estruturas bucais e fornecem superfícies receptoras para adesão de bactérias (RUHL, RAYMENT, SCHMALZ, TROXLER, 2005).

Em sua composição salivar inclui íons cálcio, fosfato, bicarbonato, fluoreto, sódio e potássio, substâncias orgânicas como glicoproteínas, enzimas digestivas, glicose e uréia, além de restos alimentares, microrganismos, produtos do metabolismo bacteriano, células que descamam do epitélio oral, muco da cavidade nasal e da faringe, fluido transudato da mucosa e exsudato dos sulcos gengivais (ERICSON, MAKINEN, 1986; THYLSTRUP, FEJERSKOV, 2001).

Segundo THYLSTRUP e FEJERSKOV (2001), alguns elementos inorgânicos constituem a secreção salivar, a saber:

- Cloreto – geralmente apresenta-se em níveis inferiores quando comparado com os níveis no plasma sanguíneo, variando em relação proporcional à taxa de fluxo salivar e desempenhando importante função osmorreguladora;
- Bicarbonato - proveniente do metabolismo da glândula salivar ou da transferência em troca com cloro, pelo menos nas porções mais distais do túbulo, desempenhando importante função osmorreguladora, variando sua concentração segundo o fluxo salivar e, ocasionalmente, podendo exceder a concentração do plasma;

- Fosfato - desempenha importante função osmorreguladora e participa do processo de remineralização no sistema-tampão, atingindo uma concentração superior à do plasma sem depender da taxa de fluxo salivar;
- Iodeto – pode alcançar altas concentrações, chegando a 100 ou mesmo a 200 vezes, quando comparado com os níveis do plasma;
- Fluoreto – importante participação no processo de prevenção da cárie dentária;
- Sódio - varia em relação à taxa de fluxo salivar, desempenha importante função osmorreguladora e participa no transporte ativo de componentes por meio da membrana celular;
- Potássio - possui taxa superior à do plasma e tem funções semelhantes às do sódio;
- Cálcio - varia em relação à taxa de fluxo salivar, é ativador de determinadas enzimas e atua na remineralização do esmalte.

c) Mecanismos de Defesa

É bem verdade que a cavidade bucal é a porta principal de entrada de patógenos para o corpo humano, contudo, há um complexo mecanismo de defesa envolvido neste processo. Os diferentes mecanismos de defesa estão presentes na saliva com o objetivo de impedir a invasão, o crescimento descontrolado e/ou o metabolismo microbiano (MIZOBE-ONO et al, 2006).

A saliva atua diretamente na regulação da microbiota e na proteção contra microrganismos. Alguns destes inúmeros agentes infecciosos que colonizam ou penetram a cavidade bucal não ocasionam patologias e são desalojados em virtude do fluxo salivar constante ou algum outro tipo de força mecânica (MIZOBE-ONO et al, 2006).

A função de proteção da secreção salivar é desempenhada por componentes celulares e moleculares pertencentes às imunidades inata e adaptativa. O Sistema Imune Inato (SII) constitui a primordial defesa do organismo contra agentes infecciosos, uma vez que reconhece rapidamente o patógeno, seus produtos tóxicos ou o tecido danificado. É o SII que sinaliza a presença do agente causador de injúria e direciona as células do Sistema Imune

Adaptativo (SIA) para uma resposta específica contra o invasor (BASSET, HOLTON, O'MAHONY, ROITT, 2003).

Ao contrário do SII, os receptores para antígenos das células do SIA (TCR - linfócitos T e o BCR - linfócitos B) podem sofrer hipermutações, que aumentam a afinidade pelo determinante antigênico. Assim, há a formação de células de memória e, desta forma, o mecanismo de defesa torna-se mais eficiente a cada encontro sucessivo (JANEWAY, MEDZHITOV, 2002).

As proteínas do SII constituem a primeira linha de defesa do organismo e tem seu mecanismo protetor potencializado pelas imunoglobulinas que são secretadas pelos linfócitos B1 do SII e pelos linfócitos B do SIA (NIEUW AMEROGEN, VEERMAN, 2002).

Segundo Mizobe-Ono et al (2006), os principais componentes celulares e moleculares pertencentes ao Sistema Imune Inato (SII) e ao Sistema Imune Adaptativo (SIA) que atuam na proteção e na manutenção da homeostasia da cavidade bucal são:

- Componentes celulares das imunidades inata e adaptativa na saliva: leucócitos, derivados das glândulas salivares, do fluido crevicular, das tonsilas, da mucosa bucal, das secreções bronco-pulmonares e da orofaringe, linfócitos NK (SII) e linfócitos T CD4 e B (SIA);
- Componentes moleculares da imunidade inata na saliva: Fosfato, bicarbonato e proteínas (sialina), Lactoferrina, Lisozima, Mucina, Estaterina, VEGh, proteína da glândula de Von Ebner, SLPI, TIMP-1, Quitinase, Calprotectina, Cromogranina A-similes IR (CgA-similes IR) e EP-GP;
- Componentes da imunidade adaptativa na saliva: IgA, IgM e Micelas.

Diversos estudos já foram realizados relacionando o mecanismo de defesa imunológico da saliva e a integridade do tecido bucal, no entanto, constata-se que algumas proteínas têm papel estratégico diante deste processo. Assim, questiona-se se há relação entre a concentração destas proteínas na saliva em pacientes de risco à cárie diferenciado e, ainda, se há algum biomarcador para o diagnóstico e prevenção desta patologia.

3.2. Uso de lectinas para identificação e prevenção de doenças em Odontologia

3.2.1. Breve histórico

O termo lectinologia foi introduzido, inicialmente, por Potapov (1968) para referir-se a uma área de pesquisas e estudos acerca de uma classe específica de proteínas (ARRUDA, 2009).

A pesquisa de lectinas originou-se nos fins do século XIX, com o isolamento da Ricina por Hermann Sttilmark em 1888 durante suas atividades acadêmicas (BARONDES, 1988). Nesta ocasião, este pesquisador desenvolveu uma série de observações em relação à aglutinação de eritrócitos por extratos de semente de mamona (*Ricinus communis*). Durante a realização deste estudo, Sttilmark observou que os extratos destas sementes ao serem misturados ao sangue, ocasionavam a aglutinação de eritrócitos.

Desta forma, a Ricina tornou-se então a primeira lectina de origem vegetal a ser descoberta. Atualmente, sabe-se que esta proteína é, na verdade, uma complexa mistura de moléculas tóxicas e lectinas não-tóxicas. Caracteriza-se por ser uma proteína heterodimérica (2 monômeros não idênticos) com especificidade de ligação para Galactose e 2-N-acetil-galactosamina (LORD et al., 1994).

Vale ressaltar que estes estudos não se desenvolveram uniformemente devido ao limitado conhecimento que se tinha sobre proteínas e química de carboidratos. Segundo Rüdger et al. (2000) houveram evoluções significativas a partir do trabalho de Watkins e Morgan (1952 apud SELL e COSTA, 2000) que confirmou de maneira incontestável que as lectinas se ligavam a carboidratos.

Mais tarde, Karl Landsteiner (1907 apud DAMICO, 2002; SHARON and LIS, 2004) realizou uma série de estudos acerca desta temática e desenvolveu ferramenta de identificação de grupos sanguíneos a partir da lógica de aglutinação de células sanguíneas por lectinas vegetais.

Maior destaque pelas lectinas foi evidenciado neste período no qual os estudos das propriedades aglutinantes e ligantes dessas proteínas começaram a despertar interesse aos

pesquisadores. Estas propriedades tornavam este grupo de proteínas reagentes úteis para a detecção, isolamento e caracterização parcial de glicoproteínas. As lectinas possibilitaram, ainda, o estudo das mudanças dos padrões glicídicos que poderiam ocorrer no glicocálice de superfícies celulares durante o desenvolvimento, diferenciação e transformação neoplásica (TEIXEIRA et al., 2007a; ARRUDA, 2009).

Ainda no século passado, mais precisamente na década de 80 e início dos anos 90, intensificaram-se os estudos sobre esta temática uma vez que estas proteínas estariam envolvidas em importantes atividades biológicas: mediação do reconhecimento celular em muitos sistemas biológicos, tais como a adesão de bactérias, vírus e protozoários em células de hospedeiros; adesão de leucócitos em células do endotélio vascular; e atuação na defesa contra os patógenos (SHARON, 1993).

O termo lectina é derivado do latim, *legere*, que significa, selecionado, referindo-se à sua capacidade de ligação seletiva aos componentes sanguíneos. Etimologicamente, reflete sua propriedade de aglutinar grupos sanguíneos. É através desta propriedade constatadas pelo ensaio de atividade hemaglutinante que pode se detectar a presença de lectinas em uma amostra (AREGHEORE, MAKKAR, BECKER, 1998).

Embora tenham sido identificadas primeiramente nas plantas, se sabe, hoje, que as lectinas apresentam distribuição por toda a natureza, incluindo organismos eucariontes e procariontes (CAVADA et al., 2001).

Por definição, lectina constitui uma classe estruturalmente diversa de proteínas de origem não imune que se liga de maneira reversível a carboidratos ou substâncias que contenham açúcares, tais como glicoproteínas (GOLDSTEIN et al., 1983; LIENER et al, 1986; SHARON, 1993).

Pneumans e Van Damme (1995 a,b) observaram que se trata de uma classe de proteínas de origem não imune que possuem pelo menos um sítio de ligação reversível a carboidratos.

O conceito apresentado neste estudo, leva em consideração as observações feitas por Cavada et al (2001). Estes autores acrescentam que as lectinas representam um grupo estruturalmente heterogêneo de proteínas, de origem não imune, que apresentam propriedades em comum de se unir a carboidratos com alta especificidade.

A nomenclatura das lectinas pode estar relacionada tanto à denominação científica das espécies em que são purificadas em coerência com seu protocolo de purificação, como também pela designação dos monossacarídeos aos quais têm especificidade ou, ainda, pela designação do tecido ao qual foram extraídas. (KENNEDY et al., 1995).

3.2.2. Classificação

Lectinas são proteínas oligoméricas, ou seja, são constituídas de monômeros arranjados tridimensionalmente, formando dímeros, tetrâmeros, heterodímeros, etc. Estas proteínas podem ser monovalentes com um sítio ligante glicídico por monômero, ou polivalentes com mais de um sítio ligante glicídico por monômero.

Além do sítio ligante para o carboidrato específico, algumas lectinas também possuem um segundo tipo de sítio ligante que interage com ligantes não-glicídicos, como por exemplo, bases nitrogenadas (SINGH e cols., 1999).

A partir deste ponto de vista, as lectinas são classificadas em quatro grandes grupos de acordo com o número de domínios: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas (PEUMANS e VAN. DAMME, 1998) e superlectinas (PEUMANS et al., 2001).

De acordo com PEUMANS e VAN DAMME (1998), denominam-se:

- Merolectinas – as lectinas que possuem apenas um sítio de ligação para carboidratos; incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células devido à sua natureza monovalente. Um exemplo deste grupo é a proteína que se liga à quitina obtida do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*);
- Hololectinas – proteínas que contêm pelo menos dois sítios de ligação para carboidratos, idênticos ou muito similares; aglutinam células e ou precipitam glicoconjugados devido à sua natureza di ou multivalente. A maioria das lectinas de plantas pertence ao grupo das hololectinas;
- Quimerolectinas - proteínas que possuem um ou mais sítios de ligação para carboidratos e outro sítio com atividade catalítica (ou outra atividade biológica) que funciona independentemente daquele de ligação para carboidratos. Agem como

merolectinas ou hololectinas dependendo do número de sítios para carboidratos. Como exemplos de quimerolectinas existem as proteínas que inativam ribossomos tipo 2.

- Superlectinas – lectinas que possuem pelo menos dois sítios de ligação para carboidratos diferentes; um exemplo de superlectina é a lectina do bulbo de tulipa, a qual possui dois sítios de ligação a carboidratos, sendo um específico para manose e outro para N-acetilgalactosamina.

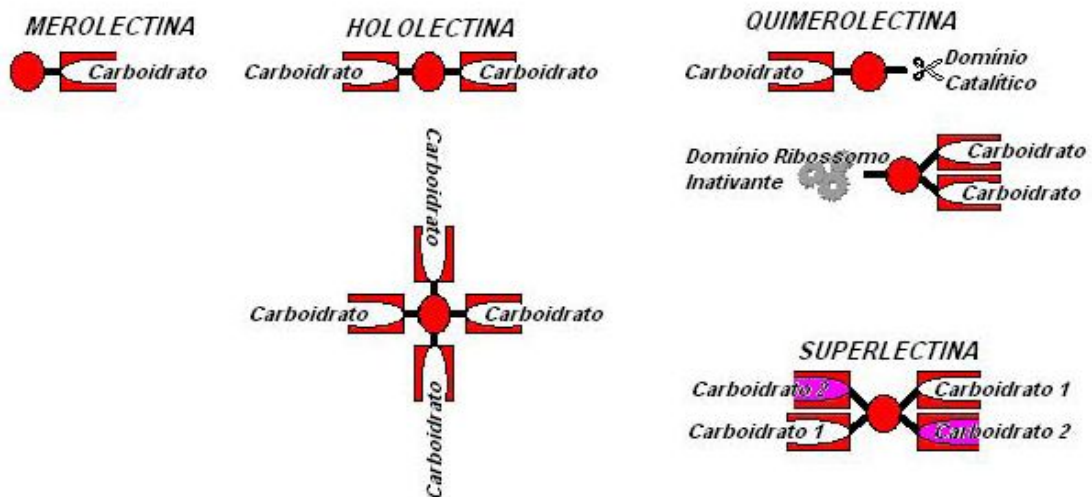


Figura 1 - Esquema demonstrador da classificação de lectinas segundo Peumans e Van Damme (1995a) e Van Damme *et al.* (1998).

As lectinas podem ser classificadas, ainda, de acordo com a similaridade na seqüência de aminoácidos, especificidade glicídica e conformação tridimensional. No que diz respeito a classificação de acordo com as características topológicas do sítio ligante glicídico, tais proteínas podem ser divididas em dois grupos principais (ELGAVISH & SHAANAN, 1997):

- Grupo I: proteínas cujos sítios ligantes glicídicos se encontram topologicamente encobertos e apresentam padrões específicos de reconhecimento. São exemplos deste grupo, as lectinas que desempenham a função de transporte, tais como as proteínas transportadoras periplasmáticas bacterianas e as enzimas;

- Grupo II: lectinas cujo sítio ligante glicídico apresenta-se topologicamente mais exposto e raso, formando, na maioria das vezes, uma depressão superficial molecular que acomoda o carboidrato ligante. Compreendem proteínas que, basicamente, se ligam e reconhecem glicídios sem que haja qualquer mudança química ou enzimática no ligante após a efetiva ligação. Neste grupo, estão grande parte das lectinas conhecidas, divididas em famílias clássicas de acordo com sua procedência ou mesmo especificidades glicídicas.

Em relação à sua origem, as lectinas podem ser classificadas em vegetal, animal, microbiana, dentre outras. As lectinas animais podem ser categorizadas, ainda, com base na homologia da sua sequência aminoacídica e na relação evolutiva entre lectinas; as lectinas das plantas, agrupadas de acordo com a família da planta e as lectinas encontradas em microorganismos, com base na sua função (VARKI, 1999).

3.2.3. Propriedades Biológicas

Sobre este grupo de proteínas, é indispensável fazer algumas considerações (NICOLSON, 1974 apud SILVA et al, 2000; SHARON, 1993; PEUMANS & VAN DAMME, 1996; CAVADA et al., 2001; FREIRE, 2003):

- Embora muitas lectinas reconheçam e se liguem a açúcares simples tais como glicose, manose, galactose, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina ou fucose, a afinidade é muito maior para com os constituintes de glicoproteínas: ácido siálico e N-acetilgalactosamina;
- Quanto à sua especificidade, as lectinas, usualmente, são definidas pelo monossacarídeo ou oligossacarídeo de ligação tendo em vista que estes compostos são mais eficazes em inibir a aglutinação ou precipitação de lectinas;
- Geralmente, são obtidas na sua forma pura, a maior parte por cromatografia, podendo também ser obtidas, mais recentemente, por recombinação com técnicas de DNA;

- Dentre os papéis biológicos detectáveis nas lectinas, podemos citar ações fungicida, antimicrobiana e inseticida, além de mimetizar as selectinas humanas e estimular células do sistema imune;
- Podem ser aplicadas na tipagem de eritrócitos, transporte de agentes quimioterápicos, indução de mitose, marcação taxonômica de microrganismos específicos, na investigação estrutural e funcional de carboidratos complexos, especialmente glicoproteínas, na observação de mudanças que ocorrem na superfície celular durante os processos fisiológicos e patológicos, desde a diferenciação celular ao câncer, na avaliação de toxicidade para células e animais, bem como no efeito imunossupressor in vivo;
- Nos animais e microorganismos elas podem servir para mediar o reconhecimento biológico de diversos eventos relacionados à comunicação celular, desenvolvimento, defesa, metástase tumoral, inflamação, etc.

Com base nas características anteriormente apresentadas, as lectinas estão atraindo, atualmente, muito interesse na pesquisa, sendo usadas como ferramentas nos diversos campos de interesse clínico e biotecnológico. Atualmente, as pesquisas nesta área têm se voltado para o estudo de lectinas vegetais superiores e, neste sentido, muitos esforços estão sendo desenvolvidos para o esclarecimento de aspectos relacionados à detecção, purificação, caracterização, especificidade, mecanismos de ação e estrutura destas proteínas. Tais considerações têm contribuído fortemente para o real entendimento deste grupo protéico como ferramenta biotecnológica.

3.2.4. Lectina de alga marinha da espécie de *Hypnea musciformis* (HML)

A *Hypnea musciformis* é um importante fonte de k-carragenana. Trata-se de um polissacarídeo sulfatado utilizado na indústria alimentícia, como agente espessante, estabilizante e gelificante, e na indústria farmacêutica, como agente espessante e estabilizante (OLIVEIRA, 1998).

Alguns estudos demonstram que a carragenana apresenta atividades antivirais, inibindo, por exemplo, o vírus HSV e o vírus HIV (NEUSHUL, 1990). Outras pesquisas têm mostrado que *H. musciformis* é composto por lectinas, que são importantes substâncias utilizadas como agentes pró e anti - inflamatórios e no diagnóstico e terapia em cancerologia (NAGANO, et al. 2002).

A atividade hemaglutinante presente no extrato aquoso de algas marinhas vermelhas foi observada pela primeira vez por Ainouz e Sampaio em 1991. Como outras lectinas de algas marinhas, a lectina derivada da espécie de *Hypnea musciformis*, HML, é uma pequena monomérica com uma massa molecular em torno de 9,000 Da (NAGANO et al., 2002).

Esta lectina isolada apresenta hemaglutinação em presença de eritrócitos tripsinizados de coelho e especificidade por mucina submaxilar bovina (0,6 µg/mL) e mucina de estomago de porco (0,3 µg/mL HML), conforme os estudos de Rodrigues e colaboradores (2005).

Em geral, a HML apresenta 90 resíduos de aminoácidos com 14 cisteínas conservadas que estão envolvidas na formação de 7 pontes dissulfeto (NAGANO, 2002). Essa proteína se apresenta de forma intacta e fragmentada. Sua estrutura, por não apresentar similaridades com nenhuma outra estrutura depositada em bancos de dados, indicam que a lectina da alga marinha vermelha *Hypnea musciformis* (HML), devem constituir uma nova família de lectinas (RODRIGUES, 2005).

3.2.5. Uso de lectinas em Odontologia

Em Odontologia, ainda, são escassos os estudos relacionados ao uso de lectinas no diagnóstico e prevenção de doenças. Estudos sobre esta temática, ainda, não conseguiram responder efetivamente qual seria o papel fisiológico das lectinas frente ao processo saúde doença cárie. Alguns autores apontam várias propostas com relação a este questionamento e apresentam dados significativos, especialmente, no que diz respeito à atuação de lectinas de vegetais superiores (TEIXEIRA, 2007a).

Algumas pesquisas apresentam referência para o estudo de cárie dentária e apontam para a avaliação da ação de lectinas vegetais na aderência de microrganismos ao biofilme oral (OLIVEIRA, 2005).

Segundo CISAR et al. (1995), interações mediadas pelas lectinas entre alguns grupos de microrganismos orais têm importante papel na colonização das superfícies dentárias. JORGE (1998) destaca que alguns tipos de lectinas vegetais podem até inibir o crescimento microbiano e a atividade proteolítica. Além disso, comenta que seria possível a inibição da aderência pelas lectinas vegetais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Lectina

A lectina utilizada nessa pesquisa está descrita na tabela abaixo, juntamente com sua especificidade por carboidratos, matriz cromatográfica usada no isolamento e referência metodológica.

Quadro 1 - Lectina, sua especificidade por carboidratos, matriz cromatográfica usada no isolamento e referência metodológica utilizada na pesquisa.

Espécie	Abrev.	Especificidade	Coluna	Referência
<i>Hypnea musciformis</i>	HML	Carboidratos complexos	DEAE	NAGANO et al, 2002

4.2. Bactéria

O microrganismo foi adquirido na ATCC (*American Type Culture Collection*) e está identificado na tabela abaixo:

Quadro 2 - Espécie e cepa dos microrganismo utilizado na pesquisa.

Microorganismo / Espécie	Cepa
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC 25175

4.3. Saliva

Inicialmente, o protocolo adotado pela pesquisa foi submetido à aprovação do CP (Comitê de Ética em Pesquisa), respeitando a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (CNS, 1996), a fim de se adequar aos procedimentos éticos defendidos por esta instituição. Todos os indivíduos receberam informações dos procedimentos antes da sua adesão à pesquisa, assinando um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foi requerida, ainda, autorização para a execução da pesquisa junto à Prefeitura Municipal de Sobral para a utilização de espaço físico e mobilização da equipe da Escola Padre Osvaldo Carneiro Chaves, do bairro do Dom Expedito, no município de Sobral. Em seguida, foi enviada uma Carta de Esclarecimento para os pais e responsáveis pelos escolares e um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ver anexo C) para a devida autorização em duas vias, de acordo com as normas exigidas para as pesquisas em seres humanos da Resolução Nº 10 de outubro de 1996 e na Resolução Nº 251 de agosto de 1997, do Conselho Nacional da Saúde/Ministério da Saúde.

Cabe esclarecer que o presente estudo foi considerado uma investigação sem riscos, já que não foi realizada nenhuma intervenção que pudesse afetar fisiológica, psicológica ou socialmente os indivíduos participantes.

Em virtude de implicações legais, e a fim de manter princípios éticos, as identidades dos sujeitos foram mantidas em sigilo e as informações confidencialmente garantidas. A utilização do material coletado, conforme acordado, só será feita em trabalhos de caráter exclusivamente científico (livros, artigos para publicação em periódicos, apresentação de trabalhos em seminários, congressos ou outros eventos científicos e relatórios de pesquisa) elaborados somente pelos pesquisadores.

Além disso, o pesquisador se comprometeu a comunicar os resultados da pesquisa às autoridades sanitárias e educacionais do município com a finalidade de contribuir para a melhoria das condições de saúde bucal da coletividade, reservando a imagem e assegurando-se que os sujeitos da pesquisa não fossem estigmatizados ou mesmo perdessem a auto-estima.

Em seguida, foi solicitada à direção da escola a realização de rastreamento de escolares da idade pertinente ao estudo e, a partir de uma listagem para pré-triagem dos pacientes

que participariam da pesquisa (APÊNDICE A). Todas as crianças desta idade foram cadastradas para a aplicação de um instrumento de avaliação do risco de cárie (CARIOGRAM[®]).

Dentre os critérios para a inclusão de escolares para a realização do presente estudo, podemos citar:

- Pertencer ao grupo de escolares de 12 anos de idade;
- Obter com autorização dos pais e responsáveis para a participação efetiva das atividades e coleta de material através de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, em duas vias;
- Estar matriculado efetivamente na instituição de ensino;
- Estar presente na escola em pelo menos um dos dias agendados para o exame.

A coleta da saliva utilizada nos experimentos desta pesquisa foi obtida no período de março a junho de 2009. A necessidade de obtenção deste material deve-se a utilização de um instrumento de avaliação do risco à cárie que inclui testes salivares como ferramenta imprescindível. Diante deste contexto, o critério adotado para divisão dos grupos de participantes para a realização do presente estudo foi o risco à doença cárie.

Amostras de saliva estimulada foram coletadas em frascos estéreis imersos em gelo e imediatamente submetidas a centrifugação a 12.000g por 30 minutos a 4°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante filtrado em filtros 0,22µm (Milipore) e denominado de saliva clarificada.

4.4. Pérolas de Hidroxiapatita

Foram utilizadas cristais/pérolas de hidroxiapatita sintéticas com diâmetro de 60 micrometros, conforme a descrição de alguns pesquisadores (NANCOLLAS and TOMSON, 1978; KOUTSOUKOS et al., 1980 apud TEIXEIRA, 2007b).

4.5. Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo explicativo-experimental de abordagem quantitativa através de questionário de saúde e análises estatísticas de dados.

A pesquisa faz referência à uma análise comparativa de testes salivares e atividade cariogênica em escolares de 12 anos de idade e a busca avaliar as potencialidades biotecnológicas da lectina de alga marinha da espécie de *Hypnea musciformis* (HML) no diagnóstico e prevenção de cárie dentária. A área de concentração deste estudo Macromolétulas / Aplicação Biotecnológica de Lectinas.

4.6. Desenho do estudo

No presente estudo, foram comparados os resultados obtidos através da aplicação de exame clínico convencional para cárie e testes salivares de atividade cariogênica apontados pelo programa CARIOGRAM[®] em associação com análises laboratoriais com a utilização de lectinas específicas.

Para melhor compreensão, o estudo foi dividido em 2 sessões, seguindo a ordem de execução da pesquisa, a saber:

1. Na primeira sessão, os pacientes foram avaliados pela equipe de execução da pesquisa, a fim de identificar e confirmar a inclusão do participante no presente estudo. Neste mesmo momento, foi confirmado o esclarecimento do paciente acerca do objeto de pesquisa, entrega do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice C), e realizados os procedimentos necessários para a alimentação do programa CARIOGRAM[®]. Por fim, foi realizada a coleta salivar para a análise laboratorial. Ao final da utilização desta ferramenta e análise dos primeiros resultados, os participantes serão classificados de acordo com o risco à cárie;

2. Em seguida, foram realizadas análises laboratoriais junto ao Laboratório de Imunologia da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral para obtenção dos dados da pesquisa no que diz respeito à:
 - a) Marcação de lectina com FITC;
 - b) Formação de Película Adquirida ao Esmalte (PAE) em pérolas de Hidroxiapatita (HA) para ensaio de marcação de película através de lectina associada ao FITC;
 - c) Ensaio de marcação de PAE com HML associadas ao FITC;
 - d) Determinação da Concentração Inibitória Mínima / Ensaio de Atividade Antibacteriana
 - e) Ensaio da formação do biofilme bacteriano em diferentes meios de cultura

4.7. CARIOGRAM®

O Cariogram® é um programa de computador interativo desenvolvido pelo Professor D. Bratthall, chefe do Departamento de Cariologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de Lund, Suécia, em colaboração com os Doutores L. Allander e B. Sc. KO. Lybegard. Este instrumento foi lançado oficialmente no mês de novembro de 1997 na versão sueca para ilustrar a interrelação entre os fatores que contribuem para o desenvolvimento da cárie dentária.

O Cariogram® ilustra uma possível avaliação de risco à cárie através de avaliações clínicas e coleta de material para estudo laboratorial. Inicialmente, dados individuais do paciente foram registrados para alguns fatores que tivessem relação direta com a doença cárie como: bactérias, dieta e susceptibilidade do hospedeiro.

Em seguida, foram atribuídos valores aos diferentes fatores, de acordo com uma escala pré-determinada, e os mesmos inseridos no programa de computador, que evidenciou a probabilidade de se evitar a cárie. Nesta lógica, o modelo Cariogram® constitui uma maneira simples de apresentar a interação entre os fatores relacionados à cárie e tem se mostrado útil em

várias situações, principalmente quando se deseja discutir com o paciente a importância dos fatores etiológicos.

O exame clínico bucal foi realizado com o objetivo de avaliar as condições de saúde bucal. Em cada exame, utilizou-se um espelho bucal nº5, uma sonda exploratória e espátula de madeira sob luz natural. Todos os procedimentos referentes ao exame clínico seguiram as normas de biossegurança, a fim de se evitar infecções cruzadas. Para isso, fez-se uso de luvas descartáveis, máscaras, aventais, gorros e óculos de proteção, além de instrumentos esterilizados, sendo utilizados somente um jogo por paciente examinado.

Os dados obtidos foram anotados em ficha clínica específica (APÊNDICE B) contendo o número de identificação do participante, a data do exame, o sexo e a idade. As fichas clínicas apresentaram informações referentes, ainda, às seguintes variáveis, a saber:

a) Índice de Placa Bacteriana

Os dentes de cada participante foram evidenciados utilizando corante a base de fucsina básica (Eviplac, Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda). Em seguida foi utilizado o método simplificado de Greene & Vermillion adaptado por Guedes-Pinto (2000), para quantificação de placa bacteriana.

Utilizou-se a superfície vestibular e lingual de 6 dentes índices, as quais receberam escores de 0 a 3 (Quadro 1). Foram observadas quatro superfícies dos primeiros molares permanentes, sendo as faces vestibulares dos primeiros molares superiores e a lingual dos inferiores de ambos os lados. Em participantes portadores somente de dentes decíduos, foram utilizados os segundos molares decíduos para estudo.

Observou-se também as faces vestibulares dos incisivos centrais direitos superior e inferior. Após registro dos valores para cada superfície, estes foram somados e divididos por seis.

Quadro 3 – Médias de escores por paciente atribuídos para cada face, utilizando-se índice de Greene & Vermillion, para quantificação de placa bacteriana (Guedes- Pinto, 2000).

Escores	Média	Interpretação
0	< 0,4	Ausência de depósito
1	0,4 a 1,0	Depósito que vai além de 1/3 da superfície dentária
2	1,1 a 2,0	Depósitos cobrem mais de 1/3, não indo além de 2/3 da superfície dentária
3	> 2,0	Depósitos cobrem mais de 2/3 da superfície dentária

b) Contagem de Estreptococos do Grupo *Mutans* na Saliva

As amostras de saliva estimulada foram obtidas através de mastigação de bloco de parafina de 1 cm³, dispensadas em Tubos Falcon e transportada até o laboratório. Para isso, foi necessário que o paciente estivesse em jejum 1 hora antes da realização da coleta.

As amostras de saliva requeridas para a determinação da contagem de células viáveis de *Streptococcus mutans* foram mantidas no gelo até o início do procedimento microbiológico para contagem, visando impedir a multiplicação das bactérias que são mesófilas e crescem à temperatura ambiente (GOLD, O.G.; JORDAN, H.V.; VAN HOUTE, 1975 apud MATTOS-GRANER et al, 1998). Mediante a esse fato, o período de tempo entre a coleta e a semeadura não ultrapassou três horas.

Com o auxílio de uma pipeta, foram retirados cinquenta microlitros da amostra de saliva, previamente colhida em tubos eppendorf. Em seguida, foram realizadas diluições decimais sucessivas em solução salina 0,85% esterilizada obtendo-se diluições decimais de 10⁻¹ a 10⁻³.

A partir da saliva pura e de cada diluição, 0,1 mL foi semeado em triplicata em placas de Petri contendo ágar mitis salivaris acrescido de 20% de sacarose, (0,2) Unidades Internacionais de Bacitracina e 0,1g de telurito de potássio. A Placa de Petri com o meio de cultura MSB foi dividida em 4 porções de modo a facilitar a identificação das colônias por diluição. As placas foram incubadas por 72 horas a 37°C em microaerofilia.

A leitura das placas foi efetuada pela contagem padrão de colônias de *Streptococcus mutans* viáveis (UFC/ml). O resultado final em UFC/ml de saliva foi obtido através da conversão da quantidade inoculada (0,1ml) e do fator de diluição.

A interpretação foi realizada de acordo com o quadro 2.

Quadro 4 – Atribuição de escores seguindo a interpretação da contagem de estreptococos do grupo *mutans*, pelo método de Köhler e Bratthall (1979).

NÚMERO DE COLÔNIAS	QUANTIDADE DE ESTREPTOCOCOS	ESCORES
1 – 20	Menor 105	1
21 – 100	105 a 106	2
Ø 100	Maior 106	3

c) Índices CPOD, ceo;

No que diz respeito à cárie dentária, a forma de avaliação e análise da presença de cárie foi feita utilizando o Índice CPO-D, descrito por KLEIN e PALMER (1937), que fornece a média do número total de dentes permanentes Cariados (C), Perdidos (P) e Obturados (O) em um grupo de indivíduos considerando o Dente (D) como medida de unidade.

O índice ceo é o correspondente à dentição temporária e exclui dentes extraídos, considerando-se a dificuldade de separar dentes perdidos por cárie ou esfoliados. Os critérios clínicos utilizados encontram-se no quadro 3. Para a experiência de cárie de cada paciente avaliado, foram atribuídos escores de 0 a 3, conforme o quadro 4.

d) Determinação da Velocidade do Fluxo Salivar

As coletas de saliva foram realizadas nos dois períodos, matutino e vespertino, com jejum mínimo de uma hora e sem higiene prévia da cavidade oral.

A determinação do fluxo salivar, baseada em Krasse (1986), foi realizada utilizando-se um pedaço de parafina e uma proveta graduada de 20 mL. Os voluntários foram orientados a não ingerir, previamente no dia do teste, qualquer substância estimulante ou contendo corantes.

Inicialmente, os voluntários enxaguaram a boca energeticamente água destilada, para limpeza de “debris” celulares. Em seguida, a parafina foi deixada na boca por 30 segundos, sendo a saliva acumulada neste período deglutida. Logo após, foi solicitado que o participante mastigasse a parafina e toda a saliva produzida foi coletada em tubos Falcon durante o período de cinco minutos. Os tubos foram previamente resfriados com a finalidade de diminuir as bolhas e a espuma. Em seguida, o recipiente foi fechado hermeticamente e o volume de saliva medido no laboratório.

Após esta análise as amostras salivares foram colocadas em mini-tubos, centrifugadas a 12.000g e armazenadas em um sistema refrigerado (freezer a -20°C) até a realização dos procedimentos analíticos (THYLSTRUP e FEJERSKOV, 1995).

Foram utilizados como índices de secreção da saliva integral estimulada com parafina os valores expressos no quadro 5, medidos em mililitros por minuto (ml/min).

e) Capacidade Tampão da Saliva

Foi adicionado 1,0 mL da saliva coletada de cada paciente em 1,0 mL de solução de HCl 0,005M, de acordo com o método de ERICSSON (1959 apud SPADARO et al, 1998). Após agitação do tubo, aguardaram-se dez minutos e determinou-se o potencial hidrogeniônico (pH) com o auxílio de um pHmetro previamente calibrado. Os escores a serem atribuídos para a capacidade tampão encontra-se no quadro 6.

f) Utilização do Flúor e Dieta

As informações referentes à utilização do flúor nas crianças examinadas foram obtidas através da anamnese na presença dos pais ou responsáveis. Os escores atribuídos encontram-se no quadro 7. Foram, ainda, atribuídos escores para o conteúdo de açúcar na dieta (Quadro 8) e a frequência de consumo de açúcar (Quadro 9).

Quadro 5 – Apresentação de critérios clínicos a serem utilizados para obtenção dos índices CPOD/S e ceod/s.

CLASSIFICAÇÃO	CÓDIGO	CRITÉRIO
Cariado	C/c	Esmalte socavado; sulcos e fissuras com opacidade do esmalte, manchas de cárie ou presença de tecido amolecido; restaurações com recidiva; em casos de dúvida entre cariado e extração indicada, o dente foi considerado cariado;
Obturado	O/o	Dente restaurado com material definitivo; em caso de dúvida entre obturado e cariado, o dente foi considerado obturado;
Perdido	P	Dente extraído devido à cárie dentária;
Extração indicada	e	Quando o dente apresenta lesão que atingiu a câmara pulpar;
Hígido	--	Quando inexistir cárie ou restauração; em caso de dúvida entre hígido e cariado, o dente foi considerado hígido.

Quadro 6 - Escores atribuídos, considerando-se a prevalência de cárie e a meta da Organização Mundial de Saúde para crianças até 12 anos.

ESCORES	PREVALÊNCIA
0	Livre de cárie e sem restaurações
1	CPOD/ ceo menor que 3
2	CPOD/ ceo igual a 3
3	CPOD/ ceo maior que 3

Quadro 7 - Escores atribuídos para quantidade de saliva obtida na determinação do fluxo salivar.

ESCORES	FLUXO SALIVAR
0	Secreção salivar normal: acima de 1,0 mL/ min
1	Secreção salivar baixa: 0,7 a 1,0 mL/ min
2	Secreção salivar muito baixa: 0,1 a 0,7 mL/ min
3	Xerostomia: menor que 0,1 mL/ min

Quadro 8 - Escores atribuídos para o valor de pH obtido na verificação da capacidade tampão da saliva.

ESCORES	VALOR DE pH
0	Capacidade tampão normal: pH acima de 6,0
1	Capacidade tampão reduzida: pH de 4,5 a 5,5
2	Capacidade tampão baixa: pH abaixo de 4,0

Quadro 9 – Escores atribuídos às Informações sobre a utilização de flúor pelas crianças, obtidas junto aos pais ou responsáveis.

ESCORES	FLÚOR
0	Uso de dentifrício fluoretado e uso constante de meios adicionais (bochechos e vernizes);
1	Uso de dentifrício fluoretado e uso eventual de meios adicionais (bochechos e vernizes);
2	Somente dentifrício fluoretado;
3	Não utiliza.

Quadro 10 - Escores atribuídos para o conteúdo de açúcar presente na dieta de cada participante, segundo pais e responsáveis.

ESCORES	CONTEÚDO DE AÇÚCAR NA DIETA
0	Muito pouco açúcar, dieta balanceada
1	Baixa presença de açúcar e dieta não cariogênica
2	Consumo de açúcar moderado, dieta com conteúdo relativamente alto de açúcar
3	Alta ingestão de açúcar, dieta cariogênica

Quadro 11 - Escores atribuídos para a frequência no consumo de açúcar presente na dieta, segundo pais e responsáveis.

ESCORES	FREQÜÊNCIA DE AÇÚCAR NA DIETA
0	Consumo máximo de três vezes/ dia;
1	Consumo máximo de cinco vezes/ dia
2	Consumo máximo de sete vezes/ dia
3	Consumo máximo superior a sete vezes/ dia

g) Doenças Sistêmicas Relacionadas

A presença de doenças ou condições sistêmicas também foi pesquisada durante a anamnese realizada com os pais ou responsáveis pelas crianças. Os escores atribuídos encontram-se no quadro 10.

Quadro 12 - Escores atribuídos para a presença de doenças sistêmicas relacionadas à cárie, segundo pais ou responsáveis.

ESCORES	DOENÇAS SISTÊMICAS RELACIONADAS
0	Paciente saudável: não existem sinais de doenças sistêmicas relacionadas à cárie
1	Presença de doença que pode influenciar no processo de cárie ou que possa contribuir para aumentar o risco (deficiência visual, incapacidade de locomoção)
2	Paciente pode estar acamado ou utilizando medicação contínua que afete a secreção salivar

4.8. Marcação de lectina e BSA com Isotiocianato de fluoresceína (FITC)

O processo de marcação de lectina e do BSA foi realizado utilizando o protocolo de marcação do kit de marcação de anticorpos “FLUOROTAG™ FITC CONJUGATION KIT” Stock No. FITC-1 da SIGMA Chemical Company.

A lectina foi dissolvida em 1mL de tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,1M pH 9,0. Após rápida agitação foi adicionada à mistura 250µL de uma solução de FITC (1mg/mL) sendo submetida à agitação constante por 2h ao abrigo da luz. Após incubação, a fração contendo lectina conjugada com FITC foi separada da FITC não conjugada por meio de cromatografia de exclusão molecular em coluna PD 10 (Pharmacia LKB – 9,0mL), previamente equilibrada com 30 mL de tampão fosfato salina 0,01M (contendo ainda: 138 mM de KCl e 27mM de NaCl) pH 7,4 e com fluxo contínuo mantido por força da gravidade.

A amostra contendo lectina e FITC foi aplicada à coluna e a amostra foi eluída em 10 mL de PBS, coletando alíquotas de 1 mL, sendo monitorada a absorvância de cada alíquota a 280nm e 495 nm em espectrofotômetro. Após as leituras as alíquotas com absorvância maior que 0,400 foram coletadas e dialisadas contra água mili-Q para posterior liofilização e estocagem do material para uso posterior.

4.9. Formação de Película Adquirida ao Esmalte (PAE) em pérolas de Hidroxiapatita (HA) para ensaio de marcação de película através de lectinas associadas ao FITC

Para a formação da Película Adquirida ao Esmalte (PAE) foi pesado 5mg de pérolas de hidroxiapatita (60µm) e, em seguida, foram adicionados 125µl de saliva clarificada de pacientes de alto e baixo risco individualmente. As amostras permaneceram por 15 minutos sobre agitação constante à temperatura ambiente e, a partir daí, foram lavadas com tampão PBS 0,1M pH 7,2 e utilizadas nos experimentos (LAMKIM e OPPENHEIM, 1993).

4.10. Ensaio de marcação de PAE com lectinas associadas ao FITC

Após o tratamento das pérolas de hidroxiapatita com saliva, foram adicionados 125µL de BSA (100µg/ml) sob agitação de 15 minutos e, em seguida, novamente lavadas com 1 ml de PBS 0,1M pH 7,2. Em seguida, foram adicionados 125µL de solução de *HML* marcada com FITC (100µg/ml) e colocados sob agitação por mais 15 minutos. Após esse tempo as pérolas foram lavadas três vezes com tampão fosfato PBS 0,01M pH 7,2 sendo, em seguida, observadas ao microscópio de fluorescência modelo “Olympus System Microscope Model BX60”.

4.11. Determinação da Concentração Inibitória Mínima / Ensaio de Atividade Antibacteriana

Partindo de uma cultura estoque, em meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion) com 20% de glicerol, os microorganismos foram crescidos inicialmente em 5 mL BHI por 24 horas a 37°C com um inóculo de 50µL. Após essa ativação inicial, a cultura foi renovada em mais 10mL de BHI caldo estéril com inóculo de 100µL e crescidos nas mesmas condições descritas acima por 18 horas. Essa renovação foi realizada com a intenção de se obter um microorganismo com melhor crescimento e desenvolvimento.

Em seguida, a cultura foi centrifugada (5000 rpm) por 5 minutos e lavada três vezes com salina sendo re-suspendidas no último ajustando-se a concentração a 10^8 UFC/ml de acordo com a escala de MacFarland 0,5. Após o ajuste da concentração, a solução de HML foi preparada a partir de uma concentração de 1000mg/mL e as amostras foram mantidas em estoque até a montagem das placas.

Foram distribuídos 100µL da solução de HML em tubos tipo *ependorfs* e adicionado 100µL da solução bacteriana ajustada. Após o inóculo, os tubos foram incubados a 37°C por mais 6 horas. Para o Grupo Controle, foram utilizados 100µL de NaCl 0,15M e 100µL de soluções de Albumina Sérica Bovina (BSA) seguindo as mesmas concentrações da lectina.

Por fim, as soluções foram retiradas da estufa e realizado um inóculo de 4µL das bactérias em contato com a lectina em placa de microtitulação (ELISA) contendo 200µL de meio BHI e realizada a primeira leitura (Tempo Zero). Após esse procedimento a placa foi incubada a 37°C e realizadas leituras nos tempos de 6, 12, 18, e 24 horas em Leitor de ELISA (BioTrak II – Plate Reader) a um comprimento de onda de 620nm.

4.12. Ensaio da formação do biofilme bacteriano em diferentes meios de cultura

O ensaio de aderência da cepa bacteriana em placa de ELISA foi realizado segundo a metodologia descrita por O'toole e Kolter (1998 a,b), com algumas adaptações.

Após a ativação inicial de uma cultura estoque, renovação e ajuste da concentração seguindo o modelo do ensaio anteriormente descrito, foram distribuídos 200µL do meio de cultura (BHI) em placa de microtitulação, e realizado um inóculo de 4µL de solução bacteriana. Após a montagem, a placa foi incubada 37°C, e realizadas a análise da formação de biofilmes nos tempos de 6, 12, 18 e 24 horas.

Em seguida, as placas foram retiradas da estufa e lavadas três vezes com água destilada (Biotrak II – Plate Wash) e depois adicionado 200µL de cristal violeta 1% por 15 minutos. Após a coloração com o cristal de violeta o processo de lavagem foi repetido e a placa colocada sob temperatura ambiente por 1 hora. Em cada poço foram adicionados 200µL de ácido acético 33%, e, após 15 minutos, a suspensão foi transferida para outra placa de microtitulação de fundo chato e seguida realizada a quantificação em leitor de ELISA em um comprimento de onda de 595nm (Genequant - *Pro*).

4.13. Análise Estatística

Os resultados dos testes de inibição de crescimento bacteriano e da formação do biofilme bacteriano foram demonstrados através de gráficos utilizando a estatística descritiva

(média e desvio padrão). A diferença entre médias de replicatas foi verificada através da aplicação do teste T para apresentação dos resultados do ensaio de inibição de crescimento bacteriano e teste One-way ANOVA com Bonferroni post-test executados com o auxílio do programa GraphPad Prism® versão 3.00 para Windows, Software GraphPad®, San Diego California USA, para formação do biofilme bacteriano. Para esses testes foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0.01$.

5. RESULTADOS

Para uma melhor compreensão, os resultados foram separados por categoria levando em consideração o tipo de metodologia aplicada. O presente trabalho avaliou, inicialmente, o risco à cárie dentária, que constitui um dos maiores problemas de saúde bucal coletiva no Brasil, em escolares da rede pública municipal de Sobral. Esta etapa constituiu o primeiro passo para a divisão dos grupos e, em seguida, partiu-se para a avaliação as potencialidades biotecnológicas de lectinas vegetais no diagnóstico e prevenção de cárie dentária.

A partir disso, foram realizados padrões de estudo em relação aos seguintes tópicos:

Primeira Etapa - Avaliação do Risco de Cárie em escolares de 12 anos de idade, em Sobral, Ceará, 2009

Segunda Etapa - Ensaios laboratoriais para a avaliação das potencialidades biotecnológicas de lectinas vegetais no diagnóstico e prevenção de cárie dentária

- Ensaio de marcação de Película Adquirida de Esmalte (PAE) com lectinas associadas com FITC;
- Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC);
- Formação de biofilmes em placas de microtitulação.

Primeira Etapa - Avaliação do Risco de Cárie em escolares de 12 anos de idade, em Sobral, Ceará, 2009

Em geral, 31 crianças foram incluídas no estudo. Em se tratando da prevalência de cárie obtido pelo exame CPOD, 26% (N=8) dos participantes do estudo apresentaram-se livres de cárie e sem restaurações (Figura 2). Em geral, o CPOD permaneceu abaixo de 3 em 58% dos casos (N=18), contudo somente 32,26% dos participantes (N=10) permanecem com a susceptibilidade à cárie dentária menor que 10% (Figura 3).

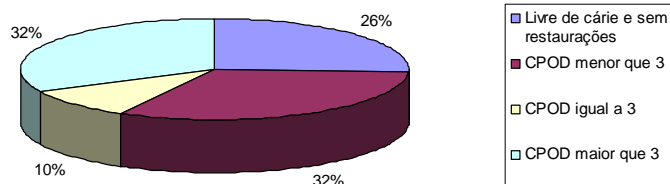


Figura 2 – Distribuição da prevalência de cárie através do CPOD em escolares de 12 anos de idade na Escola de Ensino Fundamental Padre Osvaldo Chaves, em Sobral, Ceará, 2009.

A Figura 4 mostra a classificação de risco à cárie dentária proposta pela ferramenta Cariogram[®] e apresenta três níveis de severidade, a saber: riscos baixo, intermediário e alto. Este resultado traduz o consolidado da alimentação de variáveis citadas anteriormente e agrupa os participantes em três grandes grupos.

Vale destacar que a classificação de risco de cárie, proposta pelo programa, está fortemente ligado à possibilidade de evitar novas cáries. Sendo assim, verificou-se através deste estudo que 78% (N=24) apresentaram risco de cárie nos níveis intermediário e alto (Figura 4) e, 45% dos participantes (N=14) apresentam menos de 50% de chance de evitar novas cáries (Figura 5).

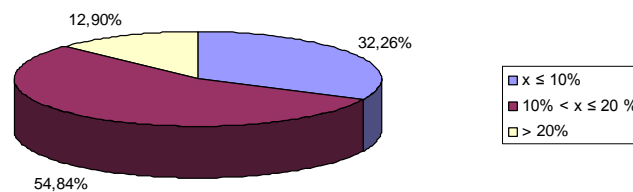


Figura 3 – Distribuição da susceptibilidade à cárie dentária pelo Cariogram[®], em escolares de 12 anos de idade na Escola de Ensino Fundamental Padre Osvaldo Chaves, em Sobral, Ceará, 2009.

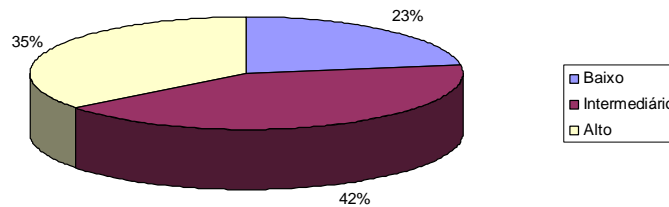


Figura 4 – Distribuição da classificação de risco à cárie dentária pelo Cariogram®, em escolares de 12 anos de idade na Escola de Ensino Fundamental Padre Osvaldo Chaves, em Sobral, Ceará, 2009.

Avaliando-se, ainda, os valores do Cariograma®, (porcentagem de possibilidade de evitar novas lesões de cárie), pôde-se observar que 2 crianças (6,45%) apresentavam possibilidade de evitar novas lesões de cárie menor que 75% (alto risco) e 4 crianças (12,90%) apresentavam uma possibilidade maior que 75% (baixo risco) de evitar estas lesões (Figura 5).

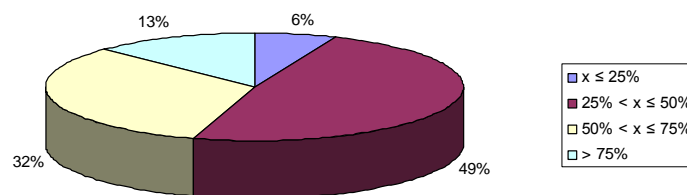


Figura 5 – Distribuição da possibilidade de evitar novas cáries à cárie dentária pelo Cariogram®, em escolares de 12 anos de idade na Escola de Ensino Fundamental Padre Osvaldo Chaves, em Sobral, Ceará, 2009.

Finalmente, foram selecionadas para o estudo, 14 amostras de pacientes em dois grupos, sendo 07 amostras de pacientes de baixo risco de cárie apontados pelo teste Cariogram® e outras 07 amostras de pacientes de alto risco.

Segunda Etapa - Ensaios laboratoriais para a avaliação das potencialidades biotecnológicas de lectinas vegetais no diagnóstico e prevenção de cárie dentária

Recentes trabalhos publicados indicam que lectinas vegetais possuem potencialidade importante como um possível insumo biotecnológico a ser utilizado em programas de prevenção de cárie e de doença periodontal (TEIXEIRA *et al.*, 2007 a,b). A partir deste contexto, partiu-se para a verificação deste padrão em crianças de 12 anos de idade categorizados como alto e baixo risco à cárie dentária.

Ensaio de marcação de Película Adquirida de Esmalte (PAE) com lectinas associadas com FITC

Para a realização deste ensaio, foram selecionadas 14 crianças categorizadas em dois grupos de 07 participantes. As amostras foram analisadas em duplicata e os registros fotografados em microscópio de fluorescência para análise comparativa entre estes dois grupamentos na tentativa de identificar um padrão diferenciado de acordo com o risco de cárie.

O Controle Negativo deste ensaio foi composto por película de saliva sobre pérola de hidroxiapatita tratada somente com solução de FITC. Para esta amostra, não foi registrado nenhum padrão específico, conforme tinha sido esperado.

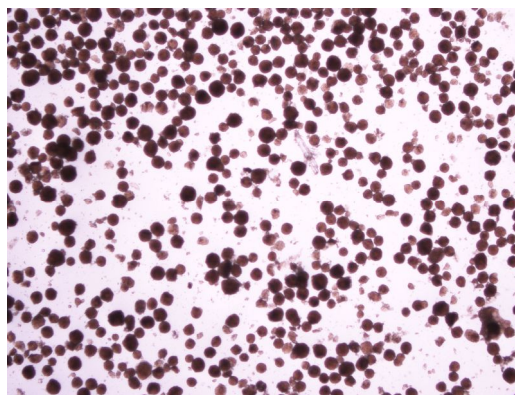


Figura 6 - Visualização do Controle Negativo (FITC) do ensaio de marcação de película adquirida em microscópio de Fluorescência no aumento de 40x.

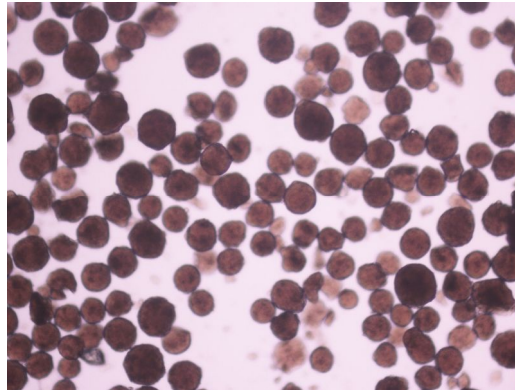


Figura 7 - Visualização do Controle Negativo (FITC) do ensaio de marcação de película adquirida em microscópio de Fluorescência no aumento de 100x.

A interação entre a lectina de algas marinhas da espécie de *Hypnea musciformis* (*HML*) e carboidratos de superfície da Película Adquirida ao Esmalte (PAE) simuladas em pérolas de hidroxiapatita foi demonstrada através de Microscopia de Fluorescência, utilizando lectina marcada com FITC (Figura 8). A lectina destas algas possui um padrão de marcação de película adquirida relevante, mostrando-se evidente em diversos pontos da imagem de maneira uniforme.

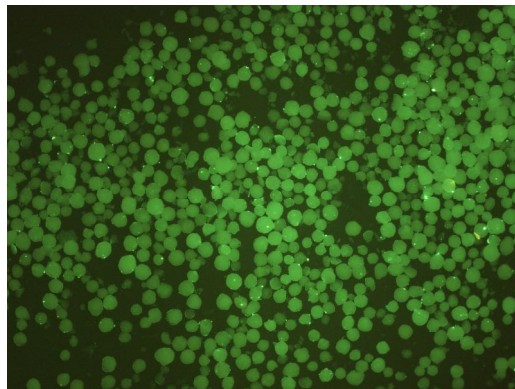


Figura 8 - Imagem por microscopia de fluorescência mostrando a interação entre a lectina de algas marinhas da espécie de *Hypnea musciformis* (*HML*)/FITC e a superfície da Película Adquirida ao Esmalte (PAE) simuladas em pérolas de hidroxiapatita. Aumento de 40x.

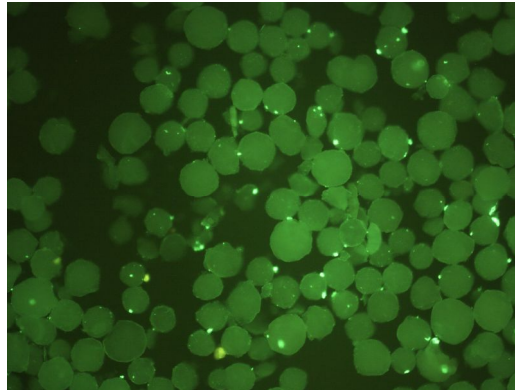
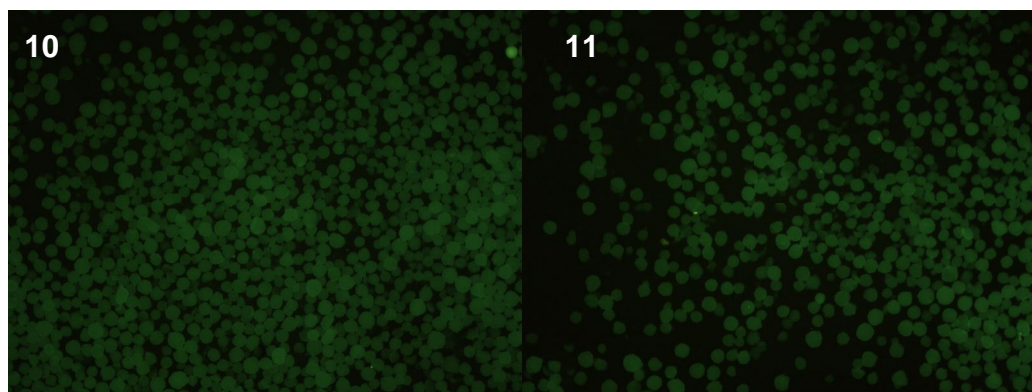
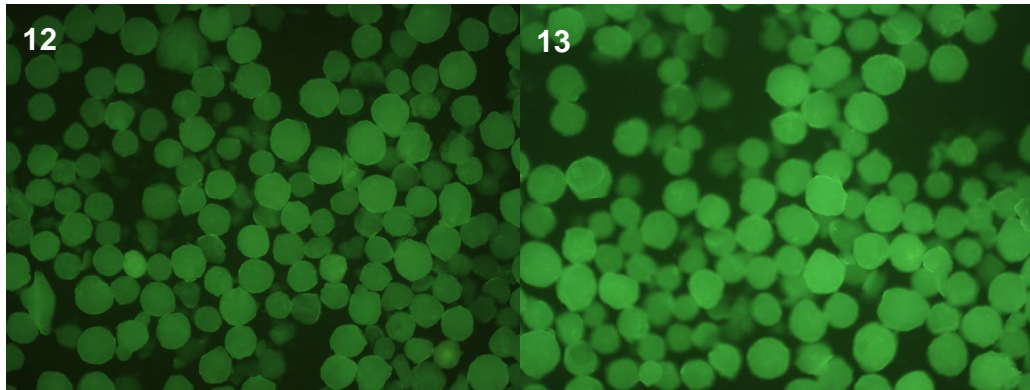


Figura 9 - Imagem por microscopia de fluorescência mostrando a interação entre a lectina de algas marinhas da espécie de *Hypnea musciformis* (HML)/FITC e a superfície da Película Adquirida ao Esmalte (PAE) simuladas em pérolas de hidroxiapatita. Aumento de 100x.

Quando comparadas as amostras de saliva de pacientes de alto e baixo risco à cárie dentária, a interação entre a lectina destas algas e carboidratos de superfície da Película Adquirida ao Esmalte (PAE) simuladas em pérolas de hidroxiapatita não apresentou evidência significativa. Embora fossem observadas imagens com um padrão de marcação evidente, isso não foi suficiente para um diagnóstico diferencial entre os dois grupos.



Figuras 10 e 11 - Imagem por microscopia de fluorescência mostrando a interação entre a lectina de algas marinhas da espécie de *Hypnea musciformis* (HML)/FITC e a superfície da Película Adquirida ao Esmalte (PAE) de pacientes de baixo (Figura 10) e alto risco (Figura 11) à cárie dentária simuladas em pérolas de hidroxiapatita. Aumento de 40x.



Figuras 12 e 13 - Imagem por microscopia de fluorescência mostrando a interação entre a lectina de algas marinhas da espécie de *Hypnea musciformis* (HML)/FITC e a superfície da Película Adquirida ao Esmalte (PAE) de pacientes de baixo (Figura 12) e alto risco (Figura 13) à cárie dentária simuladas em pérolas de hidroxiapatita. Aumento de 100x.

Determinação da Concentração Mínima Inibitória

Reconhecendo que a lectina isolada de algas marinhas vermelhas *Hypnea musciformis* (HML) reconhece glicoconjugados na saliva a partir de ensaio de marcação de Película Adquirida de Esmalte (PAE) com lectinas associadas com FITC, mas que isso não é suficiente para a diferenciação entre os grupos de alto e baixo risco à cárie, optou-se por investigar a atividade desta proteína na Concentração Mínima Inibitória (MIC) de diferentes de cepas bacterianas da espécie *Streptococcus mutans*, através da metodologia “*in vitro*” de microdiluição em placas de poliestireno. Aqui, o padrão de investigação não seria mais diferenciado por risco à cárie e, sim, por atividade frente às diferentes cepas bacterianas.

Dentro do intervalo de concentração de proteínas analisadas, a análise estatística foi aplicada e os dados mostrados são referentes à maior concentração (500 µg/ml).

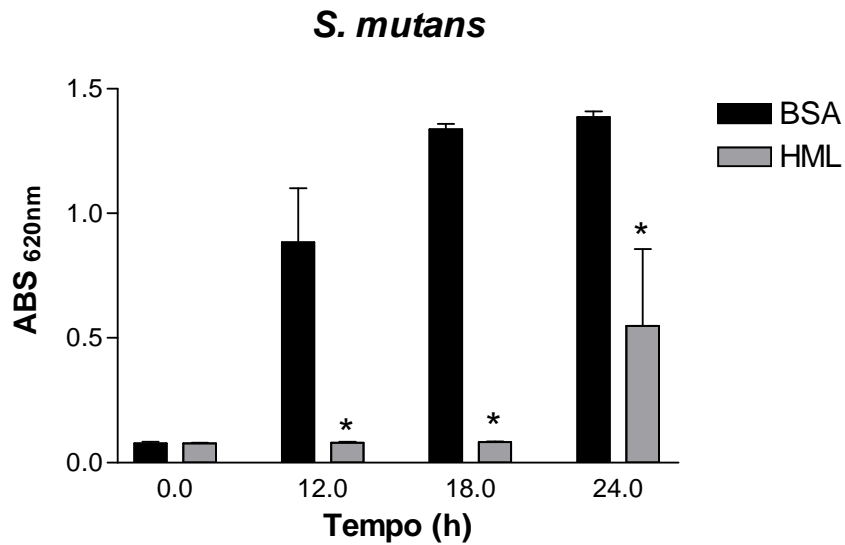


Figura 14 - Gráfico de barra do crescimento *Streptococcus mutans* (620nm) em diferentes tempos (6, 12, 18 e 24 horas) sob o efeitos das lectinas do gênero *Hypnea musciformis* (HML) na concentração de 500 µg/ml. (a) *S. mutans* x HML e (b) Controle Negativo utilizando Albumina Sérica Bovina (BSA). * Lectina x BSA. $p < 0.01$.

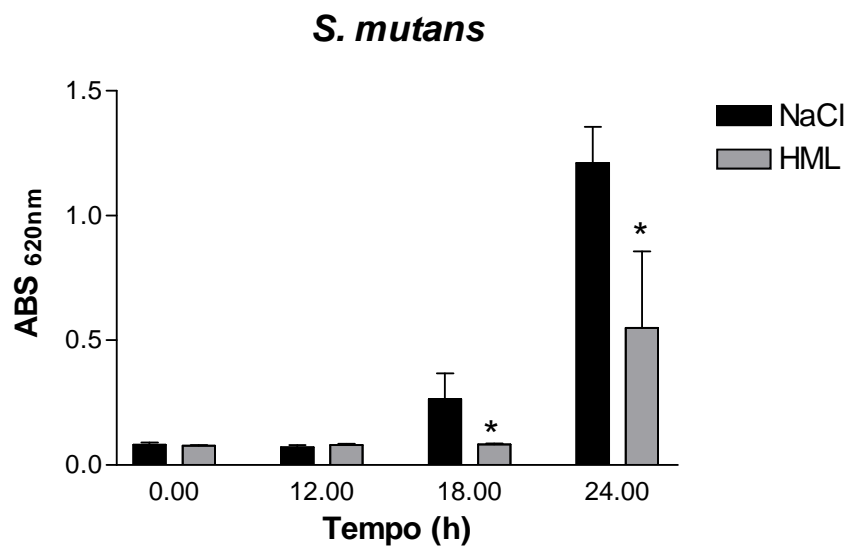


Figura 15 - Gráfico de barra do crescimento *Streptococcus mutans* (620nm) em diferentes tempos (6, 12, 18 e 24 horas) sob o efeitos das lectinas do gênero *Hypnea musciformis* (HML) na concentração de 500 µg/ml. (a) *S. mutans* x HML e (b) Salina. * Lectina x Salina. $p < 0.01$.

Através deste ensaio, foi percebido que a lectina de *Hypnea musciformis* (HML) apresentou atividade inibitória sobre *Streptococcus mutans*, quando comparados ao grupo Controle (solução salina 0,9%).

Inibição da formação de biofilme bacteriano em placas de poliestireno

Para a realização deste ensaio, o padrão de investigação não seria mais diferenciado por risco à cárie e, sim, por atividade frente à formação de biofilme de cepas bacterianas *Streptococcus mutans* UA159.

A lectina utilizada não inibiu ou estimulou a formação de biofilme de *Streptococcus mutans*. O padrão de inibição só foi observado em forma planctônica desta bactéria. Estes resultados demonstraram não haver inibição ou estimulação do desenvolvimento do biofilme destes microorganismos submetidos à lectina em teste.

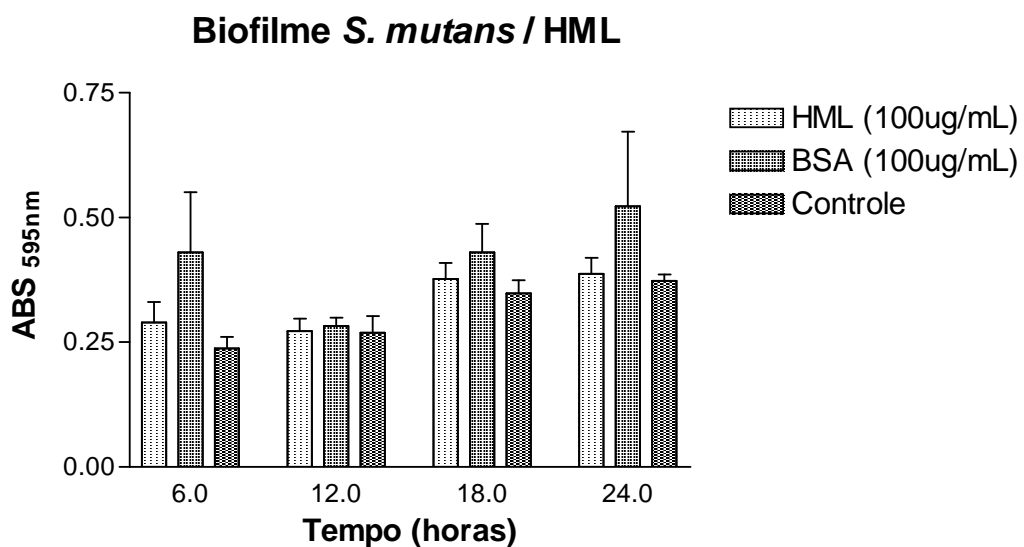


Figura 16 - Gráfico em barra do crescimento de biofilme em diferentes tempos (6, 12, 18 e 24 horas) na presença da lectina do gênero de *Hypnea musciformis* (HML) na concentração de 100 µg/ml. Para controle utilizou-se solução salina e BSA (Bovine Serum Albumine). (a) *S. mutans* x HML 100 µg/ml, (b) *S. mutans* x BSA 100 µg/ml, (c) Controle. *p<0.01.

Entretanto, a lectina isolada de algas marinhas *Hypnea musciformis* demonstrou uma capacidade de manter o crescimento das cepas de estreptococos de forma específica, ou seja, diferente, estatisticamente, de outra proteína, albumina sérica bovina.

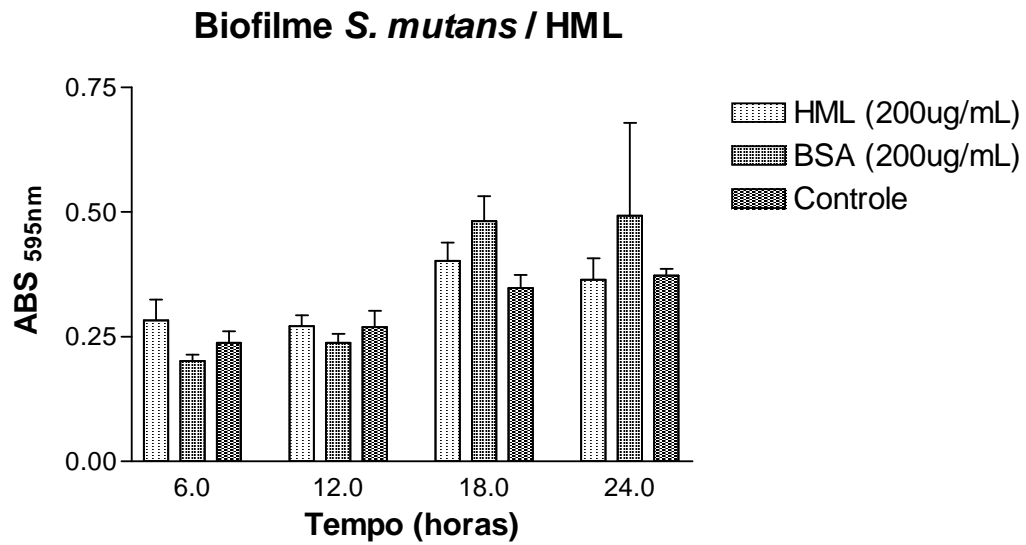


Figura 17 - Gráfico em barra do crescimento de biofilme em diferentes tempos (6, 12, 18 e 24 horas) na presença da lectina do gênero de *Hypnea musciformis* (HML) na concentração de 200 µg/ml. Para controle utilizou-se solução salina e BSA (Bovine Serum Albumine). (a) *S. mutans* x HML 200 µg/ml, (b) *S. mutans* x BSA 200 µg/ml, (c) Controle. * $p < 0.01$.

6. DISCUSSÃO

a) Epidemiologia

Quando analisados no presente estudo, os escolares aos 12 anos de idade matriculados na Escola Padre Oswaldo Chaves da rede pública municipal de Sobral, apresentaram algumas semelhanças com os dados de estudos anteriores e publicados no país. Isso pode ser observado na Figura 2 do presente estudo, em que se verificou que 42% dos escolares apresentaram índice superior ao esperado (CPOD > 3). Acredita-se que muitas ações e serviços devem ser elaborados e incorporados na realidade desta comunidade na tentativa de minimizar ainda mais o problema de saúde identificado entre elas. Contudo, é importante frisar que os esforços para a reversão deste quadro de saúde não dependem exclusivamente destas ações e serviços. É indispensável a incorporação de medidas de saúde junto à família, tendo em vista que o núcleo familiar é o eixo estruturante de todo o processo saúde-doença cárie.

Vale destacar que, a partir dos dados consolidados do questionário aplicados, a população de escolares do presente estudo mostrou-se única por diferentes razões, a saber: os indivíduos apresentam nível sócio-econômico relativamente baixo; alto consumo de açúcar extrínseco aliado a falta de esclarecimento sobre hábitos alimentares e dieta saudável, além de hábitos de higiene inadequados e acesso deficiente aos cuidados dentais preventivos e/ou terapêuticos, embora neste espaço social, diversas ações tenham sido desenvolvidas pelas Equipes de Saúde Bucal da Estratégia Saúde da Família.

Estes fatores associados podem ter contribuído, significativamente, para os altos índices de CPOD observados. Estes dados refletem ainda no número de indivíduos que apresentam maior susceptibilidade no desenvolvimento de novas lesões (Figura 3), uma vez que esta variável contribui para a definição de risco de cada paciente.

Vale destacar que os indivíduos que apresentam experiência de cárie devem ser constantemente monitorados e, dependendo da atividade de cárie presente, submetidos a métodos efetivos na prevenção da doença cárie. Este monitoramento pode ser realizado individual e coletivamente através da ferramenta apontada no presente estudo, o Cariogram[®], já que estas

variáveis estão, agora, registradas e cada um dos escolares categorizado em três diferentes segmentos de risco à cárie dentária: baixo, intermediário e alto (Figuras 4 e 5). Diante deste aspecto, as ações e serviços dedicadas à este grupo, podem ser avaliadas através de seu impacto na saúde destas crianças e monitorado através de gráficos específicos à cada um dos grupos. Individualmente, é esperado que sejam avaliados tais resultados, na tentativa de acompanhar o padrão de evolução específico a cada indivíduo.

Diante deste contexto, é indispensável a identificação de métodos específicos e efetivos na prevenção da doença cárie e promoção da saúde bucal para este grupamento de indivíduos.

b) Ensaios Laboratoriais

Lectinas vegetais podem ser utilizadas como ferramenta para o diagnóstico e prevenção de patologias orais relacionadas a biofilmes microbianos, uma vez que possuem a propriedade de se ligar de forma reversível a resíduos de carboidratos (TEIXEIRA, 2007b). Neste sentido, emerge o seguinte questionamento em relação ao diagnóstico da cárie dentária: as lectinas seriam capazes de reconhecer diferenças entre Películas Adquiridas de pacientes de alto e baixo risco à cárie?

A partir desta lógica, foram iniciados os ensaios laboratoriais na tentativa de explicação de cada um destes questionamentos. Sendo o componente saliva um dos principais fatores relacionados a este padrão de doença, foram avaliadas diferentes amostras a partir da lectina extraída da espécie *Hypnea musciformis* de algas marinhas vermelhas pertencentes à Família Hypneaceae (Divisão Rhodophyta, Classe Rhodophyceae, Subclasse Florideophyceae, Ordem Gigartinales).

A espécie de algas marinhas vermelhas *Hypnea musciformis* encontra-se distribuída geograficamente ao longo do litoral brasileiro, desde o litoral do Rio Grande do Sul até o litoral do Maranhão (NUNES, 2005; REIS et al, 2003; MARTINS, 2007). Esta espécie pode ser encontrada em regiões do infralitoral e mesolitoral, sobre rochas ou como epífita, principalmente sobre *Sargassum* spp. (SCHENKMAN 1986, REIS et al. 2003; MARTINS, 2007) e, devido a

esta distribuição geográfica, a *H. musciformis* está sujeita a variações ambientais e apresenta ampla tolerância à temperatura (18 a 30°C) e salinidade (20 a 50 ups) (YOKOYA & OLIVEIRA 1992 a,b; MARTINS, 2007).

A HML é capaz de reconhecer glicoconjugados na saliva de indivíduos de diferentes riscos à cárie (Figuras 8 e 9). Contudo, não há padrão diferencial aparente entre as amostras, o que leva a crer que esta proteína, através deste teste específico, não seria a ferramenta mais apropriada para o diagnóstico de alto e baixo risco à cárie (Figuras 10 e 11; Figuras 12 e 13).

Alguns estudos evidenciam que as interações mediadas pelas lectinas entre alguns grupos de microrganismos orais têm importante papel na colonização das superfícies dentárias (CISAR et al, 1997 apud OLIVEIRA, 2005).

Segundo Jorge (1998), alguns tipos de lectinas vegetais estão, ainda, relacionados à inibição do crescimento microbiano e da atividade proteolítica. Estudos *in vitro* indicam que o efeito antibacteriano das lectinas é variável dependendo do tipo de microrganismo. Além disso, seria possível a inibição da aderência bacteriana através do uso de lectinas vegetais.

Diante desta diversidade de características, a aplicação de lectinas sobre o controle de infecção por *S. mutans* tem sido observado e deve ser devidamente explorado, uma vez que o desequilíbrio da microbiota comensal ocasionado pela sua utilização *in vivo* poderia ser prejudicial à manutenção da saúde bucal. Contudo, existem situações em que é necessário suprimir mais rapidamente os níveis bucais bacterianos, até que outras estratégias de controle possam ser instituídas.

Vale ressaltar que diferentes microrganismos estão relacionados a diferentes tipos de cárie e, neste sentido, faz-se necessário investigar o comportamento destas proteínas frente à diversidade bacteriana envolvida no processo patológico (THYLSTRUP e FEJERSKOV, 1995; NEWBRUM, 1988; EDWARDSSON, 1974 apud HOSHINO, 1985; CHHOUR et al., 2005; UZEDA, 2002).

Em determinada fase do projeto, tornou-se imprescindível estudar a cinética de crescimento de *S. mutans* em meio contendo lectinas de algas marinhas. Assim, partiu-se para o estudo de crescimento de células de *S. mutans* em meio de cultura BHI, traçando-se a curva de crescimento durante 24 horas.

O Ensaio de Determinação da Concentração Inibitória Mínima ou Atividade Antibacteriana aplicado neste estudo faz referência ao principal microorganismo responsável pelo desenvolvimento da cárie e doença periodontal, *S. Mutans*, uma vez que é o gênero bacteriano predominante desde o nascimento até a morte do indivíduo e, segundo Uzeda (2002), a superfície coronária dos dentes representa uma área favorável à sua colonização e implantação.

Através deste tipo de experimento pode-se medir a inibição do crescimento bacteriano desta espécie bacteriana. Esse método está padronizado, possui detalhamento técnico bem definido e fornece resultados quantitativos (WOODS & WASHINGTON, 1995; NCCLS, 1997). Os resultados obtidos podem ser interpretados considerando as propriedades biológicas das lectinas e a concentração mínima a ser alcançada.

Estudos comprovam que a curva de crescimento bacteriano segue um determinado padrão, quando se trata de *S. mutans*. O crescimento de *S. mutans* em meio BHI é exponencial durante as primeiras 4 horas de incubação (Fase Exponencial). Logo em seguida, este crescimento se estabiliza, é a Fase Estacionária. O declínio do pH, como consequência da formação de ácidos orgânicos durante o crescimento celular, confirma o perfil de crescimento obtido. Assim, alterações ambientais, como a falta de nutrientes e o aumento de produtos tóxicos provenientes do próprio metabolismo celular, conduzem a um declínio no número de células viáveis que é característico da Fase de Morte (UZEDA, 2002).

Observou-se que a lectina HML foi capaz, mesmo em pequenas concentrações (15,6µg/ml), em inibir parcialmente o crescimento bacteriano (Figuras 14 e 15). Provavelmente esta lectina é capaz de se ligar a superfície da bactéria e através de alterações induzidas por esta ligação, interferir no processo de metabolismo, inibindo seu crescimento. Outra possibilidade seria a internalização da molécula produzindo efeitos inibitórios.

A formação do biofilme ocorre através de um processo ordenado e dinâmico. Nas etapas de formação e desenvolvimento do biofilme oral, há necessidade da fixação e proliferação de bactérias sobre as superfícies dos dentes (ADDY; SLAYNE; WADE, 1992). Além disso, a aderência bacteriana à película adquirida representa um dos primeiros mecanismos envolvidos na iniciação do desenvolvimento do biofilme dental (ALMEIDA, 2002; GIBBONS, 1984; LILJEMARK; SCHVER; BLOOMQUIST, 1978 apud PEREIRA, 2006).

Em cada etapa do seu desenvolvimento, o biofilme vai adquirindo novas espécies, dentre estas *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus*

sobrinus e *Lactobacillus casei* (De MICHELI; SARIAN, 1990; KORNMAN, 1986; PERES, 2003).

Com a justificativa de que o biofilme se trata de uma associação organizada, proliferante, enzimaticamente ativa e capaz de se aderir à superfície dos dentes, é indicada sua desorganização tão logo quanto possível (CIANCIO, 1992). Considerando a importância desta desorganização e as dificuldades no estímulo aos hábitos de higiene, torna-se interessante controlar o acúmulo das bactérias sobre as estruturas dentárias através de métodos químicos (CASTRO, 2001; CURY, 1997; MENDES; ZENÓBIO; PEREIRA, 1995).

Diante deste contexto, vários agentes antibacterianos, como por exemplo, os fitofármacos, estão sendo estudados com o objetivo de reduzir a formação do biofilme dental, assim como inibir o crescimento bacteriano e a adesão de microrganismos à superfície dentária (KORNMAN, 1986; MORAN et al., 2001; RODRIGUES JÚNIOR, 1998). Estes compostos têm assumido, nas últimas décadas, um papel importante como meio terapêutico alternativo na Odontologia. Isso se deve às suas propriedades antimicrobianas frente às afecções bucais, principalmente as decorrentes do biofilme dental (BHAKUNI, 1974 apud PEREIRA, 2006; GEBARA; ZARDETTO; MAYER, 1996; PEREIRA, 1998).

Segundo Akpata e Akinrimisi (1997), o extrato aquoso de plantas inibe o crescimento de *Streptococcus mutans* no biofilme dental. Vale ressaltar que o biofilme dental é essencial na patogênese da cárie dental e constitui o maior fator etiológico na doença periodontal (ADDY, SLAYNE and WADE, 1992).

Na fase inicial do processo de formação do biofilme, a presença de polissacarídeos extracelulares é bastante relevante tendo em vista sua atividade biológica no mecanismo de aderência intermicrobiana de *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus*. É importante frisar que a adesão destas bactérias às superfícies orais constitui um processo complexo e multifatorial, influenciado, ainda, pelo ambiente, superfície da célula bacteriana e a superfície do substrato (IKENO; IKENO; MIYAZAWA, 1991; SIEGRIST et al., 1986).

Segundo Gibbons (1984), o mecanismo de aderência das bactérias sobre as superfícies dos dentes envolve adesinas presentes na membrana da célula bacteriana e receptores específicos localizados na película adquirida. Diante deste mecanismo, a interação de proteínas, adesinas, lectinas, assim como as interações hidrofóbicas representam um aspecto importante que deve ser melhor investigado.

Diante destas afirmativas, a interferência com a adesão bacteriana poderia ser alternativa para se obter o controle da placa, e, conseqüentemente, prevenir a instalação de patologias bucais. Poucos estudos relatam a influência dos agentes antibacterianos no desenvolvimento do biofilme oral, especialmente com relação a seu efeito sobre os fatores envolvidos na aderência bacteriana à película adquirida (CAI et al., 1994, VAN LOVEREN; BUIJS; TEN CATE, 2000).

Neste estudo, a HML não se mostrou efetiva na inibição da formação de biofilmes orais de *S. mutans* e isso se deve provavelmente a alterações no padrão de expressão de proteínas de resistência, visto que a lectina foi capaz de inibir o crescimento na forma planctônica nas mesmas concentrações utilizadas (Figuras 16 e 17).

7. CONCLUSÕES / PERSPECTIVAS

Através da realização deste estudo, concluímos:

1. O conhecimento da etiologia e fisiopatologia da cárie dentária permite compreender a importância do diagnóstico precoce da doença, bem como os estudos de substâncias para a sua prevenção;
2. A HML apresenta atividade biológica de grande interesse científico. Esta lectina, assim como outras proteínas, vem sendo utilizada com ferramenta útil na investigação, na avaliação e no entendimento de diversos sistemas biológicos. O melhor conhecimento da função biológica desta e de outras lectinas, no reconhecimento e nas interações celulares, poderá servir de suporte no diagnóstico e no tratamento de muitas doenças.
3. Em se tratando do uso de lectinas como potencial biotecnológico para a prevenção e diagnóstico de cárie dentária, percebeu-se que há reconhecimento de glicoconjugados presentes na saliva de pacientes de alto e baixo risco observados em padrão de fluorescência;
4. Os resultados demonstram que a lectina testada tem a capacidade de interferir no crescimento bacteriano de forma negativa, sendo estatisticamente significativa ($p < 0,01$) em relação aos controles de salina e BSA. Entretanto estudos de inibição da formação de biofilmes microbianos utilizando a HML estão sendo programados, para assim avaliar a possibilidade de utilização dessas proteínas como insumos biotecnológicos a ser utilizados para prevenção da cárie dentária.
5. Os resultados obtidos pelo uso de HML na atividade antibacteriana foram promissores, mostrando que esta lectina apresentou atividade antibacteriana mesmo em quantidades muito pequenas;
6. Quanto ao uso destas proteínas na formação e desenvolvimento de biofilmes, não houve padrão característico.

8. EQUIPE EXECUTORA

A equipe de trabalho foi composta por um coordenador, dois co-orientadores, um examinador (cirurgião-dentista responsável pelo projeto), dois anotadores e auxiliares (bolsistas do NUBIS - Imunologia da Universidade Federal do Ceará, *Campus Sobral*).

A seguir estarão sendo listadas as atribuições e atividades de cada um dos componentes da Equipe Exeutora:

Nome	Função	Atividades
Fábio Solon Tajra	Estudante de Pós Graduação e autor do projeto	Execução do Projeto
Edson Holanda Teixeira	Professor Orientador	Coordenar e Orientar as Atividades Gerais do Projeto
Victor Alves Carneiro Andrea Silvia Walter de Aguiar	Professores Co-orientadores	Coordenar e Orientar as Atividades Gerais do Projeto
Cinara Carneiro Neves José Mauro Rios Neto Thyago Hallisson Mayron Alves de Vasconcelos Luiz Gonzaga do Nascimento Neto Theodora Thays Arruda Cavalcante Vassiliepe Arruda Érica Rabelo Rafaela Bastos Marcos Levy Machado Barbalho Viana	Co-autores e Colaboradores	Apoiar as atividades de execução do projeto

REFERÊNCIAS

AAS, J.A.; PASTER, B.J.; STOKES, L.N.; OSLEN, I.; DEWHIRST, F.E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, p.5721-5732, nov. 2005.

ADDY M, SLAYNE MA, WADE WG. The formation and control of dental plaque - an overview. **J Appl Bacteriol** 73: 269-278, 1992.

AHMADY K, MARSH PD, NEWMAN HN, BULMAN JS. Distribution of *S. mutans* and *S. sobrinus* at sub sites in human approximal dental plaque. **Caries Res**; 27:135-9, 1993.

AINOUZ, L. and SAMPAIO, A.H. Screening of Brazilian marine alga for hemagglutinins. **Bot. Mar.**, 34, 211-214, 1991.

AJDIC, D., W. M. MCSHAN, R. E. MCLAUGHLIN, G. SAVIC, J. CHANG, M. B. CARSON, C. PRIMEAUX, R. TIAN, S. KENTON, H. JIA, S. LIN, Y. QIAN, S. LI, H. ZHU, F. NAJAR, H. LAI, J. WHITE, B. A. ROE, AND J. J. FERRETTI. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 99: 14434-14439, 2002.

AKPATA ES, AKINRIMISI EO 1997. Antibacterial activity of extracts from some Africans chewing sticks. *Oral Surg* 717-722.

ALMEIDA PF. Microbiota estreptocócica associada com a formação inicial da placa dental. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas** 1: 33-41, 2002

AREGHEORE, E.M., MAKKAR, H.P.S., BECKER, K. Assessment of lectin activity in a toxic and a non-toxic variety of *Jatropha curcas* latex agglutination and haemagglutination methods and inactivation of lectin by heat treatments. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v.77, n.3, p.349-352, 1998.

BANAS JA, VICKERMAN MM: Glucan-binding proteins of the oral streptococci. **Crit Rev Oral Biol Med.**;14(2):89-99, 2003.

BARATIERI, LN, et al. **Odontologia Restauradora. Fundamentos e Possibilidades.** São Paulo, Santos: Livraria Editora ed; 2001.

BARONDES, S. H. **Lectins: their multiple endogenous cellular functions.** *Annu. Rev. Biochem.* 50:207-231. 20, 1981.

BARONDES, S.H. Bifunctional Properties of Lectins. Lectins Redefined. **Trends Biochem. Sci.**, 13, p. 480-482, 1988.

BASSET C, HOLTON J, O'MAHONY R, ROITT I. Innate immunity and pathogen-host interactions. **Vaccine.** 21(Suppl 2): 12-23. 2003

BEUTH, J.; PULVERER, G.; UHLENBRUCK, G.; PICHLMAIER, H. Importance of lectins for the prevention of bacterial infections and cancer metastases. **Glycoconj. J.**, 12:1-6, 1995.

BÖNECKER M, CLEATON-JONES P. Trends in dental caries in Latin American and Caribbean 5-6 and 11-13-year-old children: a systematic review. **Community Dent Oral Epidemiol** 31:152-7, 2003.

BORGES, Marcela Freire; CASTILHO, Aline Rogéria Freire de; PEREIRA, Cássio Vicente. Influência da sacarose, lactose e glicose + frutose no potencial cariogênico de *S. mutans*: estudo in situ e in vitro. **Rev. odonto ciênc.** 23(4): 360-364, 2008.

BOWDEN, G. Mutans streptococci caries and chlohexidine. **J. cant. Dent. Assoc.**, Ottawa, , v.62, n.9, p.700, Sep. 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Levantamento epidemiológico em saúde bucal: Brasil, zona urbana, 1986. Brasília: Centro de Documentação Técnica do Ministério da Saúde; 1988.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Departamento de Assistência e Promoção à Saúde. Coordenação de Saúde Bucal. Levantamento Epidemiológico em Saúde Bucal: 1a etapa – cárie dental – projeto. Brasília, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde – Coordenação Nacional de saúde Bucal. Resultados Principais do Projeto SB Brasil 2003: Condições de Saúde Bucal da população Brasileira 2002-2003. Brasília-DF, 2004.

BRATTHALL D. Dental caries: intervened – interrupted – interpreted. Concluding remarks and cariography. **Eur J Oral Sci.** 104 (4 Pt 2): 485-91, Aug-1996.

BRATTHAL, D. et al., Cariograma: Manual, São Paulo: Bios Comunicação e editora, 43 p.,1999.

BUISCHI, Y., Promoção de saúde bucal, **EAP-APCD**, v. 22, 1998.

CAIS, SIMIONATO MRL, MAYER MPA, NOVO NF, ZELANTE F. Effects of subinhibitory concentrations of chemical agents on hydrophobicity and in vitro adherence of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. **Caries Res** 28: 335-341, 1994

CASTRO SL. In vivo study efficacy of antiseptics on microaerobic microorganisms of the oral cavity. *Rev Dent* 1: 1-9, 2001.

CAVADA, B.S., BARBOSA, T., ARRUDA, S., GRANGEIRO, T. B. AND BARRALNETO, M. Revisiting proteus: Do Minor Changes in Lectin Structure Matter in Biological Activity? Lessons from and Potential Biotechnological Uses of the Subtribe Lectins. **Current Protein and Peptide Science**, 2, 123-135, 2001.

CAVADA, B.S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T.B.; BARRALNETTO, M. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current Protein and Peptides Science**, v 2, p. 1-13, 2001.

CHHOUR, K. L. et al. Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v . 43, n. 2, p. 843-849, 2005.

CIANCIO SG. Agents for the management of plaque and gingivitis. **J Dent Res** 71: 1450-1454, 1992.

CISAR, J.O. Fimbrial Lectins of the oral actinomycetes. In:..MIRELMAL, D. **Microbial lectins and agglutinins: properties and biological activity**. New York, N.Y: John Wiley & Sons, p.183-196, 1986.

CISAR, J. O. et al. Lectin recognition of host-like saccharides motifs in streptococcus cell wall polysaccharides. **Glycobiology**, n. 5, p. 655-662, 1995.

CURY JA. Controle químico da placa dental. In: Kringer, L.(coord). **Promoção de Saúde Bucal. São Paulo: ABOPREV/ Artes Médicas**, cap. 7, p.131-140, 1997.

DAMICO, Daniela Carla da Silva. Purificação, propriedades físico-químicas e estudo das atividades inseticida, fungicida e citotóxica de uma lectina presente em sementes de *Koelreuteria paniculata* / Daniela Carla da Silva Damico. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

DE MICHELI G, SARIAN R. Placa bacteriana: controle químico; estudo clínico em humanos da eficiência de dois produtos, comparados com um placebo, quando utilizados na forma de bochechos imediatamente antes da higiene bucal (pré-escovação). *Rev APCD* 44: 333-336, 1990.

ELGAVISH S. & SHAANAN B. Lectin-Carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. **Trends in Biochemical Sciences** 22, 462-467, 1997.

EPSTEIN JB, SCULLY C. The role of saliva in oral health and the causes and effects of xerostomia. **J Can Dental Association.**; 58(3):217-21, 1992.

ERICSON, T., MAKINEN, K.K., Saliva – formation, composition and possible role. In: THYLSTRUP, A., FEJERSKOV, O., **Textbook of Cariology, Copenhagen: Munksgaard**, cap. 3, 1986.

FEDERATION DENTAIRE INTERNACIONALE. Global goals for oral health in the year 2000. **Int Dent J.** 32(1):74-7, 1982.

FEJERSKOV O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. **Community Dent Oral Epidemiol**; 25 (1): 5-12. Feb-1997.

FREIRE, M.G. et al. Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds. **Toxicon**, v.42, p.275-280, 2003.

GEBARA, ECE, ZARDETTO, CGDC, MAYER, MPA. Estudo in vitro da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. **Rev Odontol Univ São Paulo** 10: 251-256, 1996.

GIBBONS RJ. Microbial ecology. Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. **J Dent Res** 63: 378-385, 1984.

GOLDESTINE, I. J. et al. Chemical taxonomy molecular biology and function of plant lectin. New York: **R. Liss Incorp**, p.225-36, 1983.

GRÖNROOS, L. et al. Mutacin production by Streptococcus mutans may be promote transmission of bacteria mother to child. **Infect. Immun.** Washington, v.66, n.6, p.2595-2600, June 1998.

GUEDES PINTO, A.C., Odontopediatria, São Paulo: Santos, 2000.

HARRIS, GS, MICHALEK, SM, CURTISS, R III. Cloning of a locus involved in Streptococcus mutans intracellular polysaccharide accumulation and virulence testing of an intracellular polysaccharide-deficient mutant. **Infect Immun**, 60: 3175-3185, 1992.

HAMADA, S., SLADE, H.D. Biology, Immunology and Cariogenicity of Streptococcus mutans. **Microbiological Reviews**, 44, 331-384, 1980.

HOBDELL M, PETERSEN PE, CLARKSON J, JOHNSON N. Global goals for oral health 2020. **Int Dent J**; 53 (5): 285- 8, Oct 2003.

HOSHINO, E. Predominant Obligate Anaerobes in Human Carious Dentin. **J Dent Res**; 64; 1195, 1985.

IKENO K, IKENO T, MIYAZAWA C. Effects of propolis on dental caries in rats. **Caries Res** 25: 347-351, 1991.

ISLAM, B., KHAN, S.N., KHAN, A.U. Dental caries: from infection to prevention. **Med. Sci. Monit.**, v. 13, n° 12, p. 589-595, December, 2005.

JANEWAY CA, MEDZHITOV R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol.**;20:197-216, 2002.

JORGE, A.O.C. Microbiologia Bucal. 2° ed. São Paulo: Santos, p. 58, 1998.

KENNEDY, J. F., PAIVA, P. M. G., CORREIA, M. T. S., CAVALCANTI, M. S. M. AND COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Poly**, 26, 219–30, 1995.

KOGA, C. Y.; UNTERKIRCHER, C. S.; FANTINATO, V.; SHIMIZU, M. T.; JORGE,

A. O. C. Testes de Atividade de Cárie. Avaliação de Diferentes Métodos. **Rev Gaúcha Odontol**, v. 43, n. 3, p. 141-144, maio/jun, 1995.

KHOCHT A. Periodontitis associated with chronic renal failure: A case report. **J Periodontology.**; 67:1.206-9, 1996.

KORNMAN KS. The role of supragingival plaque in the prevention and treatment of periodontal diseases: a review of current concepts. **J Periodont Res (Suppl.):** 5-22, 1986.

KOUTSOUKOS, P.G.; AMJAD, Z.; TOMSON, M.B.; and NANCOLLAS, G.H. Crystallization of Calcium Phosphates. A Constant Composition Study, **JAm Chem Soc** 1, 02:1553-1557, 1980.

KRASSE, B, Odont, Risco de cáries - Um guia prático para avaliação e controle, São Paulo: Quintessence, 1986.

KRASSE,B. The cariogenic potential of foods. A critical review of current methods. **Int Dent J**, v.42, p.35-6, 1985.

LAMKIM MS, OPPENHEIM FG, Structural features of salivary function. **Crit Rev Oral Biol Med.**; 4 (3/4): 251-259, 1993.

LIENER, I. R., SHARON, N. AND GOLDSTEIN, I. J. The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine. **Academic Press**, New York, 600pp, 1986.

LOESCHE WJ. Role of Streptococcus mutans in human dental decay. **Microbiol Rev** 50: 353-380, 1986.

LOESCHE, W. Cárie dental: uma infecção tratável. Rio de Janeiro: Ed. **Cultura Médica**, 349p, 1993.

LOESCHE, W. J. Ecology of the oral flora. In: NISENGARD, R. J.; NEWMAN, M. G. (Org.). **Microbiologia oral e imunologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 395p, 1997.

LORD, J.M.; ROBERTS, L.M.; ROBERTUS, J.D. Ricin: structure, mode of action, and some current applications. The Federation of American Societies for Experimental-FASEB, v. 8, p.201-208, 1994.

MALTZ, M.; CARVALHO, J., Diagnóstico da doença cárie. In: KRIGER, L., **Aboprev: Promoção de saúde bucal**, São Paulo: Artes Médicas, p. 79- 91, 1997.

MANDEL, I.D. The role of saliva in maintaining oral homeostasis. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.119, n.2, p.298-304, 1989.

MARCOTTE, H., LAVOIE, M.C., Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin. **A. Microbiol. Mol. Biol. Rev.** N° 62, p. 71-109, 1998.

MARSH PP. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. **J Dent Res** 71: 1431-1438, 1992.

MARSH, P.D.; MARTIN, M. V. *Microbiologia Oral*. 4ª ed. São Paulo: Santos, 38-42p, 2005.

MARTINS, Aline Paternostro. Efeitos da disponibilidade do nitrato no metabolismo do nitrogênio em variantes pigmentares de *Hypnea musciformis* (Wulfen in Jacqu.) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta) / Aline Paternostro Martins - São Paulo, 118 p. il. 2007.

MATEE, M. I., F. H. MIKX, J. S. DE SOET, S. Y. MASELLE, J. DE GRAAFF, and W. H. Palenstein Helderman. Mutans streptococci in caries-active and caries-free infants in Tanzania. **Oral Microbiol.Immunol.** 8:322-324, 1993.

MATTOS-GRANER, Renata de Oliveira et al . Prevalência de estreptococos do grupo mutans em crianças de 12 a 31 meses de idade e sua associação com a frequência e severidade de cárie dental. **Rev Odontol Univ São Paulo**, São Paulo, v. 12, n. 4, Oct. 1998.

MELO P, DOMINGUES J, TEIXEIRA L. A importância do despiste precoce de cárie dentária. **Rev Port Clin Geral**; 22:357 – 66, 2006.

MELO, P., AZEVEDO, AL., HENRIQUES, M., Cárie dentária – a doença antes da

cavidade, **Acta Pediatr Port**; 39(6):253-9, 2008.

MENDES, M. M. S. G. et al. “Agentes químicos para controle de placa bacteriana.” **Revista Periodontia**, v.5, n.2, p.253-256, jul/dez 1995.

MERIJOHN, G.K., The biofilm problem and a few simple solution. **California Dental Association Journal**. V. 29, Nº 9, 2001.

MIZOBE-ONO L, ARAÚJO JLP, DOS-SANTOS MC. Components of the innate and adaptive immunity present in human saliva. **Rev Odontol UNESP.**; 35(4): 253-261, 2006.

MORAN J, ADDY M, NEWCOMBE RG, MARLON I. A Study to assess the plaque inhibitory action of newly formulated triclosan toothpaste. **J Clin Periodontal** 28: 86-89, 2001.

NAGANO, C.S., MORENO, F.B.M.B., BLOCH, C., PRATES, M.V., CALVETE, J.J., SAKER -SAMPAIO, S., FARIAS, W.R.L., TAVARES, T.D., NASCIMENTO, K.S., GRANGEIRO, T.B., CAVADA, B.S. & SAMPAIO, A.H. Purification and characterization of lectins from the red marine alga *Hypnea musciformis*. **Protein and Peptide Letters** 9: 159-165, 2002.

NASCIMENTO, M. M., J. A. LEMOS, J. ABRANCHES, R. B. GONCALVES, and R. A. BURNE. Adaptive acid tolerance response of *Streptococcus sobrinus*. **J. Bacteriol.** 186:6383-6390, 2004.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Tentative Standards. **Waine: NCCLS, Document M31-T**, 64p, 1997.

NEUSHUL, M. Antiviral carbohydrates from marine red algae. **Hidrobiologia** 204/205: 99-104, 1990.

NEWBRUN,E. Cariologia. 2ªed. São Paulo: Santos, 187p. 1988.

NIEUW AMEROGEN AV, VEERMAN ECI. Salivary glands and saliva – number 2. Saliva – the defender of the oral cavity. **Oral Diseases**. 8:12-22, 2002.

NYVAD, B.; FEJERSKOV, O. Desenvolvimento, estrutura e pH da placa dental. In: THYLSTRUP, A. & FEJERSKOV, O. *Cariologia Clínica*. 2º ed. São Paulo: Santos, p.89-110, 2001.

NUNES, J.M.C. Rodofíceas marinhas bentônicas do estado da Bahia, Brasil. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 410, 2005.

OLIVEIRA, E.C. The seaweed resources of Brazil. In: A.T. Critchley & M. Ohno (eds.). *Seaweeds Resources of the World*. Japan International Cooperation Agency, Yokosuka, pp. 366-371, 1998.

OLIVEIRA, M. M. Extração, isolamento e caracterização parcial de lectina de folhas de *Bauhinia variegata* var. "cândida"/ Manuel Messias de Oliveira. – Recife: O Autor, 2006. 69 folhas. il., fig. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas – Biotecnologia, 2006.

OLIVEIRA, Mara Rubea Tinoco Rodrigues de. Avaliação in vitro do efeito de lectinas de sementes de *Talisia esculenta* e *Labramia bojeri* sobre o biofilme oral. / Mara Rubea Tinoco Rodrigues de Oliveira. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2005.

OLIVEIRA Mara R T R; NAPIMOGA Marcelo H; COGO Karina; GONÇALVES Reginaldo B; MACEDO Maria L R; FREIRE Maria G M; GROppo Francisco C Inhibition of bacterial adherence to saliva-coated through plant lectins. *Journal of oral science*; 49(2):141-5, 2007.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Saúde para todos no século XXI – Política de Saúde para a Europa. OMS, Delegação Regional para a Europa, Copenhage (versão "draft"), 1997.

O'TOOLE, G.A., KOLTER, R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS356 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*, n.28, p.449-461, 1998a.

O'TOOLE, G.A., KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, n.30, p.295-305, 1998b.

PEREA, E.J, Oral flora in the age of molecular biology. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v.9, Suppl: S1-10, 2004.

PEREIRA A. Cáries dentárias: etiologia, epidemiologia e prevenção. Porto: Medisa; p. 13-21, 1993.

PEREIRA A. Contribuição para o estudo da prevalência e da gravidade da cárie dentária em Portugal [dissertação]. Porto: Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto; 1990.

PEREIRA CV, ROSA EA, SPOLIDORIO DM, HÖFLING JF. Formation of in vitro bacterial plaque, extracellular polysaccharides and acid production by mutans streptococci from the oral cavity. **Revista da Confederação Odontológica latino-americana/FOLA ORAL**;VI:34-40, 2000.

PEREIRA JV. Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos formadores de placa bacteriana. Dissertação de Mestrado, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 92p., 1998.

PEREIRA, Jozinete V. et al . Efeito antibacteriano e antiaderente in vitro do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos do biofilme dental. **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa, v. 16, n. 1, Mar. 2006.

PERES DHDF. Prevalência dos Streptococcus do grupo mutans (Egm) em crianças de 8 a 60 meses nas creches da cidade de Joinville - **SC. J. Bras Odontopediat Odontol Bebê** 6: 36-40, 2003.

PETERSEN, P. E.; LENNON, M. A. Effective use of fluorides for the prevention of dental caries in the 21st century: the WHO approach. **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v. 32, n. 1, p. 319-321, Apr. 2004.

PEUMANS, W.J. and VAN DAMME, W.J.M. Proposal for a Novel Sistem of Nomeclature of Plant Lectins. **Lectins**, v.10, p.105-117, 1995a.

PEUMANS, W.J. and VAN DAMME, E.J.M. Lectins a plant defense proteins. **Plant Physiol.**, v.109, p.347-352, 1995b

PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J.M. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. **Trends Food Science Technology, Cambridge**, v.7, n.4, p.132-138, 1996.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: Versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, p. 199-228, 1998.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M.; BARRE, A.; ROUGE, P. Classification of plant lectins in families of structural and evolutionary related proteins. In: The molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2, **Kluwer Academic/Plenum Publishers**, p. 27-54, 2001.

PINTO, V.G. Saúde Bucal Coletiva. São Paulo, Livraria Santos Editora. 4ª edição, 2000.

REICH E, LUSSI A, NEWBRUN E. Caries risk assessment. *int Dent J.*; 49:15-26, 1999

REIS, R.P., LEAL, M.C.R., YONESHIGUE -VALENTIN, Y. & BELLUCO, R. Efeito de fatores bióticos no crescimento de *Hypnea musciformis* (Rhodophyta - Gigartinales). *Acta Botanica Brasílica*, 17: 279-286, 2003.

RIBEIRO, F., A tecnologia a favor da saúde, **Revista do Colégio de Maxi**, n. 21, ago/set 1999.

RODRIGUES JÚNIOR AL. Redução do índice de placa com listerine. Avaliação do índice de placa em relação ao uso de listerine e/ou escovação. **RGO**, 46: 101-108, 1998.

RÜDGER, H.; SIEBERT, H. C.; SOLIS, D.; JIMENEZ-BARBERO, J.; ROMERO, A.; VON DERLIETH, C.; DIAZ-MAURINO, T.; GABIUS, H. J.; Medical chemistry base on the sugar code: fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectin as target; **Current Medical Chemistry**, v. 7, p. 389-416, 2000.

RUHL SA, RAYMENT G, SCHMALZ KA, TROXLER RF. Proteins in whole saliva during the first year of infancy. **J Dent Res.**;84(1):29-34, 2005.

SAKAMOTO, M.; UMEDA, M.; BENNO, Y. Molecular analysis of human oral microbiota. **J. Periodont. Res.**, v.40, p.277-285, jun. 2005.

SEOW WK. Biological mechanisms of early childhood caries. **Community Dent Oral**

Epidemiol; 26 (1 Suppl): 8-27, 1998.

SELL, A.N., COSTA, C.P. Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina, **Acta Scientiarum** 22(2):297-303, 2000.

SHARON N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. **Trends in Biochemical Sciences** 18, 221-226, 1993.

SHARON, Nathan and LIS, Halina. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**. vol. 14 no. 11, 2004.

SIEGRIST BE, GUSBERTI FA, BRECX MC, WEBER HP, LANG NP. Efficacy of supervised rinsing with chlorhexidine digluconate in comparison to phenolic and plant alkaloid compounds. **J Periodontol Res** 60-73, 1986.

SINGH R.S., TIWARY A.K. & KENNEDY J.F. Lectins: Sources, Activities and Applications. **Critical Reviews in Biotechnology** 19, 145-178, 1999.

SILVA, Mara Reis; SILVA, Maria Aparecida Azevedo Pereira da. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 13, n. 1, Apr. 2000.

SOUZA, Luciane Zanin de. Avaliação de um programa educativo direcionado a crianças com alto risco à cárie. / Luciane Zanin de Souza. -- Piracicaba, SP: [s.n.], ix, 68f. : il., 2004.

SPADARO, Augusto César Cropanese et al . Método para avaliação clínica da capacidade tamponante salivar. **Rev Odontol Univ São Paulo**, São Paulo, v. 12, n. 3, July 1998.

STRECKFUS CF, BIGLER LR. Salivary glands and saliva: Saliva as a diagnostic fluid. **Oral Diseases**.;8(3):69-76, 2002.

TABAK, J.D. Managed care. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.126, n.7, p.824, 1995.

TAUBMAN, M. A. AND D. J. SMITH. Microbiology of dental caries, In J. Slots and M. A. Taubman (eds.), **Contemporary Oral Microbiology and Immunology**. St.

Louis : Mosby-Year Book, p. 408-421, 2005.

TEIXEIRA, E. H.; HAVT, A.; BARBOSA, P. S. F.; MENESES, D. B.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A.; SAMPAIO, A.H.; CAVADA, Benildo Sousa. Renal effects of the lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds. **Protein and Peptide Letters**, Estados Unidos, v. 8, n. 6, p. 477-484, 2001.

TEIXEIRA, E.H. ; NAPIMOGA, M.H. ; CARNEIRO, V.A. ; DE OLIVEIRA, T.M. ; NASCIMENTO, K.S. ; NAGANO, C.S. ; SOUZA, J.B. ; HAVT, A. ; PINTO, V.P.T. ; GONÇALVES, R.B.; FARIAS, W.R.L.; SAKER-SAMPAIO, S.; SAMPAIO, A.H.; CAVADA, B.S. Inhibition of oral streptococci binding to the acquired pellicle by algal lectins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 1001-1006, 2007a.

TEIXEIRA, EDSON HOLANDA; PINTO, VICENTE PAULA TEIXEIRA; NASCIMENTO, KYRIA SANTIAGO; NAPIMOGA, M.; OLIVEIRA, T. M.; NAGANO, CELSO SHINITI; CARNEIRO, V. A.; CAVADA, B. S.; FARIAS, WLADIMIR RONALD LOBO; SAKER-SAMPAIO, SILVANA; SAMPAIO, A.H. Inibição da adesão bacteriana a película adquirida através de lectinas isoladas de algas marinhas das espécies *Bryothamnion seaforthii* e *Bryothamnion triquetrum*. In: XII Congresso Latino- Americano de Ciências do Mar - XII COLACMAR, 2007, Florianópolis. Livro de Resumos, 2007b.

THEILADE, E. Factors controlling the microflora of the healthy human mouth. In: Hill M. J., Marsh P. D. **Human microbial ecology**. ed. Boca Raton, F.L.: CRC Press, p. 1-56, 1990

THYLSTRUP A, FEJERSKOV O. *Cariologia clínica*. 3. ed. São Paulo: Livraria Santos; 2001.

THYLSTRUP A. When is caries caries, and what should we do about it? *Quintessence Int*; 29:549-98, 1998.

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

VAN LOVEREN C, BUIJS JF, TEN CATE JM. The effect of triclosan toothpaste on enamel demineralization in a bacterial demineralization model. **J Antimicrob Chemoth** 45: 153-158, 2000.

VARKI, A.; CUMMINGS, R; ESKO, J.; FREEZE, H.; HART, G.; MARTH, J.

Essentials of Glycobiology. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, 1999.

WEN, Z. T.; BURNE, R. A. Functional Genomics Approach to identifying genes requires for biofilm Development by *Streptococcus mutans*. **Appl Environ Microbiol.** v. 68, n.3, p. 1196-1203, 2002.

WENNERHOLM K, BIRKHED D, EMILSON CG. Effects of sugar restriction on *Streptococcus sobrinus* in saliva and dental plaque. **Caries Res**;29:54-61, 1995.

WEYNE S. Cariologia. In: Baratieri LN, editor. Dentística: procedimentos preventivos e restauradores. 2ª ed. São Paulo: Santos Livraria; 2000.

WHO. Oral Health Surveys: Basic methods. 3rd ed. Geneva: WHO; 1987.

WHO. The objectives of the WHO Global Health Programme (ORH). Geneva: WHO; 2005.

WIATER, A., CHOMA, A., SZCZODRAK, J. Insoluble Glucans synthesized by cariogenic streptococci: a structural study, **J. Basic Microbiol.**, 39, 265-273, 1999.

WOODS, G.L., WASHINGTON, J.A. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: MURRAY, P.R., BARON, E.J., PFALLER, M.A. et al. (Ed.) Manual of clinical microbiology. Washington: American Society for Microbiology Press, p.1327-1341, 1995.

World Health Organization. Oral health surveys: basic methods. Geneva: World Health Organization; 1997.

World Health Organization. The World Oral Health Report, 2003. Continuous improvement of oral health in the 21 st century – the approach of the WHO Global Oral Health Programme. Geneva; 2003.

YAMASHITA, Y., BOWEN, W.H., BURNE, R.A., KURAMITSU, H.K. Infection and Immunity, 61, 3811-3817, 1993.

YOKOYA, N.S. & OLIVEIRA, E.C. Temperature responses of economically important red algae and their potential for mariculture in Brazilian waters. **Journal of Applied Phycology** 4: 339-345, 1992a.

YOKOYA, N.S. & OLIVEIRA, E.C. Effects of salinity on the growth rate, morphology and water content of some Brazilian red algae of economic importance. *Ciencias Marina* 18: 49-64, 1992b.

ZUMAÊTA, G.M.O. et al. Avaliação da velocidade do fluxo salivar e capacidade tampão em crianças submetidas à quimioterapia para tratamento de câncer. **Rev. da UFBA**, v. 18, p.6-10, julho/dezembro. 1999.

APÊNDICES

Apêndice B

FORMULÁRIO DE PESQUISA

1.	Número de ordem		
2.	Data de início da Investigação e pesquisa		
3.	Código do examinador		
4.	Sexo	0. Masculino	1. Feminino
5.	Idade (em anos completos)		
6.	Escolaridade (em anos de estudo)		
7.	Realização do exame	<p>1 - Exame Realizado</p> <p>2 - Exame não realizado por não ter sido autorizado pelo responsável</p> <p>3 - Exame não realizado, embora autorizado pelo responsável, porque a criança não permitiu</p> <p>4 - Exame não realizado, embora autorizado pelo responsável, porque a criança não foi encontrada no momento do exame</p> <p>5 - Exame não realizado, embora autorizado pelo responsável, em decorrência de dificuldades organizativas da equipe da pesquisa ou da instituição de saúde responsável</p> <p>6 - Exame não realizado, embora autorizado pelo responsável, em decorrência de dificuldades relacionadas ao local onde o exame seria feito ou à instituição que receberia a equipe</p> <p>7 - Exame não realizado, embora autorizado, por ausência do participante na instituição, no dia da visita</p> <p>9 - Exame não realizado por outras razões</p>	
AVALIAÇÃO INDIVIDUAL			
8.	Índice de Placa Bacteriana	<p>0 – Ausência de depósito</p> <p>1 - Depósito que vai além de 1/3 da superfície dentária</p> <p>2 - Depósitos cobrem mais de 1/3, não indo além de 2/3 da superfície dentária</p> <p>3 - Depósitos cobrem mais de 2/3 da superfície dentária</p>	
9.	Contagem de Streptococcus do grupo <i>mutans</i>	<p>1 – de 1 a 20 colônias</p> <p>2 – de 21 a 100 colônias</p> <p>3 - mais de 100 colônias</p>	
10.	Experiência de cárie: índice CPOD/ceo	<p>0 – Livre de cárie e sem restaurações</p> <p>1 – CPOD/ ceo menor que 3</p> <p>2 – CPOD/ ceo igual a 3</p> <p>3 – CPOD/ ceo maior que 3</p>	
11.	Fluxo Salivar	<p>0 – Secreção salivar normal: acima de 1,0 mL/ min</p> <p>1 – Secreção salivar baixa: 0,7 a 1,0 mL/ min</p> <p>2 – Secreção salivar muito baixa: 0,1 a 0,7 mL/ min</p> <p>3 – Xerostomia: menor que 0,1 mL/ min</p>	
12.	Capacidade Tampão da Saliva	<p>0 - Capacidade tampão normal: pH acima de 6,0</p> <p>1 - Capacidade tampão reduzida: pH de 4,5 a 5,5</p> <p>2 - Capacidade tampão baixa: pH abaixo de 4,0</p>	
13.	Utilização do flúor	<p>0 - Uso de dentifrício fluoretado e uso constante de meios adicionais (bochechos e vernizes)</p> <p>1 - Uso de dentifrício fluoretado e uso eventual de meios adicionais (bochechos e vernizes)</p> <p>2 - Somente dentifrício fluoretado</p> <p>3 - Não utiliza</p>	

14.	Conteúdo de açúcar na dieta	0 - Muito pouco açúcar, dieta balanceada 1 - Baixa presença de açúcar e dieta não cariogênica 2 - Consumo de açúcar moderado, dieta com conteúdo relativamente alto de açúcar 3 - Alta ingestão de açúcar, dieta cariogênica
15.	Frequência de consumo de açúcar na dieta	0 - Consumo máximo de três vezes/ dia 1 - Consumo máximo de cinco vezes/ dia 2 - Consumo máximo de sete vezes/ dia 3 - Consumo máximo superior a sete vezes/ dia
16.	Doenças correlacionadas Sistêmicas	0 - Paciente saudável: não existem sinais de doenças sistêmicas relacionadas à cárie 1 - Presença de doença que pode influenciar no processo de cárie ou que possa contribuir para aumentar o risco (deficiência visual, incapacidade de locomoção) 2 - Paciente pode estar acamado ou utilizando medicação contínua que afete a secreção salivar

EXAME CLÍNICO

Índice de Placa: _____

17/16	11	26/27
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

↓

CPOD/ceo

	18	17	16	55	54	53	52	51	61	62	63	64	65	26	27	28
Coroa	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
	48	47	46	85	84	83	82	81	71	72	73	74	75	36	37	38
Coroa	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

↓

Fluxo Salivar: _____

Capacidade Tampão: _____

Apêndice C

Data de Aplicação

No. DO FORMULÁRIO **CARTA DE INFORMAÇÃO AO SUJEITO DA PESQUISA**

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma dela é sua e, a outra, do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Vale do Acaraú.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Avaliação das Potencialidades Biotecnológicas de Lectinas Vegetais no Diagnóstico e Prevenção de Cárie Dentária

Pesquisadores responsáveis: Fábio Solon Tajra, Edson Holanda Teixeira, Victor Carneiro, Andréa Aguiar

Telefone para contato: (88) 3614 9431

- ◆ A pesquisa será realizada em crianças de 12 anos de idade matriculadas na Escola Padre Osvaldo Carneiro Chaves do bairro do Dom Expedito no município de Sobral;
- ◆ O objetivo da pesquisa é investigar as potencialidades biotecnológicas de lectinas vegetais no diagnóstico de pacientes de alto risco e prevenção de cárie dentária;
- ◆ A pesquisa limita-se ao acompanhamento do paciente, coleta, e avaliação de dados durante os meses de setembro de 2008 e dezembro de 2009, podendo se estender de acordo com a necessidade de apresentação de dados, desta forma não causando nenhum prejuízo e risco ao paciente;
- ◆ A identidade dos pacientes submetidos à pesquisa será mantida em absoluto sigilo, sendo os dados utilizados apenas para fins científicos;
- ◆ A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária, e você terá liberdade de recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo;
- ◆ Em nenhum momento você terá ressarcimento de despesas decorrentes da participação da pesquisa, assim como qualquer forma de indenização por sua participação.

Fábio Solon Tajra
Coordenador do Projeto

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, RG, _____, li e concordo em participar da pesquisa, como sujeito. Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo pesquisador _____ sobre a pesquisa que tem como objetivo investigar as potencialidades biotecnológicas de lectinas vegetais no diagnóstico de pacientes de alto risco e prevenção de cárie dentária, estando ciente de que os resultados poderão ser divulgados em revistas ou apresentados em eventos científicos. Declaro, também, que me foi assegurado o direito a não identificação no trabalho, e também confidencialidade das respostas. Foi-me garantido(a) que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso leve a qualquer penalidade. Ainda me foi esclarecido que os procedimentos na pesquisa envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Estou plenamente de acordo com a realização do trabalho. Assim, autorizo a execução do trabalho de pesquisa exposto acima, com a minha colaboração espontânea.

Local: _____ Data: _____

Assinatura do sujeito/responsável: _____

Examinador: _____

-----□-----

Data de Aplicação

No. DO FORMULÁRIO

Obs.: Guarde este canhoto com o número do formulário. Ele será a única forma de você se identificar caso deseje verificar o resultado do seu formulário. Após a conclusão desta etapa, estará disponível uma listagem com a pontuação e significado dela. A única forma de identificar quem preencheu o formulário será com o número que *você* tem neste canhoto. Os alunos e profissionais participantes do Projeto não possuem nenhuma forma de identificar os formulários. Isto garante o sigilo das informações colhidas.

Apêndice D

Data de Aplicação

No. DO FORMULÁRIO

--	--	--

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Para ter maior conhecimento acerca das potencialidades biotecnológicas de lectinas vegetais no diagnóstico de pacientes de alto risco e prevenção de cárie dentária.

Este termo de consentimento faz parte do processo de consentimento livre e esclarecido. Tem como objetivo informar-lhe sobre o estudo e o que irá lhe acontecer se você decidir participar dele. Leia este documento atentamente para ter certeza de que entendeu todas as informações que ele apresenta. Sua participação no estudo é completamente voluntária. Você não é obrigado a participar do estudo e sua saúde não será afetada. Esse estudo poderá não lhe trazer nenhum benefício, tampouco lhe fará mal algum. Se você quiser saber mais sobre alguma informação mencionada neste documento ou se tiver dúvidas sobre este estudo, não deixe de perguntar ao profissional responsável pela pesquisa. Você irá receber uma cópia deste documento para guardar.

Informações sobre a pesquisa:

Título do Projeto: Avaliação das Potencialidades Biotecnológicas de Lectinas Vegetais no Diagnóstico e Prevenção de Cárie Dentária

- ◆ A pesquisa será realizada em crianças de 12 anos de idade matriculadas na Escola Padre Osvaldo Carneiro Chaves do bairro do Dom Expedito no município de Sobral no período de setembro a dezembro de 2009;
- ◆ O objetivo da pesquisa é investigar as potencialidades biotecnológicas de lectinas vegetais no diagnóstico de pacientes de alto risco e prevenção de cárie dentária;
- ◆ A pesquisa limita-se ao acompanhamento do paciente, coleta e avaliação de dados durante os meses de setembro de 2009 e dezembro de 2009, podendo se estender de acordo com a necessidade de apresentação de dados, desta forma não causando nenhum prejuízo e risco ao paciente;
- ◆ A identidade dos pacientes submetidos à pesquisa será mantida em absoluto sigilo, sendo os dados utilizados apenas para fins científicos;
- ◆ A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária, e você terá liberdade de recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo;
- ◆ Em nenhum momento você terá ressarcimento de despesas decorrentes da participação da pesquisa, assim como qualquer forma de indenização por sua participação;
- ◆ Para isso, coletaremos saliva, que será utilizada apenas para avaliar o padrão de risco do participante quanto à doença cárie. Será necessária a coleta de aproximadamente 10 mL (dez mililitros) de sangue, o que não trará nenhum efeito adverso;
- ◆ Nenhum risco está associado à coleta de saliva do participante. O procedimento não está relacionado a desconforto ou qualquer possibilidade de infecção.

Testes em sua amostra de saliva:

Você pode não concordar que sua saliva fique guardado em nosso banco de dados até o término deste estudo, sendo apenas necessário que você comunique aos responsáveis pelo projeto que não quer mais que este material seja utilizado. Depois disso, a sua saliva será inutilizada para pesquisa e quaisquer outros fins.

Você concorda que uma amostra de sua saliva coletada e utilizada para a presente pesquisa?

SIM() NÃO ()

Iniciais do paciente: _____

Custos:

Você não desembolsará nada para participar deste estudo.

Benefícios potenciais:

A participação neste estudo poderá não lhe trazer benefício algum. Entretanto, com base nos resultados obtidos, espera-se que, em longo prazo, conhecer mais sobre a incidência destas doenças no Brasil e gerar maior conhecimento científico sobre elas. Desta forma, poderemos desenvolver um tratamento mais adequado para seus portadores.

Você não terá nenhuma vantagem financeira imediata e nem terá direito a qualquer remuneração de eventuais contratos ou patentes que possam advir dos estudos utilizando sua amostra de sangue.

Confidencialidade:

As informações coletadas como parte deste estudo serão reveladas a outros pesquisadores e profissionais da área de pesquisa científica. Todavia, você não será identificado em nenhum desses relatórios. Será mantida confidencialidade absoluta e você não será identificado pelo nome em nenhum dos dados e materiais submetidos. Todo material coletado para este estudo será mantido em local seguro.

Se você tiver qualquer dúvida sobre esta pesquisa ou qualquer outra pergunta sobre os procedimentos deste estudo, entre em contato com:

Pesquisadores responsáveis:

Fábio Solon Tajra, Edson Holanda Teixeira, Victor Carneiro, Andréa Aguiar

Telefone para contato:

(88) 3614 9431

Consentimento do Paciente:

Fui informado do objetivo, procedimentos, duração do estudo e concordo em participar deste estudo conduzido por: Fábio Solon Tajra, Edson Holanda Teixeira, Victor Carneiro, Andréa Aguiar. Também fui informado que não terei direito a nenhuma remuneração que por ventura este estudo possa gerar de contratos ou patentes.

Um resumo das informações foram passadas a mim e sei que estou livre para recusar participar deste estudo e posso desistir do meu consentimento a qualquer momento. Recebi uma cópia deste consentimento para guardar comigo.

Nome do paciente (em letra de forma)

Assinatura do paciente ou responsável

Registro do paciente

Nome do responsável pelo paciente

Nome do pesquisador (em letra de forma)

Assinatura do pesquisador

Sobral, ____ de _____ de 20 ____.