

VICTOR ALVES CARNEIRO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME
BACTERIANO ATRAVÉS DE LECTINAS VEGETAIS**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para obtenção do
Título de Mestre em Bioquímica.

Orientador:
Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada

Fortaleza-Ce
2007

Esta Dissertação de Mestrado foi apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e se encontra à disposição na Biblioteca Central da referida Universidade.

Victor Alves Carneiro

Dissertação aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada (Orientador)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira (Co-Orientador)
Faculdade de Medicina de Sobral
Universidade Federal do Ceará

Prof^a. Dr^a. Creuza Maria Silveira de Araújo Farias
Universidade de Fortaleza

“Se consegui enxergar mais longe, foi porque estava apoiado sobre ombros de gigantes.”

(Isaac Newton)

A meu tão estimado PAI,
mesmo que fisicamente ausente,
minha MÃE e meus IRMÃOS, dedico
com muito amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

- Em especial a meu PAI, mesmo que fisicamente ausente, por ser sempre um exemplo de um excepcional pai e grande ser humano, além de sempre me fazer acreditar que sou capaz de alcançar meus ideais.
- A minha amada MÃE, pelo seu imenso amor e dedicação.
- A meus irmãos, IGOR ROBERTO, MARCUS HELTON e MARIA GLAUEBIA, por tornarem o dia-a-dia familiar bem mais agradável.
- Ao admirável orientador Prof. Dr. BENILDO SOUSA CAVADA, pelo incentivo e motivação em todos os momentos, um exemplo de seriedade, dedicação e competência.
- Ao grande amigo e co-orientador Prof. Dr. EDSON HOLANDA TEIXEIRA, que sempre me apoiou nas horas difíceis, motivando e fazendo acreditar pela sua orientação, disposição e intensa confiança demonstrada durante a realização deste trabalho.
- À Prof^a. Dr^a. CREUZA DE ARAÚJO por ter aceitado participar da banca de defesa e pelas sugestões para o melhoramento deste trabalho.
- À Prof^a. Dr^a IRANA ZANIN, pela fundamental participação e inestimáveis contribuições para a realização e conclusão deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. VICENTE PINTO, pela amizade, sua indispensável ajuda e incentivo para o melhoramento deste trabalho e também na minha vida profissional.
- A todos os colegas do BIOMOL-LAB, em especial aos inseparáveis amigos GUSTAVO e TAIANÁ.
- A todos os PROFESSORES do curso do Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, por tornarem real a intensa sensação de ser Mestre em Bioquímica.

- A toda a Equipe do NUBIS de Sobral, pela a intensa e incansável disposição para a conclusão deste trabalho
- A minha namorada KELLY COELHO, pela sua intensa participação e seu imprescindível companheirismo.
- À todas as agências de fomento, CAPES, FUNCAP e CNPq, por todos os incentivos financeiros.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	ix
Lista de Figuras	x
Lista de abreviaturas	xiii
Resumo	xiv
Abstract	xv
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Cárie Dental.....	17
1.1.1 Histórico.....	17
1.1.2 Aspectos Gerais.....	18
1.1.3 Biofilme bacteriano.....	19
1.1.4 Fatores importantes para o surgimento da Cárie Dental.....	24
1.1.5 A progressão da Cárie Dental.....	26
1.2 Lectinas.....	28
1.2.1 Definição.....	28
1.2.2 Estrutura das Lectinas.....	31
1.2.3 Distribuição das Lectinas.....	35
1.2.4 Atividade Biológica.....	38
2. OBJETIVOS	40
2.1 Objetivos Gerais.....	41
2.2 Objetivos específicos.....	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS	42

3.1 Isolamento das Lectinas	43
3.2 Bactérias.....	43
3.3 Curva de Crescimento.....	44
3.4 Ensaio de Agregação Bacteriana Induzida por Lectinas.....	45
3.5 Ensaio de Atividade Antibacteriana.....	46
3.6 Ensaio de Inibição da Formação do Biofilme Bacteriano em Placas de Poliestireno (96 poços) Através do Tratamento com Lectinas.....	47
3.7 Análise Estatística.....	48
4. RESULTADOS.....	49
4.1 Curva de Crescimento.....	50
4.2 Agregação Bacteriana Induzida por Lectina.....	51
4.3 Atividade Antibacteriana (MIC).....	51
4.4 Inibição da formação de biofilme bacteriano em placas de 96 poços de poliestireno através do tratamento com a lectinas.....	52
5. DISCUSSÃO.....	57
6. CONCLUSÃO.....	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Lectinas utilizadas nos experimentos com suas respectivas especificidades por carboidratos.....	43
TABELA 2	Microorganismos utilizados no experimento com suas respectivas cepas.....	44
TABELA 3	Concentração mínima inibitória das cinco lectinas testadas com <i>Streptococcus sanguis</i> ATCC10556.....	52
TABELA 4	Concentração mínima inibitória das cinco lectinas testadas com <i>Streptococcus mutans</i> UA159.....	52

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Biofilme bacteriano evidenciado por uma sonda exploradora.	20
FIGURA 2	Modelo de desenvolvimento do biofilme segundo Stoodley <i>et al.</i> , 2002.....	22
FIGURA 3	Metabolismo bacteriano da sacarose na placa dental via glicosiltransferase (GTF).....	24
FIGURA 4	Tríade de Keyes – esquema desenvolvido na década de 60 pelo Dr. Paul H. Keyes para estabelecer os fatores primários da cárie.....	26
FIGURA 5	Esquema demonstrador da progressão da Cárie Dental.....	27
FIGURA 6	Esquema demonstrador da classificação de lectinas segundo Peumans e Van Damme (1995) e VAN DAMME <i>et al</i> (1998).....	31
FIGURA 7	Região do sítio de ligação a íons metálicos, Ca ⁺⁺ e Mn ⁺⁺ , da lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i>	34
FIGURA 8	Representação esquemática da montagem da placa de 96 poços para o ensaio de atividade antibacteriana. (○) poço não utilizado, (●) poço que contém lectina com a bactéria e (◐) poço que contém a lectina com tampão.....	47
FIGURA 9	Curva de crescimento da cepa de <i>Streptococcus mutans</i> UA159.....	50
FIGURA 10	Curva de crescimento da cepa de <i>Streptococcus sanguis</i> ATCC10556.....	51
FIGURA 11	Inibição da formação de biofilme da cepa de <i>Streptococcus sanguis</i> ATCC10556 em placa de poliestireno através das lectinas específicas a glicose/manose nas doses de 10µg/mL, 100µg/mL e 200µg/mL, <i>Canavalia ensiformis</i> (ConA10, ConA100 e ConA200), <i>Cymbosema roseum</i>	

- (CRL10, CRL100 e CRL200) e *Canavalia marítima* (ConM10, ConM100 e ConM200). (*) Estatisticamente significativa em relação ao controle positivo. (**) Estatisticamente significativa em relação à ConA, da mesma concentração. (***) Estatisticamente significativa em relação a CRL, da mesma concentração..... 54
- FIGURA 12 Inibição da formação de biofilme da cepa de *Streptococcus mutans* UA159 em placa de poliestireno através das lectinas específicas a glicose/manose nas doses de 10µg/mL, 100µg/mL e 200µg/mL, *Canavalia ensiformis* (ConA10, ConA100 e ConA200), *Cymbosema roseum* (CRL10, CRL100 e CRL200) e *Canavalia marítima* (ConM10, ConM100 e ConM200). (*) Estatisticamente significativa em relação ao controle positivo. (**) Estatisticamente significativa em relação à ConA , da mesma concentração..... 54
- FIGURA 13 Inibição da formação de biofilme da cepa de *Streptococcus sanguis* ATCC10556 em placa de poliestireno através da lectina de *Hypnea cervicornis* nas doses de 10µg/mL, 100µg/mL e 200µg/mL, específica por carboidrato complexo. Fazendo uma análise da diferença estatística entre a lectina na presença e na ausência de um pigmento natural, HCAP e HCA, respectivamente. (*) Estatisticamente significativa em relação ao controle positivo..... 55
- FIGURA 14 Inibição da formação de biofilme da cepa de *Streptococcus mutans* UA159 em placa de poliestireno através da lectina de *Hypnea cervicornis* nas doses de 10µg/mL, 100µg/mL e 200µg/mL, específica por carboidrato complexo. Fazendo uma análise da diferença estatística entre a lectina na presença e na ausência de um pigmento natural, HCAP e HCA, respectivamente. (*) Estatisticamente significativa em relação ao controle positivo. (**) Estatisticamente significativa

	em relação à HCA, na mesma concentração.....	55
FIGURA 15	Inibição da formação de biofilme da cepa de <i>Streptococcus sanguis</i> ATCC10556 em placa de poliestireno através da lectina de <i>Acacia farnesiana</i> nas doses de 10µg/mL, 100µg/mL e 200µg/mL, específica por N-acetiglicosamina. (*) Estatisticamente significativa em relação ao controle positivo. (**) Estatisticamente significativa em relação a AFL 10µg/mL. (***) Estatisticamente significativa em relação a AFL 100µg/mL.....	56
FIGURA 16	Inibição da formação de biofilme da cepa de <i>Streptococcus mutans</i> UA159 em placa de poliestireno através da lectina de <i>Acacia farnesiana</i> nas doses de 10µg/mL, 100µg/mL e 200µg/mL, específica por N-acetiglicosamina. (*) Estatisticamente significativa em relação ao controle positivo. (**) Estatisticamente significativa em relação a AFL 10µg/mL. (***) Estatisticamente significativa em relação a AFL 100µg/mL.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

TxLC-1:	First Tulipa Hybrid Lectin with complex especificity
MBL:	Mannan Binding Lectin
ConA:	<i>Canavalia ensiformis</i>
ConM:	<i>Canavalia maritima</i>
CRL:	<i>Cymbosema roseum</i> Lectin
AFL:	<i>Acacia farnesiana</i> Lectin
HCA:	<i>Hypnea cervicornis</i>
BSA:	Albumina Sérica Bovina
RIP's:	Ribosome-inactivating proteins
GTF's:	Glicosiltransferases
FGF's:	Frutosiltransferase
PAE:	Película adquirida do esmalte
HA:	Hidroxiapatita
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína
OD:	Densidade Óptica
ELISA:	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
SDS:	Sodium Dodecyl Sulfate
rpm:	rotações por minuto
pH:	Potencial Hidrogeniônico
mg:	Mili-grama
µg:	Micro-grama
µL:	Micro-litro
mL:	Mili-litro
mg:	Mili-gramas
M:	Concentração Molar
Micra:	Micro-metros
kDa:	Quilodalton
Å:	Angstrons
Nm:	Nanômetros

RESUMO

A medicina natural e complementar, especialmente a fitoterapia, se torna cada vez mais utilizada no combate as necessidades de grande parte da população em saúde bucal, particularmente nos países em desenvolvimento. Dentre os fitoterápicos, as lectinas podem ter um valor como agentes antiplaca e antimicrobianos, uma vez que podem estar intimamente relacionadas com a interferência da formação do biofilme dos microrganismos, já que se tratam de proteínas que reconhece carboidratos de forma específica e reversível. O objetivo deste estudo foi testar *in vitro* a capacidade de inibição das lectinas isoladas das espécies de *Canavalia ensiformis*, *Canavalia maritima*, *Cymbosema roseum*, *Acacia farnesiana* e *Hypnea cervicornis*, na formação de biofilmes bacterianos e atividade antimicrobiana contra microrganismos orais (*Streptococcus sanguis* ATCC10556 e *S. mutans* UA159). A atividade antimicrobiana das cinco lectinas testadas foi determinada pelo teste convencional da microdiluição em placas de poliestireno, sendo testada as concentrações de 2mg/mL à 31,5µg/mL contra os microrganismos em estudo. Para avaliação de aderência foi feito um ensaio semiquantitativo de aderência em placas de microtitulação de poliestireno (96 poços), onde foi adicionado 100 µL de cada uma das lectinas, em seguida adicionada 100 µL de suspensão bacteriana (10^8 UFC/mL) e incubado a 37°C em uma atmosfera de 10% de CO₂. A aderência foi revelada e quantificada por tintura com cristal violeta. A absorção do cristal violeta foi determinada através da leitura no espectrofotômetro (595nm). Somente a lectina de ConA apresentou a atividade bactericida ou bacteriostática contra os microrganismos estudados. No teste de inibição da formação do biofilme, todas as lectinas testadas foram favoráveis na inibição, reduzindo significativamente a aderência ($p < 0,05$). A lectina de ConA não teve ação sobre a formação do biofilme de nenhuma das bactérias testadas.

ABSTRACT

Natural and complementary medicine, especially phytotherapy, is becoming more and more useful to fulfill the needs of great part of the population when it comes to oral health, particularly in the developing countries. Among the phytotherapies, lectins may be valuable as anti-plaque and antimicrobial agents, since they can be intimately related with inference in biofilm formation, given that these proteins recognize carbohydrates in a specific and reversible way. Within that context, this study aimed to test the ability of five lectins (extracted from *Canavalia ensiformis*, *Canavalia maritima*, *Cymbosema roseum*, *Acacia farnesiana* and *Hypnea cervicornis*) in inhibiting the formation of biofilm and killing oral microorganisms (*Streptococcus sanguis* ATCC10556 e *S. mutans* UA159). The antimicrobial activity of the five lectins tested was determined by the conventional test of microdilution in polystyrene plaques. The lectin concentrations assayed against the microorganisms varied from 2mg/mL to 31.5µg/mL. To evaluate the adherence, a semi-quantitative assay was performed within microtitulation plaques (96 wells), to where were added 100 µL of each lectin, and then 100 µL of bacterial suspension (10^8 CFU/mL). This material was incubated in 10% CO₂ atmosphere at 37°C. Adherence was revealed and quantified by violet crystal staining. Absorption of violet crystal was determined by spectrophotometry (595nm). Only ConA presented bactericide or bacteriostatic activity against the strains tested. The assay of inhibition of biofilm formation revealed that almost all lectins had this kind of activity, reducing the adherence in a significant way ($p < 0.05$). ConA had no effect on the formation of biofilm for any bacteria tested.



1. Introdução

1.1 Cárie dental

1.1.1 Histórico

A doença cárie, que etimologicamente significa “material pobre”, apresenta-se como uma moléstia crônica que acomete grande parte da humanidade. A cárie foi detectada em todos os povos, em todas as raças e em todas as épocas. Juntamente com a doença periodontal, a cárie, começou a realmente ser estudada a partir da segunda metade do século XX, após a Segunda Grande Guerra Mundial e ainda continua sendo um dos maiores problemas de saúde pública, demandando consideráveis volumes de recursos financeiros para seu combate. Na América, a cárie incide em cerca de 95% da população, incluindo os Estados Unidos, país de elevado padrão aquisitivo, pois é também de alta prevalência em países não industrializados.

Na última década do século XIX, o aprimoramento da microscopia e formas de cultivo de microorganismos permitiu que importantes descobertas fossem feitas relacionando bactérias específicas com doenças infecciosas. Através dos tempos muitas teorias sobre a sua etiologia foram levantadas, porém só em 1890, Miller conheceu a importante pesquisa de Koch, que culminou com o cultivo do *Mycobacterium tuberculosis*. Motivado por esses estudos, Miller desenvolveu suas primeiras pesquisas com bases científicas visando estabelecer associação entre microorganismos da cavidade oral com a cárie e a doença periodontal. A partir desses estudos se formulou a teoria acidogênica do desenvolvimento da cárie. Em resumo, a patologia denominada cárie dental provoca uma destruição progressiva dos cristais de hidroxiapatita pelos ácidos produzidos pelas bactérias, levando a uma descalcificação que será detalhadamente explorada mais adiante.

1.1.2 Aspectos Gerais

A cavidade oral humana hospeda grande quantidade e variedade de microorganismos: mais de 500 espécies de bactérias já foram identificadas, além de protozoários, fungos e vírus (MOORE *et al.*, 1985; PASTER *et al.*, 2001). Atualmente, se conhece mais de 700 espécies de microorganismos orais, identificados através técnica avançada de biologia molecular (HOSHINO *et al.*, 2004). Nessa região pode ser verificada uma série de fenômenos de interações microbianas favorecidas pela grande variedade e quantidade de microorganismos. Os principais habitats da microbiota bucal incluem os dentes, mucosas, saliva, língua e sulco gengival. As populações que compõem esses ecossistemas diferem tanto em aspectos quantitativos quanto qualitativos.

A presença de microorganismos patogênicos na superfície do dente é um dos fatores predisponentes para o desenvolvimento da cárie, que é reconhecida como uma doença infecciosa de caráter crônico, dependente da interação e associação de um hospedeiro susceptível, microorganismos cariogênicos e uma dieta rica em sacarose durante um determinado período de tempo (LOESCHE, 1986; HARDIE & BOWDEN, 1974).

A cárie dental e a doença periodontal são os principais indicativos que determinam o estado fisiopatológico da cavidade bucal de um ser humano (AL IAFI e ABABNEH, 1995). Nas últimas décadas, temos acompanhado um avanço muito grande em relação à etiologia e à prevenção da cárie dentária, mas, mesmo assim, dados epidemiológicos têm demonstrado que esta continua sendo, dentro da odontologia, a doença de maior prevalência. O conceito da cárie dentária como uma doença infecciosa e transmissível ocorreu somente após estudos na década de 50 quando Keyes publicou trabalho referente ao estudo do processo cariioso em roedores (KEYES, 1960). A progressão da cárie, geralmente, ocorre de forma lenta existindo fatores do hospedeiro, que auxiliam na sua formação ou controlam o seu crescimento. Dentre estes, temos a anatomia dental e da arcada dentária, onde sulcos e fissuras profundos e o apinhamento dentário favorecem a colonização bacteriana, devido à dificuldade de higienização oral. Por outro lado,

fatores como a composição e o fluxo salivar, higiene bucal e exposição ao flúor participam da regulação da progressão da doença (TAPPUNI e CHALLACOMBE, 1993).

1.1.3 Biofilme bacteriano

A formação da cárie dental se inicia com uma intensa deposição de uma massa bacteriana sobre a superfície do dente, chamada de placa dental, biofilme ou até mesmo placa bacteriana.

Um dos fatores etiológicos mais importantes da cárie são os microorganismos de origem bacteriana que formam um biofilme patogênico que se adere à superfície dental, de modo a produzir ácidos e produtos citotóxicos, que levam a desmineralização do esmalte dental e/ou inflamação gengival, respectivamente (MARSH, 1994). Na verdade os microorganismos não se depositam ou aderem diretamente à superfície do esmalte dental, mas se ligam a uma fina camada acelular composta por proteínas salivares e outras macromoléculas que recobrem as superfícies dentárias denominadas de película adquirida (NYVAD, 1993; THYLSTRUP e FEJERSKOV, 1995).

A placa dental é, na verdade, um sistema dinâmico constituído de múltiplas espécies de bactérias encontradas nas superfícies dos dentes, e é amplamente responsável pelo desenvolvimento de doenças orais específicas (FOSTER *et al.*, 2004) (figura 1). O biofilme que se forma sobre a superfície do dente, apresenta uma composição bacteriana e bioquímica variável dependendo dos fatores intrínsecos e extrínsecos, podendo mudar de modo a tornar este biofilme patogênico (MARSH, 1992; 1994). Como citado anteriormente, os microorganismos não se aderem diretamente à superfície mineralizada do dente, visto que os dentes são sempre revestidos por uma película protéica acelular denominada película adquirida. A película se forma na superfície “nua” do dente em questão de minutos. Os principais constituintes da película são as glicoproteínas salivares, mucinas, as fosfoproteínas e, em menor extensão, os

componentes do fluido gengival (SONJU e GLANTZ, 1975). Um dos principais problemas enfrentados pelos pesquisadores na área da cariologia foi obter modelos que se assemelhassem ao mecanismo desenvolvido pelas bactérias para formação do biofilme.



Figura1: Biofilme bacteriano evidenciado por uma sonda exploradora

A composição da película recebe muita atenção devido a sua função potencial determinante da composição da microbiota inicial. Conseqüentemente, tem-se questionado se as características da superfície de diferentes materiais podem influenciar na composição protéica da película e, dessa forma, modificar o número de locais de adsorção inicial para diferentes espécies bacterianas (SONJU e GLANTZ,1975).

O mecanismo pelo qual ocorre a formação da placa dental é uma interação que se inicia entre a bactéria e a PAE (película adquirida do esmalte). Os compostos de formação da película adquirida, proteínas e carboidratos, servem como receptores de ligação para essas bactérias que possuem proteínas com domínio de ligação a glicanos na sua superfície (MOOSER e WONG, 1988). As bactérias interagem com esta película através de uma série de mecanismos específicos, dentre eles a interação do tipo lectina envolvendo as adesinas localizadas na superfície bacteriana e os receptores da película (GIBBONS, 1984; GIBBONS, 1996; JENKINSON e LAMONT, 1997). Em seguida, outras bactérias

se aderem não apenas a película como também a bactérias pré-existentes, formando o biofilme (KOLENBRANDER, 1998).

Independente do tipo de superfície do dente (esmalte ou raiz), os colonizadores iniciais constituem uma parte selecionada da microbiota oral, principalmente os estreptococos do grupo mitis, que incluem, de *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus gordonii* (BLACK *et al.*, 2004). Juntas, essas espécies de estreptococos somam 95% dos estreptococos e 56% do total da microbiota inicial (NYVAD e KILIAN, 1999). Após a colonização inicial, os microrganismos pioneiros crescem rapidamente formando colônias que ficam embebidas em uma matriz extracelular composta por componentes de origem salivar e bacteriana (BOWDEN e EDWARDSSON, 1995). A seguir, relações interbacterianas contribuem para o aumento da diversidade de bactérias até atingir uma comunidade clímax em duas ou três semanas.

Segundo Stoodley (2002) a formação do biofilme ocorre através de três eventos (figura 2). O primeiro ocorre uma redistribuição das células fixas através da motilidade na superfície. Em seguida ocorre a divisão binária das células fixas. Após a divisão, células filhas se expandem externamente e para cima e para as laterais, se ligando a superfície e formando aglomerados de células, de forma similar à formação de colônias em placas de ágar (HEYDORN *et al.*, 2000). Por último, aglomerados de células presas superfície mais externa do biofilme são recrutados, por ação do próprio ambiente, para o desenvolvimento de outros biofilmes, atingindo assim a uma comunidade clímax.

A formação do biofilme tem início quando os microrganismos recebem estímulos que podem causar a transição da vida livre (planctônica) para uma vida aderida a uma superfície (CARLSSON, 1970; PRATT e KOLTER, 1998; STOODLEY *et al.*, 1999). Estes sinais variam de acordo com cada microrganismo. Alguns microrganismos requerem exigências nutricionais, tais como *Escherichia coli* K-12 que necessita de um meio com a presença de aminoácidos (PRATT e KOLTER, 1998).

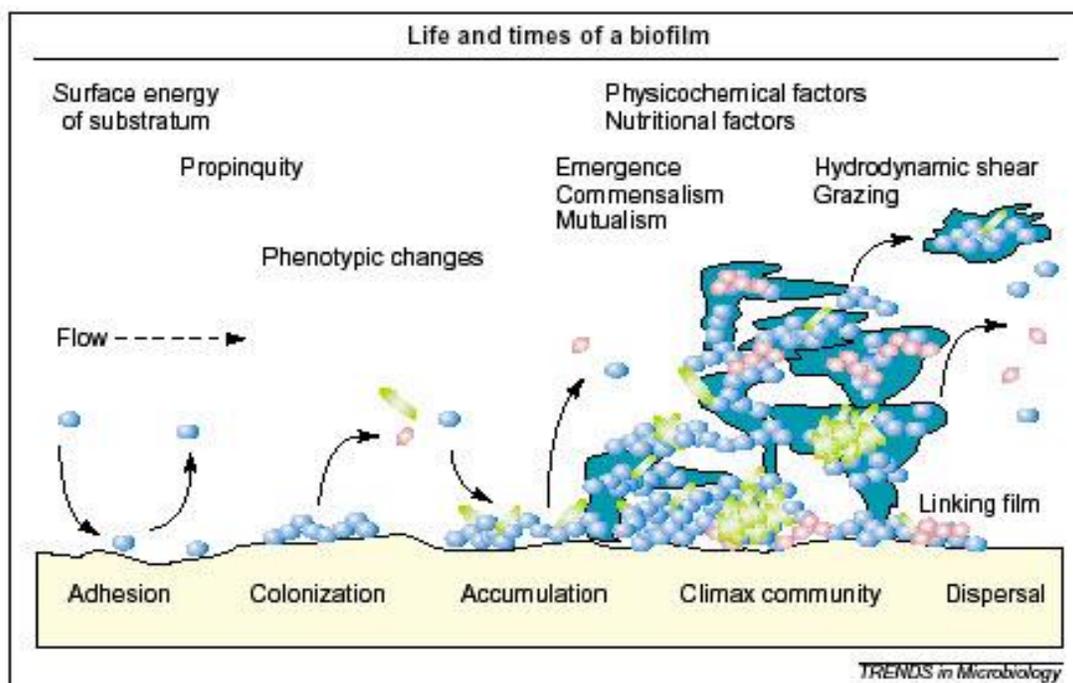


Figura 2: Modelo de desenvolvimento do biofilme segundo Stoodley *et al.*, 2002

Entretanto, há evidências consideráveis de que os estreptococos do grupo mutans (particularmente *S. mutans* e *S. sobrinus*) e os lactobacilos estejam envolvidos no início e na progressão da cárie (LOESCHE, 1986). Estudos revelaram que o aparecimento de cáries de esmalte é precedido por um aumento no número de estreptococos do grupo mutans (NYVAD, 1993; MARCOTTE e LAVOIE, 1998). A colonização e a persistência na cavidade oral dos estreptococos dependem da habilidade dessas bactérias a aderir a superfícies orais, tais como células epiteliais da mucosa ou placa bacteriana nos dentes (BLACK *et al.*, 2004). A atividade enzimática da neuraminidase bacteriana pode modificar os componentes da película de forma a destruir os receptores de algumas espécies, ao mesmo tempo em que cria novos receptores para outras espécies, isso, provavelmente, é um fator importante na regulação da colonização (GIBBONS *et al.*, 1990).

A presença de sacarose no meio bucal permite a aderência de estreptococos do grupo mutans e conseqüente colonização da superfície lisa do esmalte dental, favorecendo seu posterior acúmulo. Esses microorganismos não

só fermentam a sacarose como a partir destas sintetizam polissacarídeos extracelulares (DE STOPPELAAR *et al.*, 1971; GIBBONS e VAN HOUTE, 1975; HAMADA e SLADE, 1980). Na polimerização desses açúcares participam as enzimas denominadas glicosiltransferases (Gtfs), para as glicanas e frutossiltransferases (Ftfs), para as frutanas, e são essenciais para expressão da virulência (HAMADA *et al.*, 1984; YAMASHITA *et al.*, 1993). Essas enzimas atuam na produção de glicanos solúveis e insolúveis em água que servem de reserva energética intracelular, fonte de carbono, e também como um aderente para facilitar a fixação de outras bactérias na película adquirida. (ROLLA *et al.*, 1983; HAMADA e SLADE, 1980; LOESCHE, 1986). Amilopectina, uma glicana, é um polissacarídeo de reserva energética intracelular acumulado no citoplasma de várias bactérias da placa dental, na forma de polímeros de glicose com ligações $\alpha(1\rightarrow4)$, que serve de fonte de carbono para o metabolismo microbiano, quando o carboidrato exógeno é esgotado. Já as glicanas são sintetizadas a partir da internalização da sacarose para a quebra em monômeros de glicose e frutose, e pela ação das glicosiltransferases polímeros de glicose com ligações $\alpha(1\rightarrow6)$, dextrana, ou $\alpha(1\rightarrow3)$, mutana, são formados para participarem ativamente na aderência e formação de aglomerados bacterianos (Figura 3).

Diversos estudos apóiam a hipótese de que a Gtf C tem uma alta afinidade pela hidroxiapatita (mineral do dente) e parece estar envolvida na formação da película de saliva sobre o dente, favorecendo a deposição de outras Gtf C. Já a Gtf B está presente principalmente na superfície bacteriana auxiliando na ligação com a película ou com outras bactérias (VACCA-SMITH *et al.*, 1996 e VACCA-SMITH e BOWEN, 1998).

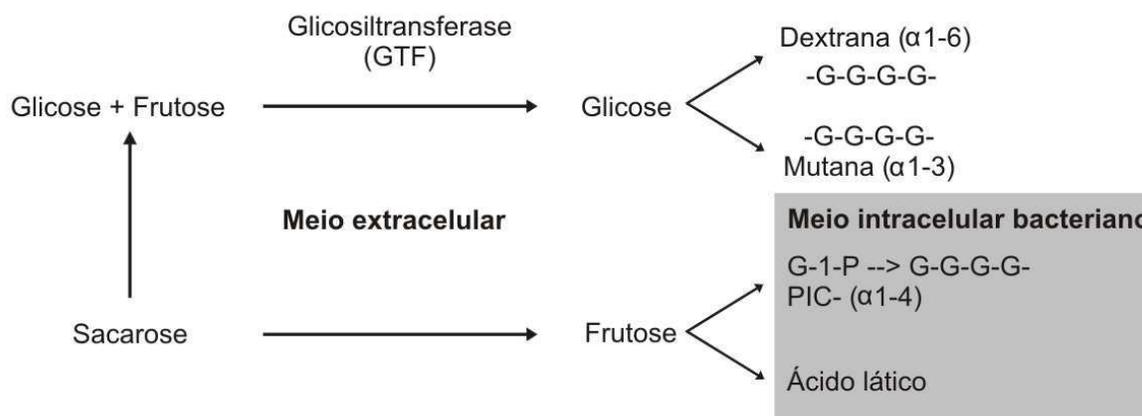


Figura 3: Metabolismo bacteriano da sacarose na placa dental via glicosiltransferase (GTF).

1.1.4 Fatores importantes para o surgimento da Cárie Dental

Segundo Thylstrup e Fejerskov (2001) “um grande número de estudos mostrou que a dieta exerce um papel central no desenvolvimento da doença cárie”. Uma relação causal entre a exposição a carboidratos fermentáveis e o surgimento da cárie foi mostrado através da observação de pacientes, de animais e de observações laboratoriais *in vitro*. A observação do comportamento da cárie em crianças internadas no orfanato da Hopewood House (BEZERRA e TOLEDO, 1999; BUISCHI, 2000; FREITAS, 2001; STORINO, 1993; THYLSTRUP e FEJERSKOV, 2001), no sul da Austrália mostrou que, em função da dieta pobre em carboidratos, a prevalência de cárie entre as crianças internadas era inferior à prevalência de cárie em crianças de outras escolas da região. A cárie é também conseqüência direta da má higienização bucal realizada pelo paciente e se estabelece pela inter-relação entre a atividade bacteriana e o tipo de tecido envolvido (KASUGA *et al*, 1997). Os estreptococos do grupo mutans apresentam algumas vantagens ecológicas, no que diz respeito a sobrevivência do microorganismo, quando da presença da sacarose no meio bucal que permitem a sua aderência e conseqüente colonização da superfície lisa do esmalte dental, favorecendo seu posterior acúmulo. Na década de 1930 foi demonstrado que a fermentação dos carboidratos da dieta alimentar nos depósitos microbianos

provoca a formação de ácido láctico, que está envolvido na desmineralização dos dentes.

Apesar das evidências experimentais em animais e observações clínico-laboratoriais em humanos confirmarem a importância dos microorganismos na etiologia da cárie, deve ser destacado que a doença é multifatorial. Weyne e Harari (2001) reforçam essa idéia, quando dizem que a interação de vários fatores em condições críticas é condição necessária para que ela se expresse clinicamente. Além da microbiota, outros fatores são importantes, destacando-se a susceptibilidade do hospedeiro e sua dieta. Microorganismos cariogênicos podem ser freqüentemente isolados da cavidade oral de indivíduos sem cárie, revelando a importância dos demais fatores no controle do desenvolvimento da doença. Fluxo e capacidade tampão da saliva, bem como o nível de componentes antimicrobianos e anticorpos neste fluido orgânico, desempenham papel importante na regulação da microbiota e sua virulência. Além disso, o grau de mineralização do esmalte dentário e a organização dessa estrutura são aspectos fundamentais para a resistência ao ataque ácido microbiano. Os carboidratos da dieta, principalmente a sacarose, participam na nutrição e na colonização microbianas da cavidade oral, representando um fator preponderante na etiologia da cárie. A tríade de Keyes, esquema desenvolvido pelo Dr. Paul Keyes na década de 60 para estabelecer os fatores primários da cárie (KEYES, 1960) (figura 4), hoje em dia é apresentado modificado com a inclusão de um novo fator que é o tempo, período em que é necessário que se permaneça todos os outros fatores para que a doença ocorra (UZEDA, 2002).

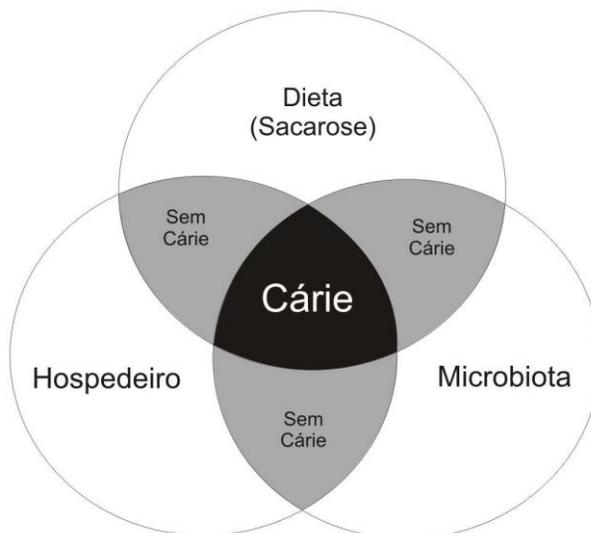


Figura 4: Tríade de Keyes – esquema desenvolvido na década de 60 pelo Dr. Paul H. Keyes para estabelecer os fatores primários da cárie.

1.1.5 A progressão da Cárie Dental

A cárie é o processo de desmineralização do dente por ácidos formados através do metabolismo dos carboidratos pelas bactérias orais (THYLSTRUP e FEJERSKOV, 2001), e a atividade cariosa pode ser diagnosticada pelo surgimento de uma área esbranquiçada, opaca e rugosa na superfície do dente gerada pela desmineralização do esmalte. A cárie incipiente ou mancha branca aparece no estágio inicial da cárie, antes que se forme uma cavidade propriamente dita. Quando o ácido produzido pelas bactérias dissolve o esmalte dos dentes provocando uma pequena cavidade temos a cárie de esmalte. Até este estágio a cárie não causa dor. Após ultrapassar o esmalte a cárie avança mais rapidamente na dentina e passa a ter uma maior probabilidade de causar dor. Um último estágio, a cárie evolui até alcançar totalmente a polpa, causando dor e podendo originar abscessos no tecido ósseo abaixo da raiz (Figura 5).

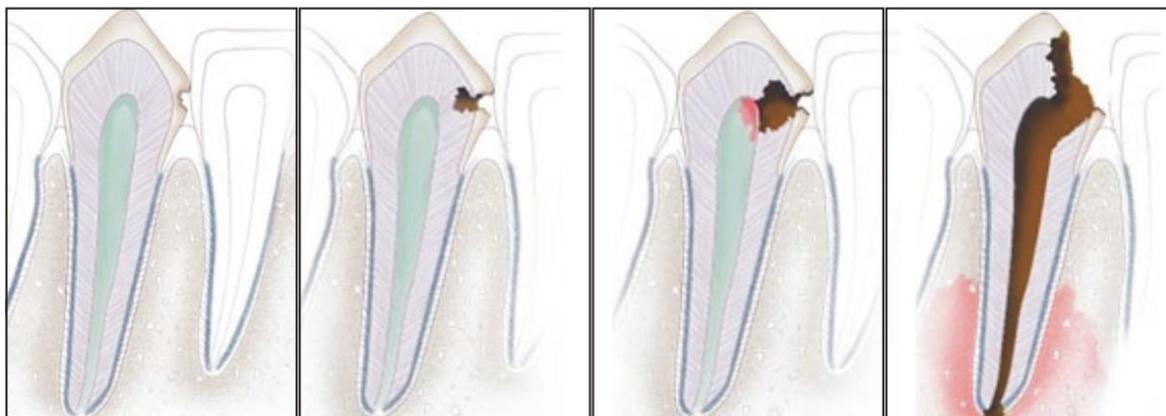


Figura 5: Esquema demonstrador da progressão da Cárie Dental

Nos últimos anos têm-se observado expressivos ganhos nos níveis de saúde bucal das pessoas na maioria dos países industrializados, e também entre alguns países em processo de desenvolvimento, de acordo com inúmeros estudos epidemiológicos. Vários são os fatores que contribuíram para a redução da incidência das doenças mediadas por biofilmes, apesar de que as doenças cárie e periodontal continuam sendo os maiores problemas de saúde pública, e que demandam consideráveis volumes de recursos financeiros para seu combate (WEYNE e HARARI, 2001). A efetividade dos dentifrícios fluoretados na redução da cárie dental começou a ser estudada a partir da segunda metade do século XX, após a Segunda Grande Guerra Mundial. Incorporado ao organismo, o flúor está presente na saliva, banhando os dentes, e incorporado ao esmalte dentário de maneira a torná-lo mais resistente ao "ataque" dos microrganismos. O flúor também está presente nos cremes dentais, soluções de bochecho, vernizes e nas aplicações locais realizadas por dentistas. O dentifrício fluoretado é a razão

principal do declínio da cárie no mundo desenvolvido, mas seu uso em jovens crianças deve ser observado para se evitar conseqüências como a fluorose, formação de estrias esbranquiçadas no dente, quando este método é associado à outra forma de liberação de flúor (SATO e NIWA, 1996).

Assim, a cárie dental é uma doença caracterizada pela destruição localizada e progressiva dos tecidos duros do dente e está intimamente associada com a microbiota residente do biofilme dental, de modo que o seu tratamento envolve a remoção mecânica desses biofilmes (MARSH e MARTIN, 1992).

Nas últimas décadas ocorreu um aumento na tentativa de desenvolver produtos naturais para prevenção de doenças bucais (WOLINSKY e SOTE, 1984; WU-YUAN *et al.*, 1990; HARPER *et al.*, 1990; ISRAELSON, 1991; MORAN *et al.*, 1991). Diversos relatos na literatura têm demonstrado que estes produtos, principalmente plantas medicinais, apresentam atividade antibacteriana sobre os patógenos bucais, entre estes *S. mutans* (SOUTHARD *et al.*, 1984; WOLINSKY e SOTE, 1984; MOSADOMI, 1987; SAKANAKA *et al.*, 1989; WOLINSKY *et al.*, 1996).

1.2 Lectinas

1.2.1 Definição

O termo “Lectinologia”, uma expressão introduzida por Potapov (1968), surgiu para designar uma área de estudos inteiramente voltada à pesquisa sobre uma classe especial de proteínas denominadas lectinas. O primeiro grande fato na história da lectinologia foi promovido por Stillmark (1888) durante seu doutorado na Universidade de Dorpat (Estônia), quando do estudo pioneiro sobre a aglutinação de eritrócitos por extratos de sementes de *Ricinus communis*. Ele observou que ao misturar os extratos das sementes com sangue, os eritrócitos eram aglutinados. A partir de então, surgiu o termo fitohemaglutininas por se pensar, na época, que os compostos aglutinadores eram exclusivamente vegetais.

Outro pioneiro no estudo de lectinas foi o pesquisador Karl Landsteiner que iniciou novos estudos utilizando aglutininas vegetais como ferramentas para o descobrimento dos grupos sanguíneos A, B e O (LANDSTEINER e RAUBITSCHKEK, 1907).

A primeira definição de lectinas foi proposta por Boyd e Shapleigh (1954). Estes autores utilizaram o termo lectina (do latim, *legere* - capaz de escolher, selecionar) para lembrar o aspecto seletivo de ligação de certas proteínas de sementes a eritrócitos humanos. Eles demonstraram essa seletividade em 1954 quando verificaram que extratos de sementes de *Phaseolus vulgaris* aglutinavam eritrócitos de apenas alguns indivíduos.

Durante aproximadamente 100 anos, a partir Stillmark (1888), a pesquisa nesta área focalizou principalmente lectinas de vegetais superiores. Vários trabalhos foram fundamentais no sentido de esclarecer inúmeros aspectos ligados à detecção, purificação, caracterização, especificidade, mecanismos de ação e estrutura dessas proteínas. Em decorrência desses estudos, vários avanços permitiram observar que as lectinas poderiam ser continuamente melhor definidas, o que tem justificado as sucessivas adaptações ocorridas até o presente para definir estas moléculas.

A idéia de especificidade de ligação, que já havia se tornado clara, aliada à conscientização do caráter ubíquo destas proteínas na natureza, levou ao surgimento de uma nova definição para lectinas. Goldstein e colaboradores em 1980 as definiram como proteínas de origem não imune, capazes de reconhecimento específico e ligação reversível a compostos contendo carboidratos e de aglutinarem células e glicoproteínas. Quase que concomitantemente, uma nova definição foi proposta por Kocourek e Horejsi (1981), definindo lectinas como proteínas ou glicoproteínas de natureza não imune que se ligam a carboidratos, sem apresentar atividade enzimática contra esses açúcares e que não requerem grupos hidroxilas livres para sua ligação.

A mais recente definição de lectinas foi proposta e discutida por Peumans e Van Damme (1995), segundo a qual, lectinas são proteínas de origem não imune que possuem pelo menos um sítio de ligação reversível a carboidratos.

Esta definição adquire credibilidade ao observarmos a subdivisão deste vasto grupo de proteínas proposta pelos mesmos autores, que as dividem em três classes principais de lectinas:

- ***Merolectinas***

Inclui lectinas que possuem apenas um sítio de ligação a carboidrato e, conseqüentemente, não são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados (figura 6). Como exemplo, podemos citar as proteínas monoméricas das orquídeas (VAN DAMME *et al.*, 1994).

- ***Hololectinas***

Compreende aquelas lectinas que tem dois ou mais sítios de ligação a um mesmo carboidrato, sendo capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados (figura 6). Essa classe de lectinas está representada pelas hemaglutininas ou fitohemaglutininas (PEUMANS *et al.*, 2000).

- ***Quimerolectinas***

Engloba as lectinas que possuem um ou mais sítios de ligação a carboidratos, além de apresentarem atividade catalítica (ou outra atividade biológica não carboidrato ligante) associada a um outro domínio molecular, portanto, diferente do sítio de ligação a carboidrato (figura 6). Como representantes dessa classe, podem ser citadas as RIP's (PEUMANS *et al.*, 2001)

Em 1996, os mesmos autores introduziram uma nova classe de lectinas, as **superlectinas**, que possuem dois sítios de ligação a carboidratos, os quais são, estruturalmente, diferentes e reconhecem açúcares não relacionados (figura 6). Um exemplo desse grupo é a lectina de tulipa TxLC-1 (first Tulipa hybrid lectin with complex specificity) que possui subunidades com um sítio específico para manose e outro para N-acetil-galactosamina, atuando de maneira totalmente independente. (VAN DAMME *et al.*, 1996).

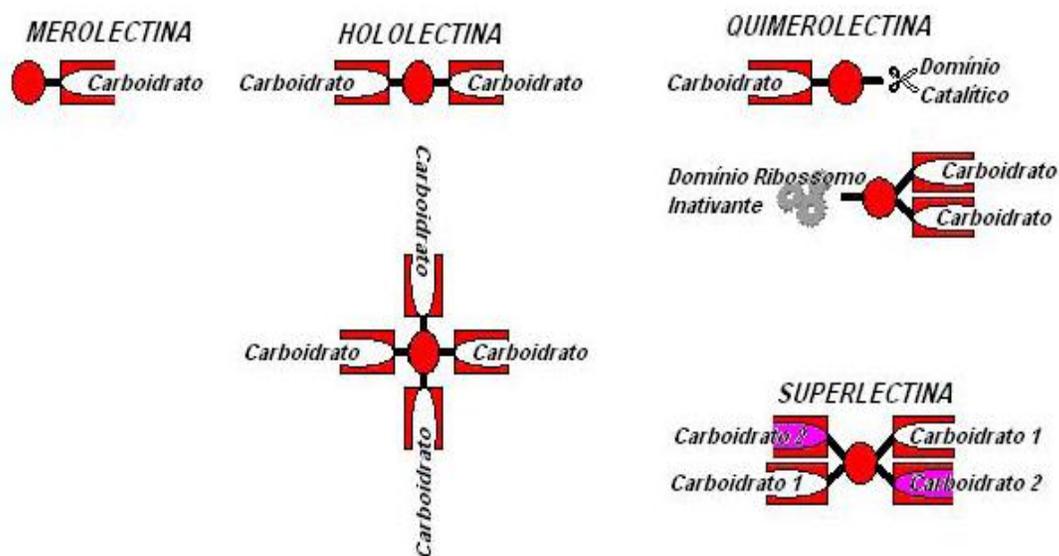


Figura 6: Esquema demonstrador da classificação de lectinas segundo Peumans e Van Damme (1995) e VAN DAMME *et al* (1998).

1.2.2 Estrutura das Lectinas

As lectinas representam um grupo de proteínas com uma grande heterogeneidade estrutural, podendo diferir em vários aspectos tais como: composição de aminoácidos, massa molecular aparente, estrutura e número de subunidades, estrutura terciária, e ainda, pelo fato de conterem ou não íons metálicos ou cátions bivalentes em sua estrutura.

Muitas destas proteínas podem ser agrupadas em famílias distintas que exibem similaridades quanto às suas propriedades estruturais e de seqüência de aminoácidos em suas cadeias polipeptídicas. No reino vegetal, podemos citar algumas espécies como as da família *Leguminosae*, onde se encontra lectinas com alto grau de homologia na seqüência de aminoácidos, estrutura secundária e conformação tridimensional, evidenciando assim, uma linha taxonômica bem definida (CAVADA *et al.*, 1993; SHARON e LIS, 1995). Proteínas com domínios

semelhantes aos de lectinas de leguminosas também foram encontrados em células animais (YAMAMOTO *et al.*, 2001).

A massa molecular aparente das lectinas varia de 3,5 - 4,0 KDa (lectina de *Crotalaria striata*, KHANG *et al.*, 1990) a 480 KDa (lectina de rizoma de *Aegopodium podagraria*, PEUMANS *et al.*, 1985). Outra característica observável é a presença de carboidratos em sua estrutura, cujo grau de glicosilação varia dentre as espécies (SHARON e LIS, 1989).

As lectinas consistem de subunidades, cujo número varia entre 1, no caso da lectina de rizomas de *Urtica dioica* (PEUMANS *et al.*, 1984) a 10, no caso de uma das lectinas de *Araucaria angustifolia* (DATTA *et al.*, 1991). No entanto, as lectinas podem apresentar diferentes padrões de associações de suas subunidades dependendo da característica do meio onde se encontram (pH e temperatura) (DEL SOL *et al.*, 2006).

As lectinas de leguminosas, no geral, são compostas por 2 ou 4 subunidades, iguais ou diferentes e com massa molecular em torno de 25 a 30 kDa. Frequentemente, estas subunidades são constituídas por um único esqueleto polipeptídico estabilizado por ligações não covalentes do tipo pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas, podendo ou não formar dímeros canônicos. As lectinas da tribo Viciae (gêneros *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus*, e *Lens*) são dímeros onde cada subunidade igual é formada por 2 cadeias polipeptídicas diferentes, uma cadeia polipeptídica leve (cadeia α) com massa de 5-7 kDa e uma cadeia polipeptídica pesada (cadeia β) com massa de 15-19 kDa, estabilizadas por ligações não covalentes. (SHARON & LIS, 1989). Já as lectinas de espécies pertencentes à sub-tribo Diocleinae são tetrâmeros compostos por uma mistura de subunidades intactas formadas por uma cadeia polipeptídica (cadeia α) com 237 resíduos de aminoácidos e de subunidades fragmentadas, nas quais a mesma cadeia polipeptídica está dividida em dois fragmentos (β e γ), devido ao fato de não ter havido a formação de uma ligação peptídica entre os resíduos 118 e 119 (CHRISPEELS *et al.*, 1986). Apesar de não estarem unidos covalentemente, os fragmentos são mantidos juntos por ligações não covalentes e formam um protômero cuja estrutura tridimensional é a mesma da subunidade

formada pela cadeia íntegra (cadeia α), sem descontinuidade da estrutura primária (BECKER *et al.*, 1975; SHARON e LIS, 1989).

As lectinas podem ser encontradas em diferentes formas moleculares, como as isoformas ou isolectinas. Isto pode ser determinado por pequenas mudanças na seqüência de aminoácidos. Um exemplo clássico deste caso é a lectina de sementes de *Datura stramonium* que é formada por duas subunidades diferentes, A com 32 KDa e B com 28 KDa. Podendo ser associadas originando três isoformas com as seguintes estruturas: AA, AB e BB (SHIBUYA *et al.*, 1986).

Grande parte das lectinas, principalmente as lectinas pertencentes aos gêneros Dioclea e Canavalia necessitam de íons metálicos divalentes (geralmente Ca^{++} e Mn^{++}) para exercer a atividade de reconhecimento e ligação a carboidratos. Estes íons ligam-se a sítios específicos na estrutura protéica, o que é fundamental para o estabelecimento do sítio de ligação a carboidratos e para conferir alto grau de estabilidade estrutural à molécula, protegendo-a contra a inativação (CAVADA *et al.*, 1993; CAVADA *et al.*, 1996) (Figura 7).

De acordo com SHARMA e SUROLIA (1997), o sítio de reconhecimento a carboidratos é formado de diversos *loops* com diferentes graus de variabilidade. As conformações destes “*loops*” são determinadas pela presença na estrutura de íons metálicos, como o Ca^{2+} e Mg^{2+} , cuja ausência resulta em uma instabilidade local e na perda da capacidade de ligar-se a carboidratos (LORIS *et al.*, 2004).

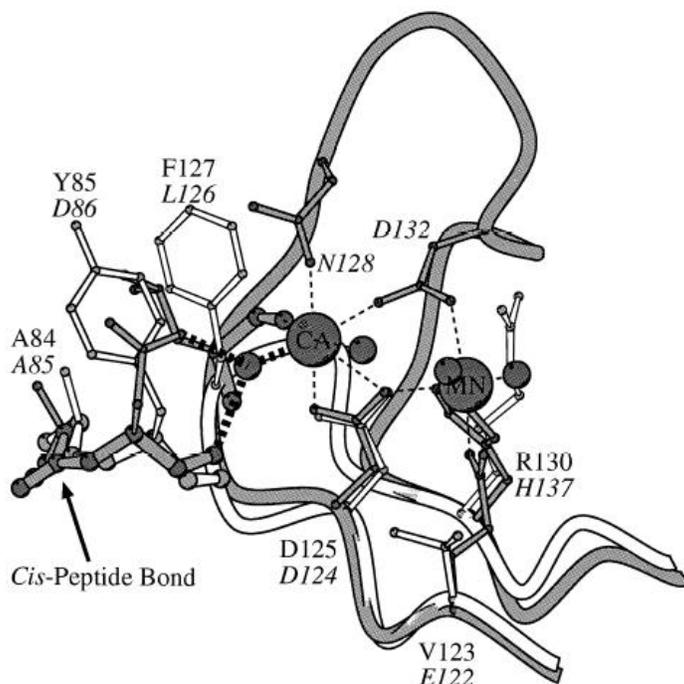


Figura 7: Região do sítio de ligação a íons metálicos, Ca^{++} e Mn^{++} , da lectina de *Phaseolus vulgaris*.

Algumas lectinas de leguminosas possuem ainda sítios de ligação hidrofóbicos que não interferem com os sítios de ligação a carboidratos (ROBERTS & GOLDSTEIN, 1982, ROBERTS & GOLDSTEIN, 1984). A função, nos organismos originais, desses sítios de ligação permanece obscura, mas o fato destes sítios estarem presentes em lectinas de leguminosas de diferentes espécies sugere que apresentam uma importante função biológica (HAMELRYCK *et al.*, 1999). Um desses sítios apresenta alta afinidade (10^6 M^{-1}) por adenina e certos derivados dessa base nitrogenada (ROBERTS & GOLDSTEIN, 1983). Este sítio já foi encontrado em lectinas tetraméricas e lectinas diméricas de leguminosas e pode ser encontrado sob duas formas: dentro da subunidade ou os que se estabelecem no centro do tetrâmero. Na lectina de *Canavalia ensiformis*, o sítio da subunidade liga-se ao hormônio vegetal ácido indolacético do grupo das auxinas (EDELMAN & WANG, 1978) e o outro sítio, existe como uma cavidade única por tetrâmero, que se liga a adenina e também citocinas, que são hormônios derivados da adenina (SHARON e LIS, 1990).

Recentemente Delatorre e colaboradores determinaram a estrutura cristalográfica da lectina de ConM, isolada e purificada de sementes de *Canavalia maritima*, complexada naturalmente, via sítio hidrofóbico, com um aminoácido não protéico, ácido α -aminobutírico, ABU. Evidenciando uma importância fisiológica das lectinas dentro do desenvolvimento dos vegetais (DELATORRE, 2006).

Existem diversos tipos de ligações para a estabilização da estrutura quaternária das lectinas, e uma dessas, muito presente nas lectinas de algas, são as pontes dissulfeto, formadas pela ligação entre resíduos de cisteína. Esse tipo de ligação permite uma alta estabilização da sua conformação, tornando-a bastante resistente a processos físicos e químicos, como elevação da temperatura e tratamento com solventes orgânicos, respectivamente. Para representar esse fato temos como exemplo, contendo na sua estrutura sete pontes dissulfeto, a lectina de alga vermelha *Hypnea musciformes* (NAGANO *et al.*, 2002).

1.2.3 Distribuição das Lectinas

Durante as duas últimas décadas, as lectinas, que até então haviam sido detectadas principalmente em plantas, mostraram-se amplamente distribuídas na natureza por terem sido isoladas de todas as classes e famílias de seres vivos (algas, vertebrados, invertebrados e microorganismos, incluindo fungos e bactérias) e até mesmo em vírus (LIENER *et al.*, 1986), apresentando uma grande variedade de formas e tamanhos, desempenhando papéis biológicos em muitos processos celulares, tais como comunicação celular, defesa de hospedeiros, fertilização, desenvolvimento, infecção parasitária e metástase tumoral (GABIUS e GABIUS, 1997; DEL SOL *et al.*, 2007).

Em vírus, a lectina parece estar envolvida no processo de adesão à célula hospedeira. A infecção pelo vírus da influenza é iniciada pelo evento de adesão, mediada por uma aglutinina da capa do vírion que reconhece e se liga a resíduos de ácido siálico da superfície celular (GLICK *et al.*, 1991).

As várias lectinas de bactérias podem funcionar nas etapas iniciais de infecções, por exemplo, quando ocorre a aderência das bactérias a células epiteliais do trato urinário e gastrintestinal. As lectinas de bactérias também podem agir como moléculas de reconhecimento por macrófagos de camundongos na fagocitose de bactérias na ausência de opsoninas. O mesmo acontece em macrófagos peritoneais, linfócitos e polimorfonucleares humanos (SHARON, 1987). As lectinas também estão envolvidas no processo de adesão de *Corynebacterium diphtheriae* aos seus hospedeiros (COLOMBO *et al.*, 2001). A *Porphyromonas gingivalis*, um patógeno com importância etiológica em doenças periodontais, liga-se através de suas fímbrias a estruturas periodontais contendo glicoproteínas, evidenciando claramente um efeito “lectin-Like” (SOJAR *et al.*, 2004).

Em protozoários, a lectina de *Entamoeba histolytica* parece desempenhar importante papel na etapa de aderência à célula hospedeira (células epiteliais do cólon), possuindo ainda, um papel na citotoxicidade celular, distinto da função de aderência (SAFFER e PETRY, 1991).

Em algas marinhas, o número de trabalhos envolvendo lectinas é ainda pequeno, porém tem crescido bastante nos últimos anos. A primeira lectina de alga marinha isolada foi a da alga vermelha *Ptilota plumosa* (ROGERS *et al.*, 1977). As algas vermelhas são as que apresentam o maior número de espécies com atividade hemaglutinante seguidas das algas pardas e verdes (SAMPAIO, 1997). Em geral as lectinas de algas marinhas apresentam valores mais baixos de pesos moleculares, variando de 4,2 kDa para as isolectinas de *Hypnea japonica* (HORI *et al.*, 1986) e 9.3 kDa para *Hypnea musciformes* (NAGANO *et al.*, 2002) até 64,5 kDa para a lectina de *Ptilota serrata* (ROGERS *et al.*, 1990). De uma maneira geral, a atividade hemaglutinantes das lectinas de algas marinhas não é dependente da adição de cátions divalentes e não são inibidas pela presença de açúcares simples (SAMPAIO, 1992 e 1997).

Em invertebrados, as lectinas estão presentes em praticamente todas as classes examinadas como caranguejos (UMETSU *et al.*, 1991), larvas de insetos (GRUBHOFFER e MATHA, 1991), carrapatos (SHARON e LIS, 1989), ouriço do

mar (YAMADA e AKETA, 1982) e insetos (YU e KANOS, 2000), onde estão presentes principalmente na hemolinfa e órgãos sexuais (SHARON e LIS, 1989). Recente publicação sugere que uma lectina presente em *Armigeres subalbatus* é responsável pela imunidade inata desse inseto a bactérias (WANG *et al.*, 2004). A lectina de *Helix pomatia*, uma espécie de lesma, é a mais conhecida entre as de invertebrados, aglutinando especificamente hemácias humanas do tipo A e sendo inibida por N-acetilgalactosamina (HAMMARSTROM, 1972).

Em vertebrados as lectinas se apresentam de duas maneiras: solúveis ou ligadas a membranas. Uma grande variedade tem sido encontrada em diferentes tecidos de mamíferos, aves e répteis, algumas semelhantes, outras bastante diferentes em sua estrutura molecular e especificidade por carboidratos. Foi também identificada a presença de uma lectina específica por galactose em veneno da cobra que tem ação direta contra microorganismos gram-positivos e gram-negativos (RADIS-BAPTISTA *et al.*, 2006). Na pele de peixes, especificamente, tem sido isolada uma lectina cálcio dependente com funções ainda não muito claras (SUZUKI *et al.*, 2003).

Em seres humanos, dentre os vários tipos de lectinas existentes, uma delas possui importância fundamental no mecanismo de deflagração do sistema complemento, o que, recentemente, modificou todo o entendimento imunológico dessa cascata de proteínas, por indicar uma nova via além da clássica e da via alternativa entendidas como únicas até então. Trata-se da “manose-binding lectin” ou MBL que é capaz de disparar a fixação do complemento após ligar-se à estrutura de algum microorganismo invasor (NAUTA *et al.*, 2004). Além disso, a MBL possui um grande potencial em remover imunocomplexos circulantes, que são responsáveis por inúmeras doenças autoimunes como o lupus eritematoso sistêmico e a artrite reumatóide (SAEVARSDOTTIR *et al.*, 2004).

1.2.4 Atividade Biológica

As células têm, sobre suas superfícies, carboidratos na forma de glicoproteínas, glicolipídeos e polissacarídeos. O potencial dos açúcares como moléculas de informação é muito grande, visto que a importância dessas moléculas nos processos bioquímicos era até então adotada como moléculas ricas em energia ou meros elementos prostéticos. Nos últimos 25 anos, tem havido um número crescente de evidências favorecendo o conceito de que os carboidratos são elementos determinantes de reconhecimento em uma grande variedade de processos biológicos, tanto fisiológicos quanto patológicos (VARKI, 1993; SHARON e LIS, 1995). É a partir dessas importantes informações dadas por essas moléculas que as lectinas exercem suas extraordinárias atividades.

Além da capacidade de aglutinar células, descrita por Stilmark em 1888, em sua tese de doutorado (BEUTH *et al.*, 1995), várias outras atividades biológicas de lectinas vegetais têm sido demonstradas. Entre estas se destacam: indução da proliferação de linfócitos e da produção de interferon- γ (BARRALNETO *et al.*, 1992); estimulação de macrófagos e liberação de peróxido de hidrogênio (RODRIGUEZ *et al.*, 1992); indução da migração de leucócitos (BENTO *et al.*, 1993); indução da liberação de histamina (GOMES *et al.*, 1994); proteção parcial *in vivo* em animais infectados com *Leishmania amazonensis* e reconhecimento da forma metacíclica promastigota da *Leishmania braziliensis* por *Bauhinia purpurea* (PINTO -da- SILVA *et al.*, 2002); indução da produção *in vivo* e *in vitro* de óxido nítrico por células peritoneais (ANDRADE *et al.*, 1999); indução de apoptose (BARBOSA *et al.*, 2001); atividade antiinflamatória e pró-inflamatória de lectinas animais e vegetais (ASSREUY *et al.*, 1997; ASSREUY *et al.*, 1999; ALENCAR *et al.*, 1999) atividade analgésica (SAYYAH *et al.*, 2004), efeitos renais em rim isolado perfundido *in vitro* (TEIXEIRA *et al.*, 2001); interferência em mecanismos parasitários (JACOBSON e DOYLE, 1996); utilização de lectinas em “drug delivery” (SHARMA *et al.*, 2004; BIES *et al.*, 2004; SMART, 2004). Recentemente foi isolado uma lectina, galactose específica, de um anelídeo marinho que possui atividade anti-HIV (MOLCHANOVA, *et al.*, 2006), além do

poder nociceptivo da lectina isolada da alga marinha *Amansia multifida* (NEVES, *et al.*, 2007)

As lectinas têm se mostrado ferramentas poderosas tanto para propósitos analíticos como para pesquisas em bioquímica, biologia celular, imunologia e áreas relacionadas. Uma de suas maiores contribuições tem sido no esclarecimento do papel de membranas celulares e subcelulares e na bioadesão celular. Nesses estudos tem sido utilizadas lectinas marcadas, quer radioativamente, quer com fluoresceína ou com imunomarcadores (RAPIN e BURGER, 1974; LIS e SHARON, 1986; BIES *et al.*, 2004).



2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais:

✓ Avaliar o potencial “*in vitro*” da interferência de cinco lectinas isoladas de sementes de *Canavalia ensiformis*, *Canavalia maritima*, *Cymbosema roseum* e *Acacia farnesiana*, bem como a lectinas de alga marinha *Hypnea cervicornis* no processo de formação de biofilme de bactérias do grupo estreptococos, *Streptococcus mutans* UA159 e *Streptococcus sanguis* ATCC10556.

2.2 Objetivos específicos:

✓ Verificar a possível agregação bacteriana através das cinco lectinas das espécies *Canavalia ensiformis*, *Canavalia marítima*, *Cymbosema roseum*, *Acacia farnesiana*, bem como a lectina de alga marinha *Hypnea cervicornis*;

✓ Verificar a possível atividade antibacteriana de lectinas das espécies *Canavalia ensiformis*, *Canavalia maritima*, *Cymbosema roseum*, *Acacia farnesiana* e *Hypnea cervicornis* através do método de microdiluição em placa de poliestireno (96 poços), contra duas cepas importantes no processo cariogênico *Streptococcus mutans* UA159 e *Streptococcus sanguis* ATCC10556;

✓ Verificar a interferência de lectinas de semente de *Canavalia ensiformis*, *Canavalia marítima*, *Cymbosema roseum* e *Acacia farnesiana*, bem como a lectina de alga *Hypnea cervicornis*, no processo de formação de biofilme bacteriano, *Streptococcus mutans* UA159 e *Streptococcus sanguis* ATCC10556, em placas de poliestireno.

3. Materiais e Métodos

3.1 Isolamento das Lectinas

As lectinas estudadas estão descritas na tabela 1, juntamente com sua especificidade por carboidratos, siglas e referência metodológica (tabela 1).

A etapa da pesquisa relacionada à obtenção das lectinas de sementes de *Canavalia ensiformis*, *Canavalia maritima*, *Cymbosema roseum* e *Acacia farnesiana*, bem como a lectinas de alga *Hypnea cervicornis* (na presença e na ausência do pigmento natural) foram realizadas no Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BIOMOL – LAB), do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Tabela 1: Lectinas utilizadas nos experimentos com suas respectivas especificidades por carboidratos.

Lectinas vegetais	Siglas	Especificidade	Referências
<i>Canavalia maritima</i>	ConM	Glicose/Manose	Perez, <i>et al.</i> , 1991
<i>Cymbosema roseum</i>	CRL	Manose	Cavada <i>et al.</i> , 2006
<i>Canavalia ensiformis</i>	ConA	Glicose/Manose	Moreira <i>et al.</i> , 1984
<i>Acacia farnesiana</i>	AFL	N-Acetilglicosamina	Santi-Gadelha, 2005
Lectinas de algas	–	–	–
<i>Hypnea cervicornis</i>	HCA	Mucinas	Nascimento <i>et al.</i> , 2006
<i>Hypnea cervicornis</i> *	HCAP	Mucinas	Dados não publicados

* *Hypnea cervicornis* complexada com pigmento natural

3.2 Bactérias

Os microorganismos foram gentilmente cedidos pelo Departamento de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP) e estão descritos na tabela abaixo:

Tabela 2: Microorganismos utilizados no experimento com suas respectivas cepas.

Microorganismo	Cepa
<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
<i>Streptococcus sanguis</i>	ATCC 10556

3.3 Curva de Crescimento

Partindo de uma cultura estoque, BHI com 20% de glicerol, os microorganismos foram crescidos inicialmente em 10mL de BHI (Brain Heart Infusion) por 18 horas à 37°C com 10% de CO₂, com um inóculo de 100µL. Após a ativação inicial, 200µL dessa cultura foram adicionados em 20 mL de BHI caldo estéril, sempre mantendo a proporção de 100µL da cultura para cada 10mL de meio estéril. O monitoramento do crescimento foi realizado retirando alíquotas de 700µL dos 20mL da cultura e observando a absorbância no espectrofotômetro a 600nm. Após colocar o inóculo de 200µL foi feita a primeira leitura, T₀ (tempo zero), a segunda leitura foi feita três horas após a primeira, pois esse intervalo corresponde a fase 'lag' do crescimento bacteriano, não havendo assim a necessidade de realizar monitoramento. As leituras seguintes foram feitas com intervalos de uma hora até a absorbância atingir valores de 0,080 unidades de absorbância. Em seguida, em cada leitura, era retirada da cultura mãe 10µL para fazer o plaqueamento, com o auxílio da alça de Drigalski em placas de Petri, 60mm x 15mm, contendo o meio de cultura BHI – agar. Quando necessário, se fazia diluição da cultura mãe, na ordem de 10, 100, 1.000, 10.000 e 1.000.000 vezes, para facilitar a contagem das colônias na placa. Após o início do plaqueamento as leituras no espectrofotômetro, seguido de plaqueamento, eram feitas com intervalos de trinta minutos, pois corresponde a fase onde o crescimento bacteriano é exponencial, fase 'log'. Quando a absorbância atingiu valores constantes, as leituras foram encerradas e após as 18 horas de crescimento, registra-se a última leitura. O ensaio foi feito em duplicata.

As placas foram incubadas por 24 horas à 37°C com 10% de CO₂. Passado o tempo de incubação, elas foram retiradas da estufa e feita a contagem do número de colônias. Em seguida foi feita a correção, de acordo com a diluição da cultura e o volume utilizado no plaqueamento, para expressar o valor em UFC/mL. Fazendo assim uma correlação do valor da absorbância com o número de colônias por mililitros, possibilitando assim uma padronização de 10⁸ UFC/mL para a utilização nos experimentos.

3.4 Ensaio de Agregação Bacteriana Induzida por Lectinas.

O ensaio de agregação bacteriana foi realizado segundo a metodologia descrita por Athamna e colaboradores em 2006 com algumas modificações. Partindo de uma cultura estoque mantido a -80°C, BHI com 20% de glicerol, os microorganismos foram crescidos inicialmente em 10mL de BHI (Brain Heart Infusion) por 18 horas à 37°C com 10% de CO₂ com um inóculo de 100µL. 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. Em seguida, a cultura foi centrifugada, lavada duas vezes com tampão fosfato 0,1M com NaCl 0,15M pH 7,2 e em seguida ajustada no espectrofotômetro para uma concentração de 10⁸ UFC/mL, de acordo com o item 3.3. Após o ajuste, 100µL dessa solução foram distribuídos em placas de ELISA (96 poços), em seguida adicionados 100µL de cada uma das lectinas nas concentrações de 100 e 200µg/mL (ensaio feito em triplicata). O monitoramento foi feito com intervalos de uma hora durante um período de 18 horas no leitor de ELISA (Biotrak II – Plate Reader) em um comprimento de onda de 620nm.

3.5 Ensaio de Atividade Antibacteriana

Partindo de uma cultura estoque, BHI com 20% de glicerol, os microorganismos foram crescidos inicialmente em 10mL de BHI (Brain Heart Infusion) por 18 horas à 37°C com 10% de CO₂ com um inóculo de 100μL. 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. Essa renovação foi feita para obter um microorganismo com melhor crescimento e desenvolvimento. Em seguida, a cultura foi centrifugada, lavada duas vezes com tampão fosfato 0,1M com NaCl 0,15M pH 7,2 e em seguida ajustada no espectrofotômetro para uma concentração de 10⁸ UFC/mL, de acordo com o item 3.3. Após o ajuste da concentração, essa solução de bactéria foi diluída 100 vezes antes da utilização, seguindo a proporção 100μL da solução de bactéria, 10⁸ UFC/mL, para cada 10mL de tampão.

As soluções de lectinas foram preparadas antes da montagem da placa, em concentrações que variaram de 2mg/mL à 15μg/mL (Figura 7) e mantidas em estoque até a utilização. A distribuição na placa de 96 poços, para cada lectina, foi feita em dois grupos, o grupo teste, T1 e T2, e o grupo controle, C1 e C2, para cada concentração de lectina, além do controle positivo e negativo de crescimento, C+ e C-, respectivamente. No grupo teste, colocou-se 50μL da solução de bactéria, preparada como descrito acima, adicionados mais 50μL da solução de lectina em cada uma das concentrações (Figura 8). No grupo controle, colocou-se 50μL de tampão, adicionando mais 50μL de lectina em cada uma das concentrações. Esse controle foi feito devido a interferência da absorbância da lectina a 600nm, para que no final do ensaio seja possível fazer uma diferença da leitura do poço teste com o poço controle da mesma concentração da proteína e assim isolar apenas o crescimento real da bactéria. Em seguida a placa foi incubada por 1 hora a 37°C com 10% de CO₂. Depois foram adicionados 100μL de meio de cultura, BHI caldo, em cada um dos poços, feita a primeira leitura a 620nm no leitor de ELISA (BioTrak II – Plate Reader) e incubada novamente

durante 24 horas a 37°C com 10% de CO₂, e feita a segunda leitura no mesmo comprimento de onda.

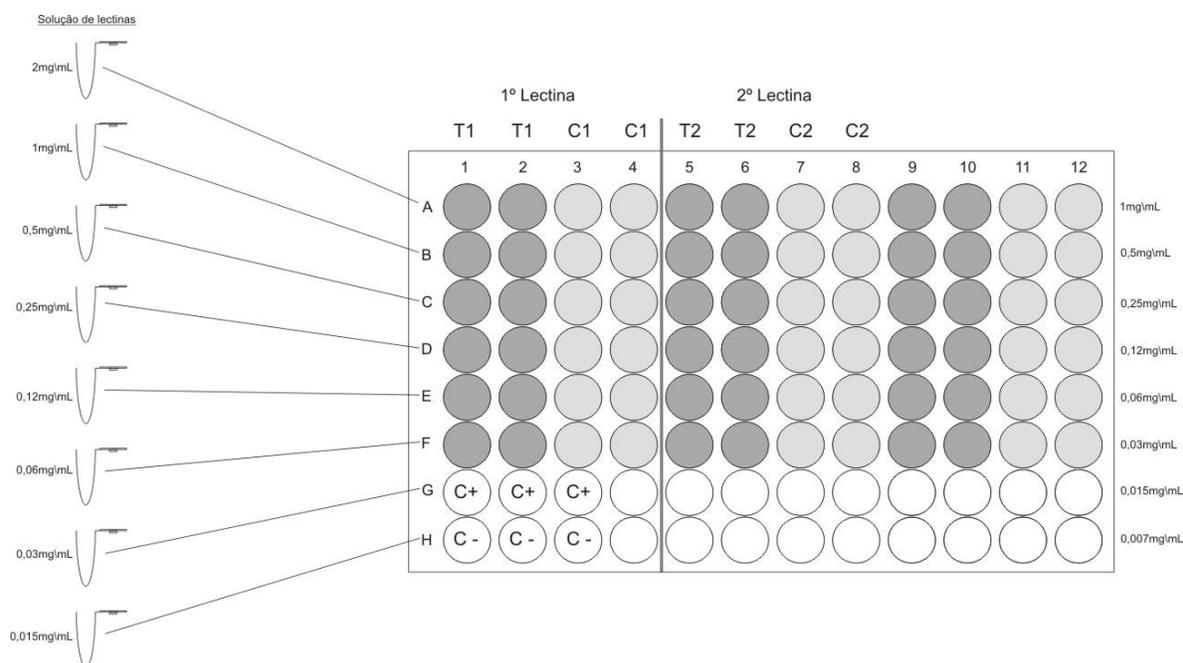


Figura 8: Representação esquemática da montagem da placa de 96 poços para o ensaio de atividade antibacteriana. (○) poço não utilizado, (●) poço que contém lectina com a bactéria e (◐) poço que contém a lectina com tampão

3.6 Ensaio de inibição da formação do biofilme bacteriano em placas de poliestireno (96 poços) através do tratamento com lectinas.

O ensaio de aderência das cepas bacterianas em placas de poliestireno foi realizado segundo a metodologia descrita por O'toole e Kolter (1998), com algumas adaptações. As soluções de cada uma das lectinas foram testadas nas concentrações de 10, 100 e 200µg/mL. Após uma ativação inicial de uma cultura estoque, a mesma foi renovada em mais 10mL de BHI caldo estéril com inóculo de 100µL e crescidos por 18 horas a 37°C com 10% de CO₂. Em seguida, a cultura foi centrifugada, lavada duas vezes com tampão fosfato 0,1M com NaCl 0,15M pH 7,2 e em seguida ajustada no espectrofotômetro para uma concentração de 10⁸

UFC/mL, de acordo com o item 3.3. Após o ajuste da concentração, 100 μ L dessa solução de bactéria foi adicionado em cada um dos poços da placa junto com 100 μ L de solução de lectina em cada uma das concentrações (10, 100 e 200 μ g/mL) e incubadas por 2 horas a 37°C com 10% de CO₂. Em seguida as placas foram retiradas da estufa e lavadas duas vezes com água destilada (Biotrak II – Plate Wash) e depois adicionado 100 μ L de cristal violeta 1% por 15 minutos. Passado esse tempo o processo de lavagem foi repetido e a placa colocada sob temperatura ambiente por 1 hora. Em cada poço foram adicionados 100 μ L de álcool metílico 70% e, após 10 minutos, a suspensão foi transferida para uma cubeta de 70 μ L seguido de leitura a 595nm (Genequant - *Pro*).

3.7 Análise Estatística

Os resultados dos testes de inibição da formação do biofilme bacteriano foram demonstrados através de gráficos. A diferença entre médias de replicatas foi verificada através da aplicação do 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 esses testes foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0.05$.



4. Resultados

4.1 Curva de Crescimento

As cepas bacterianas foram submetidas ao monitoramento do crescimento através da análise da curva de crescimento durante um período de 18 horas. As duas cepas apresentaram um comportamento bastante similar, sendo que a cepa de *Streptococcus sanguis* ATCC10556 teve um desenvolvimento maior do que a cepa de *Streptococcus mutans* UA159. Apresentou uma leitura no espectrofotômetro a 600nm (Genequant - Pro), correspondente a uma quantidade de 10^8 UFC/mL, de 0,191 e 0,173 unidade de absorbância para a cepa de *Streptococcus mutans* UA159 e *Streptococcus sanguis* ATCC10556, respectivamente, (Figura 9 e 10).

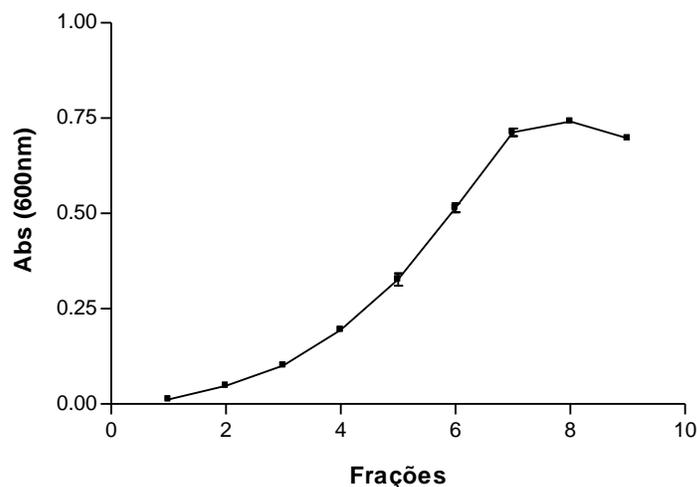


Figura 9: Curva de crescimento da cepa de *Streptococcus mutans* UA159

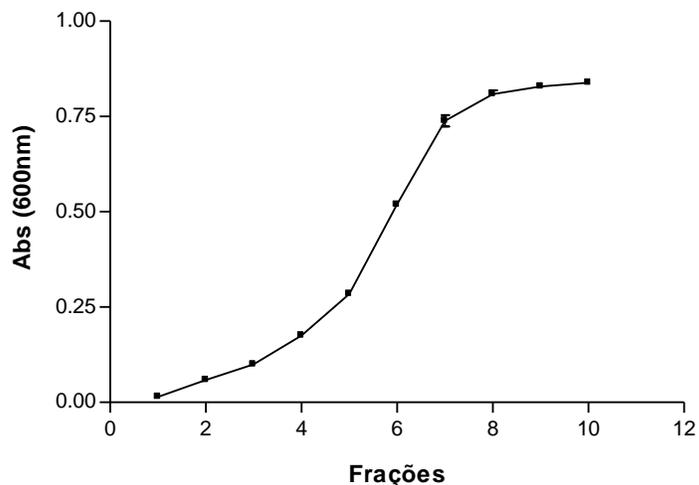


Figura 10: Curva de crescimento da cepa de *Streptococcus sanguis* ATCC10556.

4.2 Agregação Bacteriana Induzida por Lectina

As lectinas, isoladas de sementes de *Canavalia ensiformis*, *Canavalia maritima*, *Cymbosema roseum* e *Acacia farnesiana*, bem como a lectinas de alga marinha *Hypnea cervicornis*, testadas no presente estudo não foram capazes de aglutinar ou agregar nenhuma das duas bactérias, *Streptococcus mutans* UA159 e *Streptococcus sanguis* ATCC10556.

4.3 Atividade Antibacteriana (MIC)

Testes de atividade antimicrobiana foram realizadas nas cepas testadas, *Streptococcus mutans* UA159 e *Streptococcus sanguis* ATCC10556. Os resultados das lectinas testadas contra cada uma das bactérias estão dispostos na tabela 3 e 4.

As duas cepas testadas nesse estudo foram susceptíveis a lectina isolada de sementes de *Canavalia ensiformis*, apresentando uma inibição de 100% do crescimento até uma concentração de 125µg/mL, correspondendo ao MIC (concentração mínima inibitória) desta lectina (tabela 3 e 4). A lectina isolada de sementes de *Canavalia marítima* apresentou apenas uma inibição de 50% do

crescimento da cepa de *Streptococcus sanguis* ATCC10556 nas concentrações de 1000 e 500µg/mL (dados não apresentados), ou seja, apresentando uma diferença estatística em relação ao controle, cepa não tratada com lectina (tabela 3). Todas as outras lectinas não apresentaram qualquer sinal de inibição do crescimento contra as cepas testadas (tabela 3 e 4).

Tabela 3: Concentração mínima inibitória das cinco lectinas testadas com *Streptococcus sanguis* ATCC10556.

	Lectinas					
	CRL	ConA	ConM	HCA	HCAP	AFL
1000µg/mL	0,809	0,000	0,578	1,137	1,175	0,942
500µg/mL	0,884	0,000	0,543	1,166	1,162	0,927
250µg/mL	0,855	0,000	1,058	1,189	1,067	1,051
125µg/mL	0,917	0,000	1,021	1,071	1,119	1,002
62,5µg/mL	0,984	0,519	1,058	1,074	1,119	1,005
31,2µg/mL	0,826	0,775	0,904	1,049	0,95	0,866

Tabela 4: Concentração mínima inibitória das cinco lectinas testadas com *Streptococcus mutans* UA159.

	Lectinas					
	CRL	ConA	ConM	HCA	HCAP	AFL
1000µg/mL	0,697	0,000	0,861	0,703	0,791	0,635
500µg/mL	0,56	0,000	0,692	0,692	0,825	0,652
250µg/mL	0,629	0,000	0,878	0,718	0,82	0,665
125µg/mL	0,595	0,000	0,925	0,621	0,791	0,506
62,5µg/mL	0,635	0,801	0,796	0,697	0,734	0,562
31,2µg/mL	0,497	0,794	0,838	0,718	0,741	0,569

4.4 Inibição da formação de biofilme bacteriano em placas de 96 poços de poliestireno através do tratamento com a lectinas.

A lectina a ser testada foi submetida aos ensaios de inibição da adesão bacteriana em placas estéreis de poliestireno (ELISA) e quantificadas por meio de uma coloração do biofilme bacteriano utilizando cristal de violeta a 1%, desenvolvida por O'toole G.A. & Kolter, R. em 1998. Percebe-se através das figuras abaixo que todas as lectinas testadas, *Canavalia marítima*, *Cymbosema*

roseum e *Hypnea cervicornis*, com exceção da lectina de *Canavalia ensiformis*, foram capazes de inibir a formação do biofilme experimental (figura 11 a 16) das duas cepas bacterianas testadas, *Streptococcus mutans* UA159 e *Streptococcus sanguis* ATCC10556. A inibição da formação de biofilme foi mais expressiva em *Streptococcus mutans* UA159 quando se utiliza lectinas específicas por glicose/manose, em especial a lectina de *Cymbosema roseum* que apresenta uma atividade inibitória alta mesmo numa concentração de 10µg/mL, chegando a inibir totalmente a formação biofilme nas concentrações de 100 e 200µg/mL (Figura 12). Entretanto essas lectinas não apresentam esse mesmo potencial contra a cepa de *Streptococcus sanguis*, com exceção da lectina de *Canavalia marítima* (Figura 11). A lectina de *Hypnea cervicornis* apresenta uma considerável inibição das duas cepas, principalmente contra *Streptococcus sanguis*, onde dose resposta é bem representada (dados não apresentados). Não apresentando uma diferença significativa, de ação contra os biofilmes, entre a presença e ausência do pigmento natural na lectina (Figura 13 e 14).

A lectina de *Acacia farnesiana*, específica por N-acetilglicosamina, apresentou uma inibição considerável na formação do biofilme da cepa de *Streptococcus mutans*, sendo mais efetiva na concentração de 200µg/mL. Com relação à formação do biofilme da cepa de *Streptococcus sanguis*, a lectina acima citada, demonstrou ser bastante efetiva, apresentando uma dose-resposta bastante expressiva, chegando a inibir 99,99% na maior concentração (Figura 15 e 16).

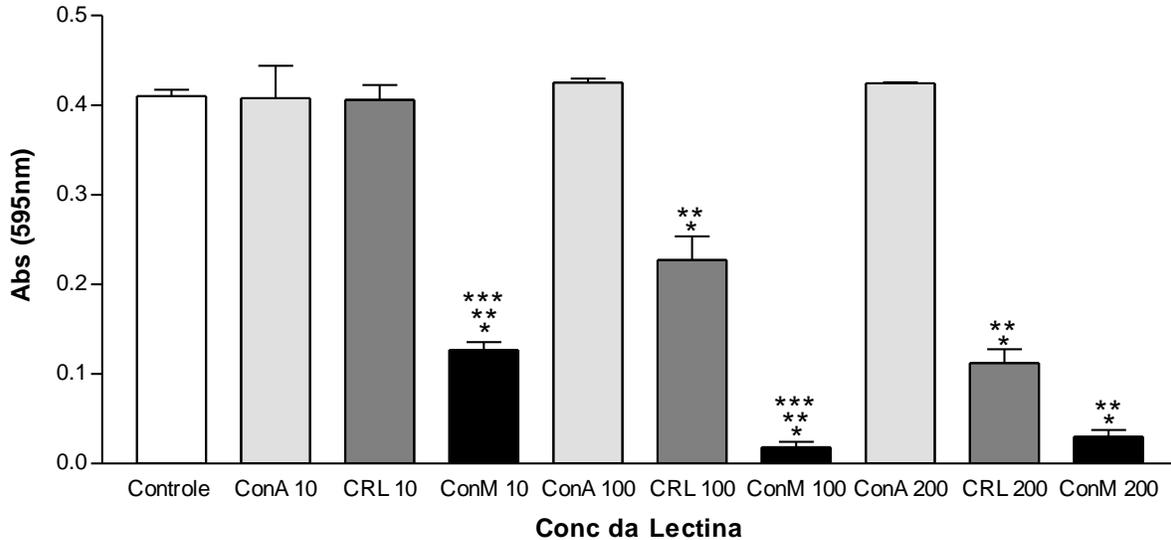


Figura 11: Inibição da formação de biofilme da cepa de *Streptococcus sanguis* ATCC10556 em placa de poliestireno através das lectinas específicas a glicose/manose nas doses de 10µg/mL, 100µg/mL e 200µg/mL, *Canavalia ensiformis* (ConA10, ConA100 e ConA200), *Cymbosema roseum* (CRL10, CRL100 e CRL200) e *Canavalia marítima* (ConM10, ConM100 e ConM200). (*) Estatisticamente significativa em relação ao controle positivo. (**) Estatisticamente significativa em relação à ConA, da mesma concentração. (***) Estatisticamente significativa em relação a CRL, da mesma concentração.

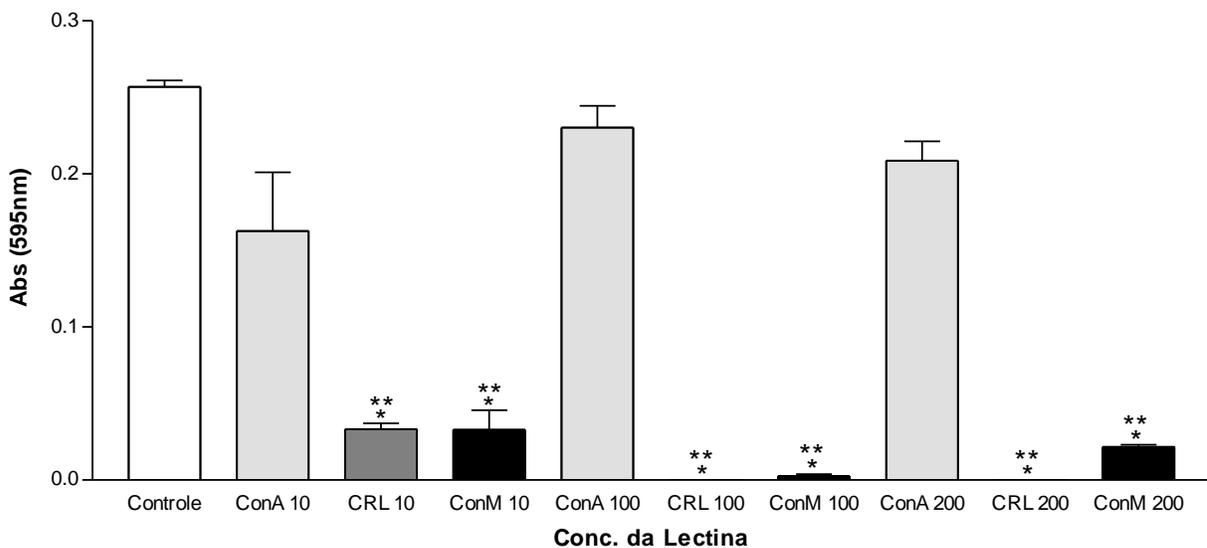


Figura 12: Inibição da formação de biofilme da cepa de *Streptococcus mutans* UA159 em placa de poliestireno através das lectinas específicas a glicose/manose nas doses de 10µg/mL, 100µg/mL e 200µg/mL, *Canavalia ensiformis* (ConA10, ConA100 e ConA200), *Cymbosema roseum* (CRL10, CRL100 e CRL200) e *Canavalia marítima* (ConM10, ConM100 e ConM200). (*) Estatisticamente significativa em relação ao controle positivo. (**) Estatisticamente significativa em relação à ConA, da mesma concentração.

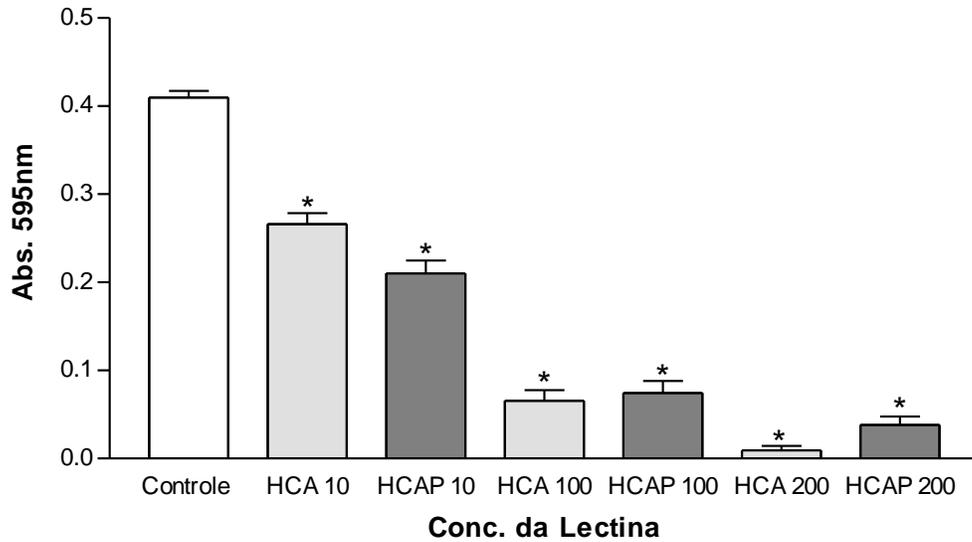


Figura 13: Inibição da formação de biofilme da cepa de *Streptococcus sanguis* ATCC10556 em placa de poliestireno através da lectina de *Hypnea cervicornis* nas doses de 10µg/mL, 100µg/mL e 200µg/mL, específica por carboidrato complexo. Fazendo uma análise da diferença estatística entre a lectina na presença e na ausência de um pigmento natural, HCAP e HCA, respectivamente. (*) Estatisticamente significativa em relação ao controle positivo.

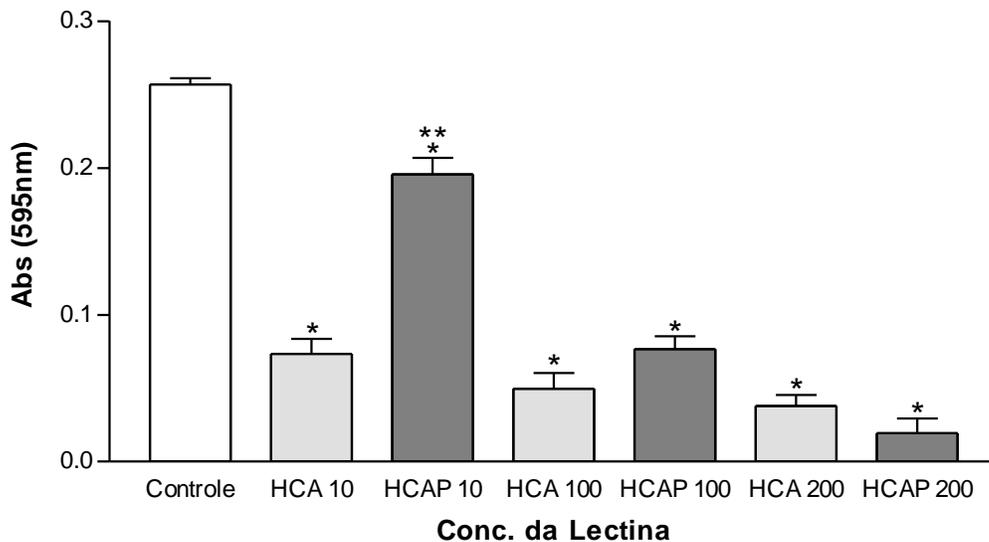


Figura 14: Inibição da formação de biofilme da cepa de *Streptococcus mutans* UA159 em placa de poliestireno através da lectina de *Hypnea cervicornis* nas doses de 10µg/mL, 100µg/mL e 200µg/mL, específica por carboidrato complexo. Fazendo uma análise da diferença estatística entre a lectina na presença e na ausência de um pigmento natural, HCAP e HCA, respectivamente. (*) Estatisticamente significativa em relação ao controle positivo. (**) Estatisticamente significativa em relação à HCA, na mesma concentração.

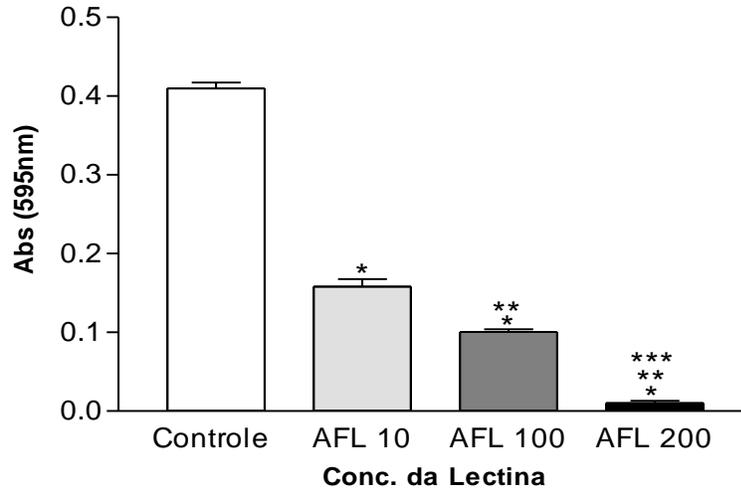


Figura 15: Inibição da formação de biofilme da cepa de *Streptococcus sanguis* ATCC10556 em placa de poliestireno através da lectina de *Acacia farnesiana* nas doses de 10µg/mL, 100µg/mL e 200µg/mL, específica por N-acetiglicosamina. (*) Estatisticamente significativa em relação ao controle positivo. (**) Estatisticamente significativa em relação a AFL 10µg/mL. (***) Estatisticamente significativa em relação a AFL 100µg/mL.

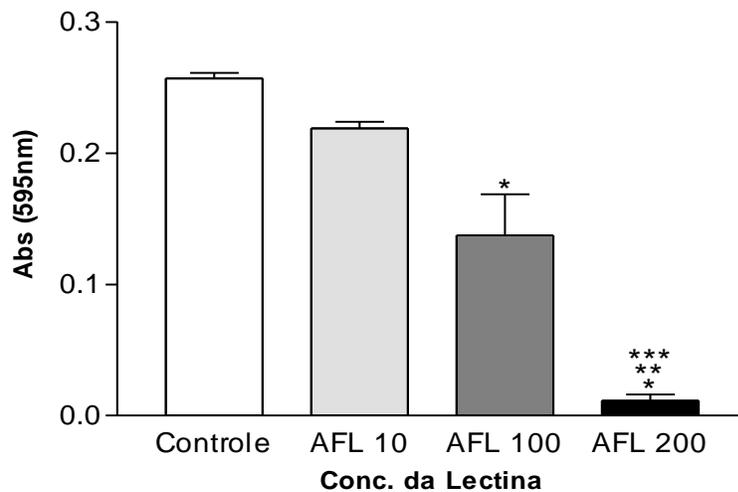


Figura 16: Inibição da formação de biofilme da cepa de *Streptococcus mutans* UA159 em placa de poliestireno através da lectina de *Acacia farnesiana* nas doses de 10µg/mL, 100µg/mL e 200µg/mL, específica por N-acetiglicosamina. (*) Estatisticamente significativa em relação ao controle positivo. (**) Estatisticamente significativa em relação a AFL 10µg/mL. (***) Estatisticamente significativa em relação a AFL 100µg/mL.



5. Discussão

O desenvolvimento de agentes terapêuticos com potencial de interferência na colonização do dente por organismos cariogênicos é uma das primeiras estratégias para a redução da incidência de doenças dentais (BOWEN, 1999). Assim, observa-se um crescente número de descobertas de produtos naturais que possuem propriedades anti-placa contra organismos cariogênicos (SOUTHARD *et al.*, 1984; MOSADOMI, 1987; SAKANAKA *et al.*, 1989). Uma possibilidade é o uso de agentes que interferem diretamente na habilidade de ligação da bactéria nos tecidos, que consiste no evento inicial para que ocorra a infecção (OFEK *et al.*, 1996). As bactérias podem interagir com a película adquirida através de uma série de mecanismos específicos, dentre eles a interação do tipo lectina envolvendo as adesinas localizadas na superfície bacteriana e os receptores da película (SHARON e OFEK, 2000). Outro mecanismo utilizado pelas bactérias para formação de biofilmes é através da indução da síntese de proteínas específicas necessárias para a colonização da superfície biótica ou abiótica (O'TOOLE e KOLTER, 1998). Segundo Costerton (1995) existe uma diferença no conjunto de proteínas sintetizadas durante o crescimento do biofilme *versus* cepa planctônica.

Muitos agentes terapêuticos vêm sendo estudados com o objetivo de reduzir os níveis de estreptococos orais. A clorexidina, como um representante oficial, tem-se demonstrado efetiva e segura em seus resultados (PUCHER e DANIEL, 1992; JENKINS *et al.*, 1993; RENTON-HARPER *et al.*, 1999; HILDEBRANDT, 1996). Entretanto, os efeitos colaterais, tais como alterações de paladar, gosto desagradável, inflamação gengival e manchamento dental, são ainda motivos de preocupação (BOWDEN, 1996). Devido a estes efeitos colaterais, as pesquisas realizadas estão buscando basicamente, compostos com efeitos terapêuticos similares a clorexidina, com uma menor indução de efeitos colaterais. Já foi demonstrado que extratos hidroalcoólicos de *Matrichara camomila* e mirra exibem efeitos comparáveis a clorexidina sobre microorganismos anaeróbios (MATOS, 1997). Também foi demonstrada a ação antimicrobiana contra bactérias cariogênicas de flavonas extraídas de plantas como *Artocarpus heterophyllus* e a *Sophora exigua* contra lactobacilos e actinomicetos (BANDEIRA, 1999;

TSUCHIYA, 1999). Além do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, uma mirtácea australiana, demonstrou efetividade “*in vitro*” contra várias cepas de estreptococos orais (KIM, 1997), sendo que da *Camelia sinenses* é extraído um polifenol (sunfenon), que apresenta efeito inibitório sobre a produção de glucanos insolúveis produzidos pelas glicosiltransferases de *S. mutans* e *S. sobrinus* (KASHKET, 1985). O extrato aquoso de alho mostrou inibição da síntese de proteínas, de ácidos nucléicos e de lipídeos de *Candida albicans*, traduzindo-se também um potente efeito fungicida (ADENTUMBI *et al.*, 1986).

Embora ainda não se saiba a real função das lectinas nos vegetais, o uso dessas proteínas como ferramenta biológica já é mundialmente aceito com aplicações em diversas áreas. A exemplo disso temos trabalhos recém publicados utilizando uma Galectina (lectina específica por β -galactose) envolvida no processo de fibrose hepática humana, com o papel de ativação de macrófagos e síntese de colágeno (NISHI *et al.*, 2007), além de uma lectina, específica por N-acetil-D-glicosamina, isolada de um anélideo marinho, *Serpula vermicularis*, que possui uma atividade contra o vírus HIV (vírus da imunodeficiência), atuando na inibição da produção do antígeno viral p24 (MOLCHANOVA *et al.*, 2006). Algumas lectinas também possuem uma grande atividade antiinflamatória, capazes de reverter processos inflamatórios severos de cistite hemorrágica, um efeito colateral em tratamentos de certos tipos de câncer com ciclofosfamida (ASSREUY *et al.*, 1999) e outra utilizada na caracterização da natureza carboidrática de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* através de marcação da lectina com FITC (STRATHMANN *et al.*, 2002). Mesmo em áreas aplicadas, como medicina e agricultura, várias lectinas têm sido patenteadas nos últimos anos em utilizações das mais variadas, que vão da utilização em cancerologia para algumas (ZUZAK *et al.*, 2006) à capacidade inseticida para outras (DUTTA *et al.*, 2005).

Apesar de todas essas linhas de pesquisa, poucas publicações têm aplicação direta de lectinas como insumo profilático em patologias orais dependentes da formação do biofilmes como a cárie e a doença periodontal. A primeira tentativa de associar essas proteínas a doenças orais foi em 1983 com uma publicação de Gibbons e Dankers em 1983. Antes desse trabalho o que se

verificava era a tentativa de inibir a agregação bacteriana provocada por componentes salivares com o intuito de se estudar a natureza dos receptores envolvidos, e exemplifica-se muito bem isso com os trabalhos que utilizam a WGA (MIRTH *et al.*, 1979) e ConA (MIRTH *et al.*, 1981). Dentro desse contexto, mais de dez anos depois, em 1994 SIMINONATO e colaboradores verificaram que a lectina de batata (*Solanum tuberosum* lectin) desempenha importante papel na colonização de *Streptococcus salivarius* a superfícies epiteliais. Atualmente alguns trabalhos demonstram “*in vitro*” alguma potencialidade das lectinas como ferramenta profilática na formação de biofilmes orais de cepas importantes no processo cariioso (TEIXEIRA *et al.*, 2006).

Estudos anteriores mostram que a interação das lectinas com as bactérias é uma importante ferramenta para diagnóstico de laboratório (DOYLE e KELLER, 1986). Recentemente, Athamna e colaboradores (2006) utilizaram 23 diferentes lectinas para identificar diferentes espécies de micobactérias, por um simples teste de aglutinação. Nos resultados obtidos através do protocolo utilizado nessa dissertação, nenhuma das lectinas testadas, mesmo tendo diferentes especificidades, foi capaz de aglutinar ou agregar as cepas bacterianas utilizadas.

Grosso e colaboradores (2002) avaliaram “*in vivo*” a atividade antimicrobiana de soluções a base de alho (*Allium sativum*), óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) e clorexidina sobre microrganismos totais e estreptococos do grupo mutans, concluindo que as três soluções promoveram reduções favoráveis, não havendo diferença estatística no efeito comparativo entre elas. Desta forma, sugere o autor, que apesar do alho apresentar efeitos indesejáveis, esta solução assim como o óleo de melaleuca, pode ser usado como alternativa à clorexidina. A aplicação de lectinas como agentes antimicrobianos ainda é uma pretensão recente, pois o primeiro trabalho verificado com esse tipo de ação é de 1997, onde Majumder e colaboradores demonstram a atividade antimicrobiana de uma lectina, específica por N-acetilgalactosamina, contra cepas de *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* atuando na inibição da respiração endógena da bactéria, além de uma lectina galactose específica induzir a morte celular sobre espécie do gênero *Candida* (KOHATSU, *et al.*, 2006). No presente estudo a lectina isolada de

sementes de *Canavalia ensiformis* demonstra uma atividade antimicrobiana contra *Streptococcus sanguis* ATCC10556, uma bactéria que faz parte flora microbiana normal da cavidade oral (HARDIE e BOWDEN, 1974), e também contra *Streptococcus mutans* UA159, cepa cariogênica propriamente dita, ou seja, que possui a capacidade de produção de ácidos (UZEDA, 2002). Essa lectina apresentou ativa numa concentração mínima inibitória do crescimento (MIC) de 125µg/mL, ou seja, até essa concentração, a lectina citada inibe 100% do crescimento dessas bactérias (tabela 3 e 4). Fazendo um comparativo da ação da lectina de *Canavalia ensiformis* com o trabalho publicado por Kohatsu, em 2006 com uma lectina específica por galactose, citado anteriormente, nos leva a sugerir que a lectina de *Canavalia ensiformis* está se ligando a um sítio, presente na parede celular da bactéria, que contém um resíduo de glicose ou manose impedindo que a parede celular seja sintetizada no momento da divisão celular, fissão binária, fazendo com que a bactéria aumente de tamanho até a parede celular perder a elasticidade culminando no rompimento da mesma, com um extravasamento do meio celular para o exterior, um efeito semelhante ao causado pela penicilina.

A lectina isolada de sementes de *Canavalia maritima* apresentou uma diminuição 50% da viabilidade da cepa de *Streptococcus sanguis* ATCC10556 nas concentrações de 1000 e 500µg/mL (tabela 3), não tendo nenhuma ação contra a cepa de *Streptococcus mutans* UA159 (tabela 4). Como já demonstrado por Alencar (2005) que a lectina de *Lonchocarpus sericeus* apesar de não possuir atividade antimicrobiana, essa proteína age diminuindo a viabilidade das bactérias da cavidade peritoneal. As lectinas de *Canavalia maritima* e *Canavalia ensiformis* mesmo apresentando uma alta similaridade, no que diz respeito à seqüência primária (PEREZ, *et al.*, 1991), demonstraram ter uma atividade microbiológica completamente distinta, assim como demonstrado em alguns trabalhos já publicados, que lectinas com alto grau de similaridade, mesma especificidades por açúcar, possuem propriedades biológicas diferentes (BENTO, *et al.*, 1993, RODRIGUEZ, *et al.*, 1992 e BARRAL-NETTO, *et al.*, 1992).

Diversas observações sugerem que a formação de biofilmes bacterianos em superfícies abióticas se processa inicialmente com uma simples interação eletrostática entre a bactéria e a superfície na qual será formado o biofilme, após esse evento, ocorre uma indução da síntese de proteínas específicas necessárias para a colonização propriamente dita, onde estão envolvidos eventos de interação superfície – bactéria e bactéria – bactéria (TIMMERMAN *et al.*, 1991; DUFRENE *et al.*, 1996 e O'TOOLE e KOLTER, 1998). Diferentemente do que sugere o estudo desenvolvido por Teixeira em 2006, mostrando que lectinas foram capazes de inibir formação do biofilme apenas por competição por sítios carboidráticos específicos localizados na película adquirida do esmalte com as adesinas das bactérias, os resultados encontrados nesse trabalho apontam as lectinas como um possível inibidor da síntese protéica necessária para formação inicial do biofilme bacteriano, além do efeito já citado por Teixeira em 2006. Os dados apresentados corroboram com diversos artigos em que relatam a inibição da atividade ribossômica, inibição da síntese protéica, causada por algumas lectinas (KOZLOV, *et al.*, 2006 e STIRPE, *et al.*, 2007), além do trabalho publicado por O'toole (1998), que demonstra a capacidade da tetraciclina, antibiótico inibidor da síntese protéica, reduzir consideravelmente a formação do biofilme bacteriano sem diminuir a viabilidade celular. Ou seja, as lectinas utilizadas nesse trabalho, provavelmente, foram internalizadas pelas bactérias, a fim de serem metabolizadas, efeito pró-biótico, tiveram afinidade por um açúcar presente na superfície do ribossomo que inibiu o processamento do RNAm, conseqüentemente a formação de algumas proteínas necessárias para a formação do biofilme bacteriano.

Os dados demonstram claramente que existe uma correlação entre os resultados obtidos. A lectina de *Canavalia ensiformis*, que apresentou uma forte atividade antibacteriana, contra *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis*, foi a única que não apresentou atividade na inibição da formação do biofilme bacteriano, provavelmente por apresentar uma maior afinidade a um carboidrato, glicose ou manose, presente na parede celular, permanecendo assim ancorada ao lado externo da bactéria, causando assim o efeito antimicrobiano.

Os dados encontrados apontam para um potencial anticárie das lectinas sendo possível a utilização destas moléculas como ferramenta biológica tanto como agente antimicrobiano como também na inibição da formação de biofilmes bacterianos.

Novos estudos com um maior aprofundamento da atividade dessas proteínas, com outras especificidades, assim como a utilização de modelos de biofilmes que mimetizam o ambiente da cavidade oral com uma maior fidelidade, passando para a experimentação “*in vivo*”, seguindo com testes de citotoxicidade confluindo para protocolos em humanos, são a linha natural que se buscará a partir de então, na tentativa de inserir uma ou mais lectinas como insumo profilático na prevenção da cárie e da doença periodontal.



6. Conclusão

Concluimos nesse estudo que as lectinas isoladas de sementes, *Canavalia maritima*, *Cymbosema roseum* e *Acacia farnesiana*, bem como a lectinas de alga marinha *Hypnea cervicornis* foram capazes de inibir a formação do biofilme das duas cepas testadas, *Streptococcus sanguis* ATCC10556 e *Streptococcus mutans* UA159. Contudo somente a lectina de ConA, *Canavalia ensiformis*, foi capaz de inibir ou matar os microorganismos estudados. Não sendo, nenhuma das lectinas testadas, capaz de aglutinar ou agregar as cepas de *Streptococcus sanguis* ATCC10556 e *Streptococcus mutans* UA159.



7. Referências Bibliográficas

ADETUMBI, M.; JAVOR, G.T.; LAU, B.H. (1986) *Allium sativum* (garlic) inhibits lipid synthesis by *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother**, **30(3)**, 499-501.

ALENCAR, N.M.; TEIXEIRA, E.H.; ASSREUY, A.M.; CAVADA, B.S.; FLORES, C.A.; RIBEIRO, R.A. (1999) Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediations of inflammation**, **8**, 107-131.

AL IAFI, T.; ABABBEH, H. (1995) The effect of the extract of the Miswak (chewing sticks) used in Jordan and the Middle East on oral bacteria. **Int. Dent. J. v. 45**, 218-222.

ANDRADE, J.L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S.; BARRAL-NETTO, M. (1999) Lectin-induced NO production. **Celular Immunology**, **194**, 98-112.

ASSREUY, A.M.S.; SHIBUYA, M.D.; MARTINS, G.J.; SOUZA, M.L.P.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A. (1997) Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators of Inflammation** **6**, 201 - 210.

ASSREUY, A.M.; MARTINS, G.J.; MOREIRA, M.E.F.; BRITO, G.A.C.; CAVADA, B.S.; RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A. (1999) Prevention Of Cyclophosphamide-Induced Hemorrhagic Cystitis By Glucose-Mannose Binding Plant Lectins. **The Journal of Urology**. **161**, 1988 – 1993.

ATHAMNA, A.; COHEN, D.; ATHAMNA, M.; OFEK, I.; STAVRI, H. (2006) Rapid identification of Mycobacterium species by lectin agglutination. **Journal of Microbiological Methods** **65**, 209– 215

BANDEIRA, M.F. (1999) Atividade antibacteriana do óleo de copaíba associado ao Ca(OH), e ao óxido de zinco. In: 16° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Odontologia, Águas de São Pedro. Águas de São Pedro: SBPQO, p.9.

BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T.B.; FREITAS, L.A. R.; BARRAL NETTO M. (2001) In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Brasil. 96(5)**, 673 – 678.

BARRAL-NETTO, M.; SANTOS, S.B.; BARRAL, A.; MOREIRA, L.I.M.; SANTOS, C.F.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S. (1992) Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the *Diocleae* tribe. **Immunological Investigations, 21**, 297-303.

BARRAL-NETTO, M.; VON SOHSTEN, R.L.; TEIXERA, M.; CONRADO DOS SANTOS, W.L.; POMPEU, M.L.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S.; FALCOFF, E.; BARRAL, A. (1996) In vivo protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta Tropica, 60**, 237-250.

BECKER J.W.; REEKE G.N.J.; WANG J.L.; CUNNINGHAM B.A.; EDELMAN G. M.; (1975) The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. III. Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides. **J Biol Chem. 250(4)**, 1513-24.

BEUTH, J.; STOFFEL, B.; KO, H.L.; JELJASZEWICZ, J.; PULVERER, G. (1995) Immunomodulating ability of galactoside-specific lectin standardized and depleted mistletoe extract. **Arzneimittelforschung. 45(11)**, 1240-1242.

BENTO, C.A.M.; CAVADA, B.S.; OLIVEIRA, J.T.A.; MOREIRA, R.A.; BARJA-FIDALGO, C. (1993) Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. **Agents and Actions**, **38**, 48-54.

BEZERRA, A.C.B.; TOLEDO, O.A. (1999) Nutrição, dieta e cárie. In: **ABOPREV: promoção de saúde bucal** coordenação Léo Kriger. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, p.43-67.

BIES, C.; LEHR, C.M.; WOODLEY, J.F. (2004) Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, **56(4)**, 425-435.

BLACK C., *et al.* (2004) Biofilm-specific surface properties and protein expression in oral *Streptococcus sanguis*. **Arch Oral Biol J** **49**, 295-304.

BOWDEN, G., EDWARDSSON, S. **Ecologia oral e cárie dentária.**

BOWDEN, G. (1996) Mutans streptococci caries and clohexidine. **J. cant. Dent. Assoc., Ottawa**, **62(9)**, 700.

BOWEN W. H. (1999) Wither or whither caries research? **Caries Res.** **33(1)**, 1-3.

BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E. (1954) Antigenic relations of blood group antigens as suggested by tests with lectins. In: Plant Lectins. Molecular and biological aspects. **Ann. Rev. Plant Physiol.** **36**, 209-234

BUISCHI, Y.P. (2000) *Promoção de saúde oral na clínica odontológica.* São Paulo: Artes Médicas: EAP-APCD, 359p. NEWBRUN, E. *Cariologia.* São Paulo: Santos, 1988. 326p.

CARLSSON, J. (1970) Establishment of *Streptococcus sanguis* in the mouths of infants. **Arch. Oral. Biol.** **15**, 1143-1148.

CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; GRANGEIRO, T.B. (1993) Primary structure and functions of plant lectins. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.** **5(2)**, 193-202.

CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T.B.; RAMOS, M.V.; CORDEIRO, E.F.; OLIVEIRA, J.T.A.; MOREIRA, R.A. (1996) Isolation and partial characterization of a lectin from the *Dioclea rostrata* Benth seeds. **R. Bras. Fisiol. Veg.** **8**, 31-36.

CAVADA, B.S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T.B.; BARRALNETTO, M. (2001) Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Curr Protein Pept Sci** **2**, 123–135.

CAVADA, B.S.; MARINHO, E.S.; SOUZA, E.P.; BENEVIDES, R.G.; DELATORRE, P.; SOUZA, L.A.; NASCIMENTO, K.S.; SAMPAIO, A.H.; MORENO, F.B.; RUSTIGUEL, J.K.; CANDURI, F.; DE AZEVEDO, W.F.Jr.; DEBRAY, H. (2006) Purification, partial characterization and preliminary X-ray diffraction analysis of a mannose-specific lectin from *Cybosema roseum* seeds. **Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun.** **62(Pt 3)**: 235-7.

COLOMBO, A.V.; HIRATA-JÚNIOR, R.; SOUZA, C.M.R.; MONTEIRO-LEAL, L.H.; PREVIATO, J.O.; FORMIGA, L.C.D.; ANDRADE, A.F.B.; MATTOS-GUARALDI, A.L. (2001) *Corynebacterium diphtheriae* surface proteins as adhesins to human erythrocytes. **FEMS Microbiology Letters**, **197**: 235-239.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, H.M. (1995) Microbial biofilms. **Annu Rev Microbiol.** **49**: 711-45. Review.

DATTA, P.K.; FIGUEROA, M.O.D.C.R.; LAJOLO, F.M. (1991) Purification and characterization of two major lectins from *Araucaria brasiliensis* syn. *Araucaria angustifolia* seeds (pinhão). **Plant Physiol**, **97**, 856-862.

DE STOPPELAAR, J.D.; KONIG, K.G.; PLASSCHAERT, A.J.; VAN DER HOEVEN, J.S. (1971) Decreased cariogenicity of a mutant of *Streptococcus mutans*. **Arch Oral Biol**. **16(8)**, 971-5.

DEL SOL R, ARMSTRONG I, WRIGHT C, DYSON P. (2006) Characterization of changes to the cell surface during the life-cycle of *Streptomyces coelicolor*: atomic force microscopy of living cells. **J Bacteriol**. Dec 28.

DUTTA, I.; SAHA, P.; MAJUMDER, P.; SARKAR, A.; CHAKRABORTI, D.; BANERJEE, S.; DAS, S. (2005) The efficacy of a novel insecticidal protein, *Allium sativum* leaf lectin (ASAL), against homopteran insects monitored in transgenic tobacco. **Plant Biotechnol J**. **3(6)**: 601-11.

DUFRENE, Y.F.; VERMEIREN, H.; VANDERLAYDEN, J.; ROUXHET, PG (1996) Direct evidence for the involvement of extracellular proteins in the adhesion attachment to polystyrene. **Can Journal Microbiology** **23**: 1-6.

DEL SOL, F.G.; CAVADA, B.S.; CALVETE, J.J. (2006) Crystal structures of *Cratylia floribunda* seed lectin at acidic and basic pHs. Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer transition. **J Struct Biol**. **8**.

DOYLE, R.J.; KELLER, F.K. (1986) Lectins in the clinical microbiology laboratory. **Clin. Microbiol. News**. **8**, 157– 159.

EDELMAN, G.M.; WANG, J.L. (1978) Binding and functional properties of concanavalin A and its derivatives. III. Interactions with indoleacetic acid and other hydrophobic ligands. **J Biol Chem**. **10**; **253(9)**: 3016-22.

FOSTER, J.S.; PAN P.C.; KOLENBRANDER, P.E. (2004) Effects of antimicrobial agents on oral biofilms in a saliva-conditioned flowcell. **Biofilms**, **1**, 5-12.

FREITAS, S.F.T. *História social da cárie dentária*. Bauru: EDUSC, 2001. 124p.

GABIUS H.J.; GABIUS S. (1997) Glycoscience Status and Perspectives. Chapman & Hall, Weinheim, **Germany**.

GIBBONS, R.J. (1996) Role of adhesion in microbial colonization of host tissues: A contribution of oral microbiology. **J. Dent. Res** **75**, 866-870.

GIBBONS, R.J. (1984) Adherence interactions that may affect microbial ecology in the mouth. **J. Dent. Res.**, **63**, 378-385.

GIBBONS, R.J.; DANKERS, I. (1983) Association of food lectins with human oral epithelial cells in vivo. **Arch. Oral Biol.** **28**, 561–566.

GIBBONS, R.J.; VAN HOUTE, J. (1975) Bacterial adherence in oral microbial ecology. **Annu.Re.Microbiol** **29**, 19-44.

GLICK, G.D.; TOOGOOD, P.L.; WILEY, D.C.; SKEHEL, J.J.; KNOWLES, J.R. (1991) Ligand recognition by influenza virus. The binding of bivalents sialosides. **The J. Biochem. Chem.**, **266(35)**, 23660-23669.

GOMES, J.C.; FERREIRA, R.R.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A. (1994) Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparison with concanavalin A. **Agents Actions** **41**, 132-135.

GOLDSTEIN, I.J.; HUGHES, R.C.; MONSIGNY, M.; OZAWA, T.; SHARON, N. (1980) What should be called a lectin? **Nature**, v. 285, p. 60.

GRUBHOFFER, L.; MATHA, V. (1991). Characteristics of a new L-fucose and N-acetyl-D-galactosamine specific lectin from the integument of *Galleria mellonella* larval. **Comp. Biochem, Physiol.**, **100(1)**: 73-76.

GROPPO, F.C.; RAMACCIATO, J.C.; SIMOES, R.P.; FLORIO, F.M.; SARTORATTO, A. (2002) Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms. **Int Dent J.** **52(6)**: 433-7.

HAMADA, S.; SLADE, H.D. (1980) Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol. Rev.** **44**, 331-384.

HAMADA, S.; KOGA, T.; OOSHIMA, T. (1984) Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. **J. Dent. Res.** **63**, 407-411.

HARPER, D.S.; MUELLER, L.J.; FINE J.B.; GORDON, J.; LASTER, L.L. (1990) Effect of 6 months use of a dentifrice and oral rinse containing sanguinaria extract and zinc chloride upon the microflora of the dental plaque and oral soft tissues. **Journal Periodontol**, **61(6)**, 359-63.

HORI, K.; MIYAZAWA, K.; FUSETANI, N.; HASHIMOTO, K.; ITO, K. (1986) Hypnins low-molecular weight peptidic agglutinins isolated from a marine red alga, *Hypnea japonica*. **Biochimica et Biophysica Acta**, **873**, 228-236.

HILDEBRANTE, G.H. (1996) Effects of Repeated Treatment with Sustained-Release Chlorhexidine Mouth Guards on Salivary Levels of Mutans Streptococci. **Cáries Res, Basel**, **30**: 445-453.

HARDIE J.M.; BOWDEN, G.H. (1974) The normal microbial flora of the mouth. **Soc Appl Bacteriol Symp Ser.** **3(0)**: 47-83. Review.

HEYDORN, A.E.; BJARNE, K.; HENTZER, M.P.; MATTHEW R.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S. (2000) Experimental reproducibility in flow-chamber biofilms. **Microbiology** **146**: 2409-2415.

HAMMARSTROM, S. (1972). Snail (*Helix pomatia*) agglutinin. **Meth. Enzymol.**, **28**: 368-383. . **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2004 Mar;48(3):195-9.

HAMELRYCK, T.W.; LORIS, R.; BOUCKAERT, J.; DAO-THI, M.H.; STRECKER, G.; IMBERTY, A.; FERNANDEZ, E.; WYNS, L.; ETZLER, M.E. (1999) Carbohydrate binding, quaternary structure and a novel hydrophobic binding site in two legume lectin oligomers from *Dolichos biflorus*. **J Mol Biol.** **286(4)**: 1161-77.

HOSHINO, T.; KAWAGUCHI, M.; SHIMIZU, N.; HOSHINO, N.; OOSHIMA, T.; FUJIWARA, T. (2004) PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using gtf genes. **Diagn Microbiol Infect Dis.** **48(3)**:195-9.

ISRAELSON, L. (1991) The role of natural products in the oral health care. **J. Clin. Dent.** (Spec. Iss): pp. 5-6.

JACOBSON, R.L.; DOYLE R.J. (1996) **Parasitol Today**, **12(2)**: 55-61.

JENKINSON, H.F.; LAMONT, R.J. (1997) Streptococcal adhesion and colonization. **Crit Rev Oral Biol Med.** **8(2)**, 175-200.

JENKINS, S.; ADDY, M.; NEWCOMBRE, R. (1993) The effects of a chlorhexidine toothpaste on the development of plaque, gingivitis and tooth staining. **J. Clin Periodontol, Copenhagen**, **20(1)**, 59-62.

KASHKET, S. (1985) *In-vitro* inhibition of glucosyltransferase from the dental plaque bacterium *Streptococcus mutans* by common beverages and food extracts. **J. Arch. Oral Biol.** **30(11-12)**: 821-826.

KASUGA, Y., IKENOYA, H., OKUDA, K. (1997) Bactericidal effects of mouthrinses on oral bacteria. **Bull Tokyo Dent. Coll.**, **38**, 297-302.

KEYES, P. (1960) The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. **Archs Oral Biol.** **1**, p. 304-320.

KHANG, N.Q.; JEAN-LUC, G.; HOEBEKE, J. (1990) A blood group A specific lectin from the seeds of *Crotalaria striata*. **Biochim. Biophys. Acta**, **1033**, 210–213.

KIN, J.H. (1997) Anti- bacterial action of onion (*Allium cepa* L.) extracts against oral pathogenic bacteria. **J. Nihon Univ. Sch. Dent.** **39(3)**, 136-141.

KOCOUREK, J.; HOREJSI, V. (1981) A note of the recent discussion of definition of the term “lectin”. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry.** Proceedings of the 5th Lectin Meeting, v. 3, p. 3-6.

KOHATSU, L.; HSU, D.K.; JEGALIAN, A.G.; LIU, F.T.; BAUM, L.G. (2006) Galectin-3 induces death of *Candida* species expressing specific beta-1,2-linked mannans. **J Immunol.** **177(7)**: 4718-26.

KOLENBRANDER, P.E. (1998) Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and ecology of dental plaque. **Ann. Rev. Microbiol.** **42**, 627-656.

KOZLOV IUV, SUDARKINA OIU, KURMANOVA AG. (2006) Ribosome-inactivating lectins from plants. **Mol Biol** **40(4)**: 711-23. Review.

LIENER, I.E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I.J. (1986) The lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine. **Academic Press**, 600.

LOESCHE, W.J. (1986) Role of *Streptococcus mutans* in human decay. **Microbiol Res**, **50(4)**, 353-380.

LANDSTEINER, K.; RAUBITSCHKEK, H. (1907). Beobachtungen über Hamolyse and Hemagglutination. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig., 45 660, *citado por* Gold & Balding, 1975.

LORIS, R.; VAN WALLE, I.; DE GREVE, H.; BEECKMANS, S.; DEBOECK, F.; WYNS, L.; BOUCKAERT, J. (2004) Structural basis of oligomannose recognition by the *Pterocarpus angolensis* seed lectin. **J Mol Biol.** **30**; **335(5)**: 1227-40.

MARSH, P.D. (1992) Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. **J. Dent. Res.** **71**, 1431-1438.

MARSH, P.D. (1994) Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Adv.Dent.Res.**, **8**, 263-271.

MIRTH, D.B.; MILLER, C.J.; KINGMAN, A.; BOWEN, W.H. (1979) Inhibition of Saliva-Induced Aggregation of *Streptococcus mutans* by Wheat Germ Agglutinin. **Caries Res.** **13**, 121-131.

MIRTH, D.B.; MILLER, C.J.; KINGMAN, A.; BOWEN, W.H. (1981) Binding of Salivary Aggregating Factors for *Streptococcus mutans* by Concanavalin A and Fucose-Binding Protein. **Caries Res.** **15**, 1-8.

MORAN, H.A.; ADDY, M.; NEWCOMBE, R. (1991) Comparasion of an herbal toothpaste with a fluoride toothpaste on plaque and gengivitis. **Clin. Prev. Dent.**, **13**, 12-15.

MOOSER, G.; WONG, C. (1988) Isolation of a glucan-binding domain of glucosiltransferase (1,6 α -glucan syntase) from *Streptococcus sobrinus*. **Infect. Immun** **56**, 880-884.

MOSADOMI, H.A. (1987) The effect of crude extracts of nine African chewing sticks on oral anaerobies. **J. Med. Microb.**, **23**, 55-60.

MOREIRA, R.A.; CAVADA, B.S. (1984) Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.). Isolation, characterisation and behaviour during germination. **Biologia Plantarum**, **26(2)**: 113-120.

MOORE, W.E.; HOLDEMAN, L.V.; CATO, E.P.; SMIBERT, R.M.; BURMEISTER, J.A.; PALCANIS, K.G. (1985). Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. **Infect Immun** **48**: 507–519.

MAJUMDER, M.; CHATTOPADHYAY, T.; GUHA, A.K.; CHATTERJEE, B.P. (1997) Inhibition of bacterial respiration by a low-molecular weight lectin, scyllin, from *Scylla serrata* crab hemolymph. **Indian J Biochem Biophys.** **34(1-2)**: 87-9.

MOLCHANOVA, V.; CHIKALOVETS, I.; CHERNIKOV, O.; BELOGORTSEVA, N.; LI, W.; WANG, J.H.; YANG, D.Y.; ZHENG, Y.T.; LUKYANOV, P.A. (2006) New lectin from the sea worm *Serpula vermicularis*: Isolation, characterization and anti-HIV activity. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.** Dec 5;

MATOS, F.J.A. (1997) **Living pharmacies.** *Ciência e Cultura.* **49(5-6)**, 409-412.

MARCOTTE, H.; LAVOIE, M.C. (1998) Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. **Microbiol Mol Biol Rev**, **62(1)**: 71-109.

MARSH, P.; MARTIN, M. (2002) **Oral microbiology.** 3. ed. London : Chapman & Hall.

NAGANO, C.S.; MORENO, F.B.M.B.; BLOCH, J.R.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. (2002) Purification and

Characterization of a new Lectin from the Red Marine Alga *Hypnea Musciformis*
Protein and Peptide Letters, **9(2)**; 159-165.

NAUTA, A.J.; CASTELLANO, G.; XU, W.; WOLTMAN, A.M.; BORRIAS, M.C.
DAHA, M.R.; VAN KOOTEN, C.; ROOS, A. (2004) Opsonization with C1q and
mannose-binding lectin targets apoptotic cells to dendritic cells. **J Immunol**, **173(5)**:
3044-50.

NYVAD, B.; KILIAN, M. (1999) Comparison of the initial streptococcal microflora
on dental enamel in caries-active and in caries inactive individuals. **Caries Res.** **4**,
267-272.

NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; NUNES, E.V.; RODRIGUES, R.F.;
GOERSCH, G.V.; CAVADA, B.S.; CALVETE, J.J.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS,
W.R.; SAMPAIO, A.H. (2006) Isolation and characterization of a new agglutinin
from the red marine alga *Hypnea cervicornis* J. Agardh. **Biochem Cell Biol.** **84(1)**:
49-54.

NEVES, S.A.; FREITAS, A.L.; SOUSA, B.W.; ROCHA, M.L.; CORREIA, M.V.;
SAMPAIO, D.A.; VIANA, G.S. (2007) Antinociceptive properties in mice of a lectin
isolated from the marine alga *Amansia multifida* Lamouroux. **Braz J Med Biol Res.**
40(1): 127-34.

NISHI, Y.; SANO, H.; KAWASHIMA, T.; OKADA, T.; KURODA, T.; KIKKAWA, K.;
KAWASHIMA, S.; TANABE, M.; GOTO, T.; MATSUZAWA, Y.; MATSUMURA, R.;
TOMIOKA, H.; LIU, F.T.; SHIRAI, K. (2007) Role of Galectin-3 in Human
Pulmonary Fibrosis. **Allergol Int.** **1;56(1)**: 57-65

NYVAD, B. (1993) Microbial colonization of human tooth surfaces. **APMIS Suppl.**
32:1-45. Review.

OFEK, I.; KAHANE, I.; SHARON, N. (1996) Toward anti-adhesion therapy for microbial diseases. **Trends Microbiology** **4(8)**, 297-9.

O'TOOLE G. A.; KOLTER R. (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. **Molecular Microbiology** **28**, 449-461.

PEUMANS, W.J.; DE LEY, M.; BROEKAERT, W.F. (1984) An unusual lectin from stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizomes. **FEBS Letters**, **177**, 99-103.

PEUMANS, W.J.; NSIMBA-LUBAKI, M.; PEETERS, B.; BROEKAERT, W.F. (1985) Isolation and partial characterization of a lectin from ground elder (*Aegopodium podagraria*) rizoms. **Planta**, **164**, 75-82.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, W.J.M. (1995) Proposal for a Novel Sistem of Nomeclature of Plant Lectins. **Lectins** **10**, 105-117.

PEUMANS, W.J.; HAO, Q.; VAN DAMME, E.J.; (2001) Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? **FASEB J.** **15(9)**, 1493-506.

PEUMANS, W.J.; HAUSE, B.; VAN DAMME E.J.; (2000) The galactose-binding and mannose-binding jacalin-related lectins are located in different sub-cellular compartments. **FEBS Lett.** **477(3)**, 186-92.

PINTO-DA-SILVA, L.H.; CAMURATE, M.; COSTA, K.A.; OLIVEIRA, S.M.P.; CUNHA-E-SILVA, N.L.; SARAIVA, E.M.B. (2002) *Leishmania (Viannia) braziliensis* metacyclic promastigotes purified using *Bauhinia purpurea* lectin are complement resistant and highly infective for macrophages in vitro and hamsters in vivo. **International Journal for Parasitology**, **32(11)**, 1371-1377.

POTAPOV, I.M. (1968) Izv. Akad. Nank Kazah S.S.R. Ser., Soviet Union **Fiziol. Med.**, **5**: 712.

PEREZ, G.; PEREZ, C.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; RICHARDSON, M. (1991) Comparison of the amino acid sequences of the lectins from seeds of *Dioclea lehmanni* and *Canavalia maritima*. **Phytochemistry**, **30(8)**: 1619-1621.

PASTER, B.J.; BOCHES, S.K.; GALVIN, J.L.; ERICSON, R.E.; LAU, C.N.; LEVANOS, V.A. (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. **J Bacteriol** **183**: 3770–3783.

PUCHER, J.J.; DANIEL, J.C. (1992) The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. **Jounal Periodontology** **63(6)**: 526-32.

PRATT, L.A.; KOLTER, R. (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. **Mol Microbiol.** **30(2)**: 285-93.

RODRIGUEZ, D.; CAVADA, B.S.; OLIVEIRA, J.T.A.; MOREIRA, R.A.; RUSSO, M. (1992) Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **25**, 823-826.

ROGERS, D.J.; FISH, B.; BARWELL, C.J. (1990) Isolation and properties of lectins from two red marine algae: *Plumaria elegans* and *Ptilota serrata*. In: KOCOUREK, J.; FREED, D. L. J. Eds: **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, **7**, 49-52.

ROGERS, D.J.; BLUNDEN, G.; EVANS, P.R. (1977) *Ptilota plumose*, A new source of a blood group B specific lectin. **Medic Laboratory Sciences**, **34**: 193-200.

ROLLA, G.J.E.; CIARDI, K.H.; EGGEN, W.H.; BOWEN, J.; AFSETH. (1983) Free glucosyl- and fructosyltransferase in human saliva and adsorption of these enzymes to teeth in vivo, p. 21-29. In R. J. Doyle and J. E. Ciardi (ed.), Glucosyltransferases, glucans, sucrose and dental caries (a special supplement to Chemical Senses). IRL Press, Arlington, Va.

RADIS-BAPTISTA, G.; MORENO, F.B.; NOGUEIRA, L.L.; MARTINS, A.M.; OLIVEIRA, T.D.; TOYAMA, M.H.; CAVADA, B.S.; DE AZEVEDO, W.F.Jr, YAMANE, T. (2006) Crotacetin, a novel snake venom C-type lectin homolog of convulxin, exhibits an unpredictable antimicrobial activity. **Cell Biochem Biophys.** **44(3)**: 412-23.

RENTON-HARPER, P. *et al.* (1999) Efeito da Malaleuca *alternifolia* sobre estreptococos e *Staphylococcus aureus*. In: 16° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa em odontologia, Águas de São Pedro. Águas de São Pedro: SBPQO, 1999, p.10.

RAPIN, A.M.; BURGER, M.M. (1974) Tumor cell surfaces: general alterations detected by agglutinins. **Adv Cancer Res.** **20**: 1-91.

ROBERTS, D.D.; GOLDSTEIN, I.J. (1982) Hydrophobic binding properties of the lectin from lima beans (*Phaseolus lunatus*). **J Biol Chem.** **10;257(19)**: 11274-7.

ROBERTS, D.D.; GOLDSTEIN, I.J. (1983) Adenine binding sites of the lectin from lima beans (*Phaseolus lunatus*). **J Biol Chem.** **258(22)**: 13820-4.

ROBERTS, D.D.; GOLDSTEIN, I.J. (1984) Effect of carbohydrate and metal ion binding on the reactivity of the essential thiol groups of lima bean lectin. **J Biol Chem.** **259(2)**: 903-8.

SANTI-GADELHA, T. Isolamento, purificação, caracterização e atividade biológica da lectina da fração das albuminas de sementes de acacia farnesiana willd (leguminosae – mimosoideae) (2005) – **Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.**

SAMPAIO, A.H. (1992) Hemaglutininas de algas marinhas do nordeste brasileiro e isolamento da hemaglutinina de *Hypnea musciformis* (WULFEN) LAMOUROUX. **Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 74.**

SAMPAIO, A.H. (1997) Lectins from *Ptilota* and *Ulva* species. **Tese de Doutorado apresentada a Universidade de Portsmouth, Inglaterra, 198.**

SAKANAKA, S. (1989) Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. **Agric. Biol. Chem., 53: 2307-2311.**

SAEVARSDOTTIR, S.; VIKINGSDDOTTIR, T.; VALDIMARSSON, H. (2004) The potential role of mannan-binding lectin in the clearance of self-components including immune complexes. **Scand J Immunol, 60(1-2): p. 23-9.**

SAYYAH, M.; HADIDI, N.; KAMALINEJAD, M. (2004) Analgesic and anti-inflammatory activity of *Lactuca sativa* seed extract in rats **Journal of Ethnopharmacology 92: 325–329.**

SHARON N.; OFEK I. (2000) Safe as mother's milk: carbohydrates as future anti-adhesion drugs for bacterial diseases. **Journal Glycoconj 17(7-9): 659-64.**

SHARMA, A.; SHARMA, S.; KHULLER, G.K. (2004) Lectin-functionalized poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles as oral/aerosolized antitubercular drug carriers for treatment of tuberculosis. **J Antimicrob Chemother**, v. 25.

SMART, J.D. (2004) Lectin-mediated drug delivery in the oral cavity. **Advanced Drug Delivery Reviews** 56: 481– 489.

SOJAR, H.T.; SHARMA, A.; GENCO, R.J. (2004) *Porphyromonas gingivalis* fimbriae binds to neoglycoproteins: evidence for a lectin-like interaction. **Biochimie**. 86(4-5): 245-9.

SOUTHARD, G.L.; BOULWARE, R.T.; WALBORN, D.R.; GROZNIK, W.J.; THORNE, E.E.; YANKELL, S.L. (1984) Sanguinarine, a new antiplaque agent: retention and plaque specificity. **J Am Dent Assoc**. 108(3): 338-41.

STILLMARK, H. (1888) Über Ricin ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen.. *Inaugural Dissertation Dorpat* – Tese de Doutorado. Universidade de Dorpat, **Estônia**.

STRATHMANN, M.; WINGENDER, J.; FLEMMING, H.C. (2002) Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Microbiol Methods**. 50(3): 237-48.

SAKANAKA, S. (1989) Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. **Agric. Biol. Chem.**, 53: 2307-2311.

SHARON, N.; LIS, H. (1989) LECTINS, Chapman and Hall. London 126.

SIMINONATO, M.R.L.; MAYER, M.P.A.; CAI, S.; LORENZO, J.L.; ZELANTE, F., (1994) Influence of lectins on adhesion of *streptococcus salivarius* to buccal epithelial cells. **Review Microbiology** **25(2)**: 83-85.

SUZUKI, Y.; TASUMI, S.; TSUTSUI, S.; OKAMOTO, M.; SUETAKE, H. (2003) Molecular diversity of skin mucus lectins in fish. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.** **136(4)**: 723-30.

SHARON, N.; LIS, H. (1995) Lectins - proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. **Essays in Biochemistry**, **30**: 59-75.

STIRPE F, BOLOGNESI A, BORTOLOTTI M, FARINI V, LUBELLI C, PELOSI E, POLITO L, DOZZA B, STROCCHI P, CHAMBERY A, PARENTE A, BARBIERI L. (2007) Characterization of highly toxic type 2 ribosome-inactivating proteins from *Adenia lanceolata* and *Adenia stenodactyla* (Passifloraceae). **Toxicon**. Mar 7.

STOODLEY, P. *et al.* (2002) Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, **56**: 187-209.

STOODLEY, P. *et al.* (1999) The formation of migratory ripples in a mixed species bacterial biofilm growing in turbulent flow. **Environmental Microbiology** **1**, 447-455.

SONJU, T.; GLANTZ, P.O. (1975) Chemical composition of salivary integuments formed in vivo on solids with some established surface characteristics. **Arch Oral Biol.** **20(10)**: 687-91.

STORINO, S.P. (1993) **Cariologia: procedimentos preventivos**. Rio de Janeiro: REVINTER, 133p.

SHARON, N. (1987) Bacterial Lectins, Cell-Cell Recognition and Infections Disease. **FEBS Lett.** **217 (2)**: 145-157.

SAFFER, L.D.; PETRY, W.A.J. (1991) Role of the galactose lectin *Entamoeba histolytica* in adherence-dependent killing of mammalian cells. **Infect. Immun.**, **59(12)**, 4681-4683.

SHARON N, LIS H. (1990) Legume lectins--a large family of homologous proteins. **FASEB J.** **4(14)**: 3198-208. Review.

SHIBUYA, N.; GOLDSTEIN, I.J.; SHAFER, J.A.; PEUMANS, W.J.; BROEKAERT, W.F. (1986) Carbohydrate binding properties of the stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizome lectin. **Arch Biochem Biophys.** **15;249(1)**: 215-24.

SHARMA, V.; SUROLIA, A. (1997) Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. **J Mol Biol.** **28; 267(2)**: 433-45.

SATO, T.; NIWA, M. (1996) Cariostatic mechanisms of fluoride and its effects on human beings. **Nippon Rinsho.** **54(1)**: 67-72. Review. Japanese.

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

TSUCHIA, H. (1999) Effects of green tea catechins on membrane fluidity. **Pharmacol.** **59 (1)**: 34-44.

TEIXEIRA, E.H., NAPIMOGA, M.H.; CARNEIRO, C.A.; OLIVEIRA, T.M.; CUNHA, R.M.S.; HAVT, A.; MARTINS, J.L.; PINTO, V.P.T.; GONÇALVES, R.B.; CAVADA,

B.S. (2006) In vitro inhibition of Streptococci binding to enamel acquired pellicle by plant lectins. **J Appl Microbiol**, **101**: 111–116.

TIMMERMAN, C.P.; FLEER, A.; BESNIER, J.M.; DE GRAAF, L.; CREMERS, F.; VERHOEF, J. (1991) Characterization of a proteinaceous adhesin of *Staphylococcus epidermidis* which mediates attachment to polystyrene. **Infect Immun**. **59(11)**: 4187-92.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. (1995) **Cariologia clínica**. 2. ed. São Paulo: Santos, Cap. 3, p. 45-49.

TAPPUNI, A.R.; CHALLACOMBE, S.J. (1993) Distribution and isolation frequency of eight streptococcal species in saliva from pre-dentate and dentate children and adults. **J Dent Res**. **72(1)**: 31-6.

UZEDA, M. (2002) **Microbiologia Oral**: Etiologia da Cárie, Doença Periodontal e Infecções Endodônticas. Petrópolis – Rj; p.60-63.

UMETSU, K.; YAMASHITA, K.; SUZUKI, T. (1991). Purification and carbohydrate binding specificities of a blood type B binding lectin from hemolymph of a crab (*cherrybdis japonica*). **J. Biochem.**, **109(5)**: 718-721.

VACCA-SMITH, A. M.; BOWEN, W.H. (1998) Binding properties of streptococcal glucosyltransferases for hydroxyapatite, coated hydroxyapatite, and bacterial surface. **Archives Oral Biology** **43**: 103-110.

VACCA-SMITH, A.M.; VENKITARAMAN, A.R.; SCHILLING, K.M.; BOWEN, W.H. (1996) Characterization of glucosyltransferase of human saliva adsorbed onto hydroxyapatite surface. **Caries Res**. **30**: 354-360.

VAN DAMME, E.J.; BALZARINI, J.; SMEETS, K.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W.J. (1994) The monomeric and dimeric mannose-binding proteins from the Orchidaceae species *Listera ovata* and *Epipactis helleborine*: sequence homologies and differences in biological activities. **Glycoconj J.** v. 11, n. 4, p. 321-32.

VAN DAMME E.J.; BRIKE, F.; WINTER H.C.; VAN LEUVEN, F.; GOLDSTEIN I.J.; PEUMANS W.J.; (1996) Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. **Eur J Biochem.** v. 236, n. 2, p. 419-27.

VARKI A. (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. **Glycobiol.** **3(2)**: 97-130.

WOLINSKY, L.E.; MANIA, S.; NACHNANI, S.; LING, S. (1996) The inhibiting effect of aqueous *Azadirachta indica* (Neem) extract upon bacterial properties influencing in vitro plaque formation. **J Dent Res.**, v. 75, n. 2, p. 816-22.

WU-YUAN, C.D.; GRENN, L.; BIRCH, W.X. (1990) *In vitro* screening of Chinese medicinal toothpastes: Their effects on grown and plaque formation of mutans streptococci. **Caries. Res.** v. 24, p. 198-202.

WOLINSKY, L.E.; SOTE, E.O. (1984) Isolation of natural plaque-inhibiting substances from 'Nigerian chewings sticks'. **Caries.Res.** v. 18, p. 216-225.

WEYNE, S; HARARI, S. Cariologia: implicações e aplicações clínicas. In: BARATIERI, L.N. et al. (2001) **Odontologia restauradora: fundamentos e possibilidades.** São Paulo: Santos Ed., p.3-29.

WANG, X.; ROCHELEAU, T.A.; FUCHS, J.F.; HILLYER, J.F.; CHEN, C.C.; CHRISTENSEN, B.M. (2004) A novel lectin with a fibrinogen-like domain and its

potential involvement in the innate immune response of *Armigeres subalbatus* against bacteria. **Insect Mol Biol.**, **13(3)**: 273-82.

YAMADA, Y.; AKETA, K. (1982). Purification and partial characterization of hemagglutinins in seminal plasma of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. **Bioch et Bioph Acta**, **709**: 220-226.

YU, X.Q.; KANOS, M.R. (2000). Immulectin-2, a lipopolysaccharide-specific lectin from na insect, *Manduca Sexta* is induced in response to gran negative bacteria. **J. Biol. Chem.**, **275(48)**: 37373-37381.

YAMADA, Y.; AKETA, K. (1982). Purification and partial characterization of hemagglutinins in seminal plasma of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, **709**: 220-226.

YU, X.Q.; KANOS, M.R. (2000). Immulectin-2, a lipopolysaccharide-specific lectin from na insect, *Manduca Sexta* is induced in response to gran negative bacteria. **J. Biol. Chem.**, **275(48)**: 37373-37381.

ZUZAK, T.J.; RIST, L.; EGGENSCHWILER, J.; GROTZER, M.A.; VIVIANI, A. (2006) Paediatric medulloblastoma cells are susceptible to *Viscum album* (Mistletoe) preparations. **Anticancer Res.**, **26(5A)**: 3485-92.

