

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
CLÍNICA ODONTOLÓGICA/ CARIOLOGIA-DENTÍSTICA

Eliane Garcia da Silveira

**PERFIL PROTEÔMICO E METABOLÔMICO DA CAVIDADE BUCAL EM
CONDIÇÕES DE SAÚDE E DE DOENÇA CÁRIE - UMA REVISÃO SISTEMÁTICA
DA LITERATURA COM META-ANÁLISE**

Porto Alegre

2023

Eliane Garcia da Silveira

**PERFIL PROTEÔMICO E METABOLÔMICO DA CAVIDADE BUCAL EM
CONDIÇÕES DE SAÚDE E DE DOENÇA CÁRIE - UMA REVISÃO SISTEMÁTICA
DA LITERATURA COM META-ANÁLISE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Clínica Odontológica/Cariologia-Dentística pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Alex Arthur

Porto Alegre

2023

Silveira, Eliane Garcia
PERFIL PROTEÔMICO E METABOLÔMICO DA CAVIDADE BUCAL
EM CONDIÇÕES DE SAÚDE E DE DOENÇA CÁRIE - UMA REVISÃO
SISTEMÁTICA DA LITERATURA COM META-ANÁLISE / Eliane
Garcia Silveira. -- 2023.
190 f.
Orientador: Rodrigo Alex Arthur.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de
Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS,
2023.

1. Biofilme. 2. Saliva. 3. Proteoma. 4. Metaboloma.
5. Cárie dental. I. Arthur, Rodrigo Alex, orient. II.
Título.

Eliane Garcia da Silveira

**PERFIL PROTEÔMICO E METABOLÔMICO DA CAVIDADE BUCAL EM
CONDIÇÕES DE SAÚDE E DE DOENÇA CÁRIE - UMA REVISÃO SISTEMÁTICA
DA LITERATURA COM META-ANÁLISE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Clínica Odontológica/Cariologia-Dentística da pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Alex Arthur

Aprovada em:Porto Alegre,16 de fevereiro de 2023.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. RODRIGO ALEX ARTHUR (Orientador)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Profª Drª JULIANA CAMPOS JUNQUEIRA
Universidade Estadual Paulista/São José dos Campos (UNESP)

Profª Drª LINA NAOMI HASHIZUME
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Profª Drª SANDRA LIANA HENZ
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, *Iracema* e *Nelcy* (*in memoriam*), que ensinaram os valores da educação, aos meus irmãos, *Jane*, *Diane* e *Nelci*, sobrinhos, *Rafael* e *Ana Carolina*, meus grandes amores, que sempre incentivaram a buscar meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, por ter permitido que eu tivesse saúde e determinação para não desanimar durante a realização deste trabalho.

Agradeço ao meu marido *Moisés* por todo amor, suporte e apoio quando entrou em minha vida na fase mais difícil do doutorado.

Aos meus cunhados *Neuza* e *Eugênio*, pelo apoio quando precisei dividir minhas angustias.

Ao professor *Rodrigo Alex Arthur*, orientador deste trabalho, pela paciência, incentivo, atenção e ensinamento precioso.

À *Sarah* e *Laura*, que foram imprescindíveis na revisão dos artigos, muito obrigada pelo tempo dedicado e apoio em toda essa jornada.

À minhas amigas *Silvana* e *Beatriz*, pelo apoio no trabalho, vocês foram essenciais para chegar nessa conquista.

À minha amiga *Mercês*, pela colaboração na concretização do texto final, sua amizade e palavras de incentivo foram muito importantes.

Aos meus colegas de pós-graduação *Carolina*, *Gustavo*, *Laís* e *Rafael*, que estavam juntos nessa jornada.

Ao *Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFRGS*, agradeço à coordenação, à equipe da secretaria e aos professores.

“Abre a mente ao que eu te revelo e retém bem o que eu te digo, pois não é ciência ouvir sem reter o que se escuta.” Dante Alighieri

RESUMO

Evidências indicam que o perfil proteômico ou metabolômico da saliva de indivíduos sem doença cárie pode ser diferente de indivíduos com doença cárie. Apesar de haver um certo nível de evidência a partir da análise dos estudos primários, uma melhor compreensão sobre o proteoma e metaboloma da cavidade bucal, a partir da análise agrupada da evidência disponível, pode fornecer dados sobre prováveis candidatos a biomarcadores para doença cárie, possibilitando o desenvolvimento de novas estratégias para controle dessa doença. **Objetivo:** O objetivo geral dessa tese foi comparar por meio de uma revisão sistemática e de meta-análise a composição proteica e de metabólitos da cavidade bucal entre indivíduos livres de cárie e indivíduos que apresentam doença cárie a fim de identificar padrões ou marcadores associados às condições de saúde e de doença. **Conclusão:** Os resultados desta revisão sistemática permitem concluir que existem diferenças na composição proteica e de metabólitos da cavidade bucal entre indivíduos com e sem doença cárie. Os resultados da meta-análise sugerem que a cavidade bucal apresenta candidatos a biomarcadores como: proteínas totais, CAT, alfa-amilase, concentração e atividade da CA-VI e atividade de urease e de SAD para as condições de saúde ou de doença cárie e a análise qualitativa indicou outros possíveis candidatos, cuja validade precisa ser avaliada por futuros estudos longitudinais.

Palavras-chave: Biofilme. Placa dental. Cavidade oral. Saliva. Proteoma. Metaboloma. Cárie dental.

ABSTRACT

Evidence indicates that the proteomic or metabolomic profile of saliva of individuals without dental caries may be different compared with individuals with caries. Although there is a certain level of evidence from the analysis of primary studies, a better understanding of the proteome and metabolome of the oral cavity, from the grouped analysis of the available evidence, can provide data on candidates for biomarkers for dental caries, enabling the development of new strategies to control this disease.

Objective: The aim of this thesis was to compare through a systematic review and meta-analysis the protein composition and metabolites of the oral cavity between caries-free and individuals with caries in order to identify patterns or markers associated with health and with dental caries. **Conclusion:** The results of this systematic review allow us to conclude that there are differences in the protein and metabolite composition of the oral cavity among individuals with and without caries disease. The results of the meta-analysis suggest that the oral cavity presents candidates to biomarkers such as: total proteins, TAC, alpha-amylase, concentration and activity of CA-VI and urease and SAD activity for health or caries disease conditions and qualitative analysis indicated other possible candidates, whose validity needs to be evaluated by future longitudinal studies.

Keywords: Biofilm. Dental plaque. Oral cavity. Saliva. Proteome. Metabolome. Dental caries.

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	Pág. 1
1.1	Cárie Dentária – Prevalência e fatores etiológicos	Pág. 1
1.2	Índices Epidemiológicos	Pág. 4
1.2.1	CPO-D e ceo-d	Pág. 4
1.2.2	ICDAS	Pág. 5
1.3	Saliva	Pág. 5
1.3.1	Fisiologia da secreção salivar	Pág. 5
1.3.2	Componentes inorgânicos e funções	Pág. 8
1.3.3	Componentes orgânicos e funções	Pág. 9
1.4	Relação entre componentes proteicos da cavidade bucal e cárie dentária – evidências obtidas de revisões sistemáticas e meta-análises	Pág. 24
1.5	Ferramentas e metodologias para análise proteômica e metabolômica da cavidade bucal	Pág. 32
1.5.1	Técnicas convencionais para purificação e quantificação das proteínas	Pág. 33
1.5.1.1	Técnicas baseadas em Cromatografia	Pág. 33
1.5.1.1.1	<i>Cromatografia de Troca Iônica (Ion Exchange Chromatography - IEC)</i>	Pág. 33
1.5.1.1.2	<i>Cromatografia de Exclusão por Tamanho (Size Exclusion Chromatography - SEC)</i>	Pág. 34
1.5.1.1.3	<i>Cromatografia de Afinidade</i>	Pág. 34
1.5.1.1.4	<i>Cromatografia Líquida (CL)</i>	Pág. 35
1.5.1.2	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (Enzyme-linked immunosorbent assay- ELISA)	Pág. 35
1.5.1.3	<i>Western blotting</i>	Pág. 36
1.5.2	Técnicas Avançadas para separação, isolamento e caracterização das proteínas	Pág. 37
1.5.2.1	Abordagens baseadas em gel	Pág. 37
1.5.2.1.1	<i>Eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio- poliacrilamida (SDS-PAGE)</i>	Pág. 37

1.5.2.1.2	<i>Eletroforese em gel bidimensional (2D-PAGE)</i>	Pág. 38
1.5.2.1.3	<i>Espectrometria de Massa (MS)</i>	Pág. 38
1.5.3	Técnicas Quantitativas	Pág. 41
1.5.3.1	Marcação de afinidade por isótopo (<i>Isotope-Coded Affinity Tag-ICAT</i>)	Pág. 41
1.5.3.2	Marcação isobárica para quantificação relativa e absoluta (<i>Isobaric tag for relative and absolute quantitation - iTRAQ</i>)..	Pág. 41
2	OBJETIVOS	Pág. 43
2.1	Objetivos Específicos	Pág. 43
2.2	Hipótese	Pág. 43
6	CONCLUSÃO	Pág. 44
	REFERÊNCIA	Pág. 45
	APÊNDICE	Pág. 77

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Cárie Dentária – Prevalência e fatores etiológicos

As doenças bucais são altamente prevalentes, afetando 3,5 bilhões de pessoas em todo o mundo. Elas incluem condições clínicas crônicas distintas que afetam a boca e os dentes, como cárie dentária, doença periodontal e câncer bucal. Dentre elas, a cárie dentária é a mais prevalente, sendo considerada a doença mais comum em todo o mundo (PERES *et al.*, 2019), uma vez que afeta 2,4 bilhões de pessoas (KASSEBAUM *et al.*, 2015).

Segundo resultados do levantamento epidemiológico SB BRASIL 2003 (BRASIL, 2004) projeto do Ministério da Saúde que avaliou as condições de saúde bucal da população brasileira, cerca de 27% das crianças de 18 a 36 meses apresentavam pelo menos um dente decíduo com experiência de cárie, sendo que a proporção chegou a quase 60% das crianças de 5 anos de idade, números que refletem a necessidade da devida atenção durante essa faixa etária. O último levantamento nacional finalizado em 2010, demonstrou que a prevalência de cárie nas crianças de 5 anos de idade foi de 53,4%, com uma média de 2,43 dentes afetados (BRASIL, 2012), com predomínio do componente cariado, que é responsável por mais de 80% do índice, também foi possível observar uma tendência de redução da cárie entre escolares e adolescentes, mas, entre os adultos, a redução da gravidade da doença foi discreta, e entre os idosos permaneceu inalterada (CHAVES *et al.*, 2017). Dados recentes indicam que a prevalência mundial de cárie não tratada em dentes permanentes foi de 29,4% em 2017 (GBD, 2017). Esses dados reforçam a necessidade de políticas públicas de atenção à saúde bucal da população brasileira.

A cárie dentária é uma doença destrutiva, biofilme-dieta dependente que para se desenvolver necessita da interação entre micro-organismos potencialmente patogênicos, e ingestão frequente de açúcar, num hospedeiro que ofereça um ambiente adequado, durante certo período de tempo (SANTANA *et al.*, 2017; SHEIHAM; JAMES, 2015). Essa doença está distribuída em toda a população e tem grande potencial de trazer impactos biológicos, sociais e financeiros para os indivíduos acometidos e de oneração dos sistemas de saúde (KASSEBAUM *et al.*, 2015). Quando esse processo de perda de minerais não é controlado, a lesão de cárie pode progredir culminando com a destruição quase total do dente e levando à infecção da polpa e tecidos de suporte, ocasionando perda prematura de dentes, contribuindo

para alterações da fala, ou até comprometimento da oclusão e da mastigação (MACEDO; AMMARI, 2014). Além disso, complicações decorrentes da doença não tratada podem levar à ausência das crianças na escola e a uma diminuição da qualidade de vida (MACEDO; AMMARI, 2014; MARTINS-JUNIOR *et al.*, 2013).

É importante ressaltar que a dieta é considerada como um fator chave para o desenvolvimento de cárie dentária (SHEIHAM; JAMES, 2015). Os micro-organismos do biofilme dentário são capazes de metabolizarem os açúcares, provenientes dos alimentos, em ácidos que, por sua vez, apresentam a capacidade de interferir com o equilíbrio físico-químico entre superfície dental e fluidos adjacentes. As quedas de pH induzidas nessa condição levam à perda de minerais da superfície dental (DAWES, 2015; PELTZER; MONGKOLCHATI, 2015) acarretando no desenvolvimento da lesão de cárie. É bem entendido que importantes modificações microbiológicas ocorrem no biofilme dentário em decorrência da acidificação induzida pela metabolização dos carboidratos da dieta. Fermentação de açúcares pela microbiota bucal pode levar à uma seleção de micro-organismos ácido-tolerantes capazes de sobreviver em condições de baixo pH, desestabilizando a homeostase microbiológica do biofilme. Nessa condição (fase acidogênica), a grande quantidade de ácidos produzidos pelos micro-organismos altera o equilíbrio químico entre a superfície dental e a saliva, possibilitando que minerais sejam perdidos da superfície dental. Uma vez que esse ambiente ácido seja perpetuado pela frequente ingestão de açúcares, micro-organismos ácido-tolerantes podem prevalecer no biofilme e levar ao desenvolvimento de uma fase acidúrica no biofilme que é capaz de acelerar o desenvolvimento de lesão de cárie (TAKAHASHI; NYVAD, 2011).

Classicamente, os *Streptococcus mutans* têm sido considerados como os principais patógenos da cárie dentária (TANZER, 2001) por serem acidogênicos e altamente ácido-tolerantes (HAMADA; SLADE, 1980; LOESCHE, 1986). Além disso, tem sido atribuído aos *S. mutans* a capacidade exclusiva de sintetizar polissacarídeos extracelulares insolúveis utilizando sacarose como substrato (NEWBRUN, 1967). Esses polissacarídeos, tornam o biofilme dental mais poroso (DIBDIN; SHELLIS, 1988), facilitando a difusão de substratos pelo biofilme, o que acarreta em maiores e mais prolongadas quedas de pH na superfície dental (ZERO *et al.*, 1992). Além disso, esses polissacarídeos extracelulares podem atuar como “colas” biológicas, viabilizando a aderência de bactérias à superfície dental (SCHILLING, BOWEN, 1992). Essas alterações induzidas pelos polissacarídeos extracelulares insolúveis

sintetizados pelos *S. mutans* são fundamentais para um aumento no potencial cariogênico do biofilme dental (BOWEN; KOO, 2011; NOBRE DOS SANTOS *et al.*, 2002). Recentes pesquisas têm sugerido, entretanto, que outros microrganismos também têm prevalência aumentada em biofilme associados à cárie dental, tais como *Propionibacterium ssp*, *Rothia ssp*, *Scardovia ssp*, *Bifidobacterium ssp* (THOMAS *et al.*, 2012; COLOMBO *et al.* 2017). Ainda, observa-se um aumento na diversidade microbiana em biofilmes associados aos sítios com cárie dental em comparação com biofilmes associados às superfícies hígidas (THOMAS *et al.*, 2012; RICHARDS *et al.*, 2017). Esses dados sugerem que apesar do importante papel atribuído aos *S. mutans*, a cariogenicidade do biofilme dental está relacionada à atuação conjunta de diferentes grupos de microrganismos. A lesão de cárie, portanto, poderia se desenvolver devido a influencia do metaboloma (conjunto de metabólitos sintetizados por todos os microrganismos do biofilme) do biofilme dentário sobre as superfícies dentárias.

O estudo clínico piloto de Zandona *et al.* (2015) comparou o perfil metabólico do biofilme dentário de crianças cárie ativas e livres de cárie, por análise de cromatografia gasosa/espectrometria de massas e verificaram que o biofilme de sítios cárie-ativos exibiu um perfil cromatográfico diferente dos sítios livres de cárie. Análises da composição qualitativa e quantitativa sugeriram um conjunto especial de álcoois de cadeia ramificada e ésteres presentes em intensidade substancialmente maior em biofilmes de sítios cárie-ativos, sugerindo que mudanças metabólicas sítio-específicas que ocorrem no biofilme oral durante a transição de um estado não-patogênico para um estado patogênico podem ser potencialmente utilizadas como indicadores importantes da doença cárie (ZANDONA *et al.*, 2015).

Além disso, como a saliva desempenha um papel fundamental na proteção contra a cárie e pode ser coletada de maneira fácil e não invasiva, muitos estudos tiveram por objetivo avaliar se existe alguma associação entre componentes salivares com resistência ou suscetibilidade à cárie. Alguns estudos têm indicado que o perfil proteômico da saliva de indivíduos sem cárie pode ser diferente do perfil proteômico de indivíduos com cárie (RIBEIRO *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2018b). Nesse mesmo contexto, Wang *et al.* (2018b) sugerem que cerca de 40 proteínas estão abundantemente expressas na saliva de indivíduos que apresentam entre 5 a 10 dentes cariados, perdidos ou restaurados quando comparadas aos indivíduos que apresentam entre 1 a 4 dentes nessas mesmas condições. Belda-Ferre *et al.* (2015),

por sua vez, sugerem que existem grupos específicos de proteínas salivares que podem ser usados como biomarcadores de saúde bucal.

Considerando essas evidências, é desejável que marcadores para saúde ou doença sejam identificados a fim de possibilitar um diagnóstico precoce da doença cárie (nos seus estágios mais iniciais) ou de indivíduos sob um maior risco de desenvolvimento de doença. Nesse sentido, é necessário conhecermos as funções da saliva e as evidências existentes até o presente momento sobre a relação entre os componentes salivares e a doença cárie.

1.2 Índices Epidemiológicos

1.2.1 CPO-D e ceo-d

O Índice CPO, foi proposto primeiramente por Klein e Palmer, em 1937. É o índice mais utilizado em levantamentos epidemiológicos, é objetivo e simples, apresentando características favoráveis que determinaram sua utilização universal. Em nível populacional, o CPO-D representa a média do número total de dentes permanentes cariados, perdidos e obturados. Neste cálculo, não é considerado dente extraído, os dentes ausentes congenitamente ou extraídos por razões ortodônticas ou em decorrência de acidentes traumáticos (KLEIN; PALMER, 1937).

O índice ceo-d, foi proposto por Gruebbel, numa adaptação do índice CPO-D à dentição decídua. Em nível populacional, representa a média de dentes decíduos cariados, com extração indicada e obturados. Os dentes perdidos não são considerados, pela dificuldade em diferenciar extraído por cárie de esfoliação natural dentária (FRIAS; ANTUNES; NARVAI, 2004). Apesar de ser o índice mais frequentemente utilizado, o levantamento epidemiológico que utiliza o CPO-D se restringe em realizar o planejamento em doença instalada.

Alternativamente, o índice CPO ou ceo podem ser calculados por superfície dentária, sendo representados por CPO-S ou ceo-s. (FRIAS; ANTUNES; NARVAI, 2004). A orientação preconizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) é que o exame visual tátil seja realizado sem remoção prévia de biofilme dental e sem secagem das superfícies dentais. Por isso, para diagnóstico de cárie em estudos populacionais é considerado como cárie a presença de cavidade evidente, com esmalte socavado ou amolecimento detectável do assoalho ou das paredes da cavidade. Dessa forma, subestima-se a prevalência de cárie pois não se considera a

presença de lesões não-cavidadas. Consequentemente,, superestima-se a proporção de indivíduos livres de cárie.

1.2.2 ICDAS

Conforme descrito acima, segundo o critério OMS a cárie dentária só é diagnosticada ao nível de cavitação ou, na fase em que uma lesão se estende à metade externa da dentina (PITTS; FYFFE, 1988) Historicamente, este é o ponto no qual maioria dos dentistas concordaram que a restauração é necessária. No entanto, a doença está presente, diagnosticável e reversível muito antes deste estágio.

Por isso, é necessário detectar precocemente lesões incipientes (não cavidadas) e em estágio reversível. (SHEEHY *et al.*, 2001). O International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) foi desenvolvido para fornecer a cirurgiões-dentistas, epidemiologistas e pesquisadores um sistema baseado em evidências, que permita a detecção de cárie desde os estágios mais iniciais e diagnóstico padronizado em diferentes ambientes e situações (PITTS, 2004). Em 2003, o ICDAS-I foi concebido com base no princípio de que o exame visual deve ser realizado em superfícies limpas, livres de biofilme dental, com cuidadosa secagem da lesão/superfície para identificar lesões precoces (PITTS, 2004).

A diferença deste índice para o citado anteriormente, é que neste, ao exame clínico, é necessário, além da superfície limpa, sem presença de biofilme dental, que se tenha uma superfície cuidadosamente seca com jato de ar, por 5 (cinco) segundos para que se consiga identificar até as lesões iniciais (mancha branca) (ISMAIL *et al.*, 2007; ORMOND; DOUGLAS; PITTS, 2010; PITTS, 2004).

A partir dos dados obtidos pelo ICDAS pode ser calculado o índice CPO (PITTS, 2004).

1.3 Saliva

1.3.1. Fisiologia da secreção salivar

A saliva é uma mistura complexa de fluidos produzidos por três glândulas salivares principais maiores (glândulas parótida, submandibular e sublingual) e várias glândulas salivares menores localizadas na mucosa oral (lábios, bochechas e palato), apresenta aspecto opalescente, as vezes, límpido e incolor (ALMEIDA *et al.*, 2008).

As células encontradas nas glândulas salivares são células acinares, várias células do sistema ductal e células mioepiteliais. As células acinares, nas quais a

saliva é primeiramente secretada (saliva primária, isotônica em relação ao plasma), determinam o tipo de secreção produzida pelas diferentes glândulas. A secreção pode ser classificada como serosa, mucosa ou mista. As secreções serosas são produzidas principalmente pela glândula parótida, as secreções mucosas pelas glândulas menores e as secreções mistas serosas e mucosas pelas glândulas sublinguais e submandibulares (BERKOWITS, 2015). As células do sistema de ductos encontradas nos ductos salivares são classificadas como intercaladas, estriadas e excretoras. As células ductais intercaladas são a primeira rede de ductos que conecta as secreções acinares ao resto da glândula. As células estriadas são as segundas na rede, funcionando como regulação eletrolítica na reabsorção de Na^+ . As células do ducto final, as células do ducto excretor, contribuem continuando a reabsorção de Na^+ e secretando K^+ . As células do ducto excretor são a última parte da rede de ductos antes que a saliva chegue à cavidade oral. A saliva após chegar na cavidade bucal (saliva total, hipotônica em relação ao plasma), contém componentes de origem não-glandular, como células epiteliais orais descamadas, restos alimentares, micro-organismos, fluido gengival e compostos derivados do sangue (proteínas plasmáticas, eritrócitos e leucócitos) e componentes inorgânicos (cálcio, fosfato, bicarbonato, flúor, sódio, cloro, potássio, magnésio, enxofre, tiocianato, chumbo, cádmio e cobre, dentre outros). As células mioepiteliais, que são longos processos celulares enrolados em torno das células acinares, se contraem na estimulação para restringir a acinar. Essa função, secretando ou “espremendo” o líquido acumulado, é o resultado de um processo puramente neural (ALMEIDA *et al.*, 2008; BERKOWITS, 2015; GARRETT, 1987).

A secreção de saliva é controlada por um centro salivar composto por núcleos na medula (MESE; MATSUO, 2007), mas existem gatilhos específicos para essa secreção. Pode-se encontrar três tipos de gatilhos, ou estímulos, para essa produção: mecânicos (o ato de mastigar), gustativos (ácido como o gatilho mais estimulante e doce o menos estimulante) e olfativo (um estímulo fraco). Outros fatores que afetam a secreção incluem fatores psíquicos, como dor, certos tipos de medicamentos e várias doenças locais ou sistêmicas que afetam as próprias glândulas (BERKOWITS, 2015; MESE; MATSUO, 2007).

As glândulas salivares são inervadas pelo sistema nervoso autônomo formado por fibras nervosas simpáticas e parassimpáticas. Ao contrário do resto do corpo, as duas partes do sistema autônomo trabalham juntas. Vários neurotransmissores e

hormônios estimulam diferentes receptores, diferentes glândulas salivares desencadeando diferentes respostas. Quando a inervação simpática predomina, os impulsos simpáticos produzem uma saliva de baixo fluxo e alta concentração de proteína, e quando a inervação parassimpática é predominante impulsos nervosos parassimpáticos produzem uma saliva de alto fluxo e baixa concentração de proteína (GARRETT, 1987; PROCTOR; CARPENTER, 2007). A estimulação de um receptor geralmente aumenta e complementa outro receptor. Deve-se enfatizar que há grande variabilidade individual na estimulação e secreção salivar de tipo celular para tipo celular, afetando assim o conteúdo da saliva regionalmente e na cavidade bucal como um todo (PROCTOR; CARPENTER, 2007).

Na prática clínica, a saliva secretada em repouso é muitas vezes chamada de "secreção não estimulada", apesar do envolvimento da atividade nervosa. O fluxo salivar não estimulado varia normalmente entre 0,3 e 0,6 ml/min, sendo oriundo em 25% da parótida, 60% da submandibular, 7 a 8% da sublingual e 7 a 8% das glândulas menores. Nos humanos, apenas as glândulas menores secretam saliva espontaneamente. Embora essas glândulas sejam inervadas e possam aumentar sua taxa de secreção em resposta à atividade nervosa, elas secretam saliva em baixa taxa, sem influência exógena durante a noite. Durante o dia e em repouso, um impulso reflexo nervoso – desencadeado por estímulos mecânicos de baixo grau devido aos movimentos da língua e dos lábios e secura da mucosa – atua nas células secretoras, envolvendo particularmente a glândula submandibular (BENN; THOMSON, 2014).

A secreção estimulada pode variar de 1 a 2 ml/min e o volume de saliva aumenta em cerca de 5x. Essa saliva estimulada é constituída em 50% pela saliva oriunda da parótida, 35% da submandibular, 7 a 8% da sublingual e 7 a 8% das glândulas menores. A contribuição da parótida torna-se mais dominante em resposta a estímulos fortes, como o ácido cítrico, a taxa de fluxo é aproximadamente igual à da glândula submandibular, enquanto em resposta à mastigação, a taxa de fluxo da glândula parótida é duas vezes maior que da glândula submandibular. A saliva estimulada é produzida em aproximadamente 1h por dia, sendo o restante saliva não estimulada, o que totaliza 0,5 a 0,6 litros de saliva estimulada produzida por dia (BENN; THOMSON, 2014; EKSTRÖM *et al.*, 2017).

1.3.2 Componentes inorgânicos e funções

A composição salivar é muito variável. De modo geral, mais de 99% da saliva é constituída por água. Menos de 1% restante é composto por uma variedade de eletrólitos (cálcio, fosfato, bicarbonato, flúor, sódio, cloro, potássio, magnésio, dentre outros), proteínas (enzimas, imunoglobulinas, glicoproteínas, traços de albumina, polipeptídios e oligopeptídios), glicose e produtos nitrogenados, como ureia e amônia (BENN; THOMSON, 2014).

Dentre os compostos inorgânicos, é possível destacar o cálcio que é encontrado 50% na forma iônica e o restante na forma de compostos moleculares, garantindo as trocas iônicas direcionadas à superfície dos dentes. A concentração de cálcio é maior na saliva derivada das glândulas submandibular e sublingual (2 vezes maior do que a parótida). Os íons fosfato têm importante papel na manutenção dos dentes, pois está envolvido no processo de desmineralização e remineralização e como nutriente da microbiota bucal.

A manutenção da integridade dentária é uma importante função da saliva, a qual está diretamente relacionada aos processos de desmineralização e remineralização. A desmineralização ocorre quando os ácidos se difundem através do biofilme dentário e da película para a fase fluida presente entre os cristais da estrutura dentária alterando o equilíbrio fisicoquímico entre dente e fluidos orais (EDGAR, 1990). Minerais dissolvidos posteriormente difundem-se para fora da estrutura do dente e na saliva ao redor do dente. A remineralização é o processo de reposição parcial dos minerais perdidos. A supersaturação de minerais do tipo cálcio e fosfato na saliva é fundamental para que este processo ocorra. As altas concentrações salivares de cálcio e fosfato, que são mantidas pelas proteínas salivares, são responsáveis pela remineralização dos tecidos dentários (ROTH; CALMES, 1981). Como será descrito mais adiante, a estaterina, um peptídeo salivar, contribui para a estabilização de sais de cálcio e fosfato na saliva (EDGAR, 1990, DOWD, 1999). As proteínas da película salivar, como estaterina, histatinas, cistatinas e proteínas ricas em prolina, são grandes demais para penetrar nos poros do esmalte. Por isso, elas permanecem na superfície, ligadas à hidroxiapatita, para auxiliar no controle do crescimento cristalino do esmalte, permitindo a penetração de minerais no esmalte para remineralização e limitando a saída de minerais (DOWD, 1999). Este controle de precipitação e de saída de minerais aumenta a estabilidade da hidroxiapatita na estrutura externa do dente (RICHARDSON *et al.*, 1993). A presença de flúor na saliva

reduz a quantidade de minerais perdidos dos tecidos dentários e acelera a precipitação de minerais, contribuindo para ativar a remineralização. Além disso, o fluoreto participa do processo de des/remineralização dentária, visto que faz com que o pH crítico para desmineralização torne-se mais baixo (BENN; THOMSON, 2014).

O bicarbonato é o principal sistema tamponante presente na saliva, promovendo neutralização dos ácidos produzidos pelos micro-organismos, aumentando o pH da saliva. A ação tampão da saliva desempenhada pelo íon bicarbonato, mediado pela enzima anidrase carbônica, funciona mais eficientemente sob fluxo salivar estimulado, mas é quase ineficaz durante períodos de baixo fluxo com saliva não estimulada (EDGAR, 1990; ROTH; CALMES, 1981), condição na qual o tamponamento é promovido pelo fosfato (LAGERLOF; OLIVEBY, 1994). O pH de repouso do biofilme (ou seja, o pH do biofilme 2 a 2,5 horas após a última ingestão de carboidratos exógenos) é de 6 a 7 (ROTH; CALMES, 1981; STEPHAN, 1944). O pH do biofilme cai para seu nível mais baixo, para 6,1 ou menos, aproximadamente 15 minutos após o consumo de alimentos. A menos que haja ingestão adicional de carboidratos fermentáveis, o pH do biofilme retorna gradualmente ao seu pH de repouso de 6 a 7 (EDGAR, 1976; BIBBY *et al.*, 1986; RUGG-GUNN *et al.*, 1975). Assim, o tamponamento salivar, a depuração e a taxa de fluxo trabalham em conjunto para influenciar o pH intraoral. O fluxo salivar pode ser aumentado pelo estímulo da mastigação, bem como pela atividade muscular dos lábios e da língua (MANDEL, 1989; MANDEL, 1987).

1.3.3 Componentes orgânicos e funções

Quanto aos componentes orgânicos, a análise do proteoma salivar humano caracterizou cerca de 3.000 proteínas e peptídeos diferentes (GRASS *et al.*, 2016). Mais de 90% em peso dos cerca de 3.000 componentes proteicos estão presentes na saliva das glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais, pertencentes às classes de proteínas ricas em prolina ácidas e básicas, α -amilases, mucinas, cistatinas, histatinas, estaterina, enzimas, peptídeos de defesa do hospedeiro dentre outras. Os 10% restantes (em peso) são componentes derivados das glândulas menores (glândulas labiais, palatinas, vestibulares e linguais) (SIQUEIRA, *et al.*, 2008), e de fluido crevicular, por exemplo, α -defensinas, e produtos de exsudatos mucosos.

Muitas dessas proteínas e peptídeos têm propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais, outras lubrificam os tecidos orais, algumas ajudam a manter altas concentrações salivares de cálcio, algumas são enzimas digestivas e algumas catalisam a conversão de bicarbonato em dióxido de carbono, de ureia e de arginina em amônio e a maioria delas agem em conjunto e exibem multifuncionalidades (AMERONGEN; VEERMAN, 2002; DAWES *et al.*, 2015; PEDERSEN *et al.*, 2018; VAN'T HOF *et al.*, 2014;). Abaixo estão alguns componentes salivares e suas funções:

Mucinas:

As mucinas são proteínas grandes e altamente glicosiladas, produzidas principalmente pelas células acinares mucosas das glândulas submandibulares, sublinguais e salivares menores (AMERONGEN; VEERMAN, 2002; AMERONGEN; BOLSCHER; VEERMAN, 1995; FRENKEL; RIBBECK, 2015; TABAK, 1995). Essas mucinas têm as propriedades de baixa solubilidade, alta viscosidade, alta elasticidade e forte adesividade. Qualquer contato intraoral entre tecidos moles, entre tecidos moles e dentes, ou entre tecidos moles e próteses se beneficia da capacidade lubrificante da saliva fornecida em grande parte por essas mucinas (EDGAR, 1990). As secreções das glândulas sublinguais e submandibulares contêm uma mucina de alto peso molecular e altamente glicosilada (MGI) e uma mucina de cadeia peptídica monoglicosilada de baixo peso molecular (MGII) (SLOMIANY *et al.*, 1996; EDGAR, 1990). A importância dessas 2 mucinas principais tem sido o foco de muitas pesquisas nas últimas 2 décadas. A MGI adsorve firmemente ao dente e, assim, contribui para a película salivar adquirida do esmalte. A MGI forma complexos heterotípicos com outras proteínas salivares, como amilase, proteínas ricas em prolina, estaterina e histatinas, atraindo simultaneamente a ligação de certas bactérias e fornecendo uma fonte de nutrientes de curto prazo para as bactérias (IONTCHEVA; OPPENHEIM; TROXLER, 1997). A MGII liga-se ao esmalte, mas é facilmente deslocada. Promove a agregação e eliminação de bactérias orais, incluindo estreptococos do grupo mutans (LEVINE *et al.*, 1987). Na saliva de pacientes sem cárie, predomina a MGII, enquanto o nível de MGI é maior em pacientes que apresentam cárie (SLOMIANY *et al.*, 1996). Uma parte importante do papel multifuncional das mucinas salivares na preservação da integridade da mucosa é sua capacidade de regular os níveis de cálcio intercelular (SLOMIANY *et al.*, 1996). Como parte da película salivar adquirida do esmalte, as mucinas ajudam a iniciar a colonização microbiana nas superfícies dentárias, formam

uma barreira protetora e lubrificada contra o desgaste excessivo, propiciam uma barreira de difusão contra a penetração de ácidos e limitando a saída de minerais da superfície do dente (TABAK, 1982).

Os tipos específicos de mucinas que foram caracterizados na cavidade oral incluem MUC5B, MUC7, MUC19, MUC1 e MUC4 (FRENKEL; RIBBECK, 2015). Como as mucinas são hidrofílicas e contêm muita água, são eficazes na lubrificação e manutenção de uma superfície úmida nos dentes e na mucosa oral. Assim, elas fornecem uma barreira protetora eficaz contra a ressecamento e contra a penetração de substâncias potencialmente prejudiciais às células epiteliais e contra proteases produzidas por bactérias no biofilme (TABAK, 1995; AMERONGEN; BOLSCHER; VEERMAN, 1995; FRENKEL; RIBBECK, 2015). A variabilidade das complexas cadeias laterais de oligossacarídeos nas mucinas oferece amplas possibilidades de interações com superfícies orais, micro-organismos orais e outras proteínas salivares, como s-IgA, lactoferrina e lisozima, alterando assim suas propriedades e capacidade de modular a colonização microbiana na cavidade oral (TABAK, 1995; AL-HASHIMI; LEVINE, 1989; IONTCHEVA; OPPENHEIM; TROXLER, 1997; WICKSTROM *et al.*, 2000; FRENKEL; RIBBECK, 2017; BRUNO *et al.*, 2005). As mucinas salivares podem servir como carreadores de proteínas salivares e transportá-las por toda a cavidade oral, a fim de aumentar sua retenção na película salivar adquirida do esmalte e/ou proteger as proteínas da degradação proteolítica por meio da formação de complexos proteicos. No entanto, as mucinas também são a fonte predominante e mais acessível de açúcar para o crescimento bacteriano.

MUC5B, a mucina formadora de gel primário na cavidade oral, é secretada por células mucosas nas glândulas salivares submandibulares, sublinguais, palatinas e labiais (NIELSEN *et al.*, 1997; THORNTON *et al.*, 1999). Foi demonstrado que MUC5B afeta as interações entre alguns micro-organismos, reduzindo a adesão e a formação de biofilme influenciando a composição da microbiota oral (FRENKEL; RIBBECK, 2017; FRENKEL; RIBBECK, 2015). Além disso, MUC5B limita a virulência de *Candida albicans* reduzindo a formação de hifas, que estão associadas à invasão da célula hospedeira (KAVANAUGH *et al.*, 2014). Isso pode contribuir para explicar por que patógenos oportunistas como *C. albicans*, podem existir na microbiota oral como residentes não patogênicos sem causar manifestação clínica de candidíase oral. As mucinas salivares também reduzem a infecção de células T pelo HIV-1 (BERGEY *et al.*, 1994).

A MUC7 é menor do que a MUC5B e é uma mucina não formadora de gel produzida pelas células acinares salivares mucosas e serosas, exceto pelas células serosas da parótida e da língua (TROXLER *et al.*, 1997; PILUDU *et al.*, 2003). Embora a MUC7 seja menos eficiente como lubrificante, ela é notavelmente mais eficiente na aglutinação e depuração bacteriana do que a MUC5B e, portanto, uma parte importante do sistema de defesa não imune da saliva (LOOMIS *et al.*, 1987; REDDY *et al.*, 1992). Assim, a MUC7 liga-se diretamente aos micro-organismos para facilitar sua remoção por deglutição. A MUC7 também se liga a proteínas ricas em prolina ácidas e básicas, esterinas e histatina 1 e, através da formação desses complexos de proteínas, os protege da proteólise, modula sua função e atividade e também serve como um sistema de entrega para distribuição de proteínas salivares secretoras em todo a cavidade oral (LOOMIS *et al.*, 1987).

As mucinas MUC1 são glicoproteínas associadas à membrana, que estão presentes na parte superficial do epitélio oral, particularmente nas superfícies epiteliais vestibulares e labiais, mas também revestem os ductos das glândulas parótidas, submandibulares e salivares menores (PRAMANIK *et al.*, 2010; SENGUPTA *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2003; KIRKEBY; MOE; BARDOW, 2010; CHANG *et al.*, 2011; KULLAA *et al.* 2014; GIBBINS *et al.*, 2014). A MUC4 é uma mucina transmembrana secretada pela glândula submandibular humana (KULLAA *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2002). Supõe-se que desempenhe um papel nas interações célula-célula e célula-matriz extracelular e na sinalização celular (FRENKEL; RIBBECK, 2015). Níveis salivares reduzidos de MUC4 podem resultar em capacidade prejudicada de aglutinar patógenos orais, levando à formação de um biofilme composto por micro-organismos mais virulentos e resposta inflamatória contínua em pacientes com periodontite (PEDERSEN; BARDOW; NAUNTOFTE, 2005).

Imunoglobulinas:

As duas principais classes de imunoglobulinas presentes na saliva humana são a IgA secretora (s-IgA) e a IgG (KORSRUD; BRANDTZAEG, 1982; BRANDTZAEG, 1984; BRANDTZAEG, 2013). A IgA dimérica é produzida pelas células plasmáticas no estroma das glândulas salivares e, em seguida, transportada através das células epiteliais glandulares pelo receptor de Ig polimérico, ou seja, o componente secretor da membrana. Na superfície apical da célula epitelial, IgA é exocitada após a clivagem do receptor de Ig, formando a s-IgA, a qual é secretada juntamente com a saliva que

está sendo produzida (BRANDTZAEG, 2013; BRANDTZAEG; PRYDZ, 1984). A maior parte da IgG salivar deriva do sangue por vazamento passivo através do fluido crevicular gengival, e apenas uma pequena parte se origina das glândulas salivares. A fração monomérica (não secretora) de IgA na saliva total é pequena (15% da IgA salivar total) e entra principalmente na cavidade oral através do fluido crevicular gengival ou transudato da mucosa (BRANDTZAEG, 2013; GRONBLAD, 1982). As frações salivares de IgM, IgD e IgE são pequenas e derivam predominantemente de fluido gengival e os níveis de IgM na saliva estão correlacionados tanto à concentração sérica de IgM quanto à inflamação periodontal (BRANDTZAEG, 2013).

Na cavidade oral, o mecanismo de defesa mais importante da s-IgA parece ser a ligação a antígenos na saliva, na mucosa oral e na película salivar adquirida do esmalte; uma atividade designada por “exclusão imune” (BRANDTZAEG, 2013). Embora o componente secretor de s-IgA proteja a imunoglobulina de ser degradada por enzimas proteolíticas, há um grupo de bactérias que quebram enzimaticamente partes da isoforma s-IgA, por exemplo *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus mitis* e patógenos periodontais tal como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella* spp. e espécies de *Capnocytophaga* spp. (KILIAN *et al.*, 1996; RUSSELL *et al.*, 1999). As propriedades antimicrobianas de s-IgA também incluem a inibição da adesão microbiana às superfícies mucosas e dentárias e eliminação aprimorada de micro-organismos, por exemplo, *Streptococcus mutans*, da cavidade oral por aglutinação. Assim, as imunoglobulinas salivares atuam em conjunto com os mecanismos de defesa do sistema imune inato, mas a formação de anticorpos salivares em resposta a, por exemplo, estreptococos também é importante para a colonização precoce das superfícies orais (KILIAN *et al.*, 1996; RUSSELL *et al.*, 1999; BORGES *et al.*, 2015).

Peptídeos antimicrobianos:

Fazem parte da imunidade inata os peptídeos antimicrobianos (geralmente denominados AMPs), que são rapidamente mobilizados para neutralizar um amplo espectro de micro-organismos (PETERS; SHIRTLIFF; JABRA-RIZK, 2010). Nos humanos, os AMPs inatos mais proeminentes são as catelicidinas e defensinas (produzidas pelas células do sistema imune), bem como as histatinas (produzidas e secretadas na saliva pelas glândulas salivares) (PETERS; SHIRTLIFF; JABRA-RIZK, 2010).

A maioria dos AMPs que atuam sobre a membrana celular é formada por 12-50 resíduos de aminoácidos unidos entre si por ligações amida (denominadas peptídicas), apresenta carga líquida positiva (+2 a +9) em pH fisiológico e estrutura anfipática (LAI; GALLO, 2009) com aproximadamente 50% de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (MARR; GOODERHAM; HANCOCK, 2006). Estas características parecem ser fundamentais para a atividade contra a célula microbiana, já que a etapa inicial de seus mecanismos de ação é a sua atração eletrostática pelos grupos carregados negativamente de compostos da parede e da membrana celular. Uma diferença marcante dos AMPs em relação aos antibióticos convencionais é a sua rápida ação bactericida em concentrações próximas ou iguais às MICs (mínimas concentrações inibitórias do crescimento dos microorganismos sobre os quais eles atuam) (FERNANDEZ-LOPEZ *et al.*, 2001), o que dificulta o surgimento da resistência microbiana. Além disso, em concentrações superiores às MICs, alguns AMPs chegam a inviabilizar 99,999% das bactérias em poucos minutos (STEIBERG *et al.*, 1997). Os AMPs são capazes de inviabilizar os micro-organismos e apresentar baixa toxicidade para as células do hospedeiro, o que é o tipo de comportamento esperado para biomoléculas que fazem parte da imunidade inata. Para exercer a atividade bacteriostática ou bactericida, os AMPs que têm como alvo celular a membrana plasmática microbiana, devem primeiro ser atraídos eletrostaticamente, danificar e atravessar a parede celular. As paredes celulares bacterianas contêm moléculas aniônicas atrativas aos AMPs como os lipopolissacarídeos (Gram-negativas), o ácido teicóico e o ácido lipoteicóico (Gram-positivas) (MATSUZAKI, 2009). Quanto às membranas plasmáticas de fungos, elas são constituídas de proteínas (52%), de fosfolipídeos (7%) e de ergosterol (4%), além de outros compostos minoritários. Quanto ao seu mecanismo de ação são propostos três modelos (1) ripas de barril; (2) tapete e (3) poro toroidal (TOKE, 2005). Segundo o modelo ripas de barril (*barrel-stave*), a face hidrofóbica do AMP interage com as cadeias carbônicas dos lipídeos da membrana plasmática e a sua face hidrofílica fica exposta, de modo a compor o lúmen do canal transmembranar formado. Já o modelo tapete prevê inicialmente a interação eletrostática entre os resíduos carregados positivamente do peptídeo e as cargas negativas dos fosfolipídeos; em seguida, o AMP se acumula na superfície da membrana plasmática, recobrando-a de forma análoga a um tapete, podendo causar a sua permeabilização. Finalmente, no modelo poro toroidal, o peptídeo anfipático interage eletrostaticamente com a membrana plasmática fosfolipídica e une-se

paralelamente à mesma. Dessa forma, o peptídeo separa as cabeças polares dos fosfolípidos e induz a monocamada lipídica superior a dobrar-se através do poro. Assim, neste modelo, o lúmen do poro é formado por moléculas de peptídeos e cabeças polares dos fosfolípidos intercaladas (TOKE, 2005). Em decorrência desses mecanismos, formam-se poros na superfície microbiana, inviabilizando o crescimento dos micro-organismos. Como exemplo de AMPs temos a catelecidina LL-37, as alfa-defensinas HNP-1 a HNP-4 (provenientes de neutrófilos e das células ductais das glândulas salivares) e as beta-defensinas HBD-1 a HBD-3 (também provenientes de neutrófilos e das células ductais das glândulas salivares, mas também de macrófagos, monócitos e células dendríticas).

As histatinas são uma família de peptídeos catiônicos produzidos pelas células ductais das glândulas salivares parótidas, sublinguais e submandibulares (OPPENHEIM *et al.*, 1988; AHMAD *et al.*, 2004). As histatinas adsorvem prontamente a hidroxiapatita e contribuem para a formação da película salivar adquirida do esmalte, desempenhando assim um papel na colonização bacteriana nas superfícies dentais. A presença de histatinas intactas na película salivar adquirida do esmalte indica que, uma vez adsorvidas, elas são capazes de evitar a degradação proteolítica por micro-organismos (GYURKO *et al.*, 2001). Todas as três principais histatinas humanas, ou seja, histatina-1, -3 e -5, exibem atividade antifúngica para *C. albicans*, mas a histatina-5 parece ser a mais eficiente (OPPENHEIM *et al.*, 1988; GYURKO *et al.*, 2001; SIQUEIRA *et al.*, 2010, OPPENHEIM *et al.*, 2012; XU *et al.*, 1991). As histatinas também exercem propriedades antibacterianas e antivirais (MACKAY *et al.*, 1984; NISHIKATA *et al.*, 1991; GUSMAN *et al.*, 2001).

Como peptídeos catiônicos, as histatinas podem se ligar a membranas celulares microbianas carregadas negativamente, promover agregação e integrar-se à bicamada lipídica da membrana celular. Supõe-se que este último mecanismo resulte na formação de canais iônicos, poros transmembrana, vazamentos de membrana e rompimento de membrana, eventualmente levando à morte de células microbianas (XU *et al.*, 1991; LI *et al.*, 2003; GROGAN *et al.*, 2001). A histatina-5 também exhibe locais de ligação específicos para íons metálicos, tais como zinco e cobre. Consequentemente, os micro-organismos são privados desses íons, que são importantes para a função de suas enzimas e, portanto, para o seu crescimento (GROGAN *et al.*, 2001; MELINO *et al.*, 2006). A histatina-5 também demonstrou inibir a atividade enzimática de bactérias envolvidas na doença periodontal, por exemplo,

P. gingivalis (GUSMAN et al., 2001; NISHIKATA et al., 1991). Juntamente com as estaterinas, a histatina-1 modula a adesão de *S. mutans* às superfícies dentais, presumivelmente por meio da inibição competitiva da adsorção de glicoproteínas salivares de alto peso molecular (SHIMOTOYODOME et al., 2006).

Amilase salivar:

A α -amilase é uma das enzimas mais abundantes da saliva humana e também está presente na película salivar adquirida do esmalte e no biofilme dental (AMERONGEN; VEERMAN, 2002; HANNIG; HANNIG; ATTIN 2005; HANNIG et al., 2017; LUNDMARK et al., 2017; SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012; ORSTAVIK; KRAUS, 1973; AGUIRRE et al., 1987; SCANNAPIECO; TORRES; LEVINE, 1993; HANNIG et al., 2004). É secretada principalmente pelas células serosas acinares nas glândulas parótidas e, em menor quantidade, pelas células serosas nas glândulas submandibulares (DAWES et al., 2015; HANNIG; HANNIG; ATTIN 2005; AGUIRRE et al., 1987; SCANNAPIECO; TORRES; LEVINE, 1993; HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001). A α -amilase salivar decompõe o amido ingerido por clivagem das ligações α -1,4 glicosídicas das moléculas de amido em maltose, maltotriose e dextrinas. A α -amilase salivar é ativa em um pH acima de 6 e é inativada no ambiente ácido do estômago (AMERONGEN; VEERMAN, 2002; VAN'T HOF et al., 2014; PEDERSEN et al., 2018; DAWES et al., 2015; HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001). A maltose pode ser fermentada por bactérias orais e a hidrólise da maltotriose leva a glicose adicional para o metabolismo por bactérias no biofilme. A produção de ácido láctico resultante da metabolização desses oligossacarídeos produzidos pela ação enzimática da α -amilase reduz o pH dentro do biofilme, o que contribui para a desmineralização do dente e o desenvolvimento de lesões de cárie (SCANNAPIECO; TORRES; LEVINE, 1993).

A α -amilase salivar não só viabiliza a fermentação de carboidratos complexos e a aderência das bactérias às superfícies orais, como também se liga especificamente a certas espécies bacterianas orais. Assim, a α -amilase pode se combinar com s-IgA na película salivar adquirida do esmalte para formar um receptor de ligação para *S. sanguinis* (GONG; MAILLOUX; HERZBERG, 2000). Além disso, *Streptococcus gordonii* e *S. mitis* codificam proteínas de ligação de amilase específicas (adesinas) (LI; TANZER; SCANNAPIECO, 2002; VORRASI et al., 2010). Por meio desses vários mecanismos, a α -amilase salivar desempenha um papel

importante na modulação da adesão, co-adesão e colonização de micro-organismos e no suporte da simbiose entre hospedeiro e microbioma da cavidade bucal.

Lipase:

A lipase lingual é secretada pelas glândulas de von Ebner presentes na língua. A lipase lingual liberada pelas glândulas serosas da língua, junto com a saliva, inicia a hidrólise dos ácidos graxos a partir dos triacilglicerídeos contribuindo assim para início da digestão de gorduras (VARGA, 2012).

Lisozima:

A lisozima faz parte dos mecanismos de defesa salivar da resposta imune inata. A lisozima presente na saliva origina-se das glândulas salivares maiores e menores e, em menor quantidade, do fluido crevicular gengival e dos leucócitos salivares. A lisozima está presente na película salivar adquirida do esmalte, bem como no biofilme (BRUNO *et al.*, 2005; MEMARZADEH ZAHEDANI *et al.*, 2017; GIBBONS; STOPPELAAR; HARDEN, 1966; BALEKJIAN; HOERMAN; BERZINSKAS, 1969; KORSRUD; BRANDTZAEG, 1982; RUDNEY, 1985).

A lisozima exerce atividade enzimática por meio da hidrólise das ligações β -1,4-glicosídicas entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetil-d-glucosamina na camada de polissacarídeo da parede celular da bactérias Gram-positivas. Além desta conhecida atividade bacteriolítica e de ser uma proteína altamente catiônica, a lisozima também tem a capacidade de agregar bactérias orais, por exemplo, estreptococos, afetando assim sua aderência às superfícies orais e promovendo a eliminação de micro-organismos da cavidade oral. Além disso, a lisozima pode ativar autolisinas bacterianas que destroem as paredes celulares bacterianas (RUDNEY, 1985; TELLEFSON; GERMAINE, 1986; SCANNAPIECO, 1994) e também foi demonstrado que a lisozima exerce atividades antifúngicas, bem como antivirais (SAMARANAYAKE *et al.*, 1997; YEH *et al.*, 2018; TSANG; SAMARANAYAKE, 1999; FABIÁN *et al.*, 2012).

Lactoferrina:

A lactoferrina é uma glicoproteína de ligação ao ferro secretada pelas células acinares serosas das glândulas salivares maiores e menores. A lactoferrina na saliva total também se origina de neutrófilos e do fluido crevicular gengival e os níveis de

lactoferrina são elevados em infecções e condições inflamatórias (MASSON; HEREMANS; SCHONNE, 1969; REITAMO; KONTTINEN; SEGERBERG-KONTTINEN, 1980; EBERHARD *et al.*, 2006). A lactoferrina se liga e sequestra o ferro disponível e, conseqüentemente, priva os micro-organismos como bactérias, leveduras e parasitas de ferro, essencial para o crescimento desses micro-organismos. Esse processo de privar as bactérias de nutrientes vitais é chamado de “imunidade nutricional” (MANDEL, 1976). Como uma proteína catiônica, a lactoferrina também pode promover a aderência e agregação de certos micro-organismos, bem como contribuir para a degradação das membranas celulares microbianas. Foi demonstrado que a forma de lactoferrina livre de ferro (apo-lactoferrina) medeia a aglutinação de *S. mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus rattus*, *S. sanguinis*, *P. gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, enquanto a forma da lactoferrina já saturada com íons ferro apenas aglutina *S. mutans* indicando que a lactoferrina possui fortes propriedades bacteriolíticas independentes de ligação ao ferro (SOUKKA; TENOVUO; RUNDEGREN, 1993; ARSLAN; LEUNG; WU, 2009). Além dos efeitos antibacterianos sobre bactérias cariogênicas e patógenos periodontais (TENOVUO; LUMIKARI; SOUKKA, 1991; WAKABAYASHI *et al.*, 2009), a lactoferrina também exerce atividade antifúngica, por exemplo, contra *C. albicans* e *Candida krusei* (NIKAWA *et al.*, 1993; WU *et al.*, 1999) e atividade antiviral, por exemplo, contra o vírus *herpes simplex*, o que provavelmente ocorre via neutralização do vírus por ligação direta e/ou bloqueando glicosaminoglicanas específicas da célula hospedeira usados para adesão viral (VALIMAA *et al.*, 2009). A lactoferrina humana é multifuncional, apresentando extensas atividades antimicrobiana, anti-inflamatória e imunomoduladora. Desempenha um papel central na regulação da microbiota oral e no estado inflamatório da mucosa oral, mantendo o microbioma da cavidade bucal em simbiose com o hospedeiro (NIKAWA *et al.*, 1993; SOUKKA; TENOVUO; LENANDER-LUMIKARI, 1992).

Enzimas relacionadas à geração de compostos alcalinos:

Ureia e arginina (aminoácido semi-essencial) estão normalmente presentes na cavidade bucal em concentrações de 3-10mM e de 50 µM, respectivamente. A ureia é rapidamente hidrolisada pela enzima urease bacteriana que a converte em amônia e CO₂. Já a arginina é desaminada e convertida em ornitina e amônia por um conjunto enzimático denominado de Sistema Arginina Desaminase (SAD) (LIU; NASCIMENTO;

BURNE, 2012). Os grupos de bactérias envolvidas nas atividades ureolítica e arginolítica são *S. sanguinis*, *Streptococcus parasanguinis*, *S. gordonii*, *Streptococcus salivarius*, *Actinomyces naeslundii* e outros (GORDAN *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2011; NASCIMENTO *et al.*, 2009). A amônia produzida atua como aceptora de íons hidrogênio contribuindo para o tamponamento e elevação do pH na cavidade bucal. Baixa atividade ureolítica e de SAD tem sido observada em indivíduos com dietas ricas em carboidratos (GORDAN *et al.*, 2010; CHEN; CLANCY; BURNE, 1996). Hipotetiza-se que a atividade da urease e do SAD poderia estar associada à diminuição da experiência de cárie (NASCIMENTO *et al.*, 2009).

Antioxidantes:

Antioxidantes são compostos que desempenham o importante papel de proteger as estruturas biológicas do estresse oxidativo promovido por radicais livres/espécies reativas de oxigênio (FR/ROS) que são caracterizados por átomos ou moléculas que apresentam elétrons não pareados. Os FR/ROS são naturalmente produzidos pelo hospedeiro como uma resposta aos micro-organismos presentes na cavidade bucal. Esse estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de FR/ROS e a atividade desses compostos antioxidantes. A atividade antioxidante da saliva é desempenhada por sistemas antioxidantes enzimáticos (peroxidases salivares) e por sistemas não-enzimáticos (como por exemplo, ácido úrico, albumina, glutathiona, ácido ascórbico). Coletivamente, esses sistemas fazem parte da “capacidade antioxidante total” - TAC da saliva (ALAJBEG *et al.*, 2017).

Dentre os antioxidantes enzimáticos destaca-se a enzima superóxido dismutase (SOD), a qual catalisa a conversão de ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (HALLIWELL, 1999). Catalase, lactoperoxidase, mieloperoxidase e íons tiocianato (SCN^-) (HOOGENDOORN *et al.*, 1977) também estão dentre os antioxidantes presentes na saliva. As enzimas peroxidases (lactoperoxidase e mieloperoxidase) salivares são produzidas nas glândulas parótidas e submandibulares (RIVA *et al.*, 1978). Essas enzimas catalisam a oxidação do tiocianato (SCN^-) a hipotiocianato (OSCN^-) mediada por peróxido de hidrogênio (HOOGENDOORN *et al.*, 1977; TENOVUO *et al.*, 1981; IHALIN; LOIMARANTA; TENOVUO, 2006). A lactoperoxidase e o tiocianato são constituintes naturais da saliva (TENOVUO *et al.*, 1981; IHALIN; LOIMARANTA; TENOVUO, 2006). A mieloperoxidase é uma proteína derivada de leucócitos e a concentração desta

enzima na saliva reflete a inflamação gengival e da mucosa (MIYASAKI; NEMIROVSKIY, 1997). Os sistemas de peroxidase salivar exercem atividade antimicrobiana e protegem as células e proteínas do hospedeiro dos efeitos potencialmente prejudiciais do peróxido de hidrogênio. O hipotiocianato inibe processos metabólicos bacterianos importantes e exerce efeitos antimicrobianos sobre *S. mutans*, lactobacilos, leveduras, várias espécies Gram-negativas, incluindo patógenos periodontais, por exemplo *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*, e certos vírus (TENOVUO; LUMIKARI; SOUKKA, 1991; LUMIKARI *et al.*, 1991; MIKOLA; WARIS; TENOVUO, 1995; KHO *et al.*, 2012). Hipotiocianato também contribui para reduzir a hidrólise de proteínas associadas com a produção de compostos sulfurados voláteis relacionados com o mau-hálito (NAKANO *et al.*, 2016). Parece que as peroxidases salivares também podem funcionar como uma catalase. Visto que H_2O_2 é altamente tóxico para células humanas e $OSCN^-$ não é, a peroxidação do SCN^- *in vivo* pode servir ao duplo propósito de limitar o acúmulo de níveis tóxicos de H_2O_2 , que são produzidos por bactérias comensais e pelas glândulas salivares enquanto, ao mesmo tempo, fornecem $OSCN^-$ e $HOSCN$.

Anidrase carbônica:

O sistema tampão mais importante em condições de estimulação salivar é o sistema bicarbonato, que é responsável por 70 a 90% da capacidade tampão da saliva total. Baseia-se no seguinte equilíbrio: $CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO^3 \leftrightarrow HCO^3^- + H^+$ onde a concentração de bicarbonato (HCO^3^-) tende a aumentar com a estimulação do fluxo salivar (LILIENTHAL, 1955; IZUTSU, 1981; BARDOW *et al.*, 2000). Na presença de um ácido (H^+), este combina-se com o bicarbonato promovendo a formação de ácido carbônico (H_2CO^3) que é instável e se decompõe em água e gás carbônico volátil. O equilíbrio químico desloca-se no sentido de formação de CO_2 , promovendo a completa remoção de ácido, o que é conhecido como neutralização ou tamponamento (KIVELA *et al.*, 1999a). Esta reação na cavidade oral e no trato digestivo superior é catalisada pela enzima anidrase carbônica VI (AC VI) que está presente na saliva (KIVELA *et al.*, 1999a; KIMOTO *et al.*, 2006).

As anidrases carbônicas (AC) são metaloenzimas de zinco que participam da manutenção da homeostase do pH em vários tecidos e fluidos biológicos do corpo humano catalisando a reação de hidratação reversível do dióxido de carbono (SLY; HU, 1995; PASTOREKOVA *et al.*, 2004). Dentre as 16 isoenzimas isoladas de

mamíferos, pelo menos duas (AC II e AC VI) estão envolvidas na fisiologia salivar, uma vez que expressas nas glândulas salivares de humanos, participam da regulação do pH no meio bucal (AC VI) e da secreção de bicarbonato na saliva (AC II) (KADOYA *et al.*, 1987; PARKKILA *et al.*, 1990; SUPURAN; SCOZZAFAVA, 2007). Em humanos, a AC VI é produzida unicamente pelas células acinares serosas das glândulas parótidas e submandibulares e é secretada na saliva, seguindo o ritmo circadiano, com baixa concentração durante o sono, aumentando rapidamente ao acordar e após a primeira refeição (PARKKILA *et al.*, 1990; PARKKILA *et al.*, 1995). Tal secreção é muito semelhante à da enzima α -amilase salivar, e uma correlação positiva foi encontrada entre o nível de atividade de α -amilase salivar e a concentração de AC VI, sugerindo-se que as duas enzimas poderiam ser secretadas pelos mesmos grânulos e mecanismos secretórios (PARKKILA *et al.*, 1995; KIVELA *et al.*, 1999b).

O papel fisiológico da AC VI salivar tem sido esclarecido nos últimos anos (LEINONEN *et al.*, 1999; KIVELA *et al.*, 1999b; KIVELA *et al.*, 2003; KIMOTO *et al.*, 2006; FRASSETO *et al.*, 2012). Pesquisas demonstram que a AC VI salivar pode ser considerada uma proteína anticárie na saliva (LEINONEN *et al.*, 1999; KIMOTO *et al.*, 2006). Quando da exposição do biofilme à sacarose, ocorre uma queda do pH no intervalo de poucos minutos, o que pode levar à dissolução mineral dos tecidos dentários. Esse fenômeno continua ocorrendo até que o pH retorne ao valor acima do pH crítico para esmalte ou dentina (DAWES, 2008). O mecanismo pelo qual esta isoenzima atua no controle do pH, sugere que a AC VI liga-se a película de esmalte e facilita a neutralização ácida pelo bicarbonato salivar (LEINONEN *et al.*, 1999). No biofilme dental, a AC VI fica situada em sítios ideais para catalisar a reação reversível de conversão de bicarbonato salivar e íons de hidrogênio fornecidos por bactérias cariogênicas, em dióxido de carbono e água (LEINONEN *et al.*, 1999, KIMOTO *et al.*, 2006). O estudo de Kimoto *et al.* (2006) evidenciou a presença desta enzima no biofilme dental, sendo mostrado uma diminuição do pH do biofilme, quando a cavidade bucal era submetida a um bochecho com solução de acetazolamida, inibidor específico da enzima AC VI. Esses autores sugerem que pelo mecanismo catalisador exercido pela enzima, a AC VI seja capaz de prover uma maior neutralização dos ácidos do biofilme dental.

Proteínas ricas em prolina:

As proteínas ricas em prolina (PRPs) são produzidas pelas glândulas parótidas e submandibulares e constituem 25-30% de todas as proteínas da saliva (BENNICK, 1982; KAUFFMAN *et al.*, 1986; TAKANO *et al.*, 1993). As PRPs salivares são divididas em PRPs ácidas, básicas e glicosiladas. Os PRPs ligam-se à superfície dos dentes e à mucosa oral e estão envolvidas na formação da película salivar adquirida do esmalte. As PRPs especialmente ácidas têm a capacidade de inibir a precipitação espontânea de sais de fosfato de cálcio e, assim, contribuir para a manutenção da supersaturação da saliva e para a proteção dos dentes (MEHANSHO; BUTLER; CARLSON, 1987; CARLSON, 1993; MURRAY; WILLIAMSON, 1994). Especialmente as PRPs glicosiladas se ligam e aglutinam bactérias orais, tais como *Fusobacterium nucleatum*, permitindo que sejam removidos da cavidade oral por meio da deglutição (AZEN; PRAKOBPHOL; FISHER, 1993). Foi demonstrado que as PRPs ácidas promovem a adesão de bactérias específicas às superfícies dentais, por exemplo, *Actinomyces viscosus* e *S. gordonii* (GIBBONS; HAY, 1988; GIBBONS; HAY, 1989; GIBBONS; HAY, 1991). Assim, as PRPs salivares têm impacto na colonização do biofilme e na interação entre as espécies bacterianas, ajudando a manter uma microbiota equilibrada. PRPs básicas e glicosiladas também promovem a adesão de *C. albicans* assim, desempenham um papel na sua colonização nas superfícies orais (CANNON; CHAFFIN, 1999). No entanto, não está claro se este mecanismo é realmente importante para equilibrar todo o microbioma oral ou se a ação das PRPs aumenta o risco de desenvolvimento de candidíase oral.

Estaterina:

A estaterina está presente na saliva das glândulas parótidas e submandibulares. A estaterina é uma fosfoproteína que se liga à hidroxiapatita e contribui para a formação da película salivar adquirida do esmalte. A estaterina inibe a precipitação primária ou espontânea de fosfato de cálcio das superfícies dentais e, portanto, é importante para a integridade dos dentes (HAY *et al.*, 1977). No entanto, a estaterina também é conhecida por promover a adesão de *A. viscosus* às superfícies dos dentes e possuir locais de ligação específicos para fímbrias de *P. gingivalis* (AMANO *et al.*, 1996). Além disso, a estaterina induz a transição de hifas de *C. albicans* para forma leveduriforme e podem, assim, contribuir para a defesa oral contra candidíase oral (LEITO *et al.*, 2009). A ligação da estaterina às mucinas forma

complexos de proteínas que podem proteger as proteínas contra a atividade proteolítica microbiana e também promover a agregação de micro-organismos que podem ser eliminados pela deglutição (BRUNO *et al.*, 2005).

Cistatinas:

As cistatinas são fosfoproteínas contendo cisteína, que têm propriedades de inibição de proteinase, controlando assim a atividade proteolítica do hospedeiro, por exemplo, leucócitos durante processos inflamatórios ou de micro-organismos (SHOMERS *et al.*, 1982; BLANKENVOORDE *et al.*, 1998). Uma série de diferentes formas de cistatina, tais como cistatina A, cistatina B, cistatina S, cistatina SN, cistatina SA e cistatina D foram detectadas na saliva humana (BLANKENVOORDE *et al.*, 1998; HENSKENS; VEERMAN; NIEUW AMERONGEN, 1996; MANCONI *et al.*, 2017). Elas participam da formação da película salivar adquirida do esmalte e também podem afetar a precipitação do fosfato de cálcio. Foi demonstrado que as cistatinas possuem uma variedade de propriedades antimicrobianas. Assim, a cistatina SA exerce atividade antibacteriana contra o patógeno periodontal *A. actinomycetemcomitans* e a cistatina S pode inibir parcialmente as enzimas proteolíticas liberadas da *P. gingivalis* (BLANKENVOORDE *et al.*, 1998; HENSKENS; VEERMAN; NIEUW AMERONGEN, 1996; GANESHNARAYAN *et al.* 2012). Além disso, as cistatinas também parecem ter fortes propriedades antifúngicas, pois os pacientes com doença autoimune endócrina com candidíase mucocutânea crônica também sofrem de deficiência de cistatina SA1 (LINDH *et al.*, 2013).

Aglutininas:

A aglutinina salivar é uma proteína altamente glicosilada, com massa molecular de aproximadamente 340 kDa. A aglutinina salivar, compartilha uma série de características com a MUC7, ambas são proteínas monoméricas, fortemente glicosiladas, com propriedades extremamente pegajosas. Como consequência, em condições nativas essas proteínas ocorrem associadas a uma variedade de proteínas salivares, incluindo s-IgA (BIESBROCK; REDDY; LEVINE, 1991; MEHROTRA; THORNTON; SHEEHAN, 1998). Tanto a MUC7 quanto a aglutinina salivar são produzidas nas células serosas das glândulas submandibular, sublingual e labial (SHARMA *et al.*, 1998; BIKKER *et al.*, 2002). No entanto, a aglutinina, ao contrário da MUC7, também é sintetizada na glândula parótida. Na glândula parótida, a aglutinina

foi localizada apenas nas células ductais, enquanto na glândula submandibular a aglutina foi detectada tanto nas células acinares serosas quanto nas células serosas semilunares que cobrem os ácinos mucosos (BIKKER *et al.*, 2002). Esta glicoproteína salivar, também é detectável como componente da película salivar adquirida do esmalte na superfície do dente (CARLÉN; OLSSON, 1995). A aglutinina, como MUC7, se liga a uma ampla variedade de micro-organismos, incluindo *S. mutans*, *S. salivarius* e *S. sanguis* promovendo a remoção desses micro-organismos da cavidade bucal (LIGTENBERG; VEERMAN; NIEUW AMERONGEN, 2000).

Gustatina/Lipocalina:

A hipotonicidade da saliva viabiliza nossa capacidade de degustação de alimentos salgados. Esta capacidade de degustação aprimorada depende da presença da proteína gustatina, que se liga ao zinco (ROTH; CALMES, 1990). A lipocalina é uma proteína secretada pelas glândulas de *Von Ebner* (localizadas ao redor das papilas circunvaladas e foliadas da língua). Essa proteína foi descrita, originalmente, como a proteína responsável pela percepção do paladar amargo. Além dessa função gustatória, a lipocalina pode agir como inibidora de cisteína proteinase, como um produto da peroxidação do estresse-oxidativo induzido nos macrófagos e, devido à sua atividade de nuclease, pode atuar como agente antiviral, inibindo a replicação de ambos os vírus de RNA e DNA (YUSIFOV *et al.*, 2000).

Dessa forma, em vista do exposto nos parágrafos acima, a saliva desempenha várias funções, dentre elas tamponamento, limpeza, manutenção da integridade do dente e atividade antimicrobiana. A atuação conjunta dessas funções contribui para a manutenção da saúde da cavidade bucal. Veremos a seguir as evidências relacionadas à associação entre determinados componentes proteicos da cavidade bucal e cárie dentária.

1.4 Relação entre componentes proteicos da cavidade bucal e cárie dentária – evidências obtidas de revisões sistemáticas e meta-análises

A revisão sistemática de Martins *et al.* (2013) avaliou se as proteínas salivares podem ou não ser consideradas biomarcadores para cárie dentária. Foram incluídos 7 estudos correspondendo a 237 indivíduos sem cárie 260 indivíduos com cárie, com

idade variando de 7 a \geq 50 anos. Todos os estudos consideraram presença de cavidade em esmalte ou dentina como limiar de diagnóstico. Os estudos avaliaram saliva coletada diretamente da glândula parótida, saliva estimulada total ou saliva não estimulada. De forma geral, esses estudos avaliaram níveis de proteínas ricas em prolina, proteínas ácidas secretadas pela parótida, proteínas ricas em prolina básicas, proteínas totais, lisozima, histatina, estaterina, amilase, ácido úrico, glicoproteínas e s-IgA. Com base nos resultados dos estudos selecionados, três deles encontraram uma diferença estatisticamente significativa entre os indivíduos com e sem experiência de cárie (AYAD *et al.*, 2000; TULUNOGLU *et al.*, 2006; ROA *et al.*, 2008). O estudo desenvolvido por Tulunoglu *et al.* 2006, encontrou maior concentração de proteínas totais em indivíduos com experiência de cárie dentária. O estudo de Roa *et al.* (2008) sugeriu que uma proteína com 17 kDa de peso molecular esteve relacionada à experiência de cárie dentária, enquanto que indivíduos com ou sem cárie apresentam fenótipos diferentes de proteínas ricas em prolina (AYAD *et al.*, 2000), o que pode ser atribuído à expressão diferencial de proteases, inibidores de protease ou polimorfismos em potenciais locais de clivagem proteolítica. Não foram encontradas diferenças nas concentrações de lisozima, histatina, estaterina, amilase, ácido úrico, proteínas ricas em prolina, proteínas secretadas pela parótida, glicoproteínas e s-IgA (STUCHELL; MANDEL, 1983; DODDS *et al.*, 1997; SHIMOTOYODOME *et al.*, 2007). Embora esses estudos tenham encontrado uma relação entre fenótipos de proteínas, concentração de proteínas totais e peso molecular de proteínas, não foi possível concluir que existem evidências suficientes para estabelecer proteínas salivares como biomarcadores de cárie dentária.

Piekoszewska-Ziętek *et al.* (2019) analisaram a relação de determinadas proteínas e peptídeos salivares com a ocorrência de cárie em crianças através de revisão sistemática. Um total de 22 artigos foram incluídos na revisão sistemática: 15 estudos avaliaram glicoproteínas (sendo 14 relacionados à imunoglobulinas s-IgA e IgG), 6 estudos avaliaram peptídeos antimicrobianos (defensinas, catelicidinas e histatinas) e 3 estudos avaliaram enzimas salivares (anidrase carbônica, lactoferrina, amilase, proteinase 3) e glicoproteínas (mucinas 5B e mucina 7). Treze artigos avaliaram dentição decídua, sete estudos avaliaram dentição mista e cinco estudos avaliaram dentição permanente. Um total de 1510 participantes foram avaliados, sendo 554 sem cárie e 956 com cárie. A idade dos participantes variou de 1 a 18 anos. Experiência de cárie foi avaliada considerando tanto lesões iniciais (não-cavidades)

quanto cavidades de cárie como limiar de diagnóstico. Os estudos avaliaram tanto saliva estimulada quanto saliva não estimulada. Cinco estudos encontraram menores níveis de s-IgA em indivíduos com cárie (DOIFODE *et al.*, 2011; OMAR *et al.*, 2012; KURIAKOSE *et al.*, 2013, PAL *et al.*, 2013; COLOMBO *et al.*, 2016a), enquanto que seis estudos mostraram níveis mais elevados de s-IgA na saliva de indivíduos com cárie (DE FARIAS *et al.*, 2003; AL AMOUDI *et al.*, 2007; BAGHERIAN *et al.*, 2008; THAWEBON *et al.*, 2008; RANADHEER *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2015a). Malcom *et al.* (2014) apresentou um estudo interessante que comprovou correlação positiva entre a presença de s-IgA anti-*Streptococcus mutans* e anti-*Streptococcus sanguis* e níveis salivares dessas bactérias. Este fenômeno pode estar relacionado com a necessidade do organismo de produzir imunoglobulinas específicas direcionadas contra um determinado patógeno que precisa ser neutralizado. Um estudo não mostrou diferença nos níveis de s-IgA entre indivíduos com e sem cárie (SHIFA *et al.*, 2008) e dois estudos mostraram maiores níveis de IgG em indivíduos com cárie (DE FARIAS *et al.*, 2003; BAGHERIAN *et al.*, 2008). Em relação aos peptídeos antimicrobianos, alguns autores afirmam aumento significativo na β -defensina salivar 2 (JURCZAK *et al.*, 2015), histatina 5 (JURCZAK *et al.*, 2015), catelicidina LL37 (DAVIDOPOULOU *et al.*, 2012; MALCOLM *et al.*, 2014) e α -defensina (MALCOLM *et al.*, 2014) em indivíduos com alta experiência de cárie ou alta quantidade salivar de *S. mutans*. Colombo *et al.* (2016a) e Toomarian *et al.* (2011) não observaram tais diferenças. Um resultado diferente dos demais foi obtido por Tao *et al.* (2005) sugerindo que uma concentração significativamente maior de α -defensinas esteve presente na saliva de crianças livres de cárie. Makawi *et al.* (2017) observaram altas concentrações de anidrase carbônica-6 em pacientes com baixo risco de cárie na dentição decídua e permanente. Isso poderia sugerir o papel protetor da anidrase carbônica acelerando a neutralização de ácidos e regulando o pH salivar. Correlação negativa entre níveis de mucina 5B e experiência de cárie foi observada por Angwaravong *et al.* (2015). Não foram observadas diferenças nos níveis de amilase e de lactoferrina entre indivíduos com e sem cárie (DE FARIAS *et al.*, 2003; MALCOM *et al.*, 2014) e maiores níveis de proteinase-3 foram encontrados em indivíduos sem cárie (YANG *et al.*, 2015a). Os autores desta revisão sistemática discutem que as diferenças nos resultados obtidos nos estudos incluídos podem ser consequência do fato de que existem muitos fatores que contribuem para o desenvolvimento de cárie,

como composição salivar, taxa de fluxo salivar, propriedades dos tecidos duros dos dentes, higiene bucal e dieta dos participantes.

A revisão sistemática de Hegde *et al.* (2019) avaliou o papel de vários componentes salivares e sua relação com participantes com e sem cárie dentária. O número de participantes para amostra total foi de 2552, sendo 240 no grupo sem cárie, e 2312 no grupo com cárie. Experiência de cárie foi avaliada considerando tanto lesões iniciais (não-cavidades) quanto cavidades de cárie como limiar de diagnóstico. Os estudos avaliaram tanto saliva estimulada, quanto saliva não-estimulada. Os autores constataram que no estudo de Nascimento *et al.* (2009) a atividade média de SAD (Sistema Arginina Desaminase) nas amostras salivares foi aproximadamente cinco vezes maior no grupo de indivíduos livres de cárie em comparação com indivíduos com atividade de cárie e os níveis de urease salivar não mostraram diferença estatística entre esses grupos. A capacidade antioxidante total da saliva foi maior em indivíduos com cárie (HEGDE *et al.*, 2013a), sendo que na pesquisa de Hegde *et al.* (2014a), a atividade da superóxido dismutase (SOD) foi maior no grupo de indivíduos cárie ativos. Maiores níveis de proteínas totais salivares foram encontrados em indivíduos com maior experiência de cárie (maiores valores de CPO-D) (PATANKAR *et al.*, 2013). Além disso, níveis de MUC1 e MUC5B e de amilase salivar foram maiores em indivíduos com alta experiência de cárie dentária (GABRYEL-POROWSKA *et al.*, 2014; MONEA *et al.*, 2018). Por outro lado, indivíduos com cárie apresentaram menores níveis de albumina salivar (HEGDE *et al.*, 2014b). No estudo de Shetty *et al.* (2017), bandas correspondentes às proteínas ricas em prolina estiveram presentes em 95% dos indivíduos sem cárie, enquanto que apenas 65% dos indivíduos com cárie apresentaram essas bandas. Assim, foi possível concluir que existe uma associação entre vários componentes da saliva e a cárie dentária.

A revisão sistemática de Ahmad *et al.* (2022) foi realizada para atualizar a revisão sistemática anterior publicada em 2013 que teve como objetivo avaliar a associação entre cárie e proteínas salivares comparando indivíduos sem cárie e com cárie. Dos 22 estudos incluídos, 1551 indivíduos foram recrutados, dos quais 848 indivíduos (54,7%) eram cárie ativos e 703 (45,3%) eram sem cárie, com idades entre 6 e 70 anos. Experiência de cárie foi avaliada considerando tanto lesões iniciais (não-cavidades) quanto cavidades de cárie como limiar de diagnóstico. Todos os estudos incluídos avaliaram a saliva não estimulada, com duas exceções, que avaliaram a

saliva estimulada. Um aumento estatisticamente significativo nos níveis salivares de α -amilase (MONEA *et al.*, 2018; SITARU *et al.*, 2018), APRP-1 (SZKARADKIEWICZ-KARPINSKA *et al.*, 2018), HTN-5 (GORNOWICZ *et al.*, 2014), lactoperoxidase (GORNOWICZ *et al.*, 2014) e MUC1 (GABRYEL-POROWSKA *et al.*, 2014) foi encontrado em pacientes com cárie, enquanto os níveis salivares de CA-VI (PICCO *et al.*, 2017), proteinase-3 (YANG *et al.*, 2015b) e estaterina (ANGARITA-DÍAZ *et al.*, 2021) foram observados significativamente aumentados em sem cárie. Uma associação estatisticamente não significativa foi observada entre os níveis salivares de 7 proteínas, incluindo a catelicidina LL-37 (ANGARITA-DÍAZ *et al.*, 2021; STOJKOVIĆ *et al.*, 2020), fibronectina (STOJKOVIĆ *et al.*, 2020), APRP-1 (SZKARADKIEWICZ-KARPINSKA *et al.*, 2018), HNP-5 (STOJKOVIĆ *et al.*, 2020), hBD-2 (STOJKOVIĆ *et al.*, 2020), MUC5B (GABRYEL-POROWSKA *et al.*, 2014) e MUC7 (GABRYEL-POROWSKA *et al.*, 2014), entre indivíduos com e sem cárie. Resultados conflitantes foram encontrados em relação aos níveis salivares de imunoglobulinas (s-IgA e IgG) e proteínas totais entre indivíduos com cárie e sem cárie. Cinco dos estudos incluídos relataram um aumento estatisticamente significativo nos níveis salivares de s-IgA em pacientes com cárie (GORNOWICZ *et al.*, 2014; HAERI-ARAGHI *et al.*, 2018; KHAN *et al.*, 2021; NAWAZ *et al.*, 2019; PRIYA *et al.*, 2013), enquanto sete estudos relataram um aumento estatisticamente significativo de IgA em indivíduos sem cárie (CASTRO *et al.*, 2016; GOLPASAND HAGH *et al.*, 2013; JAGADESH BABU *et al.*, 2017; PAL *et al.*, 2013; RAZI *et al.*, 2020; SOESILAWATI *et al.*, 2019; YASSIN, 2016). No entanto, dois estudos relataram uma associação não significativa de IgA entre indivíduos com cárie e sem cárie (AL-ANI *et al.*, 2020; ANGARITA-DÍAZ *et al.*, 2021). Em relação ao nível de proteínas totais na saliva, dois estudos relataram um aumento estatisticamente significativo em pacientes com cárie (PYATI *et al.*, 2018; RAZI *et al.*, 2020), enquanto um estudo relatou um aumento estatisticamente significativo em indivíduos sem cárie (CASTRO *et al.*, 2016). Da mesma forma, concentrações salivares comparáveis de HNP-1 (STOJKOVIĆ *et al.*, 2020), hBD-2 (STOJKOVIĆ *et al.*, 2020), s-IgA (AL-ANI *et al.*, 2020), IgG (RAZI *et al.*, 2020), catelicidina LL-37 (STOJKOVIĆ *et al.*, 2020), MUC5B (GABRYEL-POROWSKA *et al.*, 2014), MUC7 (GABRYEL-POROWSKA *et al.*, 2014) e APRP-1 (AL-ANI *et al.*, 2020) foram encontrados entre indivíduos com e sem cárie. Os estudos incluídos foram categorizados como baixo risco de viés (n= 15), médio risco de viés (n=4), e alto risco de viés (n=3). Devido à heterogeneidade significativa

em relação aos protocolos de estudo e resultados relatados entre os estudos incluídos, uma meta-análise não pôde ser realizada. Foi possível concluir que, os níveis salivares de proteína(s) podem ser um biomarcador útil para o diagnóstico de cárie, especialmente alfa-amilase, proteína-1 rica em prolina ácida, histatina-5, lactoperoxidase, mucina-1, anidrase carbônica 6, proteinase-3, e estaterina. No entanto, seu valor diagnóstico deve ser verificado por estudos prospectivos de larga escala.

Fidalgo *et al.* (2014) avaliaram a associação entre níveis salivares de s-IgA total e cárie dentária através de revisão sistemática e meta-análise. Um total de 14 estudos do tipo caso-controle foram incluídos, com um tamanho total de amostra de 303 pacientes (com idade variando de 3 a 63 anos), incluindo 201 pacientes com cárie e 102 controles saudáveis (sem cárie dentária). Os estudos incluídos avaliaram níveis de s-IgA na saliva não-estimulada e na saliva estimulada. Experiência de cárie foi avaliada de acordo com critérios da Organização Mundial da Saúde (ao nível de cavitação). A meta-análise de 13 estudos não mostrou diferença nos níveis salivares de s-IgA entre indivíduos com ou sem cárie. Devido à elevada heterogeneidade ($I^2=98\%$), seis estudos foram removidos pela análise de sensibilidade. Dessa forma, a meta-análise dos 7 estudos restantes ($I^2=41\%$) indicou níveis mais altos de s-IgA no grupo de indivíduos com cárie [diferença padronizada de médias (SMD)=0.27, IC 95%: 0.17; 0.38, $p<0,00001$]. Os autores verificaram ausência de viés de publicação. Com base nesses achados, concluiu-se que indivíduos com cárie apresentam níveis salivares aumentados de s-IgA. Segundo os autores, isso deve-se ao fato de que a s-IgA (enquanto fator imunológico), desempenha um papel de proteção do hospedeiro contra cárie, podendo ter seus níveis aumentados em resposta à exposição prévia à cárie dentária.

Já em 2020, Wu *et al.* (2020) também compararam os níveis salivares de s-IgA entre grupos de pacientes com e sem cárie e analisaram se experiência de cárie (alta ou baixa), idade (crianças: < 18 anos; adultos: > 18 anos), tipos de dentição (decídua, mista e permanente), e diferentes regiões geográficas (Ásia, Europa, América do Norte, América do Sul e África) interferem com os níveis salivares de s-IgA. Um total de 30 estudos do tipo caso-controle foram incluídos, com um tamanho total de amostra de 1545 pacientes, correspondente à 918 pacientes com cárie e 627 pacientes sem cárie. Saliva não-estimulada foi coletada desses participantes. Experiência de cárie foi avaliada de acordo com critérios da Organização Mundial da

Saúde (ao nível de cavitação). Os autores verificaram que os níveis salivares de s-IgA em pacientes com cárie foram significativamente mais baixos do que aqueles em controles saudáveis [diferença padronizada de médias (SMD) = -0.49, IC 95%: -0.94; -0.03, $p = 0.03$]. Elevada heterogeneidade foi observada dentre os estudos incluídos na meta-análise ($I^2=93\%$). Além disso, os resultados da análise de subgrupos mostraram que a diminuição significativa do nível de s-IgA salivar foi correlacionada com pacientes crianças (SMD= -0.45, IC 95%: -0.89; -0.01, $p = 0.04$); e asiáticos (Asiático: SMD= -0.62, IC 95%: -1.17; -0.08, $p = 0.02$). Além disso, os níveis salivares de S-IgA nos pacientes de alta experiência de cárie (CPO-D/ceod > 5) foram significativamente menores quando comparados aos indivíduos de baixa experiência (CPO-D/ceod < 5) ou livres de cárie (baixa experiência: SMD= -0.89, IC 95%: -1.46; 0.31, $p=0.003$; livres de cárie: SMD= -1.67, IC 95%: -2.60; -0.74, $p<0.001$). A fim de reduzir a heterogeneidade, análise de sensibilidade foi realizada e verificou-se que 14 estudos apresentaram heterogeneidade aceitável ($I^2=46\%$). Meta-análise desses estudos (correspondendo a 265 participantes sem cárie e 410 participantes com cárie) também mostrou menores níveis salivares de s-IgA em indivíduos com cárie (SMD= -1.23, IC 95%: -1.48; -0.99, $p<0,001$). Pequeno viés de publicação foi observado dentre os estudos incluídos. Foi possível concluir que os níveis salivares de s-IgA em pacientes com cárie foram significativamente mais baixos do que em controles saudáveis. Também foi demonstrado que a s-IgA salivar pode ser usada como medida alternativa para identificar indivíduos sob risco ou mais suscetíveis à cárie, sugerindo que a s-IgA salivar pode ser um fator protetor para a cárie dentária. Como se observa, esses resultados são contraditórios em relação àqueles reportados por Fidalgo *et al.* (2014), cujos estudos incluídos avaliaram níveis de s-IgA tanto na saliva estimulada quando na saliva não estimulada. Wu *et al.* (2020) discutem que, idealmente, deve-se considerar saliva não-estimulada para essa análise uma vez que a interação entre substâncias antibacterianas e bactérias na saliva ocorre principalmente na saliva total não estimulada (BENDERLI *et al.*, 2000).

A associação entre os níveis de arginina na saliva e no biofilme ou atividade de SAD em crianças e adultos com e sem cárie dentária também foi avaliada por uma revisão sistemática com meta-análise (BIJLE *et al.*, 2018). Os estudos foram subdivididos em atividade de SAD em (a) saliva de crianças e adolescentes, (b) saliva de adultos (> 18 anos), (c) biofilme de crianças e adolescentes e (d) biofilme de adultos. A idade dos participantes variou de 2 a 83 anos. Experiência de cárie foi

avaliada considerando tanto lesões iniciais (não-cavidades) quanto cavidades de cárie como limiar de diagnóstico. Sete estudos foram incluídos na análise qualitativa e 4 estudos foram incluídos na meta-análise (totalizando 464 participantes, sendo 284 com cárie e 180 sem cárie). Os resultados da meta-análise revelaram maior atividade de SAD no biofilme de adultos sem cárie [diferença padronizada de médias (SMD) = 0.93, IC 95%:0.24; 1.62, $p = 0,008$], na saliva de adultos sem cárie (SMD = 0.87, IC 95%:0.77; 0.98, $p < 0,001$) e na saliva de crianças e adultos sem cárie (SMD = 0.85, IC 95%:0.54; 1.16, $p < 0,001$). A heterogeneidade foi elevada para a meta-análise de SAD no biofilme de adultos ($I^2 = 76,7\%$) e moderada para saliva de adultos e saliva de crianças e adultos ($I^2 = 53,7\%$ e $47,4\%$, respectivamente). Os autores sugeriram que as atividades de SAD na saliva e no biofilme podem ser indicadores promissores de risco de cárie para adultos, porém os resultados permanecem inconclusivos para crianças.

Nível salivar de antioxidantes totais e sua relação com cárie em crianças foi avaliado por Pani (2018). O número de participantes para amostra total foi de 611 com idade < 14 anos, sendo 306 no grupo sem cárie, e 305 no grupo com cárie. Experiência de cárie foi avaliada considerando cavidades de cárie como limiar de diagnóstico. Os estudos avaliaram apenas saliva não estimulada. Maior capacidade antioxidante total foi encontrada em indivíduos com cárie, embora uma elevada heterogeneidade tenha sido observada dentre os 13 estudos avaliados na meta-análise.

Uma análise mais ampla do proteoma salivar e sua relação com cárie foi avaliada por Al-Tarawneh *et al.* (2011). Os autores revisaram trabalhos que avaliaram proteoma salivar por espectrometria de massas a fim de identificar biomarcadores proteicos. Neste estudo, foram incluídos 21 trabalhos que relacionavam proteoma salivar com diversas doenças, como Síndrome de *Sjogren*, carcinoma espinocelular, periodontite, e cárie dentária, dentre outras doenças. Especificamente em relação à cárie, dois estudos foram avaliados, totalizando 46 participantes livres de cárie e 37 participantes com cárie. O estudo de Preza *et al.* (2009) mostrou que um grande número de proteínas pode ser identificado por análise proteômica de secreção das glândulas parótidas, porém parece que o envelhecimento tende a ser acompanhado por mudanças em ambos os volume e composição da saliva, e essas alterações parecem ser mais pronunciadas em idosos que apresentam cárie radicular. Já Vitorino *et al.* (2006) observou por eletroforese 2D que a película salivar de indivíduos livres

de cárie apresenta maior quantidade de proteínas ricas em prolinas ácidas, lipocalina e de cistatina, enquanto que a película de indivíduos com cárie apresenta quantidade de amilase, imunoglobulina A e lactoferrina maiores. A análise conjunta desses dois estudos não permitiu identificar um padrão proteico associado à condição de saúde ou de doença. Este fato poderia ser atribuído aos seguintes motivos: os investigadores utilizaram diferentes tipos de saliva coletada e protocolo de coleta. No trabalho de *Preza et al.* (2009), foi utilizada saliva estimulada e coletada de parótida, enquanto que saliva não-estimulada foi utilizada por *Vitorino et al.* (2006) É possível que a composição proteica da saliva total seja diferente da saliva da parótida. Além disso, os métodos de análise foram diferentes: *Preza et al.* (2009) utilizou SDS-PAGE e LC-MS/MS, enquanto que *Vitorino et al.* (2006) utilizou eletroforese 2D e MALDI-TOF/MS.

1.5 Ferramentas e metodologias para análise proteômica e metabolômica da cavidade bucal

Os avanços científicos e tecnológicos das últimas décadas oportunizaram o desenvolvimento de novas metodologias e técnicas para análise de proteínas e de metabólitos. Em adição aos métodos convencionais de purificação e de quantificação de proteínas específicas, como análises cromatográficas, de imunoabsorção e do tipo *blotting*, novas ferramentas têm possibilitado identificação mais robusta e em larga escala de um conjunto ou de todas as proteínas (proteoma) ou de todos os metabólitos (metaboloma) presentes em uma determinada amostra. Por isso, é importante conhecermos essas diferentes ferramentas, suas aplicações, bem como as vantagens e desvantagens de cada uma delas.

A análise proteômica permite o estudo das proteínas e suas isoformas a partir de amostras biológicas (PANDEY; MANN, 2000). Historicamente, a proteômica surgiu no final da década de 1970, criando as bases de dados de proteínas com o uso de eletroforese bidimensional (2D) que separa as proteínas utilizando dois parâmetros diferentes, na primeira dimensão por ponto isoelétrico (ponto onde a carga líquida seja igual a zero) e na segunda por peso molecular (O'FARREL, 1975). O termo "proteoma" foi proposto por Wilkins e Willians em 1994, significando um conjunto de proteínas expressas por um genoma, ou no caso de organismos multicelulares, proteínas expressas por tecido ou células diferenciadas (WILKINS *et al.*, 1996).

O início da proteômica foi marcado pela caracterização de perfis proteicos, passando, posteriormente, a focar outros aspectos como a quantificação de proteínas, as interações entre proteínas e as modificações pós-traducionais, permitindo a descoberta de novos alvos terapêuticos e moléculas bioativas. O caráter dinâmico do proteoma oferece como vantagem a identificação de variações ocasionais neste conteúdo sob ação de estímulos hormonais, utilização de drogas e/ou exposição a patógenos (AVEZUM *et al.*, 2004; CARVALHO, 2006).

A análise proteômica apresenta maior número de variáveis em relação a análise genômica e do transcriptoma devido à grande diversidade química das proteínas e interconectividade destas em complexos e redes de sinalização, as quais podem variar muito de acordo com o tempo e espaço (ALTELAAR; MUNOZ; HECK, 2013). Neste sentido, a análise proteômica permite observar de forma indireta a expressão dos genes e a concentração relativa de seus produtos. Ainda, a análise proteômica permite a identificação de marcadores biológicos específicos de determinado estado patológico que podem ser úteis no diagnóstico de doenças e no monitoramento de sua evolução e também no tratamento (MANCONE *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2005; ZHAO *et al.*, 2003).

Atualmente segundo Aslam *et al.* (2017), é possível dividir as técnicas proteômicas em: convencionais, avançadas e quantitativas.

1.5.1 Técnicas convencionais para purificação e quantificação das proteínas

1.5.1.1 Técnicas baseadas em Cromatografia

1.5.1.1.1 Cromatografia de Troca Iônica (*Ion Exchange Chromatography - IEC*)

O termo Cromatografia iônica foi introduzido em 1975, pelos pesquisadores Small, Stevens e Baumann, abrangendo termos como troca iônica, exclusão iônica e cromatografia líquida de elevada performance (HPLC). Atualmente, a cromatografia iônica é o método dominante na determinação de ânions, ao invés de métodos de espectroscopia atômica, comumente utilizado para a determinação de cátions (SAMUELSON, 1963).

A cromatografia de troca iônica é uma ferramenta versátil para a purificação de proteínas com base em grupos carregados em sua superfície. As proteínas variam entre si em sua sequência de aminoácidos; certos aminoácidos são aniônicos enquanto outros são catiônicos. A carga líquida contida por uma proteína em pH fisiológico é avaliada pelo equilíbrio entre essas cargas. Inicialmente, a cromatografia

por troca iônica separa a proteína com base em sua natureza de carga (aniônica e catiônica), ainda com base na força de carga comparativa. Na análise de dados, um Software recebe o sinal da célula de condutividade e analisa os dados comparando os picos da amostra em um cromatograma com os produzidos por uma solução padrão.

A cromatografia de troca iônica possui um baixo custo, permite a determinação de espécies iônicas orgânicas e inorgânicas, é sensível à baixas concentrações (μg ou menos), permite a análise de pequenos volumes de amostra (1 mL), dentre outras vantagens (JUNGBAUER; HAHN, 2009). Como desvantagem apresenta a necessidade de equipamento específico, mão de obra especializada e técnico capacitado em operar o equipamento e analisar os resultados.

1.5.1.1.2 Cromatografia de Exclusão por Tamanho (Size Exclusion Chromatography - SEC)

A cromatografia por exclusão de tamanhos (SEC) separa as proteínas com base na permeação através de uma matriz transportadora porosa com tamanho de poro distinto; portanto, as proteínas são separadas com base no tamanho molecular. A cromatografia de exclusão por tamanho é uma técnica robusta capaz de manipular proteínas em diversas condições fisiológicas na presença de detergentes, íons e cofatores ou em diversas temperaturas. Essa técnica é usada para separar proteínas de baixo peso molecular e é uma ferramenta poderosa para purificação de complexos de proteínas multiméricas não covalentes sob condições biológicas (VOEDISCH; THIE, 2010). Portanto, a cromatografia de exclusão por tamanho é amplamente usada tanto no desenvolvimento quanto na fabricação para caracterização de moléculas bioterapêuticas.

1.5.1.1.3 Cromatografia de Afinidade

A Cromatografia de Afinidade é um método de separação de uma biomolécula de uma mistura, com base em uma interação de ligação macromolecular altamente específica entre a biomolécula e outra substância. O tipo específico de interação de ligação depende da biomolécula de interesse (AIZPURUA-OLAIZOLA *et al.*, 2018) . A cromatografia de afinidade é útil por sua alta seletividade e resolução de separação (NINFA *et al.*, 2009), em comparação com outros métodos cromatográficos. Essa técnica representou um grande avanço na purificação de proteínas permitindo ao

pesquisador explorar a degradação de proteínas, modificações pós-traducionais e interação proteína-proteína.

O princípio básico por trás da Cromatografia de Afinidade é a interação reversível entre o ligante de afinidade da matriz cromatográfica e as proteínas a serem purificadas (HAGE et al., 2012). A grande vantagem da cromatografia de afinidade é a sua capacidade de explorar as propriedades únicas das proteínas ao invés de pequenas diferenças nas propriedades físico-químicas entre as proteínas.

1.5.1.1.4 Cromatografia Líquida (CL)

A Cromatografia Líquida é uma técnica de separação físico-química amplamente utilizada para o estudo de diferentes moléculas, como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e outras substâncias, como fármacos e pesticidas.

Nesta técnica, a amostra é transportada através de uma coluna que contém uma fase móvel (líquida), que é ancorada por uma fase estacionária imiscível fixa. Os componentes da amostra que são mais fortemente retidos na fase estacionária movem-se mais lentamente no fluxo da fase móvel, enquanto aqueles que se ligam mais fracamente se movem mais rapidamente. Assim, conseqüente às diferentes mobilidades, dá-se a separação dos componentes em bandas ou zonas (RIVIER; MCCLINTOCK, 1983).

Existem dois métodos de cromatografia líquida principalmente usados na proteômica: Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) e Cromatografia líquida de ultra alta eficiência (CLAE) (AZARKAN *et al.*, 2007).

A RP-CLAE (HPCL) é o tipo mais comum e conta com uma diversidade de fases móveis e estacionárias. Por outro lado, a CLAE oferece vantagens em termos de resolução, velocidade e sensibilidade (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2006). Baseia-se nos mesmos princípios da RP-CLAE (HPCL), mas usa nas partículas estacionárias fases menores que 2µm, o que aumenta a resolução e reduz o tempo de análise.

1.5.1.2. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (Enzyme-linked immunosorbent assay- ELISA)

O Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) foi desenvolvido e descrito por Peter Perlmann e Eva Engvall na Universidade de Estocolmo, Suécia, em 1971. Antes do surgimento do ELISA, as técnicas de imunoensaio usavam marcadores radioativos,

o que trazia riscos para a saúde dos pacientes. O ELISA então surge como um método imunoenzimático alternativo, altamente sensível e amplamente utilizado para fins diagnósticos. O ensaio utiliza um antígeno ou anticorpos ligado em uma superfície sólida e a adição de anticorpos-conjugados com enzimas mede as flutuações nas atividades enzimáticas que são proporcionais à concentração de anticorpos e antígenos na amostra biológica (LEQUIN, 2005).

Existem vários modelos de testes de ELISA; em sua forma mais simples, chamada ELISA indireto, um antígeno aderido a um suporte sólido (placa de ELISA; placas de 96 poços) é preparado; a seguir coloca-se sobre este a amostra teste (exemplo: soro humano), na busca de anticorpos contra o antígeno. Se houver anticorpos na amostra teste ocorrerá a formação da ligação antígeno-anticorpo, que posteriormente é detectada pela adição de um segundo anticorpo (específico contra o anticorpo da amostra teste) o qual é ligado à peroxidase. Ao adicionar-se o substrato apropriado para a enzima (isto é, H_2O_2 dissolvida em uma substância química que dá uma reação colorida quando H_2O_2 é degradada). Os poços onde ocorreu a reação antígeno-anticorpo apresentam então uma coloração diferente (variável dependendo da quantidade de antígeno-anticorpo). Outro método é o chamado ELISA de bloqueio ou competição, em que a presença de anticorpos em determinada amostra é revelada pela competição com um anticorpo específico (mono ou policlonal) dirigido contra o antígeno. Neste caso, alteração na coloração ocorrerá nos poços onde não havia anticorpos específicos ao antígeno avaliado (GAN; PATEL, 2013). Como desvantagem dessas técnicas baseadas em atividade enzimática, resultados falso-positivos em relação a quantidade de anticorpos primários presentes podem ser produzidos.

1.5.1.3 Western blotting

Western blotting é um teste mais sensível que ELISA, é uma técnica analítica usada para identificar uma proteína específica em uma determinada amostra. Essa técnica avalia a capacidade de uma enzima ou anticorpo primário marcado com fluorescência em se ligar ao seu antígeno específico. É um processo de três etapas que começa com a eletroforese da amostra de interesse em gel, seguida de transferência da proteína para uma membrana de transferência, e então, aplicação de um anticorpo específico que identificará a proteína de interesse por um processo de “sondagem” (KURIEN; SCOFIELD, 2006).

Uma das maiores vantagens do *Western blotting* é sua sensibilidade, ou seja, capacidade de detectar apenas 0,1 nanogramas de proteína em uma amostra. Maior sensibilidade significa que menos anticorpos são necessários para o teste, o que reduz significativamente os custos do laboratório (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979). Essa também é uma técnica altamente específica, o que deve-se a dois grandes fatores contribuintes. Primeiro, a eletroforese em gel classifica uma amostra em proteínas de tamanho, carga e conformação diferentes. Este processo em si é um enorme passo para a detecção, uma vez que as bandas formadas no gel já dão pistas sobre o tamanho da proteína ou polipeptídeo de interesse. A especificidade da interação anticorpo-antígeno serve como o segundo grande fator. Como os anticorpos específicos mostram afinidade por proteínas específicas, o processo pode detectar seletivamente uma proteína alvo, mesmo em uma mistura de 300.000 proteínas diferentes (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979).

Em relação às limitações, proteínas maiores que não tenham tempo suficiente para se transferir adequadamente para a membrana de transferência, assim como presença de bandas distorcidas, desbotadas ou até múltiplas, podem produzir resultados falso-negativos (RENART; REISER; STARK, 1979). Uma outra desvantagem refere-se ao elevado custo do equipamento necessário para detecção e geração de imagens (por exemplo, sistemas quimioluminescentes, fluorescentes, radioativos ou de detecção a laser) (RENART; REISER; STARK, 1979).

1.5.2. Técnicas Avançadas para separação, isolamento e caracterização das proteínas

1.5.2.1. Abordagens baseadas em gel

1.5.2.1.1 *Eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE)*

SDS-PAGE é uma técnica de alta resolução para a separação de proteínas de acordo com seu peso molecular (de 10 kDa a 300 kDa). O SDS-PAGE tem a vantagem de ser barato e altamente confiável. Sua resolução de separação é maior do que a Cromatografia de Exclusão de Tamanho, mas não tão alta quanto a eletroforese em gel bidimensional (descrita a seguir). As proteínas da amostra são capazes de se mover submetidas a um campo elétrico em um meio com pH diferente do seu ponto isoelétrico. Diferentes proteínas em mistura migram com diferentes velocidades de acordo com a razão entre sua carga e massa. A adição de dodecil sulfato de sódio,

porém, desnatura as proteínas, separa-as de acordo com o peso molecular (DUNN, 1986), permitindo a identificação presuntiva com base nesse peso molecular.

1.5.2.1.2 Eletroforese em gel bidimensional (2D-PAGE)

A eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) é um método eficiente e confiável para separação de proteínas com base em sua massa e carga. Essa técnica é capaz de fazer uma triagem de cerca de 5.000 proteínas diferentes, dependendo do tamanho do gel. Na primeira dimensão, as proteínas são separadas por carga em tiras de gradiente de pH (de acordo com o ponto isoelétrico), e na segunda dimensão, as proteínas são separadas com base nas diferenças entre suas massas. Como desvantagem dessa técnica pode-se citar a possibilidade de diferentes proteínas apresentarem carga e massa semelhantes, dificultando sua separação no gel (RABILLOUD, 2002).

1.5.2.1.3 Espectrometria de Massa (MS)

A técnica de espectrometria de massa (MS) consiste basicamente na ionização de um composto e na avaliação da razão massa/carga (m/z) dos íons. O equipamento utilizado para essa finalidade compreende uma fonte de ionização, um ou mais analisadores de massas e um detector. A fonte de ionização é utilizada para gerar íons peptídicos ou proteicos, geralmente transferindo prótons (H^+) para as moléculas sem alterar sua estrutura química. O íon é acelerado por campo elétrico e separado de acordo com a razão m/z no analisador de massas (ou então é selecionado de acordo com uma m/z previamente determinada) e fragmentado em um processo denominado *in tandem*. Finalmente, os íons passam pelo detector o qual é conectado a um computador com programas para análise de dados (MAY *et al.*, 2011).

Atualmente, existem dois métodos principais de ionização utilizados em proteômica: o MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) e o ESI (*Electrospray Ionization*). O MALDI é empregado para amostras em estado sólido, e o ESI é indicado para amostras em estado líquido (ZALUZEC; GAGE; WATSON, 1995). Esses ionizadores são a chave para manter a sensibilidade, precisão de massa, resolução e gerar espectros de massa de íons ricos em informações (espectros de MS/MS) a partir de fragmentos de peptídeos (STRATHMANN; HOOFNAGLE, 2011).

No método MALDI, os peptídeos são cocristalizados com uma matriz orgânica, geralmente ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico. Após bombardeamento por laser, a

matriz sublima e seus íons transferem a carga para os analitos, resultando na formação de íons peptídicos (SALEEM *et al.*, 2019; STRATHMANN; HOOFNAGLE, 2011). Uma variante do MALDI denominada SELDI (*Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization*) é geralmente empregada para análise do proteoma de baixo peso molecular e utiliza várias matrizes ou chips que exploram as características cromatográficas e biofísicas das diferentes proteínas. Esses chips podem apresentar superfícies hidrofóbicas, de troca iônica ou com íons metálicos imobilizados, ou mesmo anticorpos, receptores, enzimas e ligantes com alta afinidade por proteínas específicas (TANG; TORNATORE; WEINBERGER, 2004). Assim, após a lavagem dos compostos não ligados, uma matriz é colocada sobre o chip e os espectros são obtidos por ionização com laser. Outra variante do MALDI é o IMS (*Imaging Mass Spectrometry*), que permite a obtenção de dados de massas de peptídeos e proteínas diretamente de seções de tecidos biológicos. Esse método oferece importantes vantagens em relação a análise por imuno-histoquímica, incluindo rapidez e independência do uso de anticorpos (GUSTAFSSON *et al.*, 2011).

No ESI, diferentemente do MALDI, uma solução aquosa com o analito é forçada a atravessar uma agulha capilar submetida a alta voltagem. A solução é ejetada como um aerossol de gotas altamente carregadas que, após evaporação do solvente por um fluxo de gás inerte aquecido, geram formas ionizadas do analito (NGUYEN; FENN, 2007). As vantagens do ESI são sua alta reprodutibilidade e alta elasticidade para combinar muitas categorias de MS. Por outro lado, as desvantagens do ESI são que ele requer uma grande quantidade de amostras e vários picos são produzidos devido aos muitos íons carregados que resultam na complexidade dos espectros MS/MS (CHIOU; WU, 2011).

Independentemente do método de ionização, a massa molecular dos íons é avaliada em um analisador após passagem por uma câmara de vácuo. Os tipos mais comuns de analisadores são o TOF (*Time Of Flight*), o quadrupolo (Qs) e o *ION TRAP* (MAY *et al.*, 2011). Nos analisadores TOF, os íons resultantes da primeira fase são acelerados por um potencial entre dois eletrodos e atravessam um tubo de vácuo com velocidade inversamente proporcional a sua massa. Quando os íons atingem o detector, o tempo decorrido entre a ionização e a detecção é utilizado para derivar o valor m/z . Na verdade, o detector converte o sinal da passagem do íon em sinal analógico, que é lido e interpretado por uma estação de trabalho. O resultado final é um gráfico de m/z versus intensidade (contagem de íons), comumente referido como

espectro MS (WOLLNIK, 1993). Os sinais gerados são comparados com informações disponíveis em bancos de dados como o MASCOT (PERKINS, 1999) e o SEQUEST (ENG; MCCORMACK; YATES, 1994), o que permite identificar a proteína de interesse. Uma das limitações do sistema MALDI-TOF é a dificuldade de detecção de proteínas de baixo peso molecular. Para melhorar o desempenho, os analisadores TOF podem ser combinados com analisadores quadrupolos (Qs), que apresentam um conjunto de quatro eletrodos em bastão e funcionam como filtros de massas. Entre esses eletrodos, um campo elétrico assegura que somente íons de uma determinada razão m/z sigam a trajetória ao detector enquanto os demais são desviados (CHERNUSHEVICH; LOBODA; THOMSON, 2001). Os analisadores do tipo *ION TRAP* ou armadilha de íons (IT) filtram e aprisionam em um campo elétrico tridimensional íons de interesse, que são gradualmente liberados em ordem de m/z crescente (WANG; FRANZEN; WANCZEK, 1993). Os FT-ICRs (*Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*) aprisiona os íons em um campo magnético adicional, que força os íons a exibirem um movimento circular com ciclos de alta frequência. O analisador determina a razão m/z a partir da frequência do movimento ciclotrônico utilizando a transformação de Fourier (MAY *et al.*, 2011). O *orbitrap* é outro tipo de analisador IT no qual os íons oscilam ao longo e ao redor de um eletrodo em forma de espiral. A frequência dessa oscilação é proporcional a raiz quadrada da razão massa/carga e pode ser determinada com alta precisão (HU *et al.*, 2005; WALTHER; MANN, 2010).

Após a determinação da m/z do peptídeo intacto, pode ser realizado o seu sequenciamento por meio de uma segunda rodada de espectrometria de massa (MS): os peptídeos mais abundantes são especificamente selecionados e submetidos a fragmentação por colisão com um gás inerte (CID – dissociação induzida por colisão) ou por transferência de elétrons (ETD). A fragmentação do peptídeo parental ocorre predominantemente ao longo de seu esqueleto, em geral entre o oxigênio do carbonil e o nitrogênio da amida. O espectro MS/MS resultante é na realidade uma lista de razões m/z para fragmentos distintos cujas diferenças em massa correspondem a um único aminoácido. A avaliação desses fragmentos permite a dedução da sequência do peptídeo. Com os resultados de vários desses peptídeos, a proteína é identificada (WALTHER; MANN, 2010).

Os espectrômetros de massa são equipamentos muito caros e delicados. Embora sejam conhecidos por produzir informações extensas sobre proteínas, falso-negativos, falso positivos e espectros não identificados podem estar dentre os

problemas decorrentes do seu uso (CHANNAVEERAPPA; NGOUNOUWETIE; DARIE, 2019).

1.5.3. Técnicas Quantitativas

1.5.3.1. Marcação de afinidade por isótopo (*Isotope-Coded Affinity Tag -ICAT*)

O ICAT é um método de marcação química *in vitro* que usa uma etiqueta de biotina para marcar proteínas contendo resíduos de cisteína (CRAFT et al., 2013). As proteínas contendo cisteína extraídas das amostras são marcadas por reagentes ICAT comerciais. Após a purificação de amostras, os peptídeos contendo cisteína são isolados por cromatografia de afinidade com avidina. Peptídeos contendo cisteína com marcadores de isótopos são identificados e quantificados por cromatografia líquida-MS/MS. Na marcação química, os proteomas a serem comparados devem ser purificados e fracionados exatamente nas mesmas condições experimentais (GYGI et al., 1999).

Existem várias vantagens importantes da tecnologia ICAT: (1) a incorporação de diferentes isótopos estáveis em duas amostras permite a determinação da abundância relativa de proteínas diferentes nas duas amostras simultaneamente; (2) a biotina facilita a separação cromatográfica de peptídeos contendo cisteína de todos os outros peptídeos, diminuindo assim o *background* durante a cromatografia líquida subsequente/detecção de MS; (3) a seleção de peptídeos contendo cisteína permite que o *software* de identificação de peptídeos se concentre exclusivamente em peptídeos tripticos contendo cisteína no banco de dados de proteínas possibilitando uma identificação mais rápida.

As principais desvantagens dessa abordagem são: (1) os peptídeos/proteínas alvo devem conter pelo menos uma cisteína para serem marcados e identificados; e (2) é necessário pelo menos 1 pmol do fator alvo para identificação. No entanto, a maioria das proteínas conhecidas contém cisteína (GYGI et al., 1999).

1.5.3.2. Marcação isobárica para quantificação relativa e absoluta (*Isobaric tag for relative and absolute quantitation - iTRAQ*)

O iTRAQ é um método de marcação isobárica usado para determinar a quantidade de proteínas de diferentes fontes em um único experimento (ROSS et al., 2004; ZIESKE, 2006; GAFKEN; LAMPE, 2006). Ele usa moléculas marcadas com

isótopos estáveis que podem ser ligadas covalentemente ao N-terminal e às aminas da cadeia lateral das proteínas.

Atualmente, existem dois reagentes usados principalmente: 4-plex e 8-plex, que podem ser usados para rotular todos os peptídeos de diferentes amostras/tratamentos (GAFKEN; LAMPE, 2006). Estas amostras são então agrupadas e geralmente fracionadas por cromatografia líquida e analisadas por espectrometria de massa in tandem (MS/MS). Uma pesquisa de banco de dados é então realizada para identificar os peptídeos marcados e, portanto, as proteínas correspondentes. A fragmentação do marcador (*tag*) gera um íon repórter de baixa massa molecular que pode ser usado para quantificar relativamente os peptídeos e as proteínas dos quais eles se originaram (WIESE, 2007).

Ao tentar realizar experimentos de proteômica quantitativa, as ferramentas necessárias para uma análise confiável podem ser caras. A maneira mais barata de quantificar peptídeos é uma abordagem sem-marcação (*non-tagged*); no entanto, condições de execução variáveis para o espectrômetro de massa podem levar a erros (OLD *et al.*, 2005). A quantidade de tempo e instrumento necessário para as replicações técnicas também é uma problema quando se trata de abordagens sem-marcação. Além disso, não é possível quantificar com precisão a abundância relativa de diferentes peptídeos, uma vez que essas moléculas têm propriedades físico-químicas diferentes e, portanto, se comportarão de maneira diferente sob condições de espectrometria de massa (CHEN *et al.*, 2015). Os diferentes métodos de rotulagem para proteômica quantitativa também têm suas falhas. Um problema universal com a maioria das abordagens de marcação é que pode haver marcação incompleta dos peptídeos, o que causaria erros na análise quantitativa.

Considerando as evidências apresentadas nos tópicos anteriores, especialmente aquelas provenientes de revisões sistemáticas, parece que determinadas proteínas e metabólitos são diferencialmente abundantes ou são diferencialmente expressos na cavidade bucal entre indivíduos com ou sem cárie dentária. Apesar de haver um certo nível de evidência a partir da análise dos estudos primários, ainda há uma carência de meta-análises sobre esse tema. Uma melhor compreensão sobre o proteoma e metaboloma da cavidade bucal, a partir da análise agrupada da evidência disponível, pode fornecer dados sobre prováveis candidatos a biomarcadores para doença cárie, possibilitando o desenvolvimento de novas estratégias para controle dessa doença.

2. OBJETIVO

O objetivo desse trabalho foi avaliar por meio de uma revisão sistemática e de meta-análise da literatura se a composição proteica e de metabólitos da cavidade bucal de indivíduos livres de cárie é diferente comparada aos indivíduos que apresentem doença cárie a fim de identificar padrões ou marcadores associados às condições de saúde e de doença.

2.1. Objetivos Específicos:

- ✓ Identificar grupos proteicos diferencialmente abundantes na película dentária, na saliva ou no biofilme dentário de indivíduos livres de cárie em comparação aos indivíduos com doença cárie dentária;
- ✓ Identificar metabólitos diferencialmente abundantes na película dentária, na saliva ou no biofilme dentário supra-gengival de indivíduos livres de cárie em comparação aos indivíduos com doença cárie dentária;
- ✓ Identificar potenciais marcadores funcionais associados às condições de saúde ou de doença cárie.

2.2. Hipótese

A hipótese nula é de que cavidade bucal de indivíduos livres de cárie não apresenta perfil proteômico e/ou metabolômico distinto da cavidade bucal de indivíduos com doença cárie.

6. CONCLUSÃO

Os resultados desta revisão sistemática permitem concluir que existem diferenças na composição proteica e de metabólitos da cavidade bucal entre indivíduos com e sem doença cárie. De forma geral, a cavidade bucal de indivíduos com cárie apresenta maior concentração de proteínas totais, maior CAT, maior atividade de alfa-amilase e de CA-VI, super-expressão de proteínas HAUS4, CAH1, IL36A, IL36G, AIMP1, KLHL8, KLH13 e SAA1, maiores níveis de lactato, acetato, aminoácidos livres, ácidos graxos e hipoxantina, maior intensidade de compostos correspondentes à álcoois e ésteres presentes no biofilme dentário associado à lesões não-cavidades, menor atividade de urease e de SAD, menor nível de CA-VI, menor concentração de s-IgA (população de elevada experiência de cárie), menor concentração de cistatina e de mucina 5B e menor intensidade de picos cromatográficos relacionados aos peptídeos 3186.2, 3195.8 e 3324.8 Da. Além disso, picos cromatográficos relacionados aos peptídeos 1346,6 Da, 2603,5 Da e 3192,8 Da foram exclusivos de indivíduos com cárie. Por outro lado, a cavidade bucal de indivíduos sem cárie apresenta super-expressão de proteínas ZN511, PRP1 e de glutathione sintetase. A proteína E2AK4 foi exclusivamente identificada na saliva de indivíduos sem cárie. Os resultados da meta-análise sugerem que a cavidade bucal apresenta candidatos a biomarcadores como: proteínas totais, CAT, alfa-amilase, concentração e atividade da CA-VI e atividade de urease e de SAD para as condições de saúde ou de doença cárie e a análise qualitativa indicou outros possíveis candidatos, cuja validade precisa ser avaliada por futuros estudos longitudinais.

REFERÊNCIAS

1. Aguirre A, Levine MJ, Cohen RE, Tabak LA. Immunochemical quantitation of alpha-amylase and secretory IgA in parotid saliva from people of various ages. *Arch Oral Biol.* 1987;32(4):297-301.
2. Agustsdottir H, Gudmundsdottir H, Eggertsson H, Jonsson SH, Gudlaugsson JO, Saemundsson SR, Eliasson ST, Arnadottir IB, Holbrook WP. Caries prevalence of permanent teeth: a national survey of children in Iceland using ICDAS. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2010 Aug;38(4):299-309.
3. Ahmad M, Piludu M, Oppenheim FG, Helmerhorst EJ, Hand AR. Immunocytochemical localization of histatins in human salivary glands. *J Histochem Cytochem.* 2004;52(3):361-70.
4. Ahmadi-Motamayel F, Goodarzi MT, Hendi SS, Kasraei S, Moghimbeigi A. Total antioxidant capacity of saliva and dental caries. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013a;18(4):e553-6.
5. Ahmadi-Motamayel F, Goodarzi MT, Hendi SS, Abdolsamadi H, Rafieian N. Evaluation of salivary flow rate, pH, buffering capacity, calcium and total protein levels in caries free and caries active adolescence. *J Dent Oral Hyg.* 2013b; 5(4):35-39.
6. Ahmadi-Motamayel F, Goodarzi MT, Mahdavinezhad A, Jamshidi Z, Darvishi M. Salivary and Serum Antioxidant and Oxidative Stress Markers in Dental Caries. *Caries Res.* 2018;52(6):565-569.
7. Ahmad P, Hussain A, Carrasco-Labra A, Siqueira WL. Salivary Proteins as Dental Caries Biomarkers: A Systematic Review. *Caries Res.* 2022;56(4):385-398.
8. Aimetti M, Cacciatore S, Graziano A, Tenori L. Metabonomic analysis of saliva reveals generalized chronic periodontitis signature. *Metabolomics* 2012;8(3):465-474.
9. Aizpurua-Olaizola O, Sastre Torano J, Pukin A, Fu O, Boons GJ; De Jong GJ et al. "Eletroforese capilar de afinidade para a avaliação da afinidade de ligação de inibidores de toxina da cólera à base de carboidratos". *Eletroforese.* 2018;39(2): 344-347.
10. Alaluusua S. Longitudinal study of salivary IgA in children from 1 to 4 years old with reference to dental caries. *Scand J Dent Res.* 1983;91(3):163-8.
11. Al Amoudi N, Al Shukairy H, Hanno A. A comparative study of the secretory IgA immunoglobulins (s.IgA) in mothers and children with SECC versus a caries free group children and their mothers. *J Clin Pediatr Dent.* 2007;32(1):53-6.

12. Al-Ali GMSS, Jafar ZJ, AL-Ghurabi BH. The Relation of Salivary Cathelicidin and Beta-Defensin with Dental Caries of Schoolchildren, *J Res Med Dent Sci*. 2021;9(4):30-35
13. Alajbeg IZ, Lapić I, Rogić D, Vuletić L, Andabak Rogulj A, Illeš D, Knezović Zlatarić D, Badel T, Vrbanović E, Alajbeg I. Within-Subject Reliability and between-Subject Variability of Oxidative Stress Markers in Saliva of Healthy Subjects: A Longitudinal Pilot Study. *Dis Markers*. 2017; 2017:2697464.
14. Al-Ani A, Macdonald DA, Ahmad M. Salivary sIgA and PRAP-1 protein in relation to dental caries: a comparative study. *J Adv Oral Res*. 2020;11(1): 71–6.
15. Al-Hashimi I, Levine MJ. Characterization of in vivo salivary-derived enamel pellicle. *Arch Oral Biol*. 1989;34(4):289-95.
16. Almeida Pdel V, Grégio AM, Machado MA, de Lima AA, Azevedo LR. Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J Contemp Dent Pract*. 2008;9(3):72-80.
17. Al-Tarawneh SK, Border MB, Dibble CF, Bencharit S. Defining salivary biomarkers using mass spectrometry-based proteomics: a systematic review. *OMICS*. 2011;15(6):353-61.
18. Altelaar AF, Munoz J, Heck AJ. Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. *Nat Rev Genet*. 2013;14(1):35-48.
19. Amado FM, Vitorino RM, Domingues PM, Lobo MJ, Duarte JA. Analysis of the human saliva proteome. *Expert Rev Proteomics*. 2005;2(4):521-39.
20. Amano A, Kataoka K, Raj PA, Genco RJ, Shizukuishi S. Binding sites of salivary statherin for *Porphyromonas gingivalis* recombinant fimbriin. *Infect Immun*. 1996;64(10):4249-54.
21. Amerongen AVN, Bolscher JGM, Veerman EC. Salivary mucinas: funções protetoras em relação à sua diversidade. *Glycobiology* 1995; 5:733-740.
22. Amerongen AV, Veerman EC. Saliva--the defender of the oral cavity. *Oral Dis*. 2002;8(1):12-22.
23. Angarita-Díaz MP, Simon-Soro A, Forero D, Balcázar F, Sarmiento L, Romero E, Mira A. Evaluation of possible biomarkers for caries risk in children 6 to 12 years of age. *J Oral Microbiol*. 2021;13(1):1956219.
24. Angwaravong O, Pitiphat W, Bolscher JG, Chaiyarit P. Evaluation of salivary mucins in children with deciduous and mixed dentition: comparative analysis between high and low caries-risk groups. *Clin Oral Investig*. 2015;19(8):1931-7.
25. Ao S, Sun X, Shi X, Huang X, Chen F, Zheng S. Longitudinal investigation of salivary proteomic profiles in the development of early childhood caries. *J Dent*. 2017;61:21-27.

26. Araujo HC, Nakamune ACMS, Garcia WG, Pessan JP, Antoniali C. Carious Lesion Severity Induces Higher Antioxidant System Activity and Consequently Reduces Oxidative Damage in Children's Saliva. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:3695683.
27. Arslan SY, Leung KP, Wu CD. The effect of lactoferrin on oral bacterial attachment. *Oral Microbiol Immunol*. 2009;24(5):411-6.
28. Aslam B, Basit M, Nisar MA, Khurshid M, Rasool MH. Proteomics: Technologies and Their Applications. *J Chromatogr Sci*. 2017;55(2):182-196.
29. Austin SB, Rosario M, McLaughlin KA, Roberts AL, Sarda V, Yu K, Missmer S, Anatale-Tardiff L, Scherer EA. Sexual orientation and salivary alpha-amylase diurnal rhythms in a cohort of U.S. young adults. *Psychoneuroendocrinology*. 2018;97:78-85.
30. Avezum A, Carvalho A C C, Mansur AP, Timerman A, Guimarães AC, Bozza AE. et al. III Diretriz sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2004; 83(suppl 4):1-86.
31. Ayad M, Van Wuyckhuysse BC, Minaguchi K, Raubertas RF, Bedi GS, Billings RJ, Bowen WH, Tabak LA. The association of basic proline-rich peptides from human parotid gland secretions with caries experience. *J Dent Res*. 2000;79(4):976-82.
32. Azarkan M, Huet J, Baeyens-Volant D, Looze Y, Vandebussche G. Affinity chromatography: a useful tool in proteomics studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007; 849(1-2):81-90.
33. Azen E, Prakobphol A, Fisher SJ. PRB3 null mutations result in absence of the proline-rich glycoprotein GI and abolish *Fusobacterium nucleatum* interactions with saliva in vitro. *Infect Immun*. 1993; 61(10):4434-9.
34. Bachtiar EW, Hermawan IY, Ratna-Farida, Bachtiar BM. Analysis of salivary protein profiles and its viscosity in early childhood caries (a cross-sectional study). *J Clin Diagn Res*. 2018;12(12): ZC28-ZC30.
35. Bader JD, Shugars DA. A systematic review of the performance of a laser fluorescence device for detecting caries. *J Am Dent Assoc*. 2004 Oct;135(10):1413-26.
36. Bagherian A, Asadikaram G. Comparison of some salivary characteristics between children with and without early childhood caries. *Indian J Dent Res*. 2012; 23(5):628-32.
37. Bagherian A, Jafarzadeh A, Rezaeian M, Ahmadi S, Rezaity MT. Comparison of the salivary immunoglobulin concentration levels between children with early childhood caries and caries-free children. *Iran J Immunol*. 2008;5(4):217-21.
38. Baici A, Szedlacsek SE, Früh H, Michel BA. pH-dependent hysteretic behaviour of human myeloblastin (leucocyte proteinase 3). *Biochem J*. 1996;317 (Pt 3)(Pt 3):901-5.

39. Balekjian AY, Hoerman KC, Berzinskas VJ. Lysozyme of the human parotid gland secretion: its purification and physicochemical properties. *Biochem Biophys Res Commun.* 1969;35(6):887-94.
40. Balekjian AY, Meyer TS, Montague ME, Longton RW. Electrophoretic patterns of parotid fluid proteins from caries-resistant and caries-susceptible individuals. *J Dent Res.* 1975;54(4):850-6.
41. Banda NR, Singh G, Markam V. Evaluation of total antioxidant level of saliva in modulation of caries occurrence and progression in children. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2017;34(3):227-32.
42. Bardow A, Moe D, Nyvad B, Nauntofte B. The buffer capacity and buffer systems of human whole saliva measured without loss of CO₂. *Arch Oral Biol.* 2000;45(1):1-12.
43. Barnes VM, Ciancio SG, Shibly O, Xu T, Devizio W, Trivedi HM, Guo L, Jönsson TJ. Metabolomics reveals elevated macromolecular degradation in periodontal disease. *J Dent Res.* 2011;90(11):1293-7.
44. Barrera J, Tortolero S, Rivas A, Flores C, Gonzales E. Increased expression and levels of human β defensins (hBD2 and hBD4) in adults with dental caries. *JHSCI.* 2013;3(2):88-97.
45. Belda-Ferre P, Williamson J, Simón-Soro Á, Artacho A, Jensen ON, Mira A. The human oral metaproteome reveals potential biomarkers for caries disease. *Proteomics.* 2015;15(20):3497-507.
46. Benderli Y, Erdilek D, Koray F, Telci A, Turan N. The relation between salivary IgA and caries in renal transplant patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000;89(5):588-93.
47. Benn AM, Thomson WM. Saliva: an overview. *N Z Dent J.* 2014;110(3):92-6.
48. Bennick A. Salivary proline-rich proteins. *Mol Cell Biochem.* 1982;45(2):83-99.
49. Bergey EJ, Cho MI, Blumberg BM, Hammarskjöld ML, Rekosh D, Epstein LG, Levine MJ. Interaction of HIV-1 and human salivary mucins. *J Acquir Immune Defic Syndr (1988).* 1994;7(10):995-1002.
50. Berkowits, N. Oral Cavity. In: Stranding, S. (Ed.). *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*, 41st Edition. 2015 London, Churchill Livingstone/Elsevier, p. 507-534.
51. Bhalla S, Tandon S, Satyamoorthy K. Salivary proteins and early childhood caries: A gel electrophoretic analysis. *Contemp Clin Dent.* 2010;1(1):17-22.
52. Bibby BG, Mundorff SA, Zero DT, Almekinder KJ. Oral food clearance and the pH of plaque and saliva. *J Am Dent Assoc.* 1986;112(3):333-7.

53. Biesbrock AR, Reddy MS, Levine MJ. Interaction of a salivary mucin-secretory immunoglobulin A complex with mucosal pathogens. *Infect Immun.* 1991;59(10):3492-7.
54. Bijle MNA, Yiu CKY, Ekambaram M. Can oral ADS activity or arginine levels be a caries risk indicator? A systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig.* 2018;22(2):583-596.
55. Bikker FJ, Ligtenberg AJ, van der Wal JE, van den Keijbus PA, Holmskov U, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Immunohistochemical detection of salivary agglutinin/gp-340 in human parotid, submandibular, and labial salivary glands. *J Dent Res.* 2002;81(2):134-9.
56. Blankenvoorde MF, van't Hof W, Walgreen-Weterings E, van Steenberg T, Brand HS, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Cystatin and cystatin-derived peptides have antibacterial activity against the pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Biol Chem.* 1998;379(11):1371-5.
57. Borges MC, Sesso ML, Roberti LR, de Menezes Oliveira MA, Nogueira RD, Geraldo-Martins VR, Ferriani VP. Salivary antibody response to streptococci in preterm and fullterm children: a prospective study. *Arch Oral Biol.* 2015;60(1):116-25.
58. Borghi GN, Rodrigues LP, Lopes LM, Parisotto TM, Steiner-Oliveira C, Nobre-Dos-Santos M. Relationship among α amylase and carbonic anhydrase VI in saliva, visible biofilm, and early childhood caries: a longitudinal study. *Int J Paediatr Dent.* 2016;27(3):174-182.
59. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 2011;45(1):69-86.
60. Brandtzaeg P. Secretory immunity with special reference to the oral cavity. *J Oral Microbiol.* 2013;5.
61. Brandtzaeg P, Prydz H. Direct evidence for an integrated function of J chain and secretory component in epithelial transport of immunoglobulins. *Nature.* 1984;311(5981):71-3.
62. Brasil. Coordenação Nacional de Saúde Bucal, Departamento de Atenção Básica, Ministério da Saúde. Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde; 2004.
63. Brasil. Coordenação Nacional de Saúde Bucal, Departamento de Atenção Básica, Ministério da Saúde. Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde; 2012.
64. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-5.

65. Bruno LS, Li X, Wang L, Soares RV, Siqueira CC, Oppenheim FG, Troxler RF, Offner GD. Two-hybrid analysis of human salivary mucin MUC7 interactions. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1746(1):65-72.
66. Buzalaf MA, Hannas AR, Kato MT. Saliva and dental erosion. *J Appl Oral Sci*. 2012;20(5):493-502.
67. Buzalaf MAR, Ortiz AC, Carvalho TS, Fideles SOM, Araújo TT, Moraes SM, Buzalaf NR, Reis FN. Saliva as a diagnostic tool for dental caries, periodontal disease and cancer: is there a need for more biomarkers? *Expert Rev Mol Diagn*. 2020 May;20(5):543-555.
68. Çağlayan F, Miloglu O, Altun O, Erel O, Yilmaz AB. Oxidative stress and myeloperoxidase levels in saliva of patients with recurrent aphthous stomatitis. *Oral Dis*. 2008;14(8):700-4.
69. Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(3):359-83.
70. Carlén A, Olsson J. Monoclonal antibodies against a high-molecular-weight agglutinin block adherence to experimental pellicles on hydroxyapatite and aggregation of *Streptococcus mutans*. *J Dent Res*. 1995;74(4):1040-7.
71. Carlson DM. Salivary proline-rich proteins: biochemistry, molecular biology, and regulation of expression. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993;4(3-4):495-502.
72. Carpenter GH. The secretion, components, and properties of saliva. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2013;4:267-76.
73. Carvalho PC, Fisher JSG, Degraive WM, Carvalho MGC. Marcadores séricos e espectrometria de massa no diagnóstico do câncer. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2006;42(6):431-436.
74. Castro RJ, Herrera R, Giacaman RA. Salivary protein characteristics from saliva of carious lesion free and high caries adults. *Acta Odontol Latinoam*. 2016;29(2):178-185.
75. Chang WI, Chang JY, Kim YY, Lee G, Kho HS. MUC1 expression in the oral mucosal epithelial cells of the elderly. *Arch Oral Biol*. 2011;56(9):885-90.
76. Channaveerappa D, Ngounou Wetie AG, Darie CC. Bottlenecks in Proteomics: An Update. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1140:753-769.
77. Chaves SCL, Almeida AMFL, Rossi TRA, Santana SF, Barros SG, Santos CML. Política de Saúde Bucal no Brasil 2003-2014: cenário, propostas, ações e resultados. *Cien Saude Colet*. 2017; 22(6):1791-1803.
78. Chawda JG, Chaduvula N, Patel HR, Jain SS, Lala AK. Salivary SIgA and dental caries activity. *Indian Pediatr*. 2011;48(9):719-21.

79. Chen W, Jiang Q, Yan G, Yang D. The oral microbiome and salivary proteins influence caries in children aged 6 to 8 years. *BMC Oral Health*. 2020;20(1):295.
80. Chen X, Wei S, Ji Y, Guo X, Yang F. Quantitative proteomics using SILAC: Principles, applications, and developments. *Proteomics*. 2015;15(18):3175-92.
81. Chen YY, Clancy KA, Burne RA. Streptococcus salivarius urease: genetic and biochemical characterization and expression in a dental plaque streptococcus. *Infect Immun*. 1996;64(2):585-92.
82. Chernushevich IV, Loboda AV, Thomson BA. An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 2001; 36(8):849-65.
83. Childers NK, Greenleaf C, Li F, Dasanayake AP, Powell WD, Michalek SM. Effect of age on immunoglobulin A subclass distribution in human parotid saliva. *Oral Microbiol Immunol*. 2003;18(5):298-301.
84. Chiou SH, Wu CY. Clinical proteomics: current status, challenges, and future perspectives. *Kaohsiung J Med Sci*. 2011 Jan;27(1):1-14.
85. Colombo NH, Kreling PF, Ribas LFF, Pereira JA, Kressirer CA, Klein MI, Tanner ACR, Duque C. Quantitative assessment of salivary oral bacteria according to the severity of dental caries in childhood. *Arch Oral Biol*. 2017 Nov;83:282-288.
86. Colombo NH, Pereira JA, da Silva ME, Ribas LF, Parisotto TM, Mattos-Graner Rde O, Smith DJ, Duque C. Relationship between the IgA antibody response against Streptococcus mutans GbpB and severity of dental caries in childhood. *Arch Oral Biol*. 2016a;67:22-7.
87. Colombo NH, Ribas LF, Pereira JA, Kreling PF, Kressirer CA, Tanner AC, et al. Antimicrobial peptides in saliva of children with severe early childhood caries. *Arch Oral Biol*. 2016b;69:40-6.
88. Corralo DJ, Ev LD, Damé-Teixeira N, Maltz M, Arthur RA, Do T, Fatturi Parolo CC. Functionally Active Microbiome in Supragingival Biofilms in Health and Caries. *Caries Res*. 2021;55(6):603-616.
89. Craft GE, Chen A, Nairn AC. Recent advances in quantitative neuroproteomics. *Methods*. 2013 Jun 15;61(3):186-218.
90. Davidopoulou S, Diza E, Menexes G, Kalfas S. Salivary concentration of the antimicrobial peptide LL-37 in children. *Arch Oral Biol*. 2012;57(7):865-9.
91. Dawes C, Pedersen AM, Villa A, Ekström J, Proctor GB, Vissink A, et al. The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. *Arch Oral Biol*. 2015;60(6):863-74.
92. Dawes C. Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *J Am Dent Assoc*. 2008;139 Suppl:18S-24S.

93. De Farias DG, Bezerra AC. Salivary antibodies, amylase and protein from children with early childhood caries. *Clin Oral Investig*. 2003;7(3):154-7.
94. Dibdin GH, Shellis RP. Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking the cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. *J Dent Res*. 1988;67(6):890-5.
95. Dodds MW, Edgar WM. Effects of dietary sucrose levels on pH fall and acid-anion profile in human dental plaque after a starch mouth-rinse. *Arch Oral Biol*. 1986;31(8):509-12.
96. Dodds MW, Johnson DA, Mobley CC, Hattaway KM. Parotid saliva protein profiles in caries-free and caries-active adults. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1997;83(2):244-51.
97. Doifode D, Damle SG. Comparison of salivary IgA levels in caries free and caries active children. *International Journal of Clinical Dental Science* 2011;2(1):10-14.
98. Douglas CW. The binding of human salivary alpha-amylase by oral strains of streptococcal bacteria. *Arch Oral Biol*. 1983;28(7):567-73.
99. Dowd FJ. Saliva and dental caries. *Dent Clin North Am*. 1999;43(4):579-97.
100. Dunn MJ. *Gel Electrophoresis of Proteins*. Oxford: Elsevier. 1986.
101. Eberhard J, Drosos Z, Tiemann M, Jepsen S, Schröder JM. Immunolocalization of lactoferrin in healthy and inflamed gingival tissues. *J Periodontol*. 2006;77(3):472-8.
102. Edgar WM. Saliva and dental health. Clinical implications of saliva: report of a consensus meeting. *Br Dent J*. 1990;169(3-4):96-8.
103. Edgar WM. The role of saliva in the control of pH changes in human dental plaque. *Caries Res*. 1976;10(4):241-54.
104. Eidt G, Waltermann EDM, Hilgert JB, Arthur RA. Candida and dental caries in children, adolescents and adults: A systematic review and meta-analysis. *Arch Oral Biol*. 2020;119:104876.
105. Ekström, J., Khosravani, N., Castagnola, M., Messina, I. (2017). Saliva and the Control of Its Secretion. In: Ekberg, O. (eds) *Dysphagia. Medical Radiology()*. Springer, Cham.
106. Eng JK, McCormack AL, Yates JR. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J Am Soc Mass Spectrom*. 1994;5(11):976-89.
107. Fábíán TK, Hermann P, Beck A, Fejérdy P, Fábíán G. Salivary defense proteins: their network and role in innate and acquired oral immunity. *Int J Mol Sci*. 2012;13(4):4295-4320.

108. Felizardo KR, Gonçalves RB, Schwarcz WD, Poli-Frederico RC, Maciel SM, Andrade FB. An evaluation of the expression profiles of salivary proteins lactoferrin and lysozyme and their association with caries experience and activity. *Revista Odonto Ciência* [online]. 2010;25(4):344-349.
109. Fernandez-Lopez S, Kim HS, Choi EC, Delgado M, Granja JR, Khasanov A, Kraehenbuehl K, Long G, Weinberger DA, Wilcoxon KM, Ghadiri MR. Antibacterial agents based on the cyclic D,L-alpha-peptide architecture. *Nature*. 2001;412(6845):452-5.
110. Fidalgo TKS, Freitas-Fernandes LB, Ammari M, Mattos CT, de Souza IP, Maia LC. The relationship between unspecific s-IgA and dental caries: a systematic review and meta-analysis. *J Dent*. 2014;42(11):1372-81.
111. Fidalgo TKS, Freitas-Fernandes LB, Angeli, R, Muniz MAS, Gonsalves E, Santos R, et al. Salivary metabolite signatures of children with and without dental caries lesions. *Metabolomics* 2013; 9:657–666.
112. Fonteles CS, Guerra MH, Ribeiro TR, Mendonça DN, de Carvalho CB, Monteiro AJ, et al. Association of free amino acids with caries experience and mutans streptococci levels in whole saliva of children with early childhood caries. *Arch Oral Biol*. 2009;54(1):80-5.
113. Fozo EM, Quivey RG Jr. Shifts in the membrane fatty acid profile of *Streptococcus mutans* enhance survival in acidic environments. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(2):929-36.
114. Frasseto F, Parisotto TM, Peres RC, Marques MR, Line SR, Nobre Dos Santos M. Relationship among salivary carbonic anhydrase VI activity and flow rate, biofilm pH and caries in primary dentition. *Caries Res*. 2012;46(3):194-200.
115. Frenkel ES, Ribbeck K. Salivary mucins protect surfaces from colonization by cariogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(1):332-8.
116. Frenkel ES, Ribbeck K. Salivary mucins in host defense and disease prevention. *J Oral Microbiol*. 2015;7:29759.
117. Frenkel ES, Ribbeck K. Suspensions of purified human MUC5B at physiological. Salivary mucins protect surfaces from colonization by cariogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 2015; 81:332-338.
118. Frenkel ES, Ribbeck K. Salivary mucins promote the coexistence of competing oral bacterial species. *ISME J*. 2017;11(5):1286-1290.
119. Frias AC, Antunes JLF, Narvai PC. Precisão e validade dos levantamentos epidemiológicos em saúde bucal: cárie dentária na cidade de São Paulo, 2002. *Rev Bras Epidemiol* 2004;7(2):144-153.

120. Gabryel-Porowska H, Gornowicz A, Bielawska A, Wójcicka A, Maciorkowska E, Grabowska SZ, Bielawski K. Mucin levels in saliva of adolescents with dental caries. *Med Sci Monit.* 2014;20:72-7.
121. Gafken PR, Lampe PD. Methodologies for characterizing phosphoproteins by mass spectrometry. *Cell Commun Adhes.* 2006;13(5-6):249-62.
122. Gan SD, Patel KR. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Invest Dermatol.* 2013;133(9):e12.
123. Ganeshnarayan K, Velliyagounder K, Furgang D, Fine DH. Human salivary cystatin SA exhibits antimicrobial effect against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res.* 2012;47(5):661-73.
124. Garrett JR. The proper role of nerves in salivary secretion: a review. *J Dent Res.* 1987;66(2):387-97.
125. GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet.* 2018;392(10159):1789-1858.
126. Gibbins HL, Proctor GB, Yakubov GE, Wilson S, Carpenter GH. Concentration of salivary protective proteins within the bound oral mucosal pellicle. *Oral Dis.* 2014;20(7):707-13.
127. Gibbons RJ, de Stoppelaar JD, Harden L. Lysozyme insensitivity of bacteria indigenous to the oral cavity of man. *J Dent Res.* 1966;45(3):877-81.
128. Gibbons RJ, Hay DI. Adsorbed salivary acidic proline-rich proteins contribute to the adhesion of *Streptococcus mutans* JBP to apatitic surfaces. *J Dent Res.* 1989;68(9):1303-7.
129. Gibbons RJ, Hay DI. Human salivary acidic proline-rich proteins and statherin promote the attachment of *Actinomyces viscosus* LY7 to apatitic surfaces. *Infect Immun.* 1988;56(2):439-45.
130. Gibbons RJ, Hay DI, Schlesinger DH. Delineation of a segment of adsorbed salivary acidic proline-rich proteins which promotes adhesion of *Streptococcus gordonii* to apatitic surfaces. *Infect Immun.* 1991;59(9):2948-54.
131. Golpasand Hagh L, Zakavi F, Ansarifard S, Ghasemzadeh O, Solgi G. Association of dental caries and salivary sIgA with tobacco smoking. *Aust Dent J.* 2013;58(2):219-23.
132. Gong K, Mailloux L, Herzberg MC. Salivary film expresses a complex, macromolecular binding site for *Streptococcus sanguis*. *J Biol Chem.* 2000;275(12):8970-4.

133. Gordan VV, Garvan CW, Ottenga ME, Schulte R, Harris PA, McEdward D, Magnusson I. Could alkali production be considered an approach for caries control? *Caries Res.* 2010;44(6):547-54.
134. Gornowicz A, Tokajuk G, Bielawska A, Maciorkowska E, Jabłoński R, Wójcicka A, Bielawski K. The assessment of sIgA, histatin-5, and lactoperoxidase levels in saliva of adolescents with dental caries. *Med Sci Monit.* 2014;20:1095-100.
135. Grassl N, Kulak NA, Pichler G, Geyer PE, Jung J, Schubert S, Sinitcyn P, Cox J, Mann M. Ultra-deep and quantitative saliva proteome reveals dynamics of the oral microbiome. *Genome Med.* 2016;8(1):44.
136. Grogan J, McKnight CJ, Troxler RF, Oppenheim FG. Zinc and copper bind to unique sites of histatin 5. *FEBS Lett.* 2001;491(1-2):76-80.
137. Grönblad EA. Concentration of immunoglobulins in human whole saliva: effect of physiological stimulation. *Acta Odontol Scand.* 1982;40(2):87-95.
138. Guedes SFF, Neves BG, Bezerra DS, Souza GHMF, Lima-Neto ABM, Guedes MIF, et al. Saliva proteomics from children with caries at different severity stages. *Oral Dis.* 2020;26(6):1219-1229.
139. Gusman H, Travis J, Helmerhorst EJ, Potempa J, Troxler RF, Oppenheim FG. Salivary histatin 5 is an inhibitor of both host and bacterial enzymes implicated in periodontal disease. *Infect Immun.* 2001;69(3):1402-8.
140. Gustafsson JO, Oehler MK, Ruszkiewicz A, McColl SR, Hoffmann P. MALDI Imaging Mass Spectrometry (MALDI-IMS)-application of spatial proteomics for ovarian cancer classification and diagnosis. *Int J Mol Sci.* 2011;12(1):773-94.
141. Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol.* 1999;17(10):994-9.
142. Gyurko C, Lendenmann U, Helmerhorst EJ, Troxler RF, Oppenheim FG. Killing of *Candida albicans* by histatin 5: cellular uptake and energy requirement. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2001 Sep;79(3-4):297-309.
143. Haeri-Araghi H, Zarabadipour M, Safarzadeh-Khosroshahi S, Mirzadeh M. Evaluating the relationship between dental caries number and salivary level of IgA in adults. *J Clin Exp Dent.* 2018;10(1):e66-e69.
144. Hage DS, Anguizola JA, Bi C, Li R, Matsuda R, Papastavros E, Pfaunmiller E, Vargas J, Zheng X. Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: recent trends and developments. *J Pharm Biomed Anal.* 2012;69:93-105.
145. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res.* 1999 Oct;31(4):261-72.

146. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev.* 1980;44(2):331-84.
147. Hannig C, Attin T, Hannig M, Henze E, Brinkmann K, Zech R. Immobilisation and activity of human alpha-amylase in the acquired enamel pellicle. *Arch Oral Biol.* 2004;49(6):469-75.
148. Hannig C, Hannig M, Attin T. Enzymes in the acquired enamel pellicle. *Eur J Oral Sci.* 2005;113(1):2-13.
149. Hannig C, Hannig M, Kensche A, Carpenter G. The mucosal pellicle - An underestimated factor in oral physiology. *Arch Oral Biol.* 2017;80:144-152.
150. Hay DI, Schlesinger DH. Calcium Binding Proteins and Calcium Function. New York: Elsevier North-Holland. 1977. Human salivary statherin. A peptide inhibitor of calcium phosphate precipitation. p.401-408.
151. Hegde AM, Rai K, Padmanabhan V. Total antioxidant capacity of saliva and its relation with early childhood caries and rampant caries. *J Clin Pediatr Dent.* 2009;33(3):231-4.
152. Hegde MN, Attavar SH, Shetty N, Hegde ND, Hegde NN. Saliva as a biomarker for dental caries: A systematic review. *J Conserv Dent.* 2019;22(1):2-6.
153. Hegde MN, Hegde ND, Ashok A, Shetty S. Biochemical indicators of dental caries in saliva: an in vivo study. *Caries Res.* 2014a;48(2):170-3.
154. Hegde MN, Bhat R, Punja A, Shetty C. Correlation between Dental Caries and Salivary Albumin in Adult Indian Population—An In Vivo Study. *JAMMR* 2014b; 4(25):4238-44.
155. Hegde MN, Hegde ND, Ashok A, Shetty S. Evaluation of total antioxidant capacity of saliva and serum in caries-free and caries-active adults: an in-vivo study. *Indian J Dent Res.* 2013a;24(2):164-7.
156. Hegde MN, Kumari S, Hegde ND, Shetty SS. Myeloperoxidase and Glutathione Peroxidase Activity of Saliva and Serum in Adults with Dental Caries: A Comparative Study. *The Journal of Free Radicals and Antioxidants.* 2013b;139:175-180.
157. Hegde MN, Shetty CM, Shetty A, Darshana D. Correlation between dental caries and salivary immunoglobulin in adult Indian population: An in vivo study. *Journal of Restorative Dentistry* 2013c;1(1); 22-25.
158. Hedenbjörk-Lager A, Bjørndal L, Gustafsson A, Sorsa T, Tjäderhane L, Åkerman S, et al. Caries correlates strongly to salivary levels of matrix metalloproteinase-8. *Caries Res.* 2015;49(1):1-8.
159. Hemadi AS, Huang R, Zhou Y, Zou J. Salivary proteins and microbiota as biomarkers for early childhood caries risk assessment. *Int J Oral Sci.* 2017;9(11):e1.

160. Henskens YM, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Cystatins in health and disease. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1996;377(2):71-86.
161. Hoogendoorn H, Piessens JP, Scholtes W, Stoddard LA. Hypothiocyanite ion; the inhibitor formed by the system lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide. I. Identification of the inhibiting compound. *Caries Res*. 1977;11(2):77-84.
162. Hu Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M, Graham Cooks R. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom*. 2005;40(4):430-43.
163. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent*. 2001;85(2):162-9.
164. Ihalin R, Loimaranta V, Tenovuo J. Origin, structure, and biological activities of peroxidases in human saliva. *Arch Biochem Biophys*. 2006;445(2):261-8.
165. Inoue H, Ono K, Masuda W, Morimoto Y, Tanaka T, Yokota M, Inenaga K. Gender difference in unstimulated whole saliva flow rate and salivary gland sizes. *Arch Oral Biol*. 2006;51(12):1055-60.
166. Iontcheva I, Oppenheim FG, Troxler RF. Human salivary mucin MG1 selectively forms heterotypic complexes with amylase, proline-rich proteins, statherin, and histatins. *J Dent Res*. 1997;76(3):734-43.
167. Ismail AI, Sohn W, Tellez M, Amaya A, Sen A, Hasson H, Pitts NB. The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2007 Jun;35(3):170-8.
168. Izutsu KT. Theory and Measurement of the buffer value of bicarbonate in saliva. *J Theor Biol*. 1981 Jun 7;90(3):397-403.
169. Jablonski-Momeni A, Stachniss V, Ricketts DN, Heinzl-Gutenbrunner M, Pieper K. Reproducibility and accuracy of the ICDAS-II for detection of occlusal caries in vitro. *Caries Res*. 2008;42(2):79-87.
170. Jagadesh Babu B, Venugopal Reddy N, Thimma Reddy B, Daneswari V, Puppala N. Comparative evaluation of salivary IgA levels and dental caries in obese and non-obese children. *Int J Adv Res*. 2017; 5(1): 766–72.
171. Jungbauer A, Hahn R. *Methods in Enzymology*. Massachusetts: Elsevier. 2009. Ion-exchange chromatography. p.349-371.
172. Jurczak A, Kościelniak D, Papież M, Vyhouskaya P, Krzyściak W. A study on β -defensin-2 and histatin-5 as a diagnostic marker of early childhood caries progression. *Biol Res*. 2015;48:61.
173. Jurczak A, Kościelniak D, Skalniak A, Papież M, Vyhouskaya P, Krzyściak W. The role of the saliva antioxidant barrier to reactive oxygen species with regard to caries development. *Redox Rep*. 2017;22(6):524-533.

174. Kadoya Y, Kuwahara H, Shimazaki M, Ogawa Y, Yagi T. Isolation of a novel carbonic anhydrase from human saliva and immunohistochemical demonstration of its related isozymes in salivary gland. *Osaka City Med J.* 1987;33(1):99-109.
175. Karthika G, Jogendra Avula SS, Sridevi E, Pranitha K, Sankar KS, Nayak P. Assessing Vitamin E and Glutathione Peroxidase Levels in Salivary Samples of Children with and without Dental Caries. *Journal of Clinical & Diagnostic Research [Internet].* 2021;15(6):6–9.
176. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. *J Dent Res.* 2015;94(5):650-8.
177. Kauffman D, Hofmann T, Bennick A, Keller P. Basic proline-rich proteins from human parotid saliva: complete covalent structures of proteins IB-1 and IB-6. *Biochemistry.* 1986;25(9):2387-92.
178. Kavanaugh NL, Zhang AQ, Nobile CJ, Johnson AD, Ribbeck K. Mucins suppress virulence traits of *Candida albicans*. *mBio.* 2014;5(6):e01911.
179. Khan ZM, Waheed H, Khurshid Z, Zafar MS, Moin SF, Alam MK. Differentially Expressed Salivary Proteins in Dental Caries Patients. *Biomed Res Int.* 2021;2021:5517521.
180. Kho HS, Kim YY, Chang JY, Kim MJ, Lee SG. Candidacidal activities of the glucose oxidase-mediated lactoperoxidase system. *Arch Oral Biol.* 2012;57(6):684-8.
181. Kilian M, Reinholdt J, Lomholt H, Poulsen K, Frandsen EV. Biological significance of IgA1 proteases in bacterial colonization and pathogenesis: critical evaluation of experimental evidence. *APMIS.* 1996;104(5):321-38.
182. Kimoto M, Kishino M, Yura Y, Ogawa Y. A role of salivary carbonic anhydrase VI in dental plaque. *Arch Oral Biol.* 2006;51(2):117-22.
183. Kirkeby S, Moe D, Bardow A. MUC1 and the simple mucin-type antigens: Tn and Sialyl-Tn are differently expressed in salivary gland acini and ducts from the submandibular gland, the vestibular folds, and the soft palate. *Arch Oral Biol.* 2010;55(11):830-41.
184. Kivelä J, Laine M, Parkkila S, Rajaniemi H. Salivary carbonic anhydrase VI and its relation to salivary flow rate and buffer capacity in pregnant and non-pregnant women. *Arch Oral Biol.* 2003;48(8):547-51.
185. Kivelä J, Parkkila S, Parkkila AK, Leinonen J, Rajaniemi H. Salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI. *J Physiol.* 1999a;520 Pt 2(Pt 2):315-20.
186. Kivelä J, Parkkila S, Parkkila AK, Rajaniemi H. A low concentration of carbonic anhydrase isoenzyme VI in whole saliva is associated with caries prevalence. *Caries Res.* 1999b;33(3):178-84.

187. Klein H, Palmer CE. Dental caries in American Indian children. *Public Health Bull.* 1937; (239): 1-54.
188. Korkmaz B, Horwitz MS, Jenne DE, Gauthier F. Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. *Pharmacol Rev.* 2010;62(4):726-59.
189. Korsrud FR, Brandtzaeg P. Characterization of epithelial elements in human major salivary glands by functional markers: localization of amylase, lactoferrin, lysozyme, secretory component, and secretory immunoglobulins by paired immunofluorescence staining. *J Histochem Cytochem.* 1982;30(7):657-66.
190. Kullaa AM, Asikainen P, Herrala M, Ukkonen H, Mikkonen JJ. Microstructure of oral epithelial cells as an underlying basis for salivary mucosal pellicle. *Ultrastruct Pathol.* 2014;38(6):382-6.
191. Kuriakose S, Sundaresan C, Mathai V, Khosla E, Gaffoor FM. A comparative study of salivary buffering capacity, flow rate, resting pH, and salivary Immunoglobulin A in children with rampant caries and caries-resistant children. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2013;31(2):69-73.
192. Kurien B, Scofield R. Western blotting. *Methods* 2006; 38(4):283-293.
193. Lagerlöf F, Oliveby A. Caries-protective factors in saliva. *Adv Dent Res.* 1994;8(2):229-38.
194. Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 2009;30(3):131-41.
195. Lamberts BL, Pruitt KM, Pederson ED, Golding MP. Comparison of salivary peroxidase system components in caries-free and caries-active naval recruits. *Caries Res.* 1984;18(6):488-94.
196. Laputková G, Bencková M, Alexovič M, Schwartzová V, Talian I, Sabo J. Proteomic and bioinformatics analysis of human saliva for the dental-risk assessment. *Open Life Sciences* [Internet]. 2017;12(1):248–65.
197. Leinonen J, Kivelä J, Parkkila S, Parkkila AK, Rajaniemi H. Salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI is located in the human enamel pellicle. *Caries Res.* 1999;33(3):185-90.
198. Leito JT, Ligtenberg AJ, Nazmi K, Veerman EC. Identification of salivary components that induce transition of hyphae to yeast in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2009;9(7):1102-10.
199. Lemos JA, Abranches J, Burne RA. Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses. *Curr Issues Mol Biol.* 2005;7(1):95-107.
200. Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem.* 2005 Dec;51(12):2415-8.

201. Lertsirivorakul J, Petsongkram B, Chaiyarit P, Klaynongsruang S, Pitiphat W. Salivary Lysozyme in Relation to Dental Caries among Thai Preschoolers. *J Clin Pediatr Dent*. 2015;39(4):343-7.
202. Letieri ADS, Freitas-Fernandes LB, Valente APC, Fidalgo TKDS, de Souza IPR. Longitudinal Evaluation of Salivary Iga-S in Children with Early Childhood Caries Before and After Restorative Treatment. *J Clin Pediatr Dent*. 2019;43(4):239-243.
203. Levine MJ, Reddy MS, Tabak LA, Loomis RE, Bergey EJ, Jones PC, Cohen RE, Stinson MW, Al-Hashimi I. Structural aspects of salivary glycoproteins. *J Dent Res*. 1987;66(2):436-41.
204. Ligtenberg AJ, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. A role for Lewis a antigens on salivary agglutinin in binding to *Streptococcus mutans*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2000;77(1):21-30.
205. Lilienthal B. An analysis of the buffer systems in saliva. *J Dent Res*. 1955;34(4):516-30.
206. Li L, Tanzer JM, Scannapieco FA. Identification and analysis of the amylase-binding protein B (AbpB) and gene (abpB) from *Streptococcus gordonii*. *FEMS Microbiol Lett*. 2002;212(2):151-7.
207. Lindh E, Brännström J, Jones P, Wermeling F, Hässler S, Betterle C, Garty BZ, Stridsberg M, Herrmann B, Karlsson MC, Winqvist O. Autoimmunity and cystatin SA1 deficiency behind chronic mucocutaneous candidiasis in autoimmune polyendocrine syndrome type 1. *J Autoimmun*. 2013;42:1-6.
208. Li X, Wang L, Nunes DP, Troxler RF, Offner GD. Pro-inflammatory cytokines up-regulate MUC1 gene expression in oral epithelial cells. *J Dent Res*. 2003;82(11):883-7.
209. Li XS, Reddy MS, Baev D, Edgerton M. *Candida albicans* Ssa1/2p is the cell envelope binding protein for human salivary histatin 5. *J Biol Chem*. 2003;278(31):28553-61.
210. Liu B, Lague JR, Nunes DP, Toselli P, Oppenheim FG, Soares RV, Troxler RF, Offner GD. Expression of membrane-associated mucins MUC1 and MUC4 in major human salivary glands. *J Histochem Cytochem*. 2002;50(6):811-20.
211. Liu Y, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J, Pashley DH, Tay FR. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *J Dent Res*. 2011;90(8):953-68.
212. Liu YL, Nascimento M, Burne RA. Progress toward understanding the contribution of alkali generation in dental biofilms to inhibition of dental caries. *Int J Oral Sci*. 2012;4(3):135-40.
213. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*. 1986;50(4):353-80.

214. Loomis RE, Prakobphol A, Levine MJ, Reddy MS, Jones PC. Biochemical and biophysical comparison of two mucins from human submandibular-sublingual saliva. *Arch Biochem Biophys*. 1987;258(2):452-64.
215. Lumikari M, Soukka T, Nurmio S, Tenovu J. Inhibition of the growth of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus casei* by oral peroxidase systems in human saliva. *Arch Oral Biol*. 1991;36(2):155-60.
216. Lundmark A, Johannsen G, Eriksson K, Kats A, Jansson L, Tervahartiala T, Rathnayake N, Åkerman S, Klinge B, Sorsa T, Yucel-Lindberg T. Mucin 4 and matrix metalloproteinase 7 as novel salivary biomarkers for periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2017;44(3):247-254.
217. Luo J, Wang Y, Wang K, Jiang W, Li X, Zhang L. Comparative proteomic analysis on acquired enamel pellicle at two time points in caries-susceptible and caries-free subjects. *J Dent*. 2020;94:103301.
218. Luthfi M, Setijanto D, Rahardjo MB, Indrawati R, Rachmadi P, Ruth MSMA, et al. Correlation between human neutrophil peptide 1-3 secretion and azurophilic granule (CD63) expression in early childhood caries. *Dent Res J (Isfahan)*. 2019;16(2):81-86.
219. Macedo LZ, Ammari MM. Cárie da primeira infância: conhecer para prevenir. *Rev Rede Cuidados em Saúde* 2014;8(3); 1-14.
220. MacKay BJ, Denepitiya L, Iacono VJ, Krost SB, Pollock JJ. Growth-inhibitory and bactericidal effects of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *Streptococcus mutans*. *Infect Immun*. 1984;44(3):695-701.
221. Mahjoub S, Ghasempour M, Gharage A, Bijani A, Masrourroudsari J. Comparison of total antioxidant capacity in saliva of children with severe early childhood caries and caries-free children. *Caries Res*. 2014;48(4):271-5.
222. Makawi Y, El-Masry E, El-Din HM. Salivary carbonic anhydrase, pH and phosphate buffer concentrations as potential biomarkers of caries risk in children. *J Unexplored Med Data* 2017;2:9-15.
223. Malcolm J, Sherriff A, Lappin DF, Ramage G, Conway DI, Macpherson LM, Culshaw S. Salivary antimicrobial proteins associate with age-related changes in streptococcal composition in dental plaque. *Mol Oral Microbiol*. 2014;29(6):284-93.
224. Mancone C, Ciccocanti F, Montaldo C, Perdomo AB, Piacentini M, Alonzi T, Fimia GM, Tripodi M. Applying proteomic technology to clinical virology. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(1):23-28.
225. Manconi B, Liori B, Cabras T, Vincenzoni F, Iavarone F, Castagnola M, Messana I, Olianias A. Salivary Cystatins: Exploring New Post-Translational Modifications and Polymorphisms by Top-Down High-Resolution Mass Spectrometry. *J Proteome Res*. 2017;16(11):4196-4207.

226. Mandel ID, Behrman J, Levy R, Weinstein D. The salivary lactoperoxidase system in caries-resistant and -susceptible adults. *J Dent Res.* 1983;62(8):922-5.
227. Mandel ID. Impact of saliva on dental caries. *Compend Suppl.* 1989;(13):S476-81.
228. Mandel ID. Nonimmunologic aspects of caries resistance. *J Dent Res.* 1976 Apr;55 Spec No:C22-31.
229. Mandel ID. The functions of saliva. *J Dent Res.* 1987;66:623-7.
230. Mandel ID, Zorn M, Ruiz R, Thompson RH Jr, Ellison SA. The proteins and protein-bound carbohydrates of parotid saliva in caries-immune and caries-active adults. *Arch Oral Biol.* 1965;10(3):471-5.
231. Marr AK, Gooderham WJ, Hancock RE. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr Opin Pharmacol.* 2006;6(5):468-72.
232. Martins C, Buczynski AK, Maia LC, Siqueira WL, Castro GF. Salivary proteins as a biomarker for dental caries--a systematic review. *J Dent.* 2013;41(1):2-8.
233. Martins-Júnior PA, Vieira-Andrade RG, Corrêa-Faria P, Oliveira-Ferreira F, Marques LS, Ramos-Jorge ML. Impact of early childhood caries on the oral health-related quality of life of preschool children and their parents. *Caries Res.* 2013;47(3):211-8.
234. Masson PL, Heremans JF, Schonke E. Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *J Exp Med.* 1969;130(3):643-58.
235. Mathew A, Mn P, Menon PK, Radeideh A, Varma S, Thomas S, Varughese N, Hamed GM. A Clinical Study on the Circadian Rhythm of Salivary Cortisol on Aggressive Periodontitis and Its Correlation with Clinical Parameters using Electrochemiluminescence Immunoassay Method. *J Contemp Dent Pract.* 2019;20(4):482-488.
236. Matsuzaki K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1788(8):1687-92.
237. May C, Brosseron F, Chartowski P, Schumbrutzki C, Schoenebeck B, Marcus K. Instruments and methods in proteomics. *Methods Mol Biol.* 2011;696:3-26.
238. Mehansho H, Butler LG, Carlson DM. Dietary tannins and salivary proline-rich proteins: interactions, induction, and defense mechanisms. *Annu Rev Nutr.* 1987;7:423-40.
239. Mehrotra R, Thornton DJ, Sheehan JK. Isolation and physical characterization of the MUC7 (MG2) mucin from saliva: evidence for self-association. *Biochem J.* 1998;334 (Pt 2)(Pt 2):415-22.

240. Melino S, Gallo M, Trotta E, Mondello F, Paci M, Petruzzelli R. Metal-binding and nuclease activity of an antimicrobial peptide analogue of the salivary histatin 5. *Biochemistry*. 2006;45(51):15373-83.
241. Memarzadeh Zahedani M, Schwahn C, Baguhl R, Kocher T, Below H, Welk A. Association of salivary peroxidase activity and concentration with periodontal health: A validity study. *J Clin Periodontol*. 2017;44(8):803-812.
242. Mese H, Matsuo R. Salivary secretion, taste and hyposalivation. *J Oral Rehabil*. 2007;34(10):711-23.
243. Mikola H, Waris M, Tenovuo J. Inhibition of herpes simplex virus type 1, respiratory syncytial virus and echovirus type 11 by peroxidase-generated hypothiocyanite. *Antiviral Res*. 1995;26(2):161-71.
244. Miyasaki KT, Nemirovskiy E. Myeloperoxidase isoform activities released by human neutrophils in response to dental and periodontal bacteria. *Oral Microbiol Immunol*. 1997;12(1):27-32.
245. Moncada G, Maureira J, Neira M, Reyes E, Oliveira Junior OB, Faleiros S, et al. Salivary Urease and ADS Enzymatic Activity as Endogenous Protection against Dental Caries in Children. *J Clin Pediatr Dent*. 2015;39(4):358-63.
246. Monea M, Vlad R, Stoica A. Analysis of salivary level of alpha-amylase as a risk factor for dental caries. *Acta Med Transilvanica*. 2018; 23(1): 93–5.
247. Moslemi M, Sattari M, Kooshki F, Fotuhi F, Modarresi N, Khalili Sadrabad Z, et al. Relationship of Salivary Lactoferrin and Lysozyme Concentrations with Early Childhood Caries. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2015;9(2):109-14.
248. Muchandi S, Walimbe H, Bijle MN, Nankar M, Chaturvedi S, Karekar P. Comparative evaluation and correlation of salivary total antioxidant capacity and salivary pH in caries-free and severe early childhood caries children. *J Contemp Dent Pract*. 2015;16(3):234-7.
249. Murray NJ, Williamson MP. Conformational study of a salivary proline-rich protein repeat sequence. *Eur J Biochem*. 1994;219(3):915-21.
250. Murugesappa DG, Math SY, Kalra D, Chandrappa PR, Pateel DGS. Microbial, Biochemical & Immunological Assessment of Dental Caries. *Annals of Medical & Health Sciences Research [Internet]*. 2018;8(5):336–9.
251. Nakano M, Shimizu E, Wakabayashi H, Yamauchi K, Abe F. A randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled clinical trial to assess effects of the single ingestion of a tablet containing lactoferrin, lactoperoxidase, and glucose oxidase on oral malodor. *BMC Oral Health*. 2016;16:37.
252. Nascimento MM, Gordan VV, Garvan CW, Browngardt CM, Burne RA. Correlations of oral bacterial arginine and urea catabolism with caries experience. *Oral Microbiol Immunol*. 2009;24(2):89-95.

253. Nascimento MM, Liu Y, Kalra R, Perry S, Adewumi A, Xu X, et al. Oral arginine metabolism may decrease the risk for dental caries in children. *J Dent Res*. 2013;92(7):604-8.
254. Naspitz GM, Nagao AT, Mayer MP, Carneiro-Sampaio MM. Anti-Streptococcus mutans antibodies in saliva of children with different degrees of dental caries. *Pediatr Allergy Immunol*. 1999 ;10(2):143-8.
255. Nawaz A, Batool H, Kashif M, Abbas A, Shahzad F, Tahir R, et al. Immune profiling of saliva in patients with and without dental caries. *Bangladesh J Med Sci*. 2019; 18(3): 536–9.
256. Newbrun E. Sucrose, the arch criminal of dental caries. *Odontol Revy*. 1967;18(4):373-86.
257. Nguyen S, Fenn JB. Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(4):1111-7.
258. Nielsen PA, Bennett EP, Wandall HH, Therkildsen MH, Hannibal J, Clausen H. Identification of a major human high molecular weight salivary mucin (MG1) as tracheobronchial mucin MUC5B. *Glycobiology*. 1997;7(3):413-9.
259. Nikawa H, Samaranayake LP, Tenovuo J, Pang KM, Hamada T. The fungicidal effect of human lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Arch Oral Biol*. 1993;38(12):1057-63.
260. Ninfa AJ, Ballou DP, Benoré M. *Abordagens Laboratoriais Fundamentais para Bioquímica e Biotecnologia*. 2 ed. Wiley. p.133, 2009.
261. Nireeksha, Hegde MN, Kumari NS, Ullal H, Kedilaya V. Salivary proteins as biomarkers in dental caries: *In vivo* study. *Dent Oral Craniofac Res*. 2017;3(2):1-7.
262. Nishikata M, Kanehira T, Oh H, Tani H, Tazaki M, Kuboki Y. Salivary histatin as an inhibitor of a protease produced by the oral bacterium *Bacteroides gingivalis*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;174(2):625-30.
263. Nobre dos Santos M, Melo dos Santos L, Francisco SB, Cury JA. Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition. *Caries Res*. 2002;36(5):347-52.
264. Nováková, Lucie, Ludmila Matysová and Petr Solich. "Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis." *Talanta* 2006; 68(3):908-18.
265. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*. 1975;250(10):4007-21.
266. Old WM, Meyer-Arendt K, Aveline-Wolf L, Pierce KG, Mendoza A, Sevinsky JR, Resing KA, Ahn NG. Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2005 Oct;4(10):1487-502.

267. Omar OM, Khattab NM, Rashed LA. Glucosyltransferase B, immunoglobulin a, and caries experience among a group of Egyptian preschool children. *J Dent Child (Chic)*. 2012;79(2):63-8.
268. Oppenheim FG, Helmerhorst EJ, Lendenmann U, Offner GD. Anti-candidal activity of genetically engineered histatin variants with multiple functional domains. *PLoS One*. 2012;7(12):e51479.
269. Oppenheim FG, Xu T, McMillian FM, Levitz SM, Diamond RD, Offner GD, Troxler RF. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *J Biol Chem*. 1988;263(16):7472-7.
270. Orstavik D, Kraus FW. The acquired pellicle: immunofluorescent demonstration of specific proteins. *J Oral Pathol*. 1973;2(1):68-76.
271. Ormond C, Douglas G, Pitts N. The use of the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) in a National Health Service general dental practice as part of an oral health assessment. *Prim Dent Care*. 2010 Oct;17(4):153-59.
272. Oztürk LK, Furuncuoğlu H, Atala MH, Uluköylü O, Akyüz S, Yarat A. Association between dental-oral health in young adults and salivary glutathione, lipid peroxidation and sialic acid levels and carbonic anhydrase activity. *Braz J Med Biol Res*. 2008;41(11):956-9.
273. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*. 2021;372:n71.
274. Pal S, Mitra M, Mishra J, Saha S, Bhattacharya B. Correlation of total salivary secretory immunoglobulin A (SIgA) and mutans specific SIgA in children having different caries status. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2013;31(4):270-4.
275. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 2000;405(6788):837-46.
276. Pandey P, Reddy NV, Rao VA, Saxena A, Chaudhary CP. Estimation of salivary flow rate, pH, buffer capacity, calcium, total protein content and total antioxidant capacity in relation to dental caries severity, age and gender. *Contemp Clin Dent*. 2015;6(Suppl 1):S65-71.
277. Pandey S, Goel M, Nagpal R, Kar A, Rapsang E, Matani P. Evaluation of Total Salivary Secretory Immunoglobulin A and Mutans-specific SIgA among Children having Dissimilar Caries Status. *J Contemp Dent Pract*. 2018;19(6):651-655.
278. Pani SC. The Relationship between Salivary Total Antioxidant Capacity and Dental Caries in Children: A Meta-Analysis with Assessment of Moderators. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2018;8(5):381-385.

279. Parisotto TM, King WF, Duque C, Mattos-Graner RO, Steiner-Oliveira C, Nobre-Dos-Santos M, et al. Immunological and microbiologic changes during caries development in young children. *Caries Res.* 2011;45(4):377-85.
280. Parkkila S, Kaunisto K, Rajaniemi L, Kumpulainen T, Jokinen K, Rajaniemi H. Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzymes VI, II, and I in human parotid and submandibular glands. *J Histochem Cytochem.* 1990;38(7):941-7.
281. Parkkila S, Parkkila AK, Rajaniemi H. Circadian periodicity in salivary carbonic anhydrase VI concentration. *Acta Physiol Scand.* 1995;154(2):205-11.
282. Pastorekova S, Parkkila S, Pastorek J, Supuran CT. Carbonic anhydrases: current state of the art, therapeutic applications and future prospects. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2004;19(3):199-229.
283. Patankar SR, Vibhakar PA, Yadav M.R, Vibhakar PA. Salivary total protein levels and their correlation to dental caries. "International Journal of Oral & Maxillofacial Pathology 2013; 4(3): 13-6.
284. Patel M, Pujara P. Total Antioxidant Capacity of Saliva and Its Relationship with Early Childhood Caries and Rampant Caries. *International Journal of Science and Research* 2015;4(7):219-222.
285. Pedersen A, Sørensen CE, Proctor GB, Carpenter GH. Salivary functions in mastication, taste and textural perception, swallowing and initial digestion. *Oral Dis.* 2018;24(8):1399-1416.
286. Pedersen AM, Bardow A, Nauntofte B. Salivary changes and dental caries as potential oral markers of autoimmune salivary gland dysfunction in primary Sjogren's syndrome. *BMC Clin Pathol.* 2005;5(1):4.
287. Peltzer K, Mongkolchat A. Severe early childhood caries and social determinants in three-year-old children from Northern Thailand: a birth cohort study. *BMC Oral Health.* 2015;15:108.
288. Peres MA, Macpherson LMD, Weyant RJ, Daly B, Venturelli R, Mathur MR, Listl S, Celeste RK, Guarnizo-Herreño CC, Kearns C, Benzian H, Allison P, Watt RG. Oral diseases: a global public health challenge. *Lancet.* 2019;394(10194):249-260.
289. Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis.* 1999;20(18):3551-67.
290. Peters BM, Shirliff ME, Jabra-Rizk MA. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathog.* 2010;6(10):e1001067.
291. Pereira JL, Duarte D, Carneiro TJ, Ferreira S, Cunha B, Soares D, et al. Saliva NMR metabolomics: Analytical issues in pediatric oral health research. *Oral Dis.* 2019;25(6):1545-1554.

292. Phattarataratip E, Olson B, Broffitt B, Qian F, Brogden KA, Drake DR, et al. *Streptococcus mutans* strains recovered from caries-active or caries-free individuals differ in sensitivity to host antimicrobial peptides. *Mol Oral Microbiol*. 2011;26(3):187-99.
293. Picco DCR, Lopes LM, Rocha Marques M, Line SRP, Parisotto TM, Nobre Dos Santos M. Children with a Higher Activity of Carbonic Anhydrase VI in Saliva Are More Likely to Develop Dental Caries. *Caries Res*. 2017;51(4):394-401.
294. Picco DCR, Marangoni-Lopes L, Parisotto TM, Mattos-Graner R, Nobre-Dos-Santos M. Activity of Carbonic Anhydrase VI is Higher in Dental Biofilm of Children with Caries. *Int J Mol Sci*. 2019;20(11):2673.
295. Piekoszewska-Ziętek P, Turska-Szybka A, Olczak-Kowalczyk D. Salivary proteins and peptides in the aetiology of caries in children: Systematic literature review. *Oral Dis*. 2019;25(4):1048-1056.
296. Piludu M, Rayment SA, Liu B, Offner GD, Oppenheim FG, Troxler RF, Hand AR. Electron microscopic immunogold localization of salivary mucins MG1 and MG2 in human submandibular and sublingual glands. *J Histochem Cytochem*. 2003;51(1):69-79.
297. Pitts N. Introduction. Detection, Assessment, Diagnosis and Monitoring of Caries. *Monographs in Oral Science*. 2009, 21:1-15.
298. Pitts NB. The diagnosis of dental caries: 3. Rationale and overview of present and possible future techniques. *Dent Update*. 1992 Jan-Feb;19(1):32, 34, 37-8.
299. Pitts N. "ICDAS"--an international system for caries detection and assessment being developed to facilitate caries epidemiology, research and appropriate clinical management. *Community Dent Health*. 2004 Sep;21(3):193-8.
300. Pitts NB, Fyffe HE. The effect of varying diagnostic thresholds upon clinical caries data for a low prevalence group. *J Dent Res*. 1988 Mar;67(3):592-6.
301. Prabhakar A, Dodawad R, Os R. Evaluation of Flow Rate, pH, Buffering Capacity, Calcium, Total Protein and Total Antioxidant Levels of Saliva in Caries Free and Caries Active Children-An In Vivo Study. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2009;2(1):9-12.
302. Pramanik R, Osailan SM, Challacombe SJ, Urquhart D, Proctor GB. Protein and mucin retention on oral mucosal surfaces in dry mouth patients. *Eur J Oral Sci*. 2010;118(3):245-53.
303. Preethi BP, Reshma D, Anand P. Evaluation of Flow Rate, pH, Buffering Capacity, Calcium, Total Proteins and Total Antioxidant Capacity Levels of Saliva in Caries Free and Caries Active Children: An In Vivo Study. *Indian J Clin Biochem*. 2010;25(4):425-8.

304. Preza D, Thiede B, Olsen I, Grinde B. The proteome of the human parotid gland secretion in elderly with and without root caries. *Acta Odontol Scand*. 2009;67(3):161-9.
305. Priya PR, Asokan S, Karthick K, Reddy NV, Rao VA. Effect of dental treatments on salivary immunoglobulin A of children with and without dental caries: a comparative study. *Indian J Dent Res*. 2013;24(3):394.
306. Proctor GB, Carpenter GH. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. *Auton Neurosci*. 2007 Apr 30;133(1):3-18.
307. Pyati SA, Naveen Kumar R, Kumar V, Praveen Kumar NH, Parveen Reddy KM. Salivary Flow Rate, pH, Buffering Capacity, Total Protein, Oxidative Stress and Antioxidant Capacity in Children with and without Dental Caries. *J Clin Pediatr Dent*. 2018;42(6):445-449.
308. Rabilloud T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics*. 2002;2(1):3-10.
309. Rahmani M, Ghorchi V, Rezaei F, Vaisi-Raygani A. Evaluation of Total Antioxidant Capacity of Saliva in High School Students. *Glob J Health Sci*. 2016 Jul 31;8(4):89-94.
310. Ranadheer E, Nayak UA, Reddy NV, Rao VA. The relationship between salivary IgA levels and dental caries in children. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2011;29(2):106-12.
311. Razi MA, Qamar S, Singhal A, Mahajan A, Siddiqui S, Mohina Minz RS. Role of natural salivary defenses in the maintenance of healthy oral microbiota in children and adolescents. *J Family Med Prim Care*. 2020;9(3):1603-1607.
312. Reddy MS, Bobek LA, Haraszthy GG, Biesbrock AR, Levine MJ. Structural features of the low-molecular-mass human salivary mucin. *Biochem J*. 1992;287 (Pt 2)(Pt 2):639-43.
313. Reitamo S, Kontinen YT, Segerberg-Kontinen M. Distribution of lactoferrin in human salivary glands. *Histochemistry*. 1980;66(3):285-91.
314. Renart J, Reiser J, Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(7):3116-20.
315. Reyes E, Martin J, Moncada G, Neira M, Palma P, Gordan V, et al. Caries-free subjects have high levels of urease and arginine deiminase activity. *J Appl Oral Sci*. 2014;22(3):235-40.
316. Ribeiro TR, Dria KJ, de Carvalho CB, Monteiro AJ, Fonteles MC, de Moraes Carvalho K, et al. Salivary peptide profile and its association with early childhood caries. *Int J Paediatr Dent*. 2012;23(3):225-34.

317. Richards VP, Alvarez AJ, Luce AR, Bedenbaugh M, Mitchell ML, Burne RA, Nascimento MM. Microbiomes of Site-Specific Dental Plaques from Children with Different Caries Status. *Infect Immun*. 2017;85(8):e00106-17.
318. Richardson CF, Johnsson M, Raj PA, Levine MJ, Nancollas GH. The influence of histatin-5 fragments on the mineralization of hydroxyapatite. *Arch Oral Biol*. 1993;38(11):997-1002.
319. Riva A, Puxeddu P, del Fiacco M, Testa-Riva F. Ultrastructural localization of endogenous peroxidase in human parotid and submandibular glands. *J Anat*. 1978;127(Pt 1):181-91.
320. Rivier J, McClintock R. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of insulins from different species. *J Chromatogr*. 1983;268(1):112-9.
321. Roa NS, Chaves M, Gómez M, Jaramillo LM. Association of salivary proteins with dental caries in a Colombian population. *Acta Odontol Latinoam*. 2008;21(1):69-75.
322. Rogers JD, Palmer RJ Jr, Kolenbrander PE, Scannapieco FA. Role of *Streptococcus gordonii* amylase-binding protein A in adhesion to hydroxyapatite, starch metabolism, and biofilm formation. *Infect Immun*. 2001;69(11):7046-56.
323. Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics*. 2004;3(12):1154-69.
324. Roth G.; Calmes R. editors. Salivary glands and saliva. In: Oral biology. St Louis: CV Mosby, p.196-23, 1981.
325. Rudney JD, Smith QT. Relationships between levels of lysozyme, lactoferrin, salivary peroxidase, and secretory immunoglobulin A in stimulated parotid saliva. *Infect Immun*. 1985;49(3):469-75.
326. Rugg-Gunn AJ, Edgar WM, Geddes DA, Jenkins GN. The effect of different meal patterns upon plaque pH in human subjects. *Br Dent J*. 1975;139(9):351-6.
327. Russell MW, Hajishengallis G, Childers NK, Michalek SM. Secretory immunity in defense against cariogenic mutans streptococci. *Caries Res*. 1999;33(1):4-15.
328. Saleem S, Tariq S, Aleem I, Sadr-Ul Shaheed, Tahseen M, Atiq A, Hassan S, Abu Bakar M, Khattak S, Syed AA, Ahmad AH, Hussain M, Yusuf MA, Sutton C. Proteomics analysis of colon cancer progression. *Clin Proteomics*. 2019;16:44.
329. Samaranayake YH, Samaranayake LP, Wu PC, So M. The antifungal effect of lactoferrin and lysozyme on *Candida krusei* and *Candida albicans*. *APMIS*. 1997;105(11):875-83.
330. Samuelson O. Ions exchange separation in analytical chemistry. Guteborg, Suécia, 1963.

231. Santana IVG. et al. Evolução científica sobre cárie dentária: revisão de literatura. 9ª JOU Jornada Odontológica Universidade Brasil. Arch. health invest. 2017; (6):60.
332. Scannapieco FA. Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. Crit Rev Oral Biol Med. 1994;5(3-4):203-48.
333. Scannapieco FA, Torres G, Levine MJ. Salivary alpha-amylase: role in dental plaque and caries formation. Crit Rev Oral Biol Med. 1993;4(3-4):301-7.
334. Schilling KM, Bowen WH. Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. Infect Immun. 1992;60(1):284-95.
335. Schulz A, Lang R, Behr J, Hertel S, Reich M, Kümmerer K, Hannig M, Hannig C, Hofmann T. Targeted metabolomics of pellicle and saliva in children with different caries activity. Sci Rep. 2020;10(1):697.
336. Sengupta A, Valdramidou D, Huntley S, Hicks SJ, Carrington SD, Corfield AP. Distribution of MUC1 in the normal human oral cavity is localized to the ducts of minor salivary glands. Arch Oral Biol. 2001;46(6):529-38.
337. Shaki F, Arab-Nozari M, Maleki F, Yazdani Charati J, Nahvi, A. Evaluation of Some Caries-Related Factors in the Saliva of 3–5 Year Old Children in Sari, Northern Iran. *International Journal of Pediatrics*, 2020;8(4): 11115-11123.
338. Sharma P, Dudus L, Nielsen PA, Clausen H, Yankaskas JR, Hollingsworth MA, Engelhardt JF. MUC5B and MUC7 are differentially expressed in mucous and serous cells of submucosal glands in human bronchial airways. Am J Respir Cell Mol Biol. 1998;19(1):30-7.
339. Sheehy EC, Brailsford SR, Kidd EA, Beighton D, Zoitopoulos L. Comparison between visual examination and a laser fluorescence system for in vivo diagnosis of occlusal caries. Caries Res. 2001 Nov-Dec;35(6):421-6.
340. Sheiham A, James WP. Diet and Dental Caries: The Pivotal Role of Free Sugars Reemphasized. J Dent Res. 2015 Oct;94(10):1341-7.
341. Shetty N, Hegde MN, Kumari S, Ullal H, Kedilaya V. Salivary proteins as biomarkers in dental caries: In vivo study. Dent Oral Cranio fac Res 2017; 3(2):1-7.
342. Shifa S, Muthu MS, Amarlal D, Rathna Prabhu V. Quantitative assessment of IgA levels in the unstimulated whole saliva of caries-free and caries-active children. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2008;26(4):158-61.
343. Shimotoyodome A, Kobayashi H, Tokimitsu I, Matsukubo T, Takaesu Y. Statherin and histatin 1 reduce parotid saliva-promoted *Streptococcus mutans* strain MT8148 adhesion to hydroxyapatite surfaces. Caries Res. 2006;40(5):403-11.

344. Shimotoyodome A, Kobayashi H, Tokimitsu I, Hase T, Inoue T, Matsukubo T, Takaesu Y. Saliva-promoted adhesion of *Streptococcus mutans* MT8148 associates with dental plaque and caries experience. *Caries Res.* 2007;41(3):212-8.
345. Shomers JP, Tabak LA, Levine MJ, Mandel ID, Hay DI. Properties of cysteine-containing phosphoproteins from human submandibular-sublingual saliva. *J Dent Res.* 1982;61(2):397-9.
346. Shu M, Morou-Bermudez E, Suárez-Pérez E, Rivera-Miranda C, Browngardt CM, Chen YY, Magnusson I, Burne RA. The relationship between dental caries status and dental plaque urease activity. *Oral Microbiol Immunol.* 2007 Feb;22(1):61-6.
347. Silva PVD, Troiano JA, Nakamune ACMS, Pessan JP, Antoniali C. Increased activity of the antioxidants systems modulate the oxidative stress in saliva of toddlers with early childhood caries. *Arch Oral Biol.* 2016;70:62-66.
348. Singh S, Sharma A, Sood PB, Sood A, Zaidi I, Sinha A. Saliva as a prediction tool for dental caries: An in vivo study. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2015;5(2):59-64.
349. Siqueira WL, Custodio W, McDonald EE. New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. *J Dent Res.* 2012;91(12):1110-8.
350. Siqueira WL, Margolis HC, Helmerhorst EJ, Mendes FM, Oppenheim FG. Evidence of intact histatins in the in vivo acquired enamel pellicle. *J Dent Res.* 2010;89(6):626-30.
351. Siqueira WL, Salih E, Wan DL, Helmerhorst EJ, Oppenheim FG. Proteome of human minor salivary gland secretion. *J Dent Res.* 2008;87(5):445-50.
352. Sitaru A, Tohati A, Pop AM, Bica C. Correlation between the salivary level of alpha-amylase and the risk for dental caries in young permanent teeth. *Rev Chim-Bucharest.* 2018; 68(12):2984–6.
353. Si Y, Ao S, Wang W, Chen F, Zheng S. Magnetic bead-based salivary peptidome profiling analysis for severe early childhood caries. *Caries Res.* 2015;49(1):63-9.
354. Slomiany BL, Murty VL, Piotrowski J, Slomiany A. Salivary mucins in oral mucosal defense. *Gen Pharmacol.* 1996;27(5):761-71.
355. Sly WS, Hu PY. Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:375-401.
356. Soesilawati P, Notopuro H, Yuliati Y, Ariani MD, Alwino Bayu Firdauzy M. The role of salivary sIgA as protection for dental caries activity in Indonesian children. *Clin Cosmet Investig Dent.* 2019;11:291-295.

357. Sørensen OE, Follin P, Johnsen AH et al. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* 2001; 97(12): 3951–3959.
358. Soukka T, Tenovuo J, Lenander-Lumikari M. Fungicidal effect of human lactoferrin against *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett.* 1992;69(3):223-8.
359. Soukka T, Tenovuo J, Rundegren J. Agglutination of *Streptococcus mutans* serotype C cells but inhibition of *Porphyromonas gingivalis* autoaggregation by human lactoferrin. *Arch Oral Biol.* 1993;38(3):227-32.
360. Sousa ET, Lima-Holanda AT, Nobre-Dos-Santos M. Carbonic anhydrase VI activity in saliva and biofilm can predict early childhood caries: A preliminary study. *Int J Paediatr Dent.* 2020;31(3):361-371.
361. Steinberg DA, Hurst MA, Fujii CA, Kung AH, Ho JF, Cheng FC, Loury DJ, Fiddes JC. *Protegrin-1*: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(8):1738-42.
362. Stephan R.M. Intra-oral hydrogen ion concentrations associated with dental caries activity. *J Dent Res* 1944; 23(4):257-266.
363. Stojković B, Igić M, Jevtović Stoimenov T, Tričković Janjić O, Ignjatović A, Kostić M, Petrović M, Stojanović S. Can Salivary Biomarkers Be Used as Predictors of Dental Caries in Young Adolescents? *Med Sci Monit.* 2020;26:e923471.
364. Strathmann FG, Hoofnagle AN. Current and future applications of mass spectrometry to the clinical laboratory. *Am J Clin Pathol.* 2011;136(4):609-16.
365. Stuchell RN, Mandel ID. A comparative study of salivary lysozyme in caries-resistant and caries-susceptible adults. *J Dent Res.* 1983;62(5):552-4.
366. Stuchell RN, Mandel ID. Studies of secretory IgA in caries-resistant and caries-susceptible adults. *Adv Exp Med Biol.* 1978;107:341-8.
367. Supuran CT, Scozzafava A. Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry. *Bioorg Med Chem.* 2007;15(13):4336-50.
368. Szabó I. Carbonic anhydrase activity in the saliva of children and its relation to caries activity. *Caries Res.* 1974;8(2):187-91.
369. Szkaradkiewicz-Karpinska AK, Sak M, Goslinska-Kuzniarek O, Sokalski J, Szkaradkiewicz J Human Salivary Acidic Proline-Rich Proteins (APRP-1/2) In Adult Patients With Dental Caries. *Dentistry* 2017;7(6):437.
370. Szkaradkiewicz-Karpinska Ak, Zeidler A, Goslinska-Kuzniarek O, Uram K, Szkaradkiewicz A. Oral lactobacilli and salivary acidic proline-rich proteins (APRP-1/2) in dental caries. *J Physiol Pharmacol.* 2018;69(1):139-44.

371. Szkaradkiewicz-Karpińska AK, Ronij A, Goślińska-Kuźniarek O, Przybyłek I, Szkaradkiewicz A. MUC7 Level As A New Saliva Risk Factor For Dental Caries In Adult Patients. *Int J Med Sci.* 2019;16(2):241-246.
372. Tabak LA. In defense of the oral cavity: structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:547-64.
373. Tabak LA, Levine MJ, Mandel ID, Ellison SA. Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. *J Oral Pathol.* 1982;11(1):1-17.
374. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res.* 2011;90(3):294-303.
375. Takano K, Malamud D, Bennick A, Oppenheim F, Hand AR. Localization of salivary proteins in granules of human parotid and submandibular acinar cells. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993;4(3-4):399-405.
376. Tang N, Tornatore P, Weinberger SR. Current developments in SELDI affinity technology. *Mass Spectrom Rev.* 2004 Jan-Feb;23(1):34-44.
377. Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ.* 2001;65(10):1028-37.
378. Tao R, Jurevic RJ, Coulton KK, Tsutsui MT, Roberts MC, Kimball JR, Wells N, Berndt J, Dale BA. Salivary antimicrobial peptide expression and dental caries experience in children. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(9):3883-8.
379. Tellefson LM, Germaine GR. Adherence of *Streptococcus sanguis* to hydroxyapatite coated with lysozyme and lysozyme-supplemented saliva. *Infect Immun.* 1986;51(3):750-9.
380. Tenovuo J, Lumikari M, Soukka T. Salivary lysozyme, lactoferrin and peroxidases: antibacterial effects on cariogenic bacteria and clinical applications in preventive dentistry. *Proc Finn Dent Soc.* 1991;87(2):197-208.
381. Tenovuo J, Mansson-Rahemtulla B, Pruitt KM, Arnold R. Inhibition of dental plaque acid production by the salivary lactoperoxidase antimicrobial system. *Infect Immun.* 1981;34(1):208-14.
382. Thaweboon S, Thaweboon B, Nakornchai S, Jitmaitree S. Salivary secretory IgA, pH, flow rates, mutans streptococci and *Candida* in children with rampant caries. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2008;39(5):893-9.
383. Thomas RZ, Zijng V, Çiçek A, de Soet JJ, Harmsen HJ, Huysmans MC. Shifts in the microbial population in relation to in situ caries progression. *Caries Res.* 2012;46(5):427-31.
384. Thornton DJ, Khan N, Mehrotra R, Howard M, Veerman E, Packer NH, Sheehan JK. Salivary mucin MG1 is comprised almost entirely of different glycosylated forms of the MUC5B gene product. *Glycobiology.* 1999;9(3):293-302.

385. Toke O. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers*. 2005;80(6):717-35.
386. Toomarian L, Sattari M, Hashemi N, Tadayon N, Akbarzadeh Baghban A. Comparison of neutrophil apoptosis, α -defensins and calprotectin in children with and without severe early childhood caries. *Iran J Immunol*. 2011;8(1):11-9.
387. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Sep;76(9):4350-4.
388. Troxler RF, Iontcheva I, Oppenheim FG, Nunes DP, Offner GD. Molecular characterization of a major high molecular weight mucin from human sublingual gland. *Glycobiology*. 1997;7(7):965-73.
389. Tsang C, Samaranayake L. Salivary lysozyme and related parameters of a predominantly Chinese, HIV-infected cohort in Hong Kong. *Oral Dis*. 1999;5(3):241-6.
390. Tulunoglu O, Demirtas S, Tulunoglu I. Total antioxidant levels of saliva in children related to caries, age, and gender. *Int J Paediatr Dent*. 2006;16(3):186-91.
391. Välimaa H, Tenovuo J, Waris M, Hukkanen V. Human lactoferrin but not lysozyme neutralizes HSV-1 and inhibits HSV-1 replication and cell-to-cell spread. *Virol J*. 2009;6:53.
392. Van Nieuw Amerongen A, Bolscher JG, Veerman EC. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? *Caries Res*. 2004;38(3):247-53.
393. Van 't Hof W, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV, Ligtenberg AJ. Antimicrobial defense systems in saliva. *Monogr Oral Sci*. 2014;24:40-51.
394. Van Wuyckhuysse BC, Perinpanayagam HE, Bevacqua D, Raubertas RF, Billings RJ, Bowen WH, et al. Association of free arginine and lysine concentrations in human parotid saliva with caries experience. *J Dent Res*. 1995;74(2):66-90.
395. Varga G. Physiology of the salivary glands. *Surgery* 2012; 30(11): 578-583.
396. Vieira AR, Vieira NM, Limesand K, Modesto A. Differences in Proteomic Profiles Between Caries Free and Caries Affected Children. *Pesqui Bras em Odontopediatria Clín Integr* 2020;20:e5592.
397. Vitorino R, de Moraes Guedes S, Ferreira R, Lobo MJ, Duarte J, Ferrer-Correia AJ, Tomer KB, Domingues PM, Amado FM. Two-dimensional electrophoresis study of in vitro pellicle formation and dental caries susceptibility. *Eur J Oral Sci*. 2006;114(2):147-53.
398. Voedisch B, Thie H. *Antibody Engineering*. Berlin: Springer. 2010. Size exclusion chromatography. p.607–612.

399. Vorrasi J, Chaudhuri B, Haase EM, Scannapieco FA. Identification and characterization of amylase-binding protein C from *Streptococcus mitis* NS51. *Mol Oral Microbiol*. 2010;25(2):150-6.
400. Wakabayashi H, Yamauchi K, Kobayashi T, Yaeshima T, Iwatsuki K, Yoshie H. Inhibitory effects of lactoferrin on growth and biofilm formation of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(8):3308-16.
401. Walther TC, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J Cell Biol*. 2010;190(4):491-500.
402. Wang K, Wang X, Zheng S, Niu Y, Zheng W, Qin X, et al. iTRAQ-based quantitative analysis of age-specific variations in salivary proteome of caries-susceptible individuals. *J Transl Med*. 2018a;16(1):293.
403. Wang K, Wang Y, Wang X, Ren Q, Han S, Ding L, Li Z, Zhou X, Li W, Zhang L. Comparative salivary proteomics analysis of children with and without dental caries using the iTRAQ/MRM approach. *J Transl Med*. 2018b;16(1):11.
404. Wang Y, Franzen J, Wanczek KP. The non-linear resonance ion trap. Part 2. A general theoretical analysis. *Int J Mass Spectrom Ion Processes* 1993;124(1):125-44.
405. Wei GX, Campagna AN, Bobek LA. Effect of MUC7 peptides on the growth of bacteria and on *Streptococcus mutans* biofilm. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57(6):1100-9.
406. Wickström C, Christersson C, Davies JR, Carlstedt I. Macromolecular organization of saliva: identification of 'insoluble' MUC5B assemblies and non-mucin proteins in the gel phase. *Biochem J*. 2000;351 Pt 2(Pt 2):421-8
407. Wiese S, Reidegeld KA, Meyer HE, Warscheid B. Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics*. 2007;7(3):340-50.
408. Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 1996;13:19-50.
409. Wollnik H. TOF-MS. *Mass Spectrom Rev*. 1993; 12(1):89-114.
410. Wu T, Samaranayake LP, Leung WK, Sullivan PA. Inhibition of growth and secreted aspartyl proteinase production in *Candida albicans* by lysozyme. *J Med Microbiol*. 1999;48(8):721-730.
411. Wu Z, Gong Y, Wang C, Lin J, Zhao J. Association between salivary s-IgA concentration and dental caries: A systematic review and meta-analysis. *Biosci Rep*. 2020 Dec 8;40(12):BSR20203208.

412. Xu T, Levitz SM, Diamond RD, Oppenheim FG. Anticandidal activity of major human salivary histatins. *Infect Immun*. 1991;59(8):2549-54.
413. Yang Y, Li Y, Lin Y, Du M, Zhang P, Fan M. Comparison of immunological and microbiological characteristics in children and the elderly with or without dental caries. *Eur J Oral Sci*. 2015a;123(2):80-7.
414. Yang TY, Zhou WJ, Du Y, Wu ST, Yuan WW, Yu Y, Su L, Luo Y, Zhang JH, Lu WL, Wang XQ, Chen J, Feng Y, Zhou XD, Zhang P. Role of saliva proteinase 3 in dental caries. *Int J Oral Sci*. 2015b;7(3):174-8.
415. Yassin HN. Comparison of immunoglobulin IgA level in the stimulated saliva of caries-free and caries-active children aged 7–10 years. *J Bagh Coll Dent*. 2016;28(3):155–8.
416. Yeh CK, Dodds MW, Zuo P, Johnson DA. A population-based study of salivary lysozyme concentrations and candidal counts. *Arch Oral Biol*. 1997 Jan;42(1):25-31.
417. Yusifov TN, Abduragimov AR, Gasymov OK, Glasgow BJ. Endonuclease activity in lipocalins. *Biochem J*. 2000;347 Pt 3(Pt 3):815-9.
418. Zaluzec EJ, Gage DA, Watson JT. Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: applications in peptide and protein characterization. *Protein Expr Purif*. 1995;6(2):109-23.
419. Zandona F, Soini HA, Novotny MV, Santiago E, Eckert GJ, Preisser JS, Benecha HK, Arthur RA, Zero DT. A Potential Biofilm Metabolite Signature for Caries Activity - A Pilot Clinical Study. *Metabolomics*. 2015;5(1):140.
420. Zengo AN, Mandel ID, Goldman R, Khurana HS. Salivary studies in human caries resistance. *Arch Oral Biol*. 1971;16(5):557-60.
421. Zero DT, Fu J, Anne KM, Cassata S, McCormack SM, Gwinner LM. An improved intra-oral enamel demineralization test model for the study of dental caries. *J Dent Res*. 1992;71(Spec No):871-8.
422. Zhang CG, Chromy BA, McCutchen-Maloney SL. Host-pathogen interactions: a proteomic view. *Expert Rev Proteomics*. 2005;2(2):187-202.
423. Zhao H, Granberg F, Elfineh L, Pettersson U, Svensson C. Strategic attack on host cell gene expression during adenovirus infection. *J Virol*. 2003;77(20):11006-15.
424. Zieske LR. A perspective on the use of iTRAQ reagent technology for protein complex and profiling studies. *J Exp Bot*. 2006;57(7):1501-8.

APÊNDICE A – REFERÊNCIAS DE ARTIGOS EXCLUÍDOS NA EGIBILIDADE

Não apresentaram grupo de indivíduos livres de cárie (n=18):

1. Ahn SJ, Kim HM, Desai S, Deep K, Rice KC. Regulation of cid and Irg expression by CodY in *Streptococcus mutans*. *Microbiologyopen*. 2020 Jul;9(7):e1040.
2. Challacombe SJ. Serum and salivary antibodies to *Streptococcus mutans* in relation to the development and treatment of human dental caries. *Arch Oral Biol*. 1980;25(7):495-502.
3. Challacombe SJ, Lehner T, Guggenheim B. Serum and salivary antibodies to glucosyltransferase in dental caries in man. *Nature*. 1972 Jul 28;238(5361):219.
4. Dewar MR, Parfitt GJ. Mucin content, physical properties of saliva and caries activity. *J Dent Res*. 1954 Dec;33(6):751-6.
5. Gandhi M, Damle SG. Relation of salivary inorganic phosphorus and alkaline phosphatase to the dental caries status in children. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2003 Dec;21(4):135-8.
6. Gornowicz A, Tokajuk G, Bielawska A, Maciorkowska E, Jabłoński R, Wójcicka A, Bielawski K. The assessment of sIgA, histatin-5, and lactoperoxidase levels in saliva of adolescents with dental caries. *Med Sci Monit*. 2014 Jun 29;20:1095-100.
7. Goyette N, Parrot M, Sutzescu D, Leduc M, Dufour L, Trahan L, Lavoie MC. Inverse correlation between the proportion of salivary bacteria inhibiting *Streptococcus mutans* and the percentage of untreated carious teeth. *J Oral Pathol Med*. 1995 Nov;24(10):462-7.
8. Green GE. A bacteriolytic agent in salivary globulin of caries-immune human beings. *J Dent Res*. 1959 Mar-Apr;38(2):262-75.
9. Kedjarune U, Migasena P, Changbumrung S, Pongpaew P, Tungtrongchitr R. Flow rate and composition of whole saliva in children from rural and urban Thailand with different caries prevalence and dietary intake. *Caries Res*. 1997;31(2):148-54.
10. Kimoto M, Kishino M, Yura Y, Ogawa Y. A role of salivary carbonic anhydrase VI in dental plaque. *Arch Oral Biol*. 2006 Feb;51(2):117-22.
11. Kulhavá L, Eckhardt A, Pataridis S, Bartoš M, Foltán R, MIKŠÍK I. Differences of Saliva Composition in Relation to Tooth Decay and Gender. *Folia Biologica*. 2018; 64(5/6): 195-203.
12. Krzyściak W, Papież M, Jurczak A, Kościelniak D, Vyhouskaya P, Zagórska-Świeży K, Skalniak A. Relationship between Pyruvate Kinase Activity and Cariogenic Biofilm Formation in *Streptococcus mutans* Biotypes in Caries Patients. *Front Microbiol*. 2017 May 16;8:856.

13. Nahas M, Sfeir E. Salivary Immunoglobulin A and *Streptococcus mutans* Levels among Lebanese Preschool Children with Early Childhood Caries. *J Contemp Dent Pract.* 2020 Sep 1;21(9):1012-1017..
14. Orstavik D, Brandtzaeg P. Secretion of parotid IgA in relation to gingival inflammation and dental caries experience in man. *Arch Oral Biol.* 1975 Nov;20(11):701-4.
15. Patil V, Deshp RR, Chhabra RS, Kamath A, Patil D, Dungarwal P, Bagde KK, Shep S Kotwal, V. Comparative evaluation of salivary total protein concentration in male and female children in deciduous dentition. *Research J Pharmaceutical, Biological Chemical Sci.*2016; 7(2):1616-1619.
16. Pekovic DD, Adamkiewicz VW, Gornitsky M. Immunoglobulins in human dental caries. *Arch Oral Biol.* 1988;33(2):135-41.
17. Sun X, Huang X, Tan X, Si Y, Wang X, Chen F, Zheng S. Salivary peptidome profiling for diagnosis of severe early childhood caries. *J Transl Med.* 2016 Aug 15;14(1):240.
18. Syed M, Sachdev V, Chopra R. Intercomparison of salivary nitric oxide as a biomarker of dental caries risk between caries-active and caries-free children. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2016 Aug;17(4):239-43.

Não abordavam explicitamente o objetivo desta revisão (n=76):

1. Aida KL, de Paula Ramos S, Seixas GF, Bozza A, Couto de Almeida RS, Dezan Garbelini CC. Influence of a preschool preventive dental programme on caries prevalence, oral care and secretory immunity to *Streptococcus mutans* in young adults. *Int J Dent Hyg.* 2018 May;16(2):249-256.
2. Alaçam T, Misirligil Z, Misirligil A. The relationship between the caries activity test (Snyder) and salivary IgA level. *J Nihon Univ Sch Dent.* 1986 Sep;28(3):195-8.
3. Alaluusua S, Takei T, Ooshima T, Hamada S. Mutacin activity of strains isolated from children with varying levels of mutants streptococci and caries. *Arch Oral Biol.* 1991;36(4):251-5.
4. Al Amoudi N, Al Shukairy H, Hanno A. A comparative study of the secretory IgA immunoglobulins (s.IgA) in mothers and children with SECC versus a caries free group children and their mothers. *J Clin Pediatr Dent.* 2007;32(1):53-6.
5. Al-ani A, MacDonald DA, Ahmad M. Salivar sIgA e proteína PRAP-1 em relação à cárie dentária: um estudo comparativo. *Jornal de Pesquisa Oral Avançada* . 2020;11(1):71-76.
6. Al Shukairy H, Alamoudi N, Farsi N, Al Mushayt A, Masoud I. A comparative study of *Streptococcus mutans* and lactobacilli in mothers and children with severe early

childhood caries (SECC) versus a caries free group of children and their corresponding mothers. *J Clin Pediatr Dent*. 2006 Winter;31(2):80-5.

7. Anderson LC, Lamberts BL, Bruton WF. Salivary protein polymorphisms in caries-free and caries-active adults. *J Dent Res*. 1982 Feb;61(2):393-6.
8. Angwaravong O, Pitiphat W, Bolscher JG, Chaiyarit P. Evaluation of salivary mucins in children with deciduous and mixed dentition: comparative analysis between high and low caries-risk groups. *Clin Oral Investig*. 2015 Nov;19(8):1931-7.
9. Bardow A, Lykkeaa J, Qvist V, Ekstrand K, Twetman S, Fiehn NE. Saliva composition in three selected groups with normal stimulated salivary flow rates, but yet major differences in caries experience and dental erosion. *Acta Odontol Scand*. 2014 Aug;72(6):466-73.
10. Belstrøm D, Jersie-Christensen RR, Lyon D, Damgaard C, Jensen LJ, Holmstrup P, Olsen JV. Metaproteomics of saliva identifies human protein markers specific for individuals with periodontitis and dental caries compared to orally healthy controls. *PeerJ*. 2016 Sep 14;4:e2433
11. Bolton RW. Naturally-occurring IgA antibodies to glycerol-teichoic acid in human saliva. Correlation with caries activity. *J Dent Res*. 1981 May;60(5):878-82.
12. Castro P, Tovar JA, Jaramillo L. Adhesion of *Streptococcus mutans* to salivary proteins in caries-free and caries-susceptible individuals. *Acta Odontol Latinoam*. 2006;19(2):59-66.
13. Challacombe SJ, Bergmeier LA, Rees AS. Natural antibodies in man to a protein antigen from the bacterium *Streptococcus mutans* related to dental caries experience. *Arch Oral Biol*. 1984;29(3):179-84.
14. Challacombe SJ. Immunoglobulins in parotid saliva and serum in relation to dental caries in man. *Caries Res*. 1976;10(3):165-77.
15. Cogulu D, Onay H, Ozdemir Y, I Aslan G, Ozkinay F, Kutukculer N, Eronat C. Associations of interleukin (IL)-1 β , IL-1 receptor antagonist, and IL-10 with dental caries. *J Oral Sci*. 2015 Mar;57(1):31-6.
16. Conway DI, Macpherson LM, Culshaw S. Salivary antimicrobial proteins associate with age-related changes in streptococcal composition in dental plaque. *Mol Oral Microbiol*. 2014 Dec;29(6):284-93.
17. Dale BA, Tao R, Kimball JR, Jurevic RJ. Oral antimicrobial peptides and biological control of caries. *BMC Oral Health*. 2006 Jun 15;6 Suppl 1(Suppl 1):S13.
18. DiPaola C, Herrera MS, Mandel ID. Host proteins in dental plaques of caries-resistant versus caries-susceptible human groups. *Arch Oral Biol*. 1984;29(5):353-5.

19. Dodwad R, Betigeri AV, Preeti BP. Estimation of total antioxidant capacity levels in saliva of caries-free and caries-active children. *Contemp Clin Dent*. 2011 Jan;2(1):17-20.
20. Dogra S, Bhayya D, Arora R, Singh D, Thakur D. Evaluation of physio-chemical properties of saliva and comparison of its relation with dental caries. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2013 Oct-Dec;31(4):221-4.
21. Fontana M, Gfell LE, Gregory RL. Characterization of preparations enriched for *Streptococcus mutans* fimbriae: salivary immunoglobulin A antibodies in caries-free and caries-active subjects. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1995 Nov;2(6):719-25.
22. Foxman B, Srinivasan U, Wen A, Zhang L, Marrs CF, Goldberg D, Weyant R, McNeil D, Crout R, Marazita M. Exploring the effect of dentition, dental decay and familiarity on oral health using metabolomics. *Infect Genet Evol*. 2014 Mar;22:201-7.
23. George J, Manju R, Hegde AM, Sheth P, Suresh LR. Estimativa da Proteína Salivar de Choque Térmico 70 (HSP70) em Crianças com Cárie Precoce da Infância. *Indian Journal of Public Health Research & Development* , 2020; 11 (7):354-360.
24. Gornowicz A, Bielawska A, Bielawski K, Grabowska SZ, Wójcicka A, Zalewska M, Maciorkowska E. Pro-inflammatory cytokines in saliva of adolescents with dental caries disease. *Ann Agric Environ Med*. 2012;19(4):711-6.
25. Gråhn E, Tenovuo J, Lehtonen OP, Eerola E, Vilja P. Antimicrobial systems of human whole saliva in relation to dental caries, cariogenic bacteria, and gingival inflammation in young adults. *Acta Odontol Scand*. 1988 Apr;46(2):67-74.
26. Han DH, Kim MJ, Jun EJ, Kim JB. The role of glutathione metabolism in cariogenic bacterial growth and caries in Korean children. *Arch Oral Biol*. 2013 May;58(5):493-9.
27. Hart TC, Corby PM, Hauskrecht M, Hee Ryu O, Pelikan R, Valko M, Oliveira MB, Hoehn GT, Bretz WA. Identification of microbial and proteomic biomarkers in early childhood caries. *Int J Dent*. 2011;2011:196721.
28. Hendi SS, Goodarzi MT, Moghimbeigi A, Ahmadi-Motamayel F. Evaluation of the Status of Salivary Antioxidants in Dental Caries, Infectious Disorders - Drug Targets 2020; 20(6):816-821.
29. Hess WC, SMITH BT. The salivary amylase activity of carious and noncarious individuals. *J Dent Res*. 1948 Oct;27(5):593-8.
30. Hocini H, Iscaki S, Bouvet JP, Pillot J. Unexpectedly high levels of some presumably protective secretory immunoglobulin A antibodies to dental plaque bacteria in salivas of both caries-resistant and caries-susceptible subjects. *Infect Immun*. 1993 Sep;61(9):3597-604.

31. Jonasson A, Eriksson C, Jenkinson HF, Källestål C, Johansson I, Strömberg N. Innate immunity glycoprotein gp-340 variants may modulate human susceptibility to dental caries. *BMC Infect Dis.* 2007 Jun 11;7:57.
32. Karshan M. Factors in Saliva Correlated with Dental Caries. *Journal of Dental Research.* 1939;18(5):395-407.
33. Kaur A, Kwatra KS, Kamboj P. Evaluation of non-microbial salivary caries activity parameters and salivary biochemical indicators in predicting dental caries. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2012;30(3):212-7.
34. Kim BS, Han DH, Lee H, Oh B. Association of Salivary Microbiota with Dental Caries Incidence with Dentine Involvement after 4 Years. *J Microbiol Biotechnol.* 2018 Mar 28;28(3):454-464.
35. Kirstilä V, Häkkinen P, Jentsch H, Vilja P, Tenovuo J. Longitudinal analysis of the association of human salivary antimicrobial agents with caries increment and cariogenic micro-organisms: a two-year cohort study. *J Dent Res.* 1998 Jan;77(1):73-80.
36. Kulhavá L, Eckhardt A, Pataridis S, Foltán R, Mikšík I. Proteomic Analysis of Whole Saliva in Relation to Dental Caries Resistance. *Folia Biol (Praha).* 2020;66(2):72-80. PMID: 32851837.
37. Lehtonen OP, Gråhn EM, Ståhlberg TH, Laitinen LA. Amount and avidity of salivary and serum antibodies against *Streptococcus mutans* in two groups of human subjects with different dental caries susceptibility. *Infect Immun.* 1984 Jan;43(1):308-13.
38. Longo PL, Mattos-Graner RO, Mayer MP. Determination of mutacin activity and detection of mutA genes in *Streptococcus mutans* genotypes from caries-free and caries-active children. *Oral Microbiol Immunol.* 2003 Jun;18(3):144-9.
39. Malberti AI, Brunotto MN, Gait MT, Crosa ME, Hilas E, Cornejo LS. Oral health and salivary factors in rural schoolchildren. *Acta Odontol Latinoam.* 2004;17(1-2):29-38.
40. Malekafzali B, Sattari M, Keyvanfar S. Correlation between salivary Toll like receptor-2 concentration and early childhood caries. *Iran J Immunol.* 2014 Sep;11(3):210-6.
41. Malcolm J, Sherriff A, Lappin DF, Ramage G, Conway DI, Macpherson LM, Culshaw S. Salivary antimicrobial proteins associate with age-related changes in streptococcal composition in dental plaque. *Mol Oral Microbiol.* 2014 Dec;29(6):284-93.
42. Margolis HC, Duckworth JH, Moreno EC. Composition and buffer capacity of pooled starved plaque fluid from caries-free and caries-susceptible individuals. *J Dent Res.* 1988 Dec;67(12):1476-82.

43. Modesto M, Biavati B, Mattarelli P. Occurrence of the family bifidobacteriaceae in human dental caries and plaque. *Caries Res.* 2006;40(3):271-6.
44. Morou-Bermudez E, Rodriguez S, Bello AS, Dominguez-Bello MG. Urease and Dental Plaque Microbial Profiles in Children. *PLoS One.* 2015 Sep 29;10(9):e0139315.
45. Mungia R, Cano SM, Johnson DA, Dang H, Brown JP. Interaction of age and specific saliva component output on caries. *Aging Clin Exp Res.* 2008 Dec;20(6):503-8.
46. Murty VL, Slomiany BL, Laszewicz W, Slomiany A, Petropoulou K, Mandel ID. Lipids of developing dental plaque in caries-resistant and caries-susceptible adult people. *Arch Oral Biol.* 1985;30(2):171-5.
47. Nazemisalman B, Jafari F, Esmaelzadeh A, Faghihzadeh S, Vahabi S, et al. Salivary Tumor Necrosis Factor-Alpha and Dental Caries in Children and Adolescents. *Iran J Pediatr.* 29(1):e80899.
48. Nogueira RD, Alves AC, Napimoga MH, Smith DJ, Mattos-Graner RO. Characterization of salivary immunoglobulin A responses in children heavily exposed to the oral bacterium *Streptococcus mutans*: influence of specific antigen recognition in infection. *Infect Immun.* 2005 Sep;73(9):5675-84.
49. Omar OM, Khattab NM, Rashed LA. Glucosyltransferase B, immunoglobulin a, and caries experience among a group of Egyptian preschool children. *J Dent Child (Chic).* 2012 May-Aug;79(2):63-8.
50. Pal S, Mitra M, Mishra J, Saha S, Bhattacharya B. Correlation of total salivary secretory immunoglobulin A (SIgA) and mutans specific SIgA in children having different caries status. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2013 Oct-Dec;31(4):270-4.
51. Paqué PN, Herz C, Wiedemeier DB, Mitsakakis K, Attin T, Bao K, Belibasakis GN, Hays JP, Jenzer JS, Kaman WE, Karpíšek M, Körner P, Peham JR, Schmidlin PR, Thurnheer T, Wegehaupt FJ, Bostanci N. Salivary Biomarkers for Dental Caries Detection and Personalized Monitoring. *J Pers Med.* 2021 Mar 23;11(3):235.
52. Preeti R, Vishnu PV, Gayathri R. Estimation of Salivary Glucose and Total Protein in Early Childhood Caries (ECC), *J Res Med Dent Sci,* 2020, 8 (7): 142-146.
53. Ribeiro CCC, Pachêco CJB, Costa EL, Ladeira LLC, Costa JF, da Silva RA, Carmo CDS. Proinflammatory cytokines in early childhood caries: Salivary analysis in the mother/children pair. *Cytokine.* 2018 Jul;107:113-117.
54. Rovera A, Rovera G, Alzahrani A, Hector M, Anderson P. Correlation between parotid saliva composition and dental caries using ³¹P-NMR and ICDAS score. *Arch Oral Biol.* 2020 Mar;111:104651.
55. Rudney JD, Staikov RK. Simultaneous measurement of the viability, aggregation, and live and dead adherence of *Streptococcus crista*, *Streptococcus mutans* and 56.

Actinobacillus actinomycetemcomitans in human saliva in relation to indices of caries, dental plaque and periodontal disease. Arch Oral Biol. 2002 May;47(5):347-59.

56. Rudney JD, Staikov RK, Johnson JD. Potential biomarkers of human salivary function: a modified proteomic approach. Arch Oral Biol. 2009 Jan;54(1):91-100.

57. Sarode G, Shelar A, Sarode S, Bagul N. Associação entre cárie dentária e peroxidação lipídica na saliva. International Journal of Oral & Maxillofacial Pathology. 2012;3(2):02-04.

58. Shimomura-Kuroki J, Nashida T, Miyagawa Y, Morita T, Hayashi-Sakai S. Analysis of salivary factors related to the oral health status in children. J Oral Sci. 2020;62(2):226-230.

59. Schulz A, Lang R, Behr J, Hertel S, Reich M, Kümmerer K, Hannig M, Hannig C, Hofmann T. Targeted metabolomics of pellicle and saliva in children with different caries activity. Sci Rep. 2020 Jan 20;10(1):697.

60. Senthil Eagappan AR, Rao VA, Sujatha S, Senthil D, Sathiyajeeva J, Rajaraman G. Evaluation of salivary nitric oxide level in children with early childhood caries. Dent Res J (Isfahan). 2016 Jul-Aug;13(4):338-41.

61. Seredin P, Goloshchapov D, Ippolitov Y, Vongsvivut P. Pathology-specific molecular profiles of saliva in patients with multiple dental caries-potential application for predictive, preventive and personalised medical services. EPMA J. 2018 Apr 25;9(2):195-203.

62. Shimomura-Kuroki J, Nashida T, Miyagawa Y, Morita T, Hayashi-Sakai S. Analysis of salivary factors related to the oral health status in children. J Oral Sci. 2020;62(2):226-230.

63. Shimomura-Kuroki J, Yamashita-Matsuda K, Miyagawa Y, Shimooka S. Prevalence of cariogenic and periodontopathic bacteria in Japanese children in the primary and mixed dentitions. J Clin Pediatr Dent. 2011 Fall;36(1):31-6.

64. Shu M, Morou-Bermudez E, Suárez-Pérez E, Rivera-Miranda C, Browngardt CM, Chen YY, Magnusson I, Burne RA. The relationship between dental caries status and dental plaque urease activity. Oral Microbiol Immunol. 2007 Feb;22(1):61-6.

65. Shukla P, Rajkumar B, Gupta V, Bhatt A. Correlation between total antioxidant level and dental caries in adults - An in vivo study. IJCPHR 2016; 2(4):864-870.

66. Stojković B, Igić M, Jevtović Stoimenov T, Tričković Janjić O, Ignjatović A, Kostić M, Petrović M, Stojanović S. Can Salivary Biomarkers Be Used as Predictors of Dental Caries in Young Adolescents? Med Sci Monit. 2020 Jun 10;26:e923471.

67. Subramanyam D, Gurunathan D, Gaayathri R, Vishnu Priya V. Comparative evaluation of salivary malondialdehyde levels as a marker of lipid peroxidation in early childhood caries. Eur J Dent. 2018 Jan-Mar;12(1):67-70.

68. Tannure PN, K chler EC. Patients With Manifest Caries Lesions Have Higher Levels of Salivary Matrix Metalloproteinase-8 Than Patients With no Caries Lesions. *J Evid Based Dent Pract.* 2016 Mar;16(1):77-8.
69. Tenovuo J, Lehtonen OP, Aaltonen AS. Caries development in children in relation to the presence of mutans streptococci in dental plaque and of serum antibodies against whole cells and protein antigen I/II of *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* 1990;24(1):59-64.
70. Thibodeau EA, O'Sullivan DM: Salivary mutans streptococci and caries development in the primary and mixed dentitions of children. *Community Dent Oral Epidemiol* 1999; 27: 406-12.
71. T thov  L, Celecov  V, Celec P. Salivary markers of oxidative stress and their relation to periodontal and dental status in children. *Dis Markers.* 2013;34(1):9-15.
72. Trautmann S, Barghash A, Fecher-Trost C, Schalkowsky P, Hannig C, Kirsch J, Rupf S, Keller A, Helms V, Hannig M. Proteomic Analysis of the Initial Oral Pellicle in Caries-Active and Caries-Free Individuals. *Proteomics Clin Appl.* 2019 Jul;13(4):e1800143.
73. Vacca Smith AM, Scott-Anne KM, Whelehan MT, Berkowitz RJ, Feng C, Bowen WH. Salivary glucosyltransferase B as a possible marker for caries activity. *Caries Res.* 2007;41(6):445-50.
74. Wilson RF, Ashley FP. The relationship between the biochemical composition of dental plaque from both approximal and free smooth surfaces of teeth and subsequent 3-year caries increment in adolescents. *Arch Oral Biol.* 1990;35(12):933-7.
75. Wilson RM, Green GE. Agglutinogens and isoagglutinins in caries-immune and susceptible human salivas. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1963 Jan;112:149-53.
76. Zhao A, Blackburn C, Chin J, Srinivasan M. Soluble toll like receptor 2 (TLR-2) is increased in saliva of children with dental caries. *BMC Oral Health.* 2014 Aug 31;14:108.