



UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**IDENTIFICAÇÃO NA SALIVA DE BIOMARCADORES DE
SUSCETIBILIDADE À CÁRIE DENTÁRIA**

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa para
obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Por

Ana Carolina Fernandes Lourenço

Viseu, 2015



UNIVERSIDADE
CATÓLICA
PORTUGUESA | INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE

**IDENTIFICAÇÃO NA SALIVA DE BIOMARCADORES DE
SUSCETIBILIDADE À CÁRIE DENTÁRIA**

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa para
obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Por

Ana Carolina Fernandes Lourenço

Sob a orientação do Professor Doutor Nuno Rosa

Viseu, 2015

*“Eu sonho. E enquanto eu sonhar ninguém precisa de
saber que eu vivo o amanhã hoje.”*

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Nuno Rosa,
orientador desta dissertação, pelo enorme apoio e motivação em todos os momentos; pela partilha de conhecimento, pelo tempo, paciência e liberdade que me deu para trabalhar.

À Professora Doutora Maria José Correia,
pela disponibilidade, interesse e decisiva contribuição; por ser responsável pelo meu interesse por esta área do conhecimento.

À Professora Doutora Marlene Barros,
pela apreciação e contribuição na resolução das mais diversas questões que surgiram no decorrer deste trabalho.

Aos meus pais,
pela calma, amor, motivação e respeito; porque são os meus pilares e maior orgulho.

À minha irmã,
que diariamente me mostra que não existem batalhas impossíveis e a felicidade é o caminho certo.

À Sofia e ao Rui,
porque foram, são e serão sempre.

À Rita,
por ser a minha binómia de vida.

À minha família e amigos,
que me tornam todos os dias na pessoa que sou e que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho fosse possível.

Resumo

A cárie dentária é uma doença crônica de etiologia multi-fatorial, causada pela complexa interação entre os ácidos produzidos pela placa bacteriana, os hidratos de carbono fermentáveis provenientes da dieta e fatores do hospedeiro que incluem a saliva. Dada a elevada prevalência da doença a nível mundial e uma base científica que suporta a existência de fatores de suscetibilidade individual para o desenvolvimento da mesma, urge a necessidade de desenvolver meios de identificação precoce de suscetibilidade para que medidas preventivas eficazes possam ser tomadas. Assim, com este estudo objetivou-se verificar a relação existente entre a presença de determinadas proteínas salivares e a presença de cárie nos indivíduos analisados, com possível identificação de potenciais marcadores de suscetibilidade à doença.

A catalogação das proteínas salivares em pacientes com cárie dentária, permitiu adicionar 28 proteínas à base de dados do OralCard (entre as quais 4 microbianas e 24 humanas). A caracterização funcional do OralOma de cárie permitiu identificar alterações estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) em determinados processos biológicos e funções moleculares das proteínas salivares de cárie dentária, nomeadamente no que respeita à ação antioxidante da saliva, especificamente por ação do sistema da peroxidase salivar. A análise interatómica realizada permitiu destacar 4 proteínas (transcobalamin-1, peptidylprolyl cis-transisomeraseB, small proline-rich protein 3 e histone 4) com elevados graus de interação com o OralOma total e com potencial influência no desenvolvimento de lesões de cárie dentária.

Verificou-se uma carência de estudos experimentais dirigidos para o proteoma microbiano em cárie dentária, no entanto a identificação dos seus fatores de virulência pode constituir um passo na análise da suscetibilidade de um indivíduo ao desenvolvimento da doença. A análise do proteoma oral realizada permitiu compreender alguns aspetos dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de cárie dentária, permitindo estabelecer potenciais biomarcadores de suscetibilidade à doença, a serem avaliados em estudos experimentais no futuro.

Palavras-chave: cárie dentária; suscetibilidade à cárie; proteínas salivares; biomarcadores; proteómica.

Abstract

Dental carie is a chronic disease of multifactorial etiology caused by a complex interaction between the biofilm produced acids, fermentable carbohydrates from the diet and several host factors including the saliva composition. Due to the worldwide high prevalence of the disease and a large scientific base that supports the existence of individual susceptibility factors for its development, it urges the need to develop early susceptibility assessment methods in a way that preventive measures can be taken urges. Therefore, this study aims at verifying the relationship between the presence of certain salivary proteins and the presence of dental caries in the analyzed individuals with the identification of potential biomarkers of susceptibility to disease.

The listing of patients with salivary proteins in dental caries allowed to add 28 proteins to OralCard database (including 4 microbial and 24 human proteins). Functional characterization of caries OralOme allowed the identification of statistically significant changes ($p \leq 0,05$) in certain biological processes and molecular functions of salivary proteins involved in tooth decay, particularly with regard to saliva antioxidant activity by specific action of salivary peroxidase system. The inter-atomic analysis has highlighted 4 proteins (Transcobalamin-1, Peptidylprolyl cis-transisomeraseB, Small proline-rich protein 3 histone 4) with high levels of interaction with the total OralOme and potential influence in dental caries development and progress.

A lack of experimental studies directed to the microbial proteome of dental caries was noted; however the identification of virulence factors may be a step to the analysis of individual susceptibility to disease development. The analysis of the oral proteome allowed the understanding of some molecular mechanisms involved in dental caries process, enabling the establishment of potential biomarkers for disease susceptibility, to be evaluated in future experimental studies.

Key-words: dental caries; dental caries susceptibility; salivary proteins; biomarkers; proteomics.

Nota Prévia

Ao longo desta dissertação surgem, por vezes, expressões em língua Inglesa, escritas em itálico, como resultado da necessidade de uniformização global dos termos usados para descrever conceitos biológicos entre culturas e línguas diferentes. A tradução destas expressões poderia implicar a distorção do seu significado original e a alteração do conceito biológico que se pretende identificar.

Índice

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. CÁRIE DENTÁRIA	1
1.1.1. Definição e epidemiologia	1
1.1.2. Etiologia da cárie dentária.....	1
1.1.3. Fatores de risco e suscetibilidade.....	5
1.1.3.1. Fatores extrínsecos.....	5
1.1.3.2. Fatores intrínsecos	6
Estado de saúde em geral e medicação	7
Historial prévio de cáries	7
Microbiota oral	7
Dieta e nutrição	11
Dente	12
1.2. SALIVA.....	14
1.2.1. Origem	15
1.2.2. Composição.....	15
1.2.3. Função: o papel das proteínas	17
1.2.4. A saliva como fluído diagnóstico.....	18
1.2.5. Proteoma salivar e cárie dentária	20
1.2.6. Biomarcadores de suscetibilidade à cárie	21
2. OBJETIVOS.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1. PROTEOMA HUMANO EM CÁRIE DENTÁRIA.....	27
3.1.1. Seleção dos estudos.....	27
3.1.2. Anotação manual de informações relativas às proteínas identificadas	27
3.1.2.1. Identificação das proteínas salivares em cárie dentária	28
3.1.2.2. Origem das amostras salivares estudadas e respetivo conteúdo proteico	29
3.1.2.3. Relação com os estados de saúde e de doença.....	30
3.1.2.4. Caracterização do dador da amostra analisada.....	31
3.1.2.5. Métodos de amostragem e análise	31
3.1.2.6. Outras informações	32

3.1.3. Caracterização funcional.....	32
3.1.4. Comparação com o OralOma Normal.....	34
3.1.5. Interactoma oral em cárie dentária.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1. ORALOMA HUMANO EM ESTUDOS DE CÁRIE DENTÁRIA.....	39
4.1.1. Composição.....	39
4.1.2. Organismos identificados.....	43
4.1.3. Origem das proteínas orais identificadas	44
4.1.4. Relação com estados de saúde e de doença.....	46
4.1.5. Caracterização do dador da amostra	48
4.1.6. Métodos de amostragem e análise.....	49
4.1.7. Outras informações	50
4.2. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO ORALOMA DE CÁRIE DENTÁRIA	51
4.2.1. Processos biológicos das proteínas salivares em cárie dentária.....	51
4.2.2. Funções moleculares das proteínas salivares em cárie dentária.....	56
4.3. INTERACTOMA ORAL DE CÁRIE DENTÁRIA	62
5. CONCLUSÃO	69
6. BIBLIOGRAFIA.....	71
7. ANEXOS	71

Índice de abreviaturas:

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

CPO – Cariados, Perdidos, Obturados

GTF – Glicosiltransferase

sCD14 – CD14 solúvel

sIg – Imunoglobulina salivar

IL – Interleucina

LPS – Lipopolissacarídeo

MeSH – *Medical Subject Headings*

MUC – Mucina

OMIM – *Online Mendelian Inheritance in Man*

PANTHER – *Protein Analysis Through Evolutionary Relationships*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PPI – *Protein-protein interaction*

PPIB – *Peptidylprolyl cis-transisomerase B*

TLR – *Toll Like Receptor*

TNF – *Tumor Necrosis Factor*

UniProtKB – *Universal Protein Knowledgebase*

WIG – *Water insoluble glucan*

Índice de figuras

Figura 1 – Mecanismo fisiológico do processo de desmineralização e remineralização dos tecidos dentários por ação de agentes externos. (Adaptado de Selwitz et all, 2007)	3
Figura 2 – Diagrama de Keyes (14) adaptado por Newbrum (15), ilustrando os fatores etiológicos envolvidos no desenvolvimento de cárie dentária (adaptado de Lima <i>et al</i> 2007).	4
Figura 3 – Composição taxonómica de amostras bacterianas ativas em diferentes lesões de cárie dentária. Os gráficos mostram a proporção de espécies bacterianas identificadas de acordo com o tipo de lesão cariosa avaliada: lesão branca de esmalte (à esquerda); lesão de dentina cavitada (no centro) e lesão de dentina não-cavitada (à direita). No gráfico inferior são apresentadas as proporções relativas às diferentes espécies de <i>Streptococcus</i> (Imagem adaptada de Simón-Soro, A et, all 2014 (30)).	10
Figura 4 – Diversidade de graus de suscetibilidade do dente à acumulação de biofilme dentário e ao desenvolvimento de cárie dentária, de acordo com a sua anatomia. (adaptado de Costolonga <i>et al</i> (2014)(29)).	13
Figura 5 – Principais componentes salivares.....	16
Figura 6 – Representação esquemática da relação entre as principais funções salivares e os seus constituintes intervenientes (41).	18
Figura 7 – Cabeçalhos que permitem a organização sistemática da informação recolhida dos diferentes estudos analisados e referentes às proteínas salivares em cárie dentária.	28
Figura 8 – Cabeçalhos das colunas da tabela registo do proteoma salivar em cárie dentária referentes à identificação de cada proteína.	29
Figura 9 – Exemplo ilustrativo da visualização da ferramenta de pesquisa de proteínas online, no site da UniProt.	29
Figura 10 – Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2010 relativa à origem das amostras salivares utilizadas para análise proteica.	30
Figura 11 – Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2010 referente à relação das proteínas anotadas com os estados de saúde e doença.	30
Figura 12 – Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2010 referente à caracterização do dador da amostra de saliva analisada.	31

Figura 13 – Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2010 referente aos métodos de amostragem e análise das proteínas salivares em cárie dentária.	32
Figura 14 – Sistema de análise em grupo da ferramenta de classificação do PANTHER. As opções selecionadas correspondem às definições utilizadas para analisar os conjuntos de proteínas anotados em cária dentária.	33
Figura 15 – Seleção do tipo de classificação por ontologia desejado, na ferramenta PANTHER.	34
Figura 16 – Dados importados para o programa Cytoscape, com a definição da fonte e alvo de interação, assim como a classificação do tipo de interação.	36
Figura 17 – Importação de dados referentes aos atributos dos nós para o programa Cytoscape, com informação relativa aos microrganismos produtores de cada proteína.	37
Figura 18 – Escolha do layout, recorrendo às funcionalidades do programa Cytoscape.	38
Figura 19 – Distribuição das proteínas identificadas de acordo com o organismo a que pertencem.	43
Figura 20 – Diagrama de Venn representativo da distribuição das proteínas salivares segundo a sua origem. Gráfico obtido com recurso ao programa Venny (83).	45
Figura 21 – Distribuição das proteínas identificadas em estudos relacionados com cárie dentária e a sua relação com indivíduos com e sem cáries (Gráfico obtido recorrendo ao programa Venny (83)); em baixo são discriminadas as proteínas exclusivas de cárie e de saúde dentária, na coluna da esquerda e da direita respetivamente.	46
Figura 22 Distribuição das proteínas salivares de pacientes com cárie dentária, segundo os processos biológicos em que intervêm, recorrendo à ferramenta PANTHER (63,64). É apresentada a diferença fracional entre as proteínas identificadas em cárie dentária e no OralOma normal. A verde estão indicados os processos biológicos que apresentam uma alteração em relação ao OralOma Normal considerada estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).	52
Figura 23 – Distribuição das proteínas salivares de pacientes com cárie dentária, segundo as funções moleculares que desempenham, recorrendo à ferramenta PANTHER (63,64). É apresentada a diferença fracional entre as proteínas identificadas em cárie dentária e no OralOma normal. A verde estão indicadas as funções moleculares que apresentam uma	

alteração em relação ao OralOma Normal considerada estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).	57
Figura 24 – Gráfico representativo da distribuição das proteínas de cárie dentária anotadas no nível 1 da ontologia “Molecular Function” do PANTHER como tendo atividade de regulação enzimática.	59
Figura 25 – Gráfico representativo da distribuição das proteínas de cárie dentária anotadas no nível 2 das ontologia “Molecular function” do PANTHER como tendo função inibitória.	60
Figura 26 – Gráfico representativo da distribuição de proteínas de cárie dentária anotadas no nível 3 da ontologia “Molecular function” do PANTHER como tendo atividade inibitória de peptidases.	61
Figura 27 – Rede de interações das proteínas orais de cárie dentária (círculo da esquerda) com as proteínas presentes no OralOma humano (círculo da direita), gerada através do algoritmo OralInt e visualizada com recurso à ferramenta Cytoscape.	63
Figura 28 – Destaque das proteínas <i>Transcobalamin-1</i> (a verde), <i>Peptidylprolyl cis-transisomeraseB</i> (a amarelo), <i>Small proline-rich protein 3</i> (a lilás) e <i>histone 4</i> (a castanho), a partir da rede de interações das proteínas orais de cárie dentária (círculo da esquerda) com as proteínas presentes no OralOma humano (círculo da direita), gerada através do algoritmo OralInt e visualizada com recurso à ferramenta Cytoscape.	64
Figura 29 – Interações das proteínas orais de cárie dentária, gerada através do algoritmo OralInt, cuja visualização foi realizada com recurso à ferramenta Cytoscape.	66

Índice de tabelas

Tabela 1 – Proteínas salivares identificadas a partir de estudos de proteómica no âmbito de cárie dentária.....	40
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

1. INTRODUÇÃO

1.1. CÁRIE DENTÁRIA

1.1.1. DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

A cárie dentária consiste na destruição localizada de tecidos duros dentários suscetíveis, por ação de produtos resultantes da fermentação bacteriana dos hidratos de carbono provenientes da dieta (1).

Trata-se de uma doença multifatorial, infecciosa, transmissível e dieta-dependente (2), que resulta de uma sequência de estados de doença, de crescente severidade e destruição dentária, que vão desde alterações subclínicas de nível molecular a um envolvimento dentinário ou até pulpar, seja com superfície dentária intacta ou com uma óbvia cavitação (1).

Tratando-se da doença infecciosa crônica mais prevalente no ser humano, a cárie dentária constitui um grave problema de saúde pública a nível mundial (1,3). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 40 a 60% das crianças de todo o mundo apresentam um ou mais dentes cariados, condição que, em indivíduos adultos, representa uma percentagem que ultrapassa os 90% (4).

A cárie dentária constitui a causa primária de dor na cavidade oral (5,6) conduzindo a estados de disfunção orgânica, (nomeadamente no que toca à mastigação, fonética e respiração), mas também a situações de perturbação psicossocial, podendo, em estados tardios, originar complicações infecciosas locais e gerais (6). Vários estudos em crianças têm ainda demonstrado uma possível relação entre a presença da doença e uma taxa de crescimento e desenvolvimento insuficientes (7–10).

1.1.2. ETIOLOGIA DA CÁRIE DENTÁRIA

O processo de desmineralização e remineralização dos tecidos duros dentários ocorre frequentemente ao longo do dia, na maioria das pessoas; a cada ingestão de hidratos

de carbono estes fenómenos repetem-se. Em estados fisiológicos, a remineralização da superfície do esmalte ocorre se o componente nutritivo for removido, se as capacidades de *clearence*, tamponamento e neutralização da saliva forem adequados, e se as concentrações de cálcio, fosfato e iões flúor forem suficientes. Quando o tempo decorrente entre eventos de desmineralização e remineralização é suficiente, a resistência do esmalte à ação dos ácidos aumenta, pela dissolução da apatite carbonada mais solúvel e pela formação de fluorapatite menos solúvel, resultante da incorporação de cálcio e fosfato salivar (1)(Figura 1).

Em casos em que a ingestão de hidratos de carbono se sucede ao longo de intervalos demasiado curtos para que a remineralização tecidual tenha lugar, a difusão de cálcio, fosfato e carbonato para fora do tecido mineralizado torna-se contínua e prolongada, o processo de desmineralização não é compensado pelo processo fisiológico de remineralização e a lesão cáries implementa-se (1,2,11).

O mecanismo pelo qual a cárie dentária se processa é idêntico para todo o tipo de cáries, sejam de esmalte, de dentina ou radiculares: bactérias endógenas, presentes no biofilme oral produzem ácidos fracos, como resultado do metabolismo de hidratos de carbono fermentáveis (glicose, sucrose e frutose) (11); estes ácidos conduzem a uma diminuição sustentada dos valores de pH na interface placa-tecido dentário mineralizado, que se pode estender por mais de 45 minutos após a administração alimentar (11), provocando uma desmineralização local dos tecidos dentários mais suscetíveis (2,11).

A cárie dentária resulta, portanto, de um desequilíbrio ecológico na harmonia fisiológica entre os tecidos mineralizados do dente (esmalte, cemento e dentina) e o biofilme microbiano oral (12).

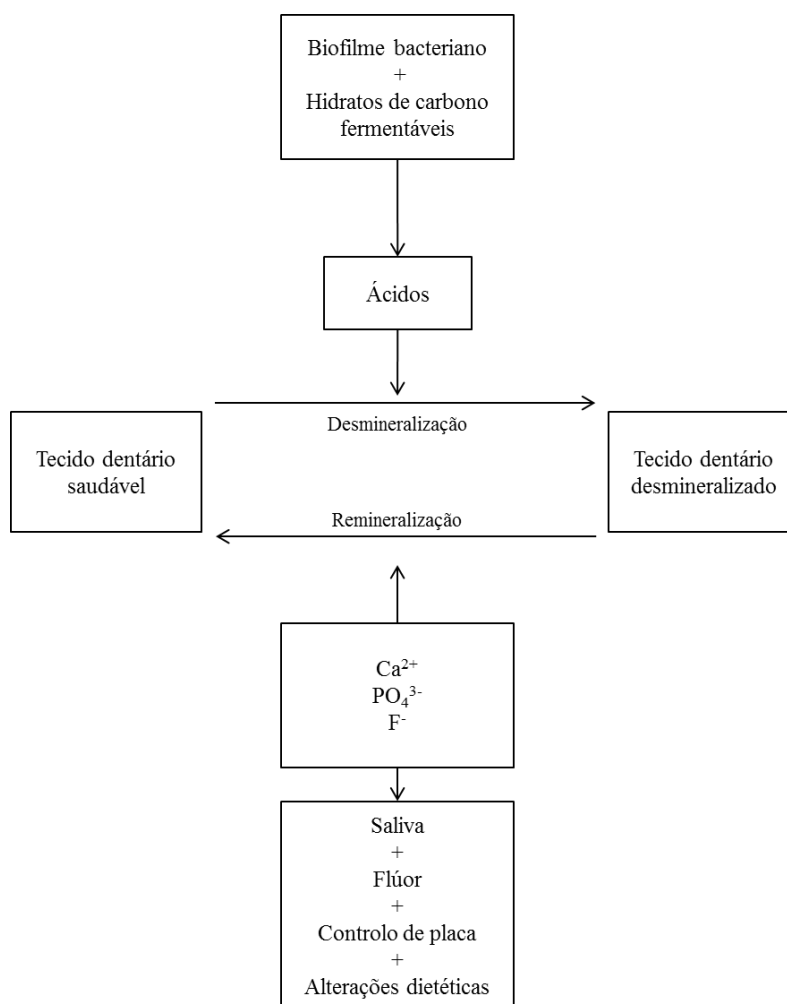


Figura 1 – Mecanismo fisiológico do processo de desmineralização e remineralização dos tecidos dentários por ação de agentes externos. (Adaptado de Selwitz et all, 2007)

A primeira manifestação clínica de cárie dentária resulta de uma desmineralização subsuperficial, sendo observada e denominada como uma “lesão branca do esmalte” (2,11,13). Embora nalguns casos a superfície dentária possa aparentar estar íntegra, desta lesão pode resultar a perda de até 50% da composição mineral do esmalte, com consequente alteração da sua tonalidade. Quando este processo, iniciado no esmalte, não é controlado, a lesão continua a progredir, com destruição gradual das estruturas dentárias, podendo atingir a dentina ou dar origem a uma cavidade profunda de cárie, com envolvimento de esmalte e dentina (2,11,14).

Em 1962, ilustrado por Paul Keyes (15), o conceito de cárie dentária como uma doença multifatorial baseava-se na interação de vários fatores determinantes como “dente suscetível”, “microrganismo” e “dieta”. Mais tarde, em 1983, Newbrum (16), considerando a cárie como resultado de um processo crônico que surge de uma continuidade da presença e interação desses fatores, incluiu o tempo como outro fator etiológico desta doença, dando origem a uma adaptação do Diagrama de Keyes (Figura 2).

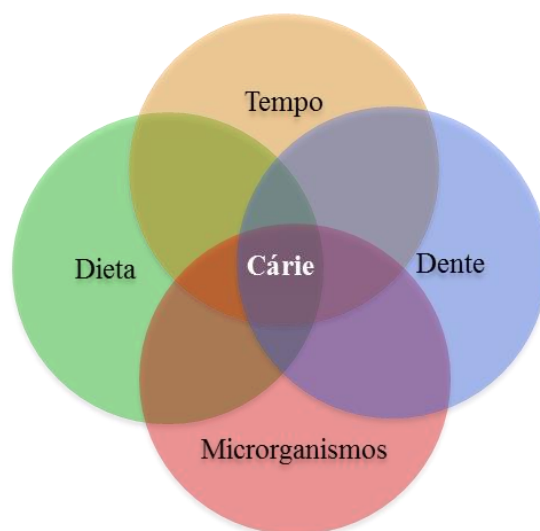


Figura 2 – Diagrama de Keyes (15) adaptado por Newbrum (16), ilustrando os fatores etiológicos envolvidos no desenvolvimento de cárie dentária.

Mais recentemente, num artigo que visou a conceptualização da cárie dentária, Lima *et al* (2), conclui que, embora todos estes fatores participem nos processos de desenvolvimento destas lesões, não podem ser considerados determinantes da doença, mas antes determinantes na formação da placa bacteriana; segundo o autor, é a placa bacteriana que, aderida à estrutura dentária e através do metabolismo microbiano dos hidratos de carbono provenientes da dieta, prolongado no tempo, condiciona o desenvolvimento de cárie dentária (2). Assim, a placa bacteriana tem sido considerada um importante fator no que concerne à formação e progressão das lesões de cárie, sendo influenciada por condições diversas que incluem o pH salivar e o conteúdo em hidratos de carbono fermentáveis da dieta (17,18).

1.1.3. FATORES DE RISCO E SUSCETIBILIDADE

Apesar do estudo intensivo e das estratégias implementadas até ao momento para controlo dos fatores etiológicos da cárie dentária, os resultados não foram além da diminuição da sua incidência; a sua erradicação não foi alcançada. Assim, a relação entre os fatores etiológicos e a atividade de cárie, sugere que os métodos de diagnóstico de pacientes de risco sejam revistos (2).

Embora a cárie dentária seja uma doença multifatorial, com a microflora bacteriana a ser apontada, nas últimas décadas, como o fator primordial da sua origem, fatores adicionais têm demonstrado constituir uma influência na aceleração ou abrandamento do desenvolvimento de novas lesões (19).

A probabilidade de um indivíduo, num determinado momento da sua vida, desenvolver novas lesões cáries ou de se verificarem alterações de tamanho e/ou atividade em lesões pré-existent, designa-se por suscetibilidade à cárie, podendo esta ser influenciada por fatores que tornam o indivíduo mais ou menos suscetível à doença (20,21).

A suscetibilidade de um indivíduo à cárie pode variar ao longo do tempo uma vez que uma parte dos fatores é modificável (1), podendo estes dividir-se em fatores extrínsecos e intrínsecos (2).

1.1.3.1. Fatores extrínsecos

Os fatores de suscetibilidade extrínsecos incluem condições relacionadas com a estrutura sociocultural em que o indivíduo se encontra inserido e que influenciam o seu comportamento, interferindo consequentemente no controle e incidência da doença, tanto a nível individual como a nível populacional (2,22). Ao longo das últimas décadas, um grande número de estudos, na maioria levados a cabo em países desenvolvidos, reportaram uma ligação entre o desenvolvimento de cáries dentárias e fatores sociais e comportamentais (22).

- Sistemas de saúde e serviços de saúde oral – a disponibilidade, métodos preventivos, orientação para tratamento, a centralização ou descentralização e a integração ou não em cuidados primários de saúde, foram considerados

pela OMS, fatores de risco associados à saúde oral em geral e à cárie dentária em particular (22).

- Fatores socioculturais – o nível de educação, a profissão, o rendimento, a etnia, estilo de vida e o acesso a redes de apoio social foram também considerados na avaliação do risco de doença oral, nomeadamente no que respeita à cárie (22).

Os estados social e económico não estão diretamente envolvidos no processo de doença no entanto são de grande importância por afetarem a expressão e o controlo da doença. O estado socioeconómico e educacional do paciente tem implicações na *compliance* e alterações comportamentais que poderão diminuir o risco de cárie nos mesmos (17).

- Fatores ambientais – fatores como o acesso a água fluoretada e saneamento público, disponibilidade de meios para higiene pessoal, estado de nutrição e dieta são fatores que, não sendo intrínsecos ao indivíduo afetam diretamente o seu comportamento e interferem consequentemente influenciam o controlo e incidência de cárie na população(2).

O uso difundido de flúor tem reduzido a prevalência de lesões de cárie, podendo ser considerado um dos fatores preventivos mais importante. Assim, o não acesso a águas fluoretadas constitui um fator potenciador da suscetibilidade à cárie dentária (20).

1.1.3.2. Fatores intrínsecos

Os fatores de suscetibilidade intrínsecos, por outro lado, correspondem a condições físicas e biológicas inerentes ao próprio indivíduo enquanto ser vivo individual e único. Neste grupo incluem-se fatores como o estado de saúde do indivíduo em geral, a medicação administrada, historial prévio de cárie dentária, características da própria dentição – nomeadamente referentes à anatomia dentária e grau de mineralização dos tecidos duros dos dentes – bem como as características inerentes à saliva (2,20,21,23)

Comparativamente com os extrínsecos, os fatores de suscetibilidade intrínsecos são dificilmente controláveis ou modificáveis, o que, sob o ponto de vista de ações preventivas os deixa longe de grandes considerações no âmbito das estratégias a serem propostas. (2) No entanto, o seu caráter intrínseco e imodificável pode constituir a chave no que concerne a métodos de previsão e identificação de suscetibilidade individual à cárie dentária, permitindo uma consequente adequação das medidas preventivas a adotar.

Estado de saúde em geral e medicação

Certo tipo de medicação, nomeadamente psicofármacos, reduzem o fluxo de saliva, podendo interferir na suscetibilidade do paciente à cárie. O mesmo acontece com alterações da saúde geral, como Síndrome de Sjogren ou diabetes não controlada, que, diminuindo a quantidade de saliva libertada na cavidade oral aumenta a probabilidade de desenvolvimento de lesões cariosas. Para além disso, alterações mentais ou físicas que afetem os cuidados regulares de higiene oral ou que requeiram um consumo enriquecido de hidratos de carbono podem influenciar igualmente a suscetibilidade do indivíduo. O uso regular e prolongado de medicação contendo glicose, frutose ou sacarose, pode também constituir um fator de suscetibilidade à cárie dentária (22).

Historial prévio de cáries

Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma relação positiva forte entre experiência de cárie passada e futura, assim como, em crianças cujas mães apresentavam lesões cariosas durante a gestação. A presença de lesões de cárie em dentição primária é igualmente um preditor de suscetibilidade a lesões na dentição definitiva (20)

Microbiota oral

Nas últimas décadas, vários trabalhos de investigação têm fornecido informações significativas no que toca à relação entre a cárie dentária e a composição microbiana salivar (18,24–28). Como descrito acima, um dos fatores etiológicos primários desta doença consiste na presença de ácidos resultantes da metabolização dos hidratos de carbono alimentares por bactérias salivares e do biofilme dentário (21).

Ao contrário do que se verifica com a mucosa oral, que apresenta uma contínua descamação das camadas epiteliais superficiais, a superfície dentária não é constituída por tecidos descamativos, fator que favorece e potencia o desenvolvimento e maturação de um biofilme microbiano complexo (29).

Constantemente exposta e banhada por saliva, cujo conteúdo proteico constitui o principal fator de adesão dos colonizadores microbianos iniciais, a superfície dentária é sujeita à formação da película salivar aderida. Esta fina película, variável em espessura entre 0,1 e 1 μm , consiste numa grande variedade de proteínas e glicoproteínas, essencialmente provenientes da saliva mas também do fluido crevicular gengival e da flora bacteriana oral, concentrando estes constituintes na superfície dos dentes, onde os mesmos apresentam diferentes funções tanto na manutenção da superfície dentária como nas interações com a componente bacteriana oral (30).

A adesão inicial das células bacterianas à película aderida é seguida pela sua proliferação, produção de uma matriz extracelular polissacarídea e formação de ácidos orgânicos resultantes da exposição e metabolização dos hidratos de carbono fermentáveis provenientes da dieta. O biofilme dentário, historicamente designado por “placa bacteriana”, consiste nesta estrutura bacteriana formada sobre a película aderida e cuja acumulação consiste numa organizada e complexa sequência de eventos. Com o aumento de espessura de placa, estabelecem-se interações, não só entre as diferentes espécies bacterianas envolvidas (incluindo interações específicas e cooperação metabólica) mas também entre as bactérias e o componente proteico associado à película aderida (30).

As lesões de cárie progridem em locais em que o biofilme oral tem a possibilidade de se estabelecer e desenvolver por um período de tempo prolongado: quando se forma uma cavidade resultante de um processo carioso, esta serve de proteção para os microrganismos da placa que, gradualmente, se adaptam ao ambiente ácido (1,2,14).

Estudos baseados no ácido desoxirribonucleico (ADN) bacteriano da cavidade oral estimam que o biofilme dentário supragengival humano contenha entre 500 e 700 espécies bacterianas. Estas estimativas aumentam consideravelmente, para cerca de 1000 a 2000 espécies, se considerarmos a saliva, uma vez que este fluido está em contacto com todos os nichos da cavidade oral. Em lesões de cárie, no entanto, o número decresce para cerca de

100-200 filótipos a nível da espécie, seja em cáries iniciais, de esmalte, de dentina ou cavidades profundas envolvendo os dois tecidos (25).

Apesar da variabilidade a nível do microbiota oral observada em indivíduos com lesões de cárie ativa e indivíduos livres de cárie, estes partilham cerca de 50 % do microbiota supragengival (29). Os níveis de diversidade bacteriana variam não apenas entre indivíduos mas também entre diferentes lesões de cárie no mesmo indivíduo. Enquanto lesões iniciais de cárie apresentam nichos de diversidade restrita, lesões cavitadas com envolvimento de dentina apresentam comunidades de grande complexidade; comparando lesões de dentina com e sem cavitação, as primeiras apresentam maior diversidade microbiana comparada com a segunda, o que sugere que em lesões de cavitação possa haver um suplemento de microrganismos provenientes da cavidade oral (25,31).

Estudos clássicos baseados em culturas microbianas estabeleceram *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus sp.* como os principais agentes etiológicos das lesões de cárie dentária. No entanto, as lesões de cárie têm provado ser ecossistemas extraordinariamente diversos dos quais *S. mutans* constitui, no máximo, 1,6% da comunidade bacteriana da lesão. Nos últimos anos, outras espécies microbianas têm sido igualmente isoladas de lesões cariosas e têm sido relacionadas com a doença, incluindo *Bifidobacterium sp.* e *Scardovia sp.* (25,31).

Sob condições acídicas e prolongadas, como as que acompanham a progressão da lesão de cárie dentária, aumenta a predominância de bactérias acidúricas, o que envolve não apenas *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus sp.*, mas também estirpes de *Streptococcus não-mutans*, *Actinomyces sp.*, *Bifidobacterium sp.* e fungos (32,33).

Para além da diversidade observada entre lesões cariosas, estudos recentes sugerem uma base tecido-dependente na variabilidade das comunidades microbianas, suportada por diferenças significativas entre a composição bacteriana ativa em lesões de esmalte e lesões de dentina. Os géneros *Streptococcus*, *Rothia*, *Leptotrichia* e *Veillonella* destacam-se com elevados níveis em cáries de esmalte, enquanto os géneros *Lactobacillus sp.*, *Shlegelella*, *Pseudoramibacter* e *Atopobium* têm surgido claramente associados a lesões de dentina (Figura 3). Existe ainda um elevado número de espécies minoritárias (com proporções inferiores a 1%) encontradas exclusivamente em lesões de esmalte e outras como as

pertencentes aos géneros *Tannarella*, *Olsenella*, *Filifactor* e *Treponema* identificadas apenas em lesões de dentina. (31)



Figura 3 – Composição taxonómica de amostras bacterianas ativas em diferentes lesões de cárie dentária. Os gráficos mostram a proporção de espécies bacterianas identificadas de acordo com o tipo de lesão cariosa avaliada: lesão branca de esmalte (à esquerda); lesão de dentina cavitada (no centro) e lesão de dentina não-cavitada (à direita). No gráfico inferior são apresentadas as proporções relativas às diferentes espécies de *Streptococcus* (Imagem adaptada de Simón-Soro, A *et al* (2014) (31)).

O facto das comunidades bacterianas associadas a lesões de cárie variarem em diferentes estados de progressão da doença, bem como a desigualdade verificada entre indivíduos, sugere que as mesmas funções podem ser realizadas por diferentes grupos de microrganismos (25). Assim, mais importante do que conhecer uma lista de todos os microrganismos cariogénicos é fundamental compreender a sua ação, o seu metabolismo e interação com elementos presentes no ambiente dentário, nomeadamente a saliva e os seus constituintes.

A contagem de bactérias presentes na saliva, por exemplo, associada a outros fatores anteriormente discutidos, como a dieta e fatores sistêmicos, pode permitir uma estimativa da suscetibilidade a cárie do indivíduo. Um número aumentado de *Lactobacillus* e *Streptococcus mutans* na saliva tem sido associado a uma prevalência aumentada de cárie dentária. Além disso, a análise dos níveis de bicarbonato e outros íons importantes que demonstrem alterações podem também ser sugestivos de uma predisposição à cárie dentária, dada a sua importância na manutenção do pH salivar e na capacidade de tamponamento. (34)

A participação dos microrganismos na cavidade oral é inquestionável e indispensável no que toca ao processo de cárie, já que a lesão de cárie passa pelo metabolismo bacteriano com formação de ácidos. No entanto, este não deve ser considerado um fator determinante, uma vez que o processo fisiológico de desmineralização-remineralização não é sinónimo do desenvolvimento de lesão de cárie dentária (2). Novos estudos indicam que, aparentemente, a cárie dentária poder-se-á desenvolver por ineficiência da neutralização dos ácidos produzidos e não pelo aumento da sua produção (35). Assim, o microrganismo deve ser considerado como um fator participativo mas não determinante na etiologia da cárie.

Dieta e nutrição

A relação entre dieta, nutrição e a saúde dentária pode ser vista como uma ligação sinérgica de duas vias: a dieta tem um efeito local primário na integridade das peças dentárias, pH e composições da saliva e placa bacteriana; por outro lado, a nutrição tem um efeito sistémico na integridade dos tecidos da cavidade oral, nomeadamente dos dentes, periodonto, mucosa e osso alveolar. Alterações no aporte de nutrientes secundário a modificações dietéticas, pode afetar a integridade, tanto dos tecidos dentários, como dos tecidos paradentários (36).

A cárie dentária tem sido fortemente associada, nomeadamente ao longo dos anos 80 e 90, com a frequência de ingestão de hidratos de carbono fermentáveis, que se dividem em dois grupos: complexos e simples. Embora os hidratos de carbono complexos sejam considerados menos cariogénicos, uma vez que os seus amidos não são solúveis nos fluidos orais e tem uma taxa de difusão baixa no biofilme, hidratos de carbono simples, como a

sacarose, glicose e frutose, pela facilidade de solução na saliva e difusão no biofilme oral, são considerados altamente cariogênicos, tendo sido, ao longo das últimas décadas, indicados como importantes determinantes no desenvolvimento de cáries dentárias (37).

As propriedades cariogênicas dos hidratos de carbono explicam-se com base no mecanismo: a difusão dos mesmos na placa bacteriana permite a sua metabolização pelas bactérias que a constituem, conduzindo à libertação de ácidos em concentrações suficientes para diminuir o pH na superfície do dente e conduzir aos processos de desmineralização previamente abordados; a sacarose está envolvida na síntese de glicanos extracelulares, fator que favorece a acumulação de bactérias cariogênicas no biofilme dentário (38).

No entanto, é importante perceber que a relação entre a dieta e o desenvolvimento de lesões de cárie mudou ao longo do tempo: embora não exista uma clara alteração no consumo total de açúcares ao longo dos últimos 30 anos, é visível uma mudança na forma como o açúcar é utilizado, com uma redução da utilização de sacarose e aumento do uso de frutose. Assim, apesar da redução na prevalência de cáries ter vindo a ser atribuída aos efeitos tópicos do flúor, a redução do consumo de sacarose e a sua substituição por outro tipo de hidratos de carbono pode ter tido, igualmente, uma contribuição positiva (39).

A avaliação dos hábitos alimentares de cada indivíduo, com especial análise à exposição a açúcares e tipo de alimentos diariamente ingeridos, torna-se então um componente essencial nos cuidados preventivos de saúde oral e na previsão do risco individual de desenvolvimento de lesões cariosas. Um aconselhamento nutricional deve focar-se não apenas na redução da exposição a açúcares mas também a recomendações sobre alternativas mais saudáveis (37,40).

Dente

A suscetibilidade do dente à cárie é determinada por fatores respeitantes à própria denteição, destacando-se a sua localização, morfologia, composição e idade pós eruptiva.

Localização e morfologia

A somar à complexa etiologia da cárie dentária encontra-se a não uniforme suscetibilidade das superfícies dentárias ao longo de toda a denteição. A sequência e natureza das lesões de cárie demonstram uma hierarquia de suscetibilidade à cárie, com os

sulcos e fissuras a exibir maior risco do que superfícies lisas (23). Quanto mais favoráveis as condições para o desenvolvimento do biofilme dentário e maior dificuldade de higienização (como por exemplo nas zonas interproximais, faces posteriores e palatinas dos dentes inferiores), maior a suscetibilidade do dente ao desenvolvimento de lesões cariosas (29) (Figura 4).

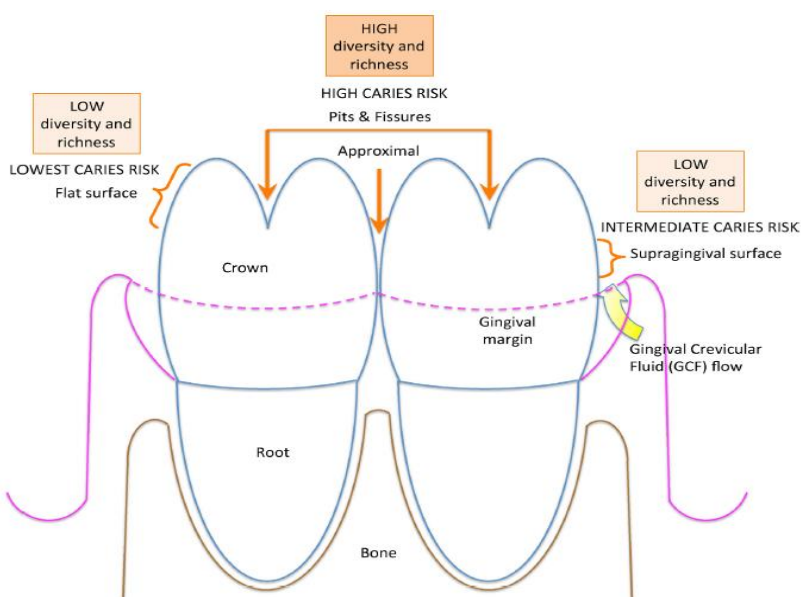


Figura 4 – Diversidade de graus de suscetibilidade do dente à acumulação de biofilme dentário e ao desenvolvimento de cárie dentária, de acordo com a sua anatomia. (adaptado de Costolonga *et al* (2014)(29)).

Composição

O grau de mineralização dos tecidos dentários é inversamente proporcional à sua resistência à dissolução ácida. Este fator está intimamente relacionado com fatores de suscetibilidade extrínsecos e intrínsecos, nomeadamente ambientais e presentes no desenvolvimento dentário (2). Assim, dentes acabados de erupcionar são mais suscetíveis à cárie do que aqueles que já erupcionaram e tiveram oportunidade de terminar o seu desenvolvimento na cavidade oral (28). Adicionalmente, defeitos do esmalte, como a hipoplasia, têm sido relacionados com suscetibilidade aumentada à cárie (28).

Embora o esmalte receba mais atenção científica pela sua superfície se encontrar diretamente exposta ao ambiente oral, mais recentemente, também a dentina começou a receber considerações no que toca à suscetibilidade à cárie. Uma vez que a dentina é relativamente mais solúvel do que o esmalte, diferenças críticas no que toca à suscetibilidade deste tecido ao desenvolvimento e progresso de lesões de cárie devem ser esperadas (37).

Idade pós eruptiva

Imediatamente após a erupção do dente, a superfície do esmalte em contacto com o ambiente oral inicia um processo de maturação, com aumento da sua mineralização e resistência. No entanto, e uma vez que os processos de desmineralização-remineralização se repetem ao longo do tempo, a velocidade de maturação do esmalte pode não ser suficiente para acompanhar os processos de desmineralização e a lesão de cárie instala-se. Assim, a suscetibilidade do esmalte à cárie é maior quanto mais recente for a sua data de erupção (37).

Um estudo preciso do risco individual dos pacientes ao desenvolvimento de lesões de cárie poderá permitir a identificação de pacientes de risco aumentado, possibilitando terapias preventivas e melhorando a efetividade dos tratamentos (21)

1.2. SALIVA

A saliva é o biofluido de recolha menos invasiva do corpo humano, banhando permanentemente a cavidade oral e responsável pela manutenção do equilíbrio de um meio em constante mudança. (41,42) A este fluido são reconhecidas funções extremamente importantes no que toca a mecanismos protetores da cavidade oral, de manutenção da flora normal e da integridade das superfícies dentárias nomeadamente pela eliminação bacteriana, atividade antibacteriana, capacidade tampão e remineralização dentária (17), sendo por isso relevante a sua análise para avaliação de processos cariogénicos.

1.2.1. ORIGEM

Ao longo do dia, um indivíduo adulto saudável produz, em média, 1-1,5 litros de saliva (41,43–45), podendo, no entanto, a sua produção ser modificada quantitativa e qualitativamente na presença de condições tanto fisiológicas como patológicas (46).

É possível considerar dois tipos salivares de acordo com a sua origem: a saliva total e a saliva específica de cada glândula produtora. A saliva total corresponde à complexa mistura de fluídos provenientes não só das glândulas salivares secretoras como também de origens não-salivares, como sejam o fluido crevicular gengival ou restos alimentares submetidos a mastigação; o segundo tipo corresponde ao fluido produzido diretamente em cada glândula salivar específica, sendo maioritariamente segregada pelos três pares de glândulas principais: parótidas (20%), submandibulares (65-70%) e sublinguais (7-8%). Cerca de 90% do volume diário de saliva é produzido por estas glândulas, estando a restante produção a cargo de diversas glândulas salivares menores, dispersas pela mucosa oral (41,43).

1.2.2. COMPOSIÇÃO

A composição salivar varia de local para local no interior da cavidade oral de cada indivíduo e é modificada de acordo com a altura do dia e a proximidade das refeições, dependendo também do facto de resultar de uma produção basal ou estimulada; as suas propriedades são ainda afetadas pelo nível de hidratação e de saúde geral do indivíduo (46,47).

O fluido salivar constitui uma secreção mucosserosa clara, exócrina e ligeiramente acídica (pH 6-7), consistindo em aproximadamente 99% de água com concentrações variáveis de eletrólitos (sódio, potássio, cálcio, magnésio, bicarbonato e fosfato) e componentes orgânicos, nomeadamente proteínas da mais variada importância na manutenção da saúde oral (44,45,47,48) (Figura 5).



Figura 5 – Principais componentes salivares.

Na saliva total, correspondente à complexa mistura de fluídos provenientes não só das glândulas salivares secretoras como também de origens não-salivares, é ainda possível identificar outros componentes, nomeadamente provenientes do fluido crevicular gengival, transudato da mucosa oral, secreções nasais e faríngeas, derivados sanguíneos, bactérias e produtos bacterianos, vírus, fungos, células epiteliais descamadas e restos alimentares submetidos ao processo de mastigação (43–45).

Diversas proteínas presentes na saliva, assim como outros componentes (por exemplo fármacos e hormonas), apresentam origem sanguínea, que normalmente não se encontram entre os constituintes salivares, mas que podem surgir na sua composição. Os processos pelos quais estas moléculas e substâncias surgem no fluído salivar são variados,

podendo ocorrer por: sangramento intra-oral, que permite o contacto de células serológicas com a saliva; transferência direta através do plasma, no interior das glândulas salivares, tanto por vias intracelulares (difusão simples) como por vias extracelulares (ultrafiltração); através do fluxo de fluido crevicular gengival (FCG) que, dependendo do grau de inflamação gengival pode consistir num exsudado sérico ou inflamatório com componentes séricos (45).

1.2.3. FUNÇÃO: O PAPEL DAS PROTEÍNAS

Inúmeras são as funções nas quais a saliva se envolve, encontrando-se estas intimamente ligadas com a sua composição proteica, e das quais se destacam a ação sobre os dentes, a mucosa oral, os alimentos e os microrganismos colonizadores da cavidade oral (43) (Figura 6).

Entre as muitas funções salivares incluem-se:

- Lubrificação e proteção dos tecidos orais;
- Ação sobre o paladar, atuando como solvente para iões e por ação de proteínas como a gustina;
- Manutenção da integridade da mucosa oral, pela ação de fatores de crescimento, promotores de uma cicatrização adequada e rápida, e de cistatinas, inibidoras de enzimas destrutivas como as cistatinas protéases;
- Assistência à digestão alimentar, por ação de amilases e protéases;
- Diluição e irrigação da cavidade oral;
- Tamponamento de ácidos provenientes da alimentação e presentes na placa bacteriana, prevenindo a desmineralização causada pelos mesmos;
- Reserva de iões essenciais nos processos de remineralização dentária;
- Controlo da microflora oral através de mediadores imunológicos, enzimáticos, proteicos e químicos. (47)

Os componentes salivares, particularmente as proteínas, são multifuncionais (realizando mais de uma função), redundantes (realizando funções semelhantes em

contextos e extensões diferentes) e anfifuncional (atuando tanto a favor como contra o hospedeiro) (45).

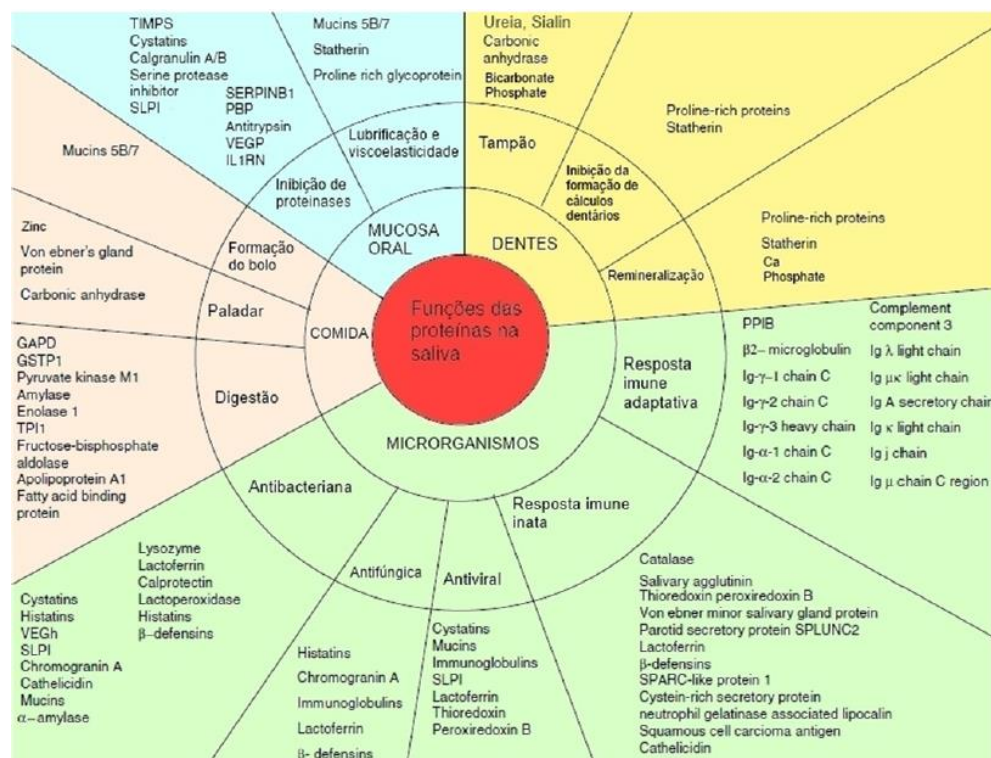


Figura 6 – Representação esquemática da relação entre as principais funções salivares e os seus constituintes intervenientes (adaptado de Rosa *et al* (2011) (43)).

1.2.4. A SALIVA COMO FLUÍDO DIAGNÓSTICO

A possibilidade de monitorização de estados de saúde bem como do surgimento, progressão e prognóstico de doenças, através de meios não invasivos é um dos grandes objetivos no que toca à promoção e cuidados de saúde (49).

Um grande obstáculo na utilização da saliva como fluido diagnóstico tem sido a noção de que elementos informativos (analitos) se encontram em menores quantidades na saliva do que no soro. Com o desenvolvimento de novas e mais sensíveis técnicas de análise, no entanto, a pequena quantidade de analitos na saliva, deixou de ser uma limitação, com a possibilidade de quase todos os elementos passíveis de serem encontrados

numa análise sanguínea, poderem-no ser igualmente na saliva. Assim, a capacidade de deteção de doenças sistémicas a partir de análises salivares tem sido demonstrada nos últimos anos para várias patologias, nomeadamente, cancro oral, Síndrome de Cushing, HIV 1 e 2 e Hepatites Virais A, B e C (48).

Como fluido diagnóstico, a saliva oferece vantagens em relação ao soro podendo ser recolhida de forma não-invasiva por indivíduos não especializados, facilmente armazenada e transportada, e oferecendo um custo-benefício favorável na recolha de quantidades suficientes para análise (46,51). Adicionalmente, a saliva é um fluido de diagnóstico em tempo real: uma vez que as glândulas salivares são de natureza exócrina, produzem perfis proteicos indicativos do estado de saúde ou doença do indivíduo no momento da recolha. Para além disso, a recolha salivar está associada a um risco mínimo de infeções, podendo ser efetuada até em situações mais desafiantes, como em crianças não cooperantes ou pacientes ansiosos, nos quais a recolha de sangue pode ser de difícil execução (46).

Nas últimas duas décadas, várias técnicas têm sido estudadas na avaliação do risco dos pacientes para determinadas doenças, entre as quais doenças orais, nomeadamente a doença periodontal e a cárie dentária (51).

De facto, no que toca à suscetibilidade à cárie dentária, a saliva tem demonstrado um potencial real para a sua avaliação. Edgar e Highman (52), categorizaram os efeitos anti-cariogénicos da saliva como sendo estáticos ou dinâmicos: efeitos estáticos são aqueles que podem ser considerados contínuos e são exercidos na composição microbiana da placa através de fatores metabólicos ou antimicrobianos, efeitos protetores resultantes da formação da película salivar e efeitos dos eletrólitos salivares (como fluor) na manutenção de um ambiente supersaturado para os minerais dentários; efeitos dinâmicos, por seu turno, relacionam-se com o fluxo que segue a estimulação salivar e que se altera ao longo do tempo. Estes últimos incluem a neutralização dos produtos ácidos resultantes do metabolismo bacteriano após a ingestão de açúcares e a capacidade de tamponamento (21).

A saliva é ainda adequada na monitorização do conteúdo bacteriano capaz de sobreviver em ambiente oral e utilizar os constituintes salivares como substrato para o seu crescimento. Mais de 700 espécies microbianas orais estão neste momento identificadas, tornando a flora oral uma das mais complexas comunidades microbianas do corpo humano. Existem cerca de 10^8 a 10^9 CFU/ml de microrganismos vivos na saliva, refletindo a

composição microbiana e podendo servir como biomarcadores de estados de saúde e doença na cavidade oral. Por exemplo, estudos prévios, têm demonstrado uma correlação significativa entre as concentrações de *Streptococcus mutans* e *Lactobacilos sp* na saliva e na placa dentária; os níveis de espécies cariogénicas na saliva tem sido igualmente investigadas como potenciais ferramentas de avaliação de risco de cárie (21).

1.2.5. PROTEOMA SALIVAR E CÁRIE DENTÁRIA

De um ponto de vista bioquímico, as proteínas constituem o componente mais importante da saliva, pelo que, uma análise compreensiva e que conduziu à identificação do conteúdo proteico da saliva foi o primeiro passo para a descoberta de biomoléculas salivares associadas a estados de saúde e doença no homem (46).

Atualmente, a proteómica é amplamente vista como um poderoso meio de pesquisa biomédica, procurando a identificação e caracterização de novos péptidos e proteínas com importante atividade biológica, nomeadamente a nível de condições patológicas (46).

Com os avanços significativos em espetrometria de massa e tecnologias associadas aos estudos de proteómica, a descoberta de biomarcadores proteicos tem-se tornado uma das aplicações centrais da proteómica. Assim, e associando as vantagens da utilização da saliva como fluido de diagnóstico, a análise do seu proteoma tem vindo a adquirir um papel de relevo na descoberta de biomarcadores para doenças humanas, nomeadamente a cárie dentária (46,53).

No que concerne à sua ação sobre os dentes, a saliva, e em particular o seu conteúdo proteico, é essencial na conservação da dentição ao longo da vida, estando várias das suas funções associadas à proteção e manutenção da saúde dentária:

- A superfície dentária é continuamente protegida do desgaste por mucinas e glicoproteínas ricas em prolina presentes no biofilme salivar;
- As proteínas presentes no biofilme que inicialmente se forma na superfície dentária, nomeadamente proteínas ricas em prolina e estaterinas, promovem a remineralização do esmalte por atração de iões cálcio;

- A desmineralização dos tecidos dentários é limitada por ação de proteínas da película aderida, em conjunto com íons cálcio e fosfato da saliva e da placa bacteriana;
- Diversas glicoproteínas salivares previnem a adesão de microrganismos orais à película dentária, inibindo o seu crescimento;
- O sistema de tamponamento salivar é responsável pela neutralização dos ácidos associados à desmineralização do esmalte e ao processo de cárie dentária, conduzido por bicarbonatos, fosfatos e ureia;
- Proteínas macromoleculares e mucinas têm atividade depuradora, agregante e/ou de ligação a microrganismos orais, contribuindo para o metabolismo da placa bacteriana;
- Diversas proteínas e complexos enzimáticos, nomeadamente associados a imunoglobulinas, providenciam ação antibacteriana (45,54);
- A saliva é fundamental na manutenção da regulação homeostática do ambiente oral, pelo que as interações entre as proteínas salivares e fatores de virulência microbianos têm um papel crucial na imunidade inata do hospedeiro (55);
- Proteínas salivares com capacidade antioxidante atuam de forma a neutralizar os radicais livres produzidos aquando do desenvolvimento e progressão de lesões de cárie (56).

É ainda previsível que exista uma grande variedade de proteínas presentes na saliva, cuja caracterização não foi ainda realizada e cuja função tenha impacto, não apenas a proteção dos tecidos dentários, mas na dinâmica geral do desenvolvimento de cárie dentária (57).

1.2.6. BIOMARCADORES DE SUSCETIBILIDADE À CÁRIE

Até à data, a utilidade diagnóstica de análises salivares para quantificação de componentes ou microrganismos de forma individualizada, demonstrou ser limitada no que concerne à previsão da suscetibilidade à cárie dentária (57). Dada a influência do proteoma

salivar na manutenção da dinâmica do ambiente oral, é concebível considerar que alterações no seu conteúdo possam ser paralelas às alterações verificadas durante o desenvolvimento e progressão de lesões de cárie dentária e que, desta forma, as proteínas salivares possam constituir potenciais biomarcadores de suscetibilidade de um indivíduo ao desenvolvimento de cárie(s) dentária(s).

Um biomarcador é definido como uma medida farmacológica ou fisiológica utilizada na predição de um evento tóxico; trata-se de uma molécula específica no organismo com características particulares que a tornam num instrumento de medida de progressão de uma doença ou efeitos de um tratamento (58).

Um variado grupo de proteínas salivares (nomeadamente imunoglobulinas, citocinas, lisozimas, lactoferrinas, lactoperoxidase, aglutininas, mucinas, cistatinas) tem sido amplamente associado a propriedades antimicrobianas, influenciando o desenvolvimento da película aderida, por inibição da adesão de *Streptococcus mutans*, modulando a agregação bacteriana ao biofilme e/ou ativando os mecanismos imunológicos de defesa do hospedeiro (59).

Um dos elementos humorais mais importantes do sistema imune local da cavidade oral é a Imunoglobulina A (IgA) salivar, capaz de reduzir a adesão dos microrganismos à superfície dentária e à mucosa oral, contribuindo para o controlo do início da colonização bacteriana (60,61). O mecanismo de ação desta proteína pensa-se estar relacionado com a sua interferência na adesão sacarose-dependente e independente de *Streptococcus mutans* à hidroxiapatite bem como à provável inibição da atividade metabólica de colónias bacterianas (61).

As mucinas salivares também têm demonstrado uma variedade de funções no que concerne à manutenção da saúde oral. Como constituintes da película aderida, as mucinas cooperam na colonização bacteriana inicial, pela promoção do crescimento de microrganismos benignos da flora comensal oral, formando uma barreira protetora e lubrificando a superfície dentária contra o desgaste, providenciando uma barreira de difusão contra a penetração de ácidos e limitando o egresso de minerais da superfície do dente (21,62).

CD14 solúvel (sCD14), uma glicoproteína membranar expressa predominantemente na superfície de monócitos/macrófagos e neutrófilos, tem um papel crucial no

reconhecimento de diversos produtos microbianos, como são exemplo os lipopolissacarídeos (LPS) e peptidoglicanos, que constituem os maiores componentes das superfícies de bactérias gram-negativas e gram-positivas respetivamente (63).

A *lactoferrin*, um dos fatores de defesa não específicos na saliva, tem sido objeto de estudo nos últimos 40 anos, pelo seu efeito bacteriostático direto, atribuído não apenas à sua alta afinidade ao ferro (elemento fundamental para o crescimento bacteriano), mas também pela sua capacidade de danificar a membrana bacteriana externa (61).

Embora a maioria dos estudos de proteómica dirigidos à cárie dentária concentrem as suas pesquisas na identificação de biomarcadores humanos, também as proteínas microbianas têm demonstrado uma variação considerável ao longo do desenvolvimento das lesões. A cariogenicidade associada a *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, por exemplo, está associada às suas capacidades de produção de três e quatro tipos de glicosiltransferases (GTF), respetivamente. Trata-se de enzimas com importantes funções de catálise na formação, a partir da sacarose alimentar, de glicanos extracelulares insolúveis em água (WIG). Os WIG desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de placa bacteriana pela sua capacidade de adesão a superfícies lisas, como são as superfícies dentárias, assim como pela mediação da agregação de células bacterianas e restos alimentares (64).

A identificação de proteínas salivares como biomarcadores de cárie dentária poderá, no futuro, permitir a classificação dos pacientes como suscetíveis, quando o respetivo marcador se encontrar presente ou alterado na análise salivar efetuada. Desta forma, o individuo pode ser orientado para um programa de saúde oral especializado, nomeadamente com controlo alimentar e de hábitos de higiene oral, de forma a prevenir o desenvolvimento de cáries dentárias por meio de um maior acompanhamento (19).

2. OBJETIVOS

A realização do presente trabalho tem como base o estudo de alterações proteicas salivares em pacientes com cárie dentária e o conhecimento de que a saliva constitui um dos agentes primários de proteção das estruturas dentárias.

Os principais objetivos deste trabalho consistiram em:

- Catalogação das proteínas humanas e microbianas da cavidade oral de pacientes com cárie dentária e anotação manual de informações consideradas relevantes para a interpretação de dados de proteómica nesta patologia;
- Atualização do OralCard com a informação levantada no decorrer do trabalho;
- Avaliação das principais diferenças entre o proteoma salivar em cárie e o mesmo em indivíduos saudáveis;
- Avaliação das implicações funcionais das proteínas humanas orais identificadas no proteoma salivar de cárie dentária;
- Avaliação da interação das proteínas salivares presentes em cárie com os restantes componentes microbianos e proteicos presentes na cavidade oral e influentes no mecanismo de cárie dentária;
- Revisão e proposta de proteínas que, de acordo com as suas funções e dados de quantificação em cárie dentária, representem potencial de biomarcadores da doença.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. PROTEOMA HUMANO EM CÁRIE DENTÁRIA

3.1.1. SELEÇÃO DOS ESTUDOS

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica eletrônica com recurso a ferramentas de pesquisa como o portal PubMed Medline, Lilacs e Scielo, utilizando como expressões de pesquisa os seguintes termos MeSH (*Medical Subject Headings*): “dental caries”; “caries susceptibility”; “salivar proteins”; “biomarkers”; “proteomics”.

De forma a poder desenvolver uma revisão sistemática baseada na relação entre proteínas salivares e cárie dentária, procedeu-se ao registo de todas as proteínas identificadas em dois tipos de estudos: estudos observacionais controlados de comparação proteómica de indivíduos com experiência de cárie (CPO=0) e indivíduos sem experiência de cárie (CPO>0); e estudos observacionais controlados de comparação proteómica de indivíduos de acordo com o seu nível de CPO. Desta forma foi possível, posteriormente, avaliar se as proteínas salivares poderão ou não constituir potenciais biomarcadores da doença. Artigos não referentes à cárie dentária ou estudos experimentais com amostras não provenientes da cavidade oral e/ou de população não pertencente à espécie *Homo sapiens*, foram excluídos.

Com base na análise dos artigos selecionados, foi realizado um levantamento de todas as proteínas salivares identificadas nas amostras estudadas que ainda não tinham sido incluídas na base de dados do proteoma oral do OralCard, procedendo-se, assim, à atualização da base de dados referente ao OralOma humano e microbiano de cárie dentária.

3.1.2. ANOTAÇÃO MANUAL DE INFORMAÇÕES RELATIVAS ÀS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS

A análise de cada um dos estudos experimentais permitiu a anotação manual de uma série de informações que foram consideradas essenciais para a interpretação dos dados

catalogados. Esta inclui: dados de identificação de cada uma das proteínas, o local de recolha da amostra, a relação de cada proteína com os estados de saúde e de doença, a caracterização do dador da amostra, a caracterização dos métodos de amostragem e de análise, bem como a existência de modificações pós-tradução associadas a cada proteína (Figura 7). As informações recolhidas poderão ser igualmente úteis na análise comparativa de discrepâncias encontradas entre resultados de estudos diferentes.

UniProtKBAC	Gene name	Name	Organism	Parotid	Parotid Exosome	SM/SL
Minor	Whole Saliva	Crevicular Fluid	Mucosa	Tongue	Biofilme	In Vitro
Health	Disease (OMIM ID)	Disease (MeSH ID)	Regulation	Age group	Gender [±]	Social Habits [±]
Methods of Sampling ^{**}	Methods of Analysis ^{***}	Type of Study	PTM	Biomarker	Citation (NCBI ID)	Obs.

Figura 7 – Cabeçalhos que permitem a organização sistemática da informação recolhida dos diferentes estudos analisados e referentes às proteínas salivares em cárie dentária.

3.1.2.1. Identificação das proteínas salivares em cárie dentária

O primeiro passo no registo das proteínas salivares foi a sua identificação (Figura 8).

UniProtKBAC	Gene name	Name	Organism
-------------	-----------	------	----------

Figura 8 – Cabeçalhos das colunas da tabela registo do proteoma salivar em cárie dentária referentes à identificação de cada proteína.

A cada proteína foi atribuído o seu código de identificação universal (UniProtKB), através da pesquisa e seleção na base de dados *online* UniProt (<http://www.uniprot.org/>) (Figura 9).

Entry	Entry name	Protein names	Gene names	Organism	Length
P49935	CATH_MOUSE	Pro-cathepsin H (Cathepsin B3) (Cathepsin BA) [Cleaved into: Cathepsin H mini chain; Cathepsin H (EC 3.4.22.16); Cathepsin H heavy chain; Cathepsin H light chain]	Ctsh	Mus musculus (Mouse)	333
P09668	CATH_HUMAN	Pro-cathepsin H [Cleaved into: Cathepsin H mini chain; Cathepsin H (EC 3.4.22.16); Cathepsin H heavy chain; Cathepsin H light chain]	CTSH, CPSB	Homo sapiens (Human)	335
P07339	CATD_HUMAN	Cathepsin D (EC 3.4.23.5) [Cleaved into: Cathepsin D light chain; Cathepsin D heavy chain]	CTSD, CPSD	Homo sapiens (Human)	412
P24268	CATD_RAT	Cathepsin D (EC 3.4.23.5) [Cleaved into: Cathepsin D 12 kDa light chain; Cathepsin D 9 kDa light chain; Cathepsin D 34 kDa heavy chain; Cathepsin D 30 kDa heavy chain]	Ctsd	Rattus norvegicus (Rat)	407

Figura 9 – Exemplo ilustrativo da visualização da ferramenta de pesquisa de proteínas *online*, no site da UniProt.

Utilizando o *site* da UniProt, obtivemos dados essenciais à identificação proteica: com base no nome da(s) proteína(s) recolhido durante a fase de análise bibliográfica, obtivemos as informações referentes ao código de entrada da base de dados, nome do gene associado e organismo a que pertence.

3.1.2.2. Origem das amostras salivares estudadas e respetivo conteúdo proteico

De acordo com a origem das amostras salivares recolhidas e analisadas em cada estudo, as proteínas foram associadas a um dos seguintes grupos: glândulas parótidas; exossoma das glândulas parótidas; glândulas submandibulares/sublinguais; glândulas

minor; saliva total; fluído crevicular; mucosa oral; língua; biofilme ou de culturas *in vitro* (Figura 10).

Parotid	Parotid Exosome	SM/SL	Minor	Whole Saliva	Crevicular Fluid	Mucosa	Tongue	Biofilme	In Vitro
---------	-----------------	-------	-------	--------------	------------------	--------	--------	----------	----------

Figura 10 – Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2010 relativa à origem das amostras salivares utilizadas para análise proteica.

3.1.2.3. Relação com os estados de saúde e de doença

A anotação da relação das proteínas em cárie dentária com estados de saúde ou doença, permite inferir se as mesmas são exclusivas de um único estado fisiológico (presença de cárie dentária (doença) ou ausência de cárie dentária (saúde)), ou se, por outro lado, estas estão presentes em ambas os casos (Figura 11).

Para identificação da patologia em estudo foram anotados o código MeSH ID e identidade no *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM ID).

Health	Disease (OMIM ID)	Disease (MeSH ID)	Regulation
--------	-------------------	-------------------	------------

Figura 11 – Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2010 referente à relação das proteínas anotadas com os estados de saúde e doença.

No que respeita à regulação de cada proteína, esta corresponde à variação da sua expressão na doença em relação ao controlo saudável. A regulação das proteínas salivares em cárie dentária teve em consideração a *fold change calculation*:

$$\frac{\text{Número de ocorrências em doença}}{\text{Número de ocorrências em saúde}} = \text{Valor}$$

Hipótese a) valor ≥ 1 : regulação positiva (+)

Hipótese b) $0 < \text{valor} < 1$: regulação negativa (-)

Em caso da hipótese b) se verificar, é necessário o cálculo do quociente abaixo descrito de forma a obter um valor de regulação negativo:

$$\frac{1}{\text{Valor}} = Y \text{ (a este é atribuído o valor negativo : } -Y\text{)}$$

O cálculo deste quociente permite uma melhor interpretação dos dados uma vez que uma *fold change* com valor de, por exemplo, 0,5 corresponderia a uma diminuição de 2 vezes na quantidade de expressão da respetiva proteína. Assim, a partir do quociente descrito acima, obtemos diretamente o valor de -2, tornando a interpretação de dados mais direta e facilitada.

3.1.2.4. Caracterização do dador da amostra analisada

A caracterização do dador da amostra analisada em cada estudo, incluiu a sua faixa etária, género e hábitos sociais (como por exemplo hábitos tabágicos ou consumo de álcool), uma vez que estes fatores são considerados modificadores da expressão proteica dos indivíduos. Foram igualmente anotados os critérios de exclusão definidos pelos autores de cada estudo analisado (Figura 12).

Age group	Gender*	Social Habits*
--------------	---------	-------------------

Figura 12 – Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2010 referente à caracterização do dador da amostra de saliva analisada.

3.1.2.5. Métodos de amostragem e análise

Os métodos de amostragem e análise permitiram caracterizar a metodologia utilizada na colheita, identificação e análise proteica salivar. Esta informação é essencial na

interpretação de dados de proteômica pela variabilidade de técnicas de amostragem e de análise que podem ser utilizadas no decorrer de estudos desta natureza (Figura 13).

Methods of Sampling**	Methods of Analysis***
-----------------------------	------------------------------

Figura 13 – Cabeçalho da tabela em Microsoft Excel 2010 referente aos métodos de amostragem e análise das proteínas salivares em cárie dentária.

3.1.2.6. Outras informações

Foram ainda registadas informações acerca do tipo de estudo, presença de modificações pós-tradução nas proteínas identificadas e a viabilidade, definida pelo autor do estudo, de utilizar ou não a respetiva proteína como biomarcador molecular da patologia.

3.1.3. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL

Com o objetivo de compreender o papel fisiológico das proteínas orais presentes em cárie dentária, estas foram classificadas funcionalmente de acordo com a sua ontologia, nomeadamente no que concerne ao processo biológico em que intervêm, a função molecular que desempenham e as vias de sinalização em que participam. Esta classificação foi realizada com recurso à ferramenta *online* PANTHER (*Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*) (<http://pantherdb.org/>) (Figura 14)(65)(66). São múltiplas as funcionalidades do PANTHER cruciais no desenvolvimento deste trabalho, nomeadamente: obter informação organizada sobre um gene de interesse; explorar famílias de proteínas, funções moleculares, processos biológicos, componentes celulares e vias de sinalização; gerar listas de genes que pertencem a determinadas famílias ou subfamílias de proteínas, de acordo com a sua função molecular, participação em processo(s) biológico(s) ou via(s) de sinalização; analisar listas de genes, proteínas ou transcritos de acordo com categorias

baseadas na família, função molecular, processo biológico, componente celular e/ou via de sinalização.

The screenshot displays the PANTHER Classification System web interface. At the top, there are logos for GENEONTOLOGY and PANTHER Classification System, along with navigation links like Home, About, PANTHER Data, PANTHER Tools, Workspace, Downloads, and Help/Tutorial. A banner indicates that the system now includes comprehensive GO annotations directly imported from the GO database.

The main content area is titled "Gene List Analysis" and includes a "Browse" button. Below this, a message refers to an article in Nature Protocols for detailed instructions. The interface is divided into three main sections for user input:

- 1. Enter IDs:** This section allows users to enter IDs or select a file for batch upload. It includes a text input field with "P23284", "P23284", and "Q00530" entered, and a "Supported IDs" button. Below this is an "Upload IDs:" section with a "File format" button and a "Nenhum ficheiro selecionado" (No file selected) message. A note states: "Please login to be able to select lists from your workspace."
- 2. Select organism:** This section features a dropdown menu with the following options: Homo sapiens, Mus musculus, Rattus norvegicus, Gallus gallus, and Danio rerio.
- 3. Select Analysis:** This section contains four radio button options:
 - ☒ Functional classification viewed in gene list
 - ☐ Functional classification viewed in pie chart
 - ☐ Statistical overrepresentation test
 - ☐ Statistical enrichment test
 There are also checkboxes for "Use default settings" next to the last two options.

A "submit" button is located at the bottom right of the form.

On the left side of the interface, there is a "Search" section with a dropdown menu set to "All" and a "Go" button. Below this are "Quick links" for "Whole genome function views", "Genome statistics", and "How to cite PANTHER". There is also a "News" section mentioning "NEW! Recent publication describing PANTHER" and a "Newsletter subscription" form with an email input field and a "Subscribe" button.

Figura 14 – Sistema de análise em grupo da ferramenta de classificação do PANTHER. As opções selecionadas correspondem às definições utilizadas para analisar os conjuntos de proteínas anotados em cária dentária.

Inicialmente os códigos UniProtKB, correspondentes à identificação das proteínas anotadas são inseridos no campo correspondente. Selecionando a espécie humana e o tipo de análise que desejamos realizar, obtém-se como resultado a lista das proteínas inseridas acompanhadas das respetivas informações.

Posteriormente é escolhido o tipo de classificação que pretendemos fazer: segundo as funções moleculares, processos biológicos, componentes celulares, classes proteicas e/ou vias de sinalização (Figura 15).

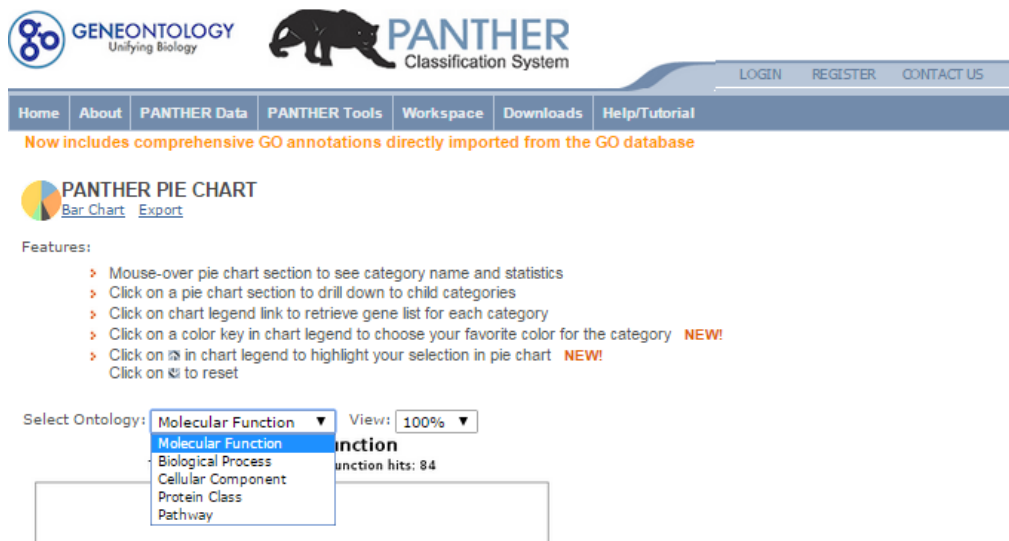


Figura 15 – Seleção do tipo de classificação por ontologia desejado, na ferramenta PANTHER.

Neste trabalho, foram apenas utilizadas as classificações segundo as funções moleculares e os processos biológicos.

3.1.4. COMPARAÇÃO COM O ORALOMA NORMAL

O objetivo desta análise foi determinar estatisticamente se as diferentes ontologias das proteínas salivares em cárie dentária, resultantes da classificação obtida com recurso à ferramenta PANTHER, se encontravam acima ou abaixo dos valores esperados comparativamente ao verificado em indivíduos saudáveis (OralOma Normal). Para tal, cada lista de proteínas salivares de cárie dentária classificada segundo uma determinada ontologia PANTHER (função molecular ou processo biológico) foi comparada com uma lista de referência (OralOma normal). Por cálculo de proporção direta, inferiu-se o valor espectável para cada uma das categorias caso se verificasse proporção direta entre as entidades comparadas.

Para quantificar a diferença entre os valores observados e os valores esperados para cada categoria, procedeu-se ao cálculo da diferença fracional, segundo a seguinte fórmula:

$$DF = \left(\frac{Z_t - \hat{Z}_t}{\hat{Z}_t} \right)$$

em que Z_t representa o valor observado, \hat{Z}_t o valor esperado e DF a diferença fracional (metodologia adaptada do PANTHER *Overrepresentation Test*).

Assim, a diferença fracional consiste no valor cuja multiplicação pelo valor esperado traduz a fração que deveria ser adicionada ou subtraída ao valor observado para que este igualasse o valor teoricamente esperado.

Posteriormente foi aplicado um teste binominal, descrito por Cho & Campbell, TIGs, em 2000 (67), de forma a obter a significância estatística dos resultados expressa segundo um nível de significância (*p-value*). O “*p-value*” representa a probabilidade de erro envolvida em aceitar o resultado observado como válido, isto é, como representativo da “população”. Dizer que um resultado é estatisticamente significativo significa que as diferenças encontradas são grandes o suficiente para não serem atribuídas ao acaso, com uma certeza estabelecida.

A lista de referência (OralOma normal) derivou da base de dados do OralCard (<http://bioinformatics.ua.pt/OralCard/>) (43,68). Esta ferramenta bioinformática, em constante atualização, reúne os dados de proteómica salivar, provenientes de amostras de saliva, identificados a partir de estudos experimentais, permitindo a caracterização das proteínas segundo o local de produção da proteína, a sua função molecular, a presença de modificações pós-tradução, a sua associação a doenças, entre outros. Para este trabalho, foi considerado OralOma Normal como o conjunto total de proteínas exclusivamente presentes na cavidade oral de indivíduos saudáveis e não identificadas em situação de patologia.

3.1.5. INTERACTOMA ORAL EM CÁRIE DENTÁRIA

O conjunto de proteínas do OralOma de cárie, identificado pelos métodos acima descritos, foi posteriormente submetido a uma análise de interatômica, através do algoritmo OlarInt. O OlarInt é um algoritmo computacional que permitiu a previsão do interactoma oral. A principal inovação desta ferramenta é o facto de permitir determinar o interactoma interespecífico (humano-microbiano e microbiano-microbiano). Este algoritmo foi desenvolvido pelo grupo de Biomedicina Computacional e Diagnóstico em saliva do

Departamento de Ciências da Saúde da UCP em parceria com o grupo de Bioinformática da Universidade de Aveiro e o Departamento de Engenharia Informática da Universidade de Coimbra. Uma das aplicações do conhecimento gerado consiste na identificação de proteínas-chave envolvidas em patologias orais, que podem ser utilizadas no diagnóstico (como biomarcadores moleculares) ou no tratamento (como alvos terapêuticos)(69).

Esta análise permitiu fazer a previsão das interações estabelecidas entre as proteínas presentes na cavidade oral – OralOma – sejam elas de origem humana ou microbiana. Do total das interações obtidas, selecionaram-se as interações proteína-proteína (PPIs) com *score* igual ou superior a 0,9, limitando a análise a pares com nível elevado de confiança de existência da interação.

Para visualização e validação destas redes de interações recorreu-se à utilização da ferramenta Cytoscape, capaz de realizar a integração biomolecular de redes com diferentes dados (70). Os dados da rede de interações foram importados para o Cytoscape, tendo-se definido que das duas proteínas que constituem cada par de interação, uma seria a fonte de interação (proteína 1) e a outra seria o alvo da interação (proteína dois); foi escolhido o tipo de interação com base no *score* (Figura 16).

Select a Network Collection

Network Collection: Create new network collection

Node Identifier Mapping Column: shared name

Interaction Definition

Source Interaction: Column 1

Interaction Type: Column 3

Target Interaction: Column 5

Columns in BLUE will be loaded as EDGE ATTRIBUTES.

Advanced

Show Text File Import Options

Preview

Excel™ Workbook

Left Click: Enable/Disable Column, Right Click: Edit Column

✓ P1	✗ Organism1	✓ P2	✗ Organism2	✓ Score
P60709	Homo sapiens (Human)	P60709	Homo sapiens (Human)	0.999999842503
Q53GK6	Homo sapiens (Human)	P60709	Homo sapiens (Human)	0.999999833583
P60709	Homo sapiens (Human)	Q53GK6	Homo sapiens (Human)	0.999999828153
P60709	Homo sapiens (Human)	P63261	Homo sapiens (Human)	0.999999819828
P63261	Homo sapiens (Human)	P60709	Homo sapiens (Human)	0.999999802741
P60709	Homo sapiens (Human)	P62987	Homo sapiens (Human)	0.999999724034
P60709	Homo sapiens (Human)	Q9BYX7	Homo sapiens (Human)	0.999999567532
P60709	Homo sapiens (Human)	A8AY84	Streptococcus gordonii (strain Ch...	0.999999115992

OK Cancel

Figura 16 – Dados importados para o programa Cytoscape, com a definição da fonte e alvo de interação, assim como a classificação do tipo de interação.

Foi posteriormente importado um ficheiro com os atributos dos nós (proteínas), constando nele a informação referente aos microrganismos envolvidos na produção de cada proteína envolvida na rede de interações previamente criada (Figura 17).

Target Table Data

Where to Import Table Data: To a Network Collection

Select a Network Collection

Network Collection: Interactoma Cáries Dentárias.txt

Key Column for Network: Organism

Importing Type

Import Data as: Node Table Columns

Advanced

☐ Show Mapping Options ☐ Show Text File Import Options ☒ Case Sensitive

Preview

Text File Left Click: Enable/Disable Column, Right Click: Edit Column

newTable

Protein	Organism	OralomaCaries
P60709	Homo sapiens (Human)	caries
Q53GK6	Homo sapiens (Human)	
P63261	Homo sapiens (Human)	
Q8TDM6	Homo sapiens (Human)	
Q9BYX7	Homo sapiens (Human)	
C0X7B7	Enterococcus faecalis TX0104	
Q3SY84	Homo sapiens (Human)	
P08240	Homo sapiens (Human)	
Q9BZF2	Homo sapiens (Human)	

File Size: Unknown

OK Cancel

Figura 17 – Importação de dados referentes aos atributos dos nós para o programa Cytoscape, com informação relativa aos microrganismos produtores de cada proteína.

O *layout* escolhido para visualização das redes de interação foi escolhido de forma a permitir avaliar claramente as interações existentes entre as proteínas identificadas ao longo da recolha de informação do OralOma de cárie dentária e o conjunto de proteínas do OralOma Total (Figura 18).

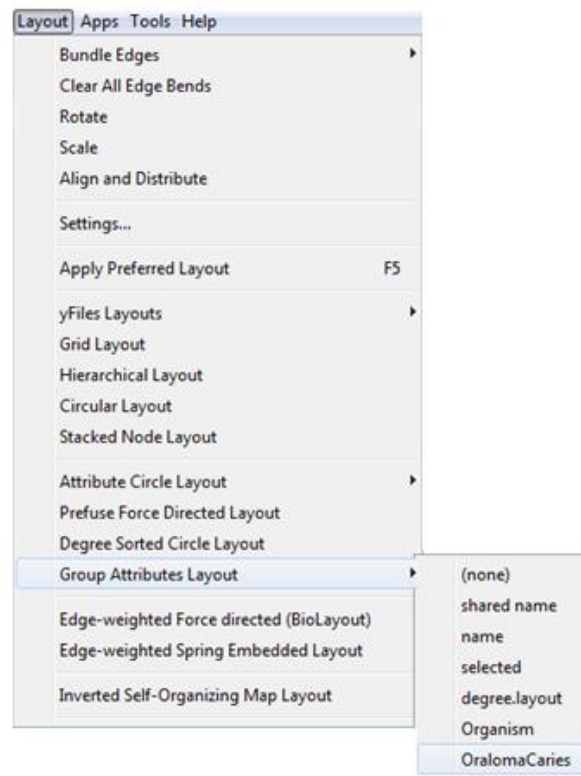


Figura 18 – Escolha do layout, recorrendo às funcionalidades do programa Cytoscape.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ORALOMA HUMANO EM ESTUDOS DE CÁRIE DENTÁRIA

A definição do OralOma Humano de cárie dentária é um passo essencial para a compreensão dos mecanismos biológicos e moleculares da patologia, permitindo uma posterior identificação de potenciais proteínas biomarcadoras de suscetibilidade à doença. A análise e discussão dos resultados será realizada seguindo a organização da tabela constante no Anexo A.

4.1.1. COMPOSIÇÃO

A identificação das proteínas salivares presentes na cavidade oral e relacionadas com cárie dentária foi conseguida recorrendo a uma extensa pesquisa e análise de resultados de estudos experimentais de proteómica. A análise dos resultados destes estudos permitiu identificar os perfis de expressão proteica característicos de pacientes com cárie dentária, proceder à atualização da base de dados do OralCard e, simultaneamente, fazer uma comparação com as proteínas presentes nos controlos saudáveis. A atualização da informação constante no OralCard é indispensável, pela constante publicação de novos estudos experimentais de proteómica salivar que poderão conter dados que identifiquem proteínas com perfis de expressão alterados, ainda não identificados, ou corroborar resultados experimentais atingidos por outros autores com desenhos de estudos experimentais semelhantes. Toda esta informação que caracteriza a cárie dentária está reunida na base de dados do OralCard e permite aos seus utilizadores a sua análise de uma forma sistemática e simplificada.

A Tabela 1 indica as proteínas orais identificadas em estudos experimentais recolhidos e analisados no decorrer deste trabalho.

Tabela 1 – Proteínas salivares identificadas a partir de estudos de proteômica no âmbito de cárie dentária.

UniProtKBAC	Nome	Estado	Organismo produtor	Citação
Q9HC84	Mucin-5B	Cárie dentária	<i>Homo sapiens</i>	Bielawska A <i>et al</i> (2014) (62)
P15941	Mucin-1	Cárie dentária	<i>Homo sapiens</i>	
Q8TAX7	Mucin-7	Cárie dentária	<i>Homo sapiens</i>	
Q5DX22	Toll-like receptor 2	Saúde e Cárie	<i>Homo sapiens</i>	Zhao A <i>et al</i> (2014) (71)
P10145	Interleukin-8	Saúde e Cárie	<i>Homo sapiens</i>	
P08571	Soluble CD14	Saúde e Cárie	<i>Homo sapiens</i>	
P11912	Salivary immunoglobulin A	Cárie dentária	<i>Homo sapiens</i>	Bielawska A <i>et al</i> (2014) (72)
P15516	Histatin-5	Cárie dentária	<i>Homo sapiens</i>	
P22079	Lactoperoxidase	Cárie dentária	<i>Homo sapiens</i>	
Q9HC84	High molecular weight salivary mucin MG1	Cárie dentária	<i>Homo sapiens</i>	Tarabay B <i>et al</i> (2002) (73)
Q02817	Mucin glycoprotein-2	Cárie dentária	<i>Homo sapiens</i>	
P04280	Proline-rich protein-1	Cárie dentária	<i>Homo sapiens</i>	
P08987	Glucosyltransferase-B	Cárie dentária	<i>S.mutans</i>	Takizawa H <i>et al</i> (2014) (64)
P11001	Glucosyltransferase-1	Cárie dentária	<i>S.sobrinus</i>	
P00441	Superoxide dismutase	Saúde e Cárie	<i>Homo sapiens</i>	Hedge MN <i>et al</i> (2014) (56)
P01375	Tumor necrosis factor	Saúde e Cárie	<i>Homo sapiens</i>	Agnieszka G <i>et al</i> (2012) (74)
P05231	Interleukin-6	Saúde e Cárie	<i>Homo sapiens</i>	
P10145	Interleukin-8	Saúde e Cárie	<i>Homo sapiens</i>	
P08987	Glucosyltransferase-B	Saúde e Cárie	<i>S.mutans</i>	Omar OM <i>et</i>

<u>P11912</u>	Salivary Immunoglobulin A	Saúde e Cárie	<i>Homo sapiens</i>	<i>al</i> (2012) (75)
<u>P08571</u>	Soluble CD14	Saúde	<i>Homo sapiens</i>	Biria M <i>et al</i> (2010) (76)
<u>P08987</u>	Glucosyltransferase-B	Saúde e Cárie	<i>S.mutans</i>	Smith AMV <i>et al</i> (2007) (77)
<u>P13470</u>	Glucosyltransferase-C	Saúde e Cárie	<i>S.mutans</i>	
<u>P49331</u>	Glucosyltransferase-D	Saúde e Cárie	<i>S.mutans</i>	
<u>P68871</u>	Hemoglobin subunit beta	Saúde e Cárie	<i>Homo sapiens</i>	Hong SW <i>et al</i> (2014) (55)
<u>P12273</u>	Prolactin-inducible protein	Saúde e Cárie	<i>Homo sapiens</i>	
<u>P69905</u>	Hemoglobin subunit alpha	Saúde e Cárie	<i>Homo sapiens</i>	
<u>P62805</u>	Histone H4	Saúde	<i>Homo sapiens</i>	
<u>P06702</u>	Protein S100-A9	Saúde e Cárie	<i>Homo sapiens</i>	
<u>P07737</u>	Profilin-1	Saúde	<i>Homo sapiens</i>	
<u>P59665</u>	Neutrophil defensin-1	Saúde	<i>Homo sapiens</i>	
<u>Q96DR5</u>	BPI fold-containing family A member 2	Saúde e Cárie	<i>Homo sapiens</i>	
<u>P01034</u>	Cystatin-C	Cárie dentária	<i>Homo sapiens</i>	
<u>P01037</u>	Cystatin-SN	Cárie dentária	<i>Homo sapiens</i>	
<u>P01036</u>	Cystatin-S	Cárie dentária	<i>Homo sapiens</i>	
<u>P61626</u>	Lysozyme	Cárie dentária	<i>Homo sapiens</i>	
<u>P28325</u>	Cystatin-D	Cárie dentária	<i>Homo sapiens</i>	
<u>P27482</u>	Calmodulin-like protein 3	Cárie dentária	<i>Homo sapiens</i>	
<u>P60709</u>	Beta-actin	Cárie dentária	<i>Homo sapiens</i>	
<u>P08571</u>	Soluble CD14	Saúde	<i>Homo sapiens</i>	Bergandi L <i>et al</i> (2007)

				(78)
<u>P17693</u>	Salivary Immunoglobulin G	Saúde e Cárie	<i>Homo sapiens</i>	Lehtonen OPJ <i>et al</i> (1984) (79)
<u>P11912</u>	Salivary immunoglobulin A	Saúde e Cárie	<i>Homo sapiens</i>	
<u>P61626</u>	Lysozyme	Saúde e Cárie	<i>Homo sapiens</i>	Stuchell RN <i>et al</i> (1983) (80)
<u>P01009</u>	Alpha-1- antiproteinase	Cárie dentária	<i>Homo sapiens</i>	Sikorska MHJ <i>et al</i> (2002) (61)
<u>P02788</u>	Lactoferrin	Cárie dentária	<i>Homo sapiens</i>	
<u>P11912</u>	Salivary immunoglobulin A	Cárie dentária	<i>Homo sapiens</i>	
<u>P11912</u>	Salivary immunoglobulin A	Saúde e Cárie	<i>Homo sapiens</i>	Farias DG <i>et al</i> (2003) (81)
<u>P17693</u>	Salivary Immunoglobulin G	Saúde e Cárie	<i>Homo sapiens</i>	
<u>P11912</u>	Salivary Immunoglobulin M	Saúde e Cárie	<i>Homo sapiens</i>	
<u>P61626</u>	Lysozyme	Saúde e Cárie	<i>Homo sapiens</i>	Felizardo KR <i>et al</i> (2010) (59)
<u>P02788</u>	Lactoferrin	Saúde e Cárie	<i>Homo sapiens</i>	
<u>P11912</u>	Salivary Immunoglobulin A	Saúde e Cárie	<i>Homo sapiens</i>	Shifa S <i>et al</i> (2015) (82)
<u>P11912</u>	Salivary Immunoglobulin A	Saúde e Cárie	<i>Homo sapiens</i>	Bagherian A <i>et al</i> (2008) (83)
<u>P17693</u>	Salivary Immunoglobulin G	Saúde e Cárie	<i>Homo sapiens</i>	

No total foram incluídos 21 artigos, com datas de publicação até 9/06/2014, sendo que 5 apresentam datas de publicação anteriores a 2005 (1983-2003).

Para além das proteínas identificadas foram ainda utilizadas 70 proteínas, anteriormente anotadas no OralCard relativas à cárie dentária, perfazendo um total de 189 entradas e 98 proteínas únicas, subsequentemente analisadas (Anexo A).

4.1.2. ORGANISMOS IDENTIFICADOS

Das 98 proteínas analisadas ao longo deste trabalho, 94 são de origem humana e apenas 4 apresentam origem bacteriana, sendo três produzidas por *Streptococcus mutans* e uma por *Streptococcus sobrinus* (Figura 19).

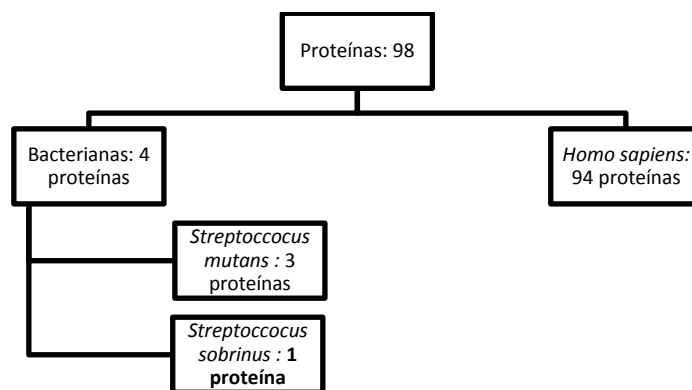


Figura 19 – Distribuição das proteínas identificadas de acordo com o organismo a que pertencem.

As espécies bacterianas representadas pelas proteínas identificadas em 3 estudos dirigidos (64,75,77), correspondem a duas espécies fortemente associadas ao desenvolvimento de cárie dentária: *Streptococcus mutans* (*glucosyltransferase-B*, *glucosyltransferase-C* e *glucosyltransferase-D*) e *Streptococcus sobrinus* (*glucosyltransferase-I*).

Os resultados do estudo realizado por Takizawa *et al* (64) demonstraram a existência de valores elevados de *Glucosyltransferase-I* (GTF-I), um dos quatro tipos de GTF produzidas por *Streptococcus sobrinus*, em indivíduos com alta suscetibilidade à

cárie. Neste estudo, GTF-I não foi identificada em nenhum indivíduo dos 3 grupos de controlo saudáveis, tendo sido sugerido como biomarcador de suscetibilidade. Os mesmos valores foram obtidos em relação à *Glucosyltransferase-B* (GTF-B), fator patogénico de *S. mutans* (64). Vacca Smith *et al* (77) obteve os mesmos resultados para a GTF-B e Omar *et al* (75) sugeriu igualmente esta proteína como biomarcador de suscetibilidade à cárie, com os níveis totais da enzima a mostrar um aumento significativo com o aumento da experiência de cárie (75).

No estudo de Vacca Smith *et al* (77) foram ainda identificadas as proteínas *glucosyltransferase-C* (GTF-C) e *glucosyltransferase-D* (GTF-D), produzidas por *Streptococcus mutans*, no entanto os resultados não foram estatisticamente significativos, não sendo possível estabelecer uma relação entre os valores obtidos com a presença de cárie dentária (77).

Estes resultados vêm corroborar o conhecimento do papel de *Streptococcus sp* no que toca ao desenvolvimento e progressão de lesões de cárie, no entanto, novos estudos focados não só nos fatores patogénicos desta espécie mas também de outras espécies cariogénicas conhecidas poderão constituir a chave na identificação de biomarcadores de suscetibilidade à cárie dentária.

4.1.3. ORIGEM DAS PROTEÍNAS ORAIS IDENTIFICADAS

As amostras de saliva analisadas em cada estudo de proteómica oral pode ser resultado da secreção específica de uma glândula salivar ou da mistura dos fluídos orais presentes na cavidade oral dos indivíduos; as proteínas identificadas nas amostras salivares podem, no entanto, não ser exclusivas de secreções salivares, sendo de origem não-salivar. Do total das proteínas orais identificadas em cárie dentária, 49 são provenientes de amostras de saliva total, 69 das glândulas parótidas, 2 do biofilme oral, e 1 de glândulas SM/SL.

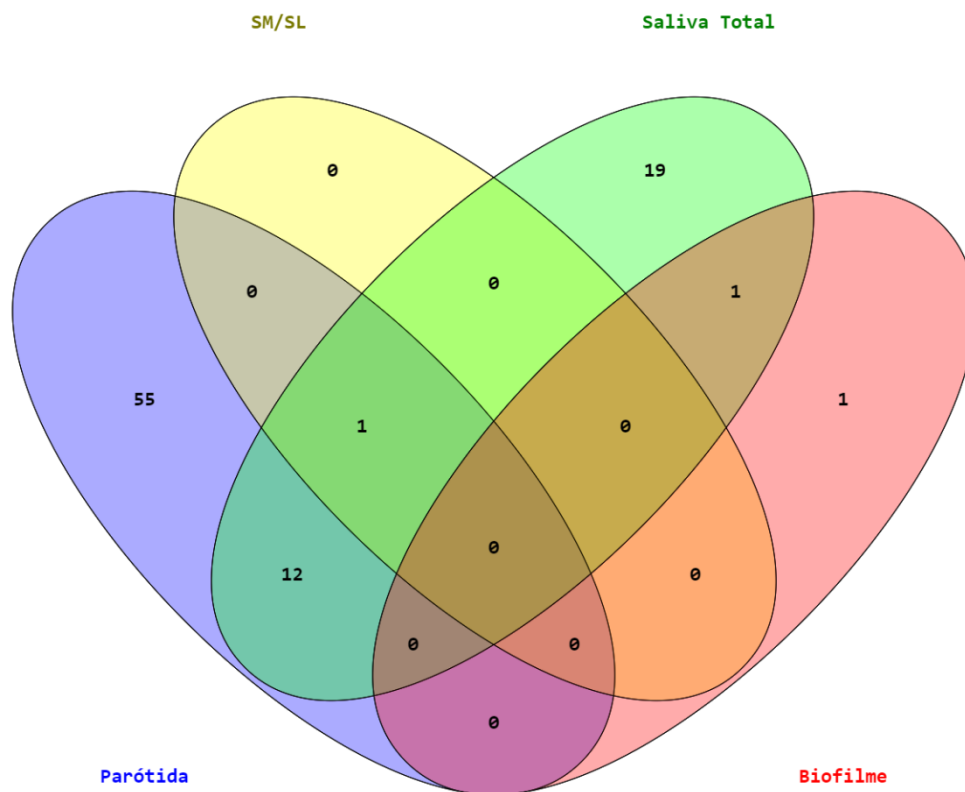


Figura 20 – Diagrama de Venn representativo da distribuição das proteínas salivares segundo a sua origem. Gráfico obtido com recurso ao programa Venny (84).

A análise da Figura 20 permite verificar a existência de uma predominância de proteínas identificadas exclusivamente em amostras salivares com origem na glândula parótida. Esta evidência prende-se com o facto de o único estudo de proteómica não-dirigido analisado no decorrer deste trabalho ter sido realizado com base na análise de amostras salivares da glândula parótida (85). No entanto, a facilidade da recolha de amostras de saliva total, comparativamente às específicas de cada glândula, justifica a utilização predominante na identificação proteica nos restantes estudos analisados, de natureza dirigida e com identificação de um número consideravelmente menor de proteínas.

A identificação do proteoma salivar característico dos tecidos orais em cárie dentária através da análise de amostras salivares, aumenta exponencialmente o já crescente papel da saliva como fluido de diagnóstico na avaliação de potenciais fatores patológicos e fisiológicos associados à suscetibilidade à cárie dentária (21).

4.1.4. RELAÇÃO COM ESTADOS DE SAÚDE E DE DOENÇA

Do conjunto total de proteínas identificadas em estudos relacionados com cárie dentária, 75 foram identificadas tanto em indivíduos com cárie dentária como nos controles saudáveis, 16 foram apenas identificadas na presença de cárie e 7 exclusivas do estado de saúde dentária (Figura 21).

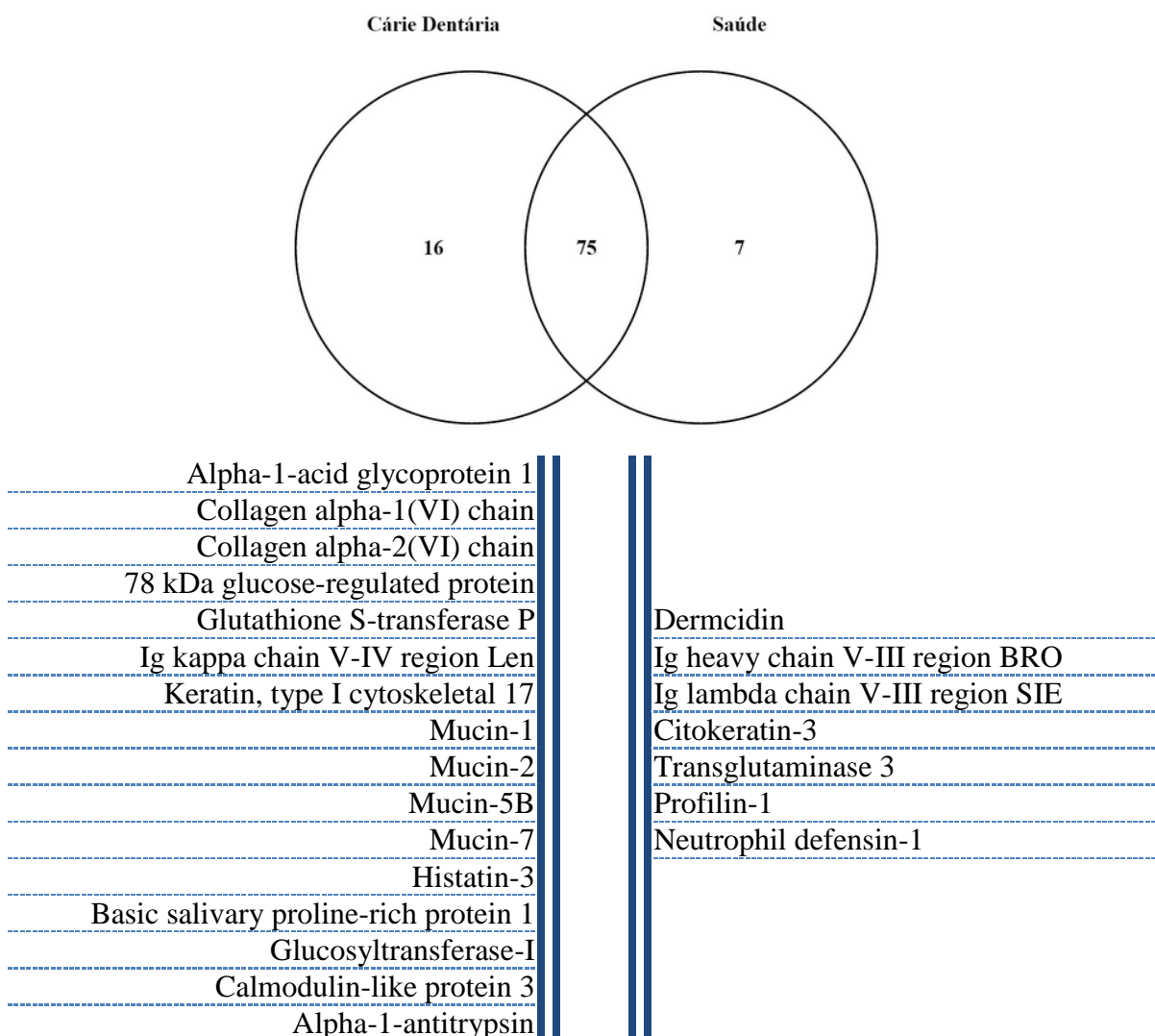


Figura 21 – Distribuição das proteínas identificadas em estudos relacionados com cárie dentária e a sua relação com indivíduos com e sem cáries (Gráfico obtido recorrendo ao programa Venny (84)); em baixo são discriminadas as proteínas exclusivas de cárie e de saúde dentária, na coluna da esquerda e da direita respetivamente.

A identificação de proteínas salivares presentes em indivíduos sem lesões de cárie dentária e a sua ausência quando a cárie está presente foi o ponto de partida para avaliação de potenciais biomarcadores da doença.

A *dermacidine*, uma proteína identificada num estudo de Preza *et al* (85), é um importante componente do suor também encontrado em secreções salivares produzidas pela glândula parótida; apresenta uma importante função antibacteriana, nomeadamente contra *Enterococcus faecalis*, uma das bactérias associadas às lesões de cárie dentária. Neste estudo a *dermacidine* foi identificada como exclusiva de pacientes sem cárie, com valores significativamente mais altos em jovens do que em idosos (o que pode ser justificado pela menor produção salivar e proteica decorrente do avanço da idade) (85). Analogamente ao que se verifica na pele, em que uma reduzida secreção de *dermicidine* está associada a uma maior frequência de infeções bacterianas neste órgão (86) o mesmo fator poderá estar relacionado com o desenvolvimento de cárie dentária. Outra das proteínas identificadas neste estudo como exclusiva de indivíduos sem cárie dentária foi a *Transglutaminase 3*, referida na literatura como promotora de remodelação estrutural da película aderida durante o processo de maturação da mesma, apresentando um importante papel na criação de películas mais resistentes aos ácidos (37,87). Ainda neste estudo, foram identificadas as proteínas *Ig heavy chain V-III region BRO*, *Ig lambda chain V-III region SIE* e *Citokeratin-3* tendo, no entanto, o autor considerado a sua presença equívoca: no caso das cadeias-Ig (nas quais também se inclui *Ig kappa chain V-IV region Len*, identificada como exclusiva de cárie) não foi possível averiguar se a sua presença na saliva era resultante de secreção glandular ou por ligação a células da própria glândula parótida recolhidas aquando da recolha salivar direta; no caso das citoqueratinas, a sua presença pode ter sido reflexo de uma contaminação das amostras (85).

Profilin-1 e *neutrophil defensin-1* foram duas proteínas identificadas com elevada significância na saliva de indivíduos livres de cárie, num estudo de Hong *et al* (55), sugerindo os resultados que estas proteínas estão envolvidas nos processos antimicrobianos de defesa do hospedeiro. Enquanto a *profilin-1* demonstrou interferir na motilidade bacteriana por interação com o monómero de actina, em infeções por *Listeria monocytogenes* (88), a *neutrophil defensin-1*, sendo um elemento da família das α -defensinas, exerce uma atividade antimicrobiana contra um vasto espectro de

microorganismos, como bactérias, fungos e vírus, pela ruptura das suas membranas negativamente carregadas (55). Estudos futuros, com foco no papel destas proteínas nos mecanismos de proteção da cavidade oral e, em particular, no que concerne ao processo de desenvolvimento de cárie dentária, poderão ser uma mais-valia na identificação de biomarcadores de suscetibilidade à doença.

Quanto às proteínas identificadas ao longo deste estudo como exclusivas de cárie dentária, analisando os dados presentes na tabela Anexo A, pode verificar-se que das 16 proteínas assinaladas 7 (*mucin-5B*, *mucin-1*, *mucin-7*, *mucin-2*, *histatin-3*, *basic salivary proline-rich protein 1* e *alpha-1-antitrypsin*) surgem como “exclusivas” de cárie dentária como resultado de estudos em que não foi feita a comparação com amostras salivares de indivíduos livres de cárie (35,61,62,72,89,90).

A análise das restantes proteínas presentes em situação de cárie, sendo ou não exclusivas desta condição, será aprofundada adiante.

4.1.5. CARACTERIZAÇÃO DO DADOR DA AMOSTRA

Uma boa caracterização do dador da amostra, incluindo a análise da sua faixa etária, do seu género e hábitos sociais relevantes, é essencial para a correta análise dos resultados. O intervalo de variação geral da faixa etária das populações incluídas em todos os estudos analisados compreende-se entre 1 e 98 anos de idade. Esta grande amplitude etária prevê uma grande variabilidade nos resultados de regulação proteica observada, uma vez que a idade é um fator modificador da expressão proteica nos indivíduos. O avançar da idade está associado a alterações a nível da cavidade oral que podem conduzir ao aumento ou diminuição da expressão de determinadas proteínas, bem como a diminuições na quantidade de saliva produzida. De notar uma variabilidade em relação ao género dos indivíduos incluídos nas populações dos estudos experimentais analisados, sexo feminino e sexo masculino, sem que, no entanto, esta variabilidade se verificasse no que respeita à raça: todos os indivíduos eram de raça caucasiana. Nenhum dos estudos analisados apresentou informações em relação a hábitos sociais, nomeadamente tabagismo, fator que facilita a análise de dados de proteómica de uma forma global, pela homogeneidade e desnecessária interpretação fisiológica suplementar.

De referir que, a caracterização do dador da amostra nos estudos analisados não inclui a análise dos fatores de risco para o desenvolvimento de cárie dentária (modificáveis ou não). A futura anotação desta informação poderá revelar-se útil e potenciar uma mais completa interpretação dos resultados dos estudos de proteómica em pacientes com cárie dentária.

4.1.6. MÉTODOS DE AMOSTRAGEM E ANÁLISE

A extensa pesquisa bibliográfica realizada obteve como resultados estudos de proteómica gerais, com a identificação de proteínas orais no âmbito da cárie dentária, e estudos de investigação dirigida, com identificação de números reduzidos de proteínas orais em cárie dentária. Os estudos dirigidos pretendem analisar a presença específica de proteínas que normalmente não são identificadas em estudos abrangentes de proteómica e que poderão desempenhar um papel importante no processo molecular de cárie dentária, existindo previamente evidências da sua possível implicação na patologia. No entanto, o facto de o estudo ser realizado de forma dirigida poderá ser uma limitação no que toca à identificação de novas funções e implicações moleculares, assim como, na dedução de conclusões significativas em relação a redes de sinalização moleculares orais da cárie, pelo baixo número de proteínas identificadas. Para contrariar este facto, a realização de estudos gerais de proteómica oral, isto é, mais abrangentes, com desenhos similares entre eles poderá apresentar vantagens na identificação de um vasto leque de proteínas, permitindo relacionar as variações da expressão proteica na cárie dentária comparativamente ao OralOma normal.

A heterogeneidade dos métodos de amostragem e análise dos dados dos estudos analisados torna difícil a sua interpretação e a execução de uma avaliação fidedigna dos resultados dos estudos, pelo que, a comunidade científica deve procurar uniformizar estes métodos de amostragem e adotar metodologias de análise mais sensíveis, com capacidade de caracterização de pequenas quantidades de material orgânico, nomeadamente proteínas e péptidos.

4.1.7. OUTRAS INFORMAÇÕES

Como referido na secção Material e Métodos, subsecção “Outras informações”, foram também analisadas informações consideradas relevantes para a análise e interpretação dos dados de proteómica.

Pela análise dos estudos recolhidos, verificou-se a inexistência de estudos de proteómica focados nas modificações pós-tradução de proteínas identificadas no âmbito de cárie dentária, pelo que, nenhuma informação relativa a este assunto foi associada às proteínas anotadas no respetivo OralOma.

A sugestão de biomarcadores por parte dos autores dos artigos analisados no decorrer deste trabalho foi também verificada. Assim, das 189 proteínas anotadas, 3 foram sugeridas como biomarcadoras no âmbito da cárie dentária, por parte dos autores dos estudos que as identificaram.

Zhao *et al* (71) observou o papel da proteína *toll-like receptor 2* na saliva de pacientes com lesões de cárie ativas e sugeriu que a sua quantificação poderá representar um eficiente biomarcador de atividade cariosa, o que poderá constituir um ponto de partida na avaliação da mesma como biomarcadora de suscetibilidade à cárie dentária (71).

Hashizume-takizawa *et al* (64) , num estudo cujo objetivo foi o desenvolvimento de um sistema rápido e conveniente de estimativa da suscetibilidade à cárie dentária, obtiveram resultados que sugerem as proteínas microbianas GTF-I e GTF-B como potenciais biomarcadores desta condição (64). A GTF-B foi ainda sugerida como potencial biomarcador de suscetibilidade à cárie dentária num estudo realizado com crianças por Omar *et al* (75).

Dada a incidência e prevalência da cárie dentária à escala mundial, associada à dificuldade de erradicação da mesma após as mais variadas técnicas de prevenção e diagnóstico da doença, urge a necessidade de desenvolver técnicas eficazes de avaliar a suscetibilidade individual a esta doença, para que métodos de prevenção adequados e personalizados possam ser realizados. A identificação de biomarcadores que permitam o averiguar de forma precoce a suscetibilidade de um indivíduo ao desenvolvimento de novas lesões de cárie poderá constituir um contributo essencial para o controlo, a nível mundial, desta condição. A questão impõe-se: qual é então a característica que torna uma proteína num biomarcador molecular fidedigno? E a resposta está na sua especificidade. No entanto,

o facto de estarmos a falar de biomarcadores de suscetibilidade, a especificidade pode consistir num alargado conjunto de possibilidades: a proteína pode ser encontrada unicamente em indivíduos sem cárie e deixar de ser identificável quando uma lesão se estabelece; a proteína, estando presente em indivíduos saudáveis, pode registar alterações na sua quantificação, resultantes dos mecanismos gerais de desenvolvimento das lesões; pode, inclusivamente, determinada proteína estar presente em indivíduos com ou sem cárie dentária e ser possível estabelecer um intervalo de quantificação preditivo da probabilidade de, num dado momento, o indivíduo se encontrar em risco de desenvolver novas lesões.

Os resultados de estudos como este amplificam a possibilidade de utilização da saliva como fluido de diagnóstico e monitorização dos estados de saúde e de doença, de uma forma não invasiva. No entanto, impõe-se a validação dos biomarcadores propostos, através de ensaios clínicos controlados e com populações significativas.

4.2. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO ORALOMA DE CÁRIE DENTÁRIA

4.2.1. PROCESSOS BIOLÓGICOS DAS PROTEÍNAS SALIVARES EM CÁRIE DENTÁRIA

A identificação das proteínas salivares características dos tecidos orais em cárie dentária permitiu a sua catalogação de acordo com a ontologia “*Biological Process*”, recorrendo à ferramenta PANTHER (65,66) de acordo com o exposto em “Materiais e Métodos – secção Caracterização funcional”. Com base nesta análise foi possível catalogar os processos biológicos em que participam 79 das 91 proteínas orais identificadas nestes pacientes.

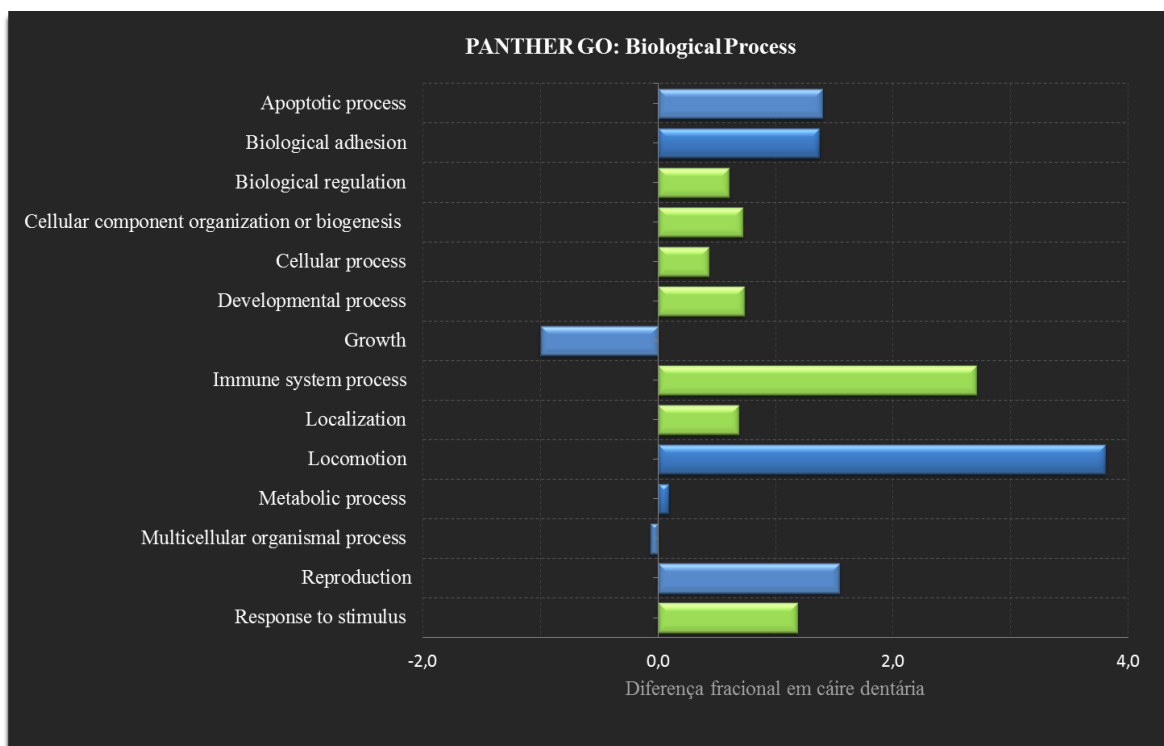


Figura 22 Distribuição das proteínas salivares de pacientes com cárie dentária, segundo os processos biológicos em que intervêm, recorrendo à ferramenta PANTHER (65,66). É apresentada a diferença fracional entre as proteínas identificadas em cárie dentária e no OralOma normal. A verde estão indicados os processos biológicos que apresentam uma alteração em relação ao OralOma Normal considerada estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

A análise da Figura 22 permite inferir a existência de processos biológicos com aumentos estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) em cárie dentária comparativa ao OralOma normal, representados por colunas preenchidas a verde. O número de proteínas envolvidas em processos biológicos como *immune system process* e a *response to stimulus* estão significativamente aumentados em cárie dentária, com $p\text{-value} < 0,01$; também processos relacionados com *biological regulation*, *cellular component organization or biogenesis*, *cellular process*, *development process* e *localization* apresentaram-se aumentados com significância estatística, apresentando $p\text{-values} < 0,05$.

Analisando as proteínas envolvidas nos processos de *response to stimulus*, *biological regulation*, *cellular process* e *localization* e considerando a não especificidade do processo biológico *immune system process*, verificou-se que todas elas estão envolvidas

nas repostas de defesa do hospedeiro que se verificam no desenvolvimento de cárie dentária. Assim, as proteínas identificadas ao longo deste estudo e ativas nos processos biológicos acima mencionados serão analisadas no âmbito do processo geral immune system process.

O aumento verificado do número de proteínas com função nestes processos biológicos como *immune system process* em cárie dentária é consistente com o reconhecimento da saliva como crucial no que toca à manutenção da regulação homeostática do ambiente oral: interações entre proteínas salivares e fatores de virulência microbianos têm um papel determinante no que toca à manutenção da homeostasia e à resposta imunitária do hospedeiro (55,60).

Na presença de antigénios bacterianos, quadro característico da presença de cárie dentária, Linfócitos T e B são estimulados, tendo vindo a ser estudada a sua relação com cárie dentária, nomeadamente pela expressão de um grande número de citocinas pro-inflamatórias, que atuam sinergicamente, bloqueando a migração de macrófagos e fixando-os no foco infeccioso (60). Exemplos destas citocinas, identificadas ao longo deste trabalho incluem as interleucinas *IL-6*, *IL-4*, *IL-1-β*, *IL-1-α*, a *tumor necrosis factor* (TNF-α) e a *linfotoxin-α*, cujas concentrações salivares foram avaliadas por Gornowicz *et al* (74) com o intuito de comparar e relacionar pacientes com e sem cárie dentária. Os resultados obtidos demonstraram uma elevação estatisticamente significativa de IL-6, IL-8 e TNF-α na saliva total não estimulada de indivíduos com cárie(s) dentária(s), comparando com os controlos saudáveis, não tendo, no entanto, sido registadas alterações significativas nos restantes elementos estudados. Assim, os autores sugeriram uma ligação entre a produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias e imunorreguladoras, como as referidas, e a doença cárie dentária (74).

A *salivar immunoglobulin A* (sIgA) foi outra das proteínas identificadas ao longo deste trabalho. Vários estudos têm sido realizados em crianças e adultos com o intuito de avaliar a relação entre os níveis de Ig-A salivares e a presença de cárie dentária, no entanto, resultados contraditórios têm sido obtidos: enquanto alguns autores registaram um aumento de níveis de IgA com a diminuição de atividade cáriosa (75,91), outros, pelo contrário, demonstram aumentos simultâneos entre os níveis de sIgA e de atividade cáriosa (61,72,81). Por outro lado, alguns estudos não revelam uma associação significativa entre a

experiência de cáries e os níveis de Ig-A salivares (62,63). Uma possível explicação para este facto pode prender-se com o índice de cáries utilizado para caracterização das amostras ao longo dos estudos realizados: sendo a sIgA um fator imunológico, é de prever que os seus valores aumentem em situações de insultos moderados como mecanismo de proteção do organismo contra o ataque cariioso; sendo assim, talvez o parâmetro mais importante a considerar na avaliação de níveis de sIgA devesse ser apenas o componente “Cariado” e não o resultado do índice total CPO (cariado, perdido e obturado). Outra possibilidade prende-se com a especificidade da sIg-A avaliada em cada estudo: enquanto estudos como o de Lehtonen *et al* e Bielawska *et al* procederam a quantificações de sIgA específicas contra *Streptococcus mutans* a maioria dos restantes teve por base medidas de níveis totais de IgA salivares (82).

Sikorska *et al* (61) demonstraram existir uma relação significativa entre os níveis de sIg-A e *α1-proteinase inhibitor* com a extensão das cáries ativas na população estudada, tendo sido registado um aumento dos valores de sIg-A, *α1-proteinase inhibitor* e *lactoferrin* com o avanço das lesões de cárie. Neste estudo os autores propuseram existência de uma relação significativa entre o índice CPO e os valores destas proteínas na saliva, com resultados que sugerem que os elementos imunológicos e não-imunológicos do sistema de defesa do hospedeiro operam em consonância embora os mecanismos não sejam ainda claros. (61)

A *lactoferrin*, um dos fatores de defesa não específica na saliva, foi outra das proteínas identificadas ao longo deste trabalho, associada a processos biológicos de *localization*. Num estudo de Felizardo *et al* (59), em que se avaliou a expressão de perfis salivares da proteína *lactoferrin* e a sua associação com a experiência e atividade cariiosa, embora 45% da população estudada não apresentasse expressão da proteína, os autores demonstraram evidências de uma relação entre a presença salivar da mesma e elevados valores de CPO e, em particular, de número de dentes restaurados (59). Os resultados foram consistentes com os registados por Vitorino *et al* (92) e Brancher *et al* (93) que também observaram uma relação entre a expressão de *lactoferrin* e índices de CPO elevados (92,93), assim como com os de Sikorska *et al*(61), que demonstrou uma relação significativa entre os níveis desta proteína e o valor de CPO em 83 adolescentes de 15 anos (61).

Concomitantemente com avaliação das concentrações de sIg-A, três estudos realizados em crianças (79,81,83), analisaram as concentrações de Imunoglobulina-G salivar (Ig-G) tendo, de forma unânime, registado um aumento das mesmas, na presença de cáries rampantes da infância. Estes resultados poderão dever-se à presença simultânea de cáries e de inflamação gengival, uma vez que o fluido crevicular é a maior fonte de IgG em indivíduos normais e, estando o mesmo aumentado em situações de inflamação gengival, é mais provável que altos níveis de IgG surjam na saliva destes pacientes. De salientar a estrita relação entre gengivite e baixa qualidade de higiene oral, um dos fatores mais preponderantes no surgimento das cáries rampantes de infância. Por outro lado, a bibliografia refere que, em conjunto com a fração do complemento C3b, Ig-G específicos anti-*Streptococcus mutans* facilitam a opsonização, a fagocitose e a destruição bacteriana por granulócitos polimorfonucleares neutrófilos e pelos macrófagos, atrasando a progressão da colonização bacteriana, característica de quadros de cárie dentária (60).

Embora não existam atualmente estudos que avaliem as alterações das mucinas (MUC) de forma comparativa entre indivíduos com e sem cárie dentária, vários estudos têm vindo a salientar a existência de uma relação entre concentrações alteradas das mesmas e índices aumentados de CPO: ainda que Bielawska *et al*, num estudo com adolescentes com cáries dentárias, não tenham obtido resultados estatisticamente significativos, Banderas-Tarabay *et al*(73), num estudo a 120 alunos de medicina dentária Mexicanos, demonstrou a existência de uma correlação entre MUC-5B e MUC-2 e o índice de CPO: a diminuição destas mucinas em 6-13% da população em estudo foi associada a valores mais elevados de CPO (73). Estudos futuros deverão ser feitos de forma a obter mais informações sobre o papel destas moléculas no que toca à modificação do risco dos indivíduos à cárie.

Ainda no que concerne aos processos biológicos envolvidos na atividade imunológica do hospedeiro, num estudo de Bergandi *et al* (78) foi comparada a presença da proteína sCD14 na saliva de indivíduos jovens com e sem cárie dentária. Neste estudo, os resultados sugeriram que a presença de sCD14 exhibe uma relação inversa com a presença de lesões de cárie: uma muito forte diferença entre controlos (indivíduos sem cárie) e pacientes (indivíduos com cárie) foi registada, com sCD14 a surgir exclusivamente no primeiro grupo supracitado. O mesmo estudo demonstrou ainda que após restauração dentária com remoção do tecido cariado no grupo com cáries ativas, sCD14 surgiu na

análise das amostras salivares, o que sugere que esta proteína seja uma boa candidata como biomarcador de atividade cariosa (78).

Hong *et al* (2014) identificaram, com significância estatística, a *Calmodulin-like protein 3* exclusivamente em indivíduos com cárie (55). A *Calmodulin-like protein 3*, identificada no estudo de Baughan *et al* (90) é uma proteína epitelial específica envolvida na migração de células pela estabilização de miosina-10 em células epiteliais, contribuindo, entre outros processos, para a cicatrização de feridas. Esta proteína liga-se especificamente ao ácido lipoteicoico, conhecido como importante fator de virulência da parede celular de *S. mutans*, estando envolvido na adesão bacteriana e indução inflamatória (94).

Quanto ao aumento significativo do número de proteínas envolvidas em processos biológicos de *cellular component organization or biogenesis e development process*, este pode ser justificado com o envolvimento de proteínas com funções de formação e organização da placa bacteriana. Diversas foram as proteínas identificadas neste trabalho com implicações nesses processos biológicos, nomeadamente as *citokeratin 2, 4, 5, 6, 13, 14, 16 e 17* e as *collagen alpha 1 chain* e *collagen alpha 2 chain*. Embora, como referido anteriormente, os autores do estudo em que estas foram identificadas consideram a presença de citoqueratinas reflexo de uma possível contaminação das amostras salivares, os mesmos consideraram significativa a presença das cadeias colagénicas apenas em indivíduos com cárie dentária (85). O colagénio, com um já conhecido papel na adesão bacteriana à superfície dentária, poderá influenciar a flora microbiana da placa bacteriana, podendo constituir um potencial biomarcador de suscetibilidade à cárie.

4.2.2. FUNÇÕES MOLECULARES DAS PROTEÍNAS SALIVARES EM CÁRIE DENTÁRIA

Os dados do proteoma oral de pacientes com cárie(s) dentária(s) foram catalogadas de acordo com a ontologia “*Molecular Function*”, recorrendo à ferramenta PANTHER (65,66) e de acordo com o exposto em “Materiais e Métodos – secção Caracterização funcional”. Com base nesta análise foi possível catalogar as funções moleculares em que participam 79 das 81 proteínas orais identificadas nestes pacientes.

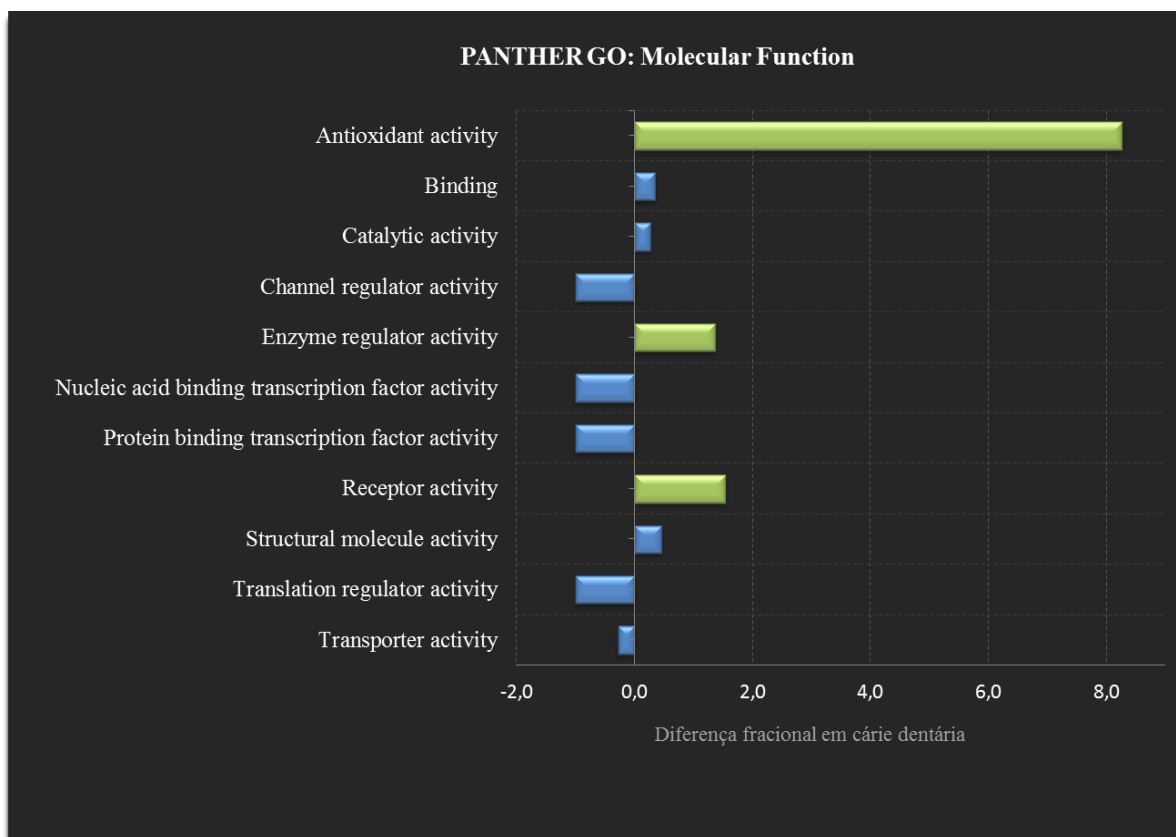


Figura 23 – Distribuição das proteínas salivares de pacientes com cárie dentária, segundo as funções moleculares que desempenham, recorrendo à ferramenta PANTHER (65,66). É apresentada a diferença fracional entre as proteínas identificadas em cárie dentária e no OralOma normal. A verde estão indicadas as funções moleculares que apresentam uma alteração em relação ao OralOma Normal considerada estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

A análise da Figura 23 permite inferir a existência de funções moleculares estatisticamente aumentadas em cárie dentária ($p \leq 0,05$) comparativamente ao verificado na análise do OralOma normal, representados por colunas preenchidas a verde. As proteínas orais envolvidas em *antioxidant activity* apresentam um aumento estatisticamente significativo em cárie dentária, com um *p-value* $< 0,01$; também as proteínas orais com funções de *enzyme regulator activity* e *receptor activity* estão estatisticamente aumentadas em cárie dentária, com um *p-value* $< 0,02$.

O número de radicais livres produzidos durante o desenvolvimento das lesões de cárie dentária têm demonstrado variar de acordo com a própria atividade cariiosa, cabendo aos elementos antioxidantes a sua neutralização (56). A explicação para o aumento do

número de proteínas associadas com funções antioxidantes em cárie dentária prende-se com a identificação de proteínas associadas ao sistema da peroxidase salivar (*superoxide dismutase*, *lactoperoxidase* e *peroxiredoxin-1*). Este sistema enzimático tem um papel importante no controlo bacteriano oral, responsável pela formação de placa bacteriana e por desequilíbrios ecológicos que, consequentemente, conduzem ao desenvolvimento de lesões de cárie dentária (95). A *superoxide dismutase* é uma enzima antioxidante que atua contra os radicais livres, catalisando a dismutação de iões superóxido em oxigénio e peróxido de hidrogénio; a *lactoperoxidase* salivar, por sua vez, utiliza o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) para catalisar a oxidação de iões tiocianato (SCN⁻) e para produção de produtos de oxidação mais estáveis, com propriedades biocidas, como o hipotiocianato (OSCN⁻); assim, esta família de proteínas tem capacidades de inibição do crescimento e metabolismo de diversas bactérias Gram-negativas e, consequentemente, conduz a um impedimento ou, pelo menos, abrandamento do progresso das lesões cariosas (72,96). Vários autores têm reportado uma maior atividade de moléculas antioxidantes em indivíduos com cárie dentária quando comparado com indivíduos sem cárie (56,96–98) e, recentemente, num estudo com adolescentes classificados de acordo com os seus índices de CPO, Kumar *et al* (99), concluíram que indivíduos com níveis de CPO mais altos apresentam igualmente valores de capacidade antioxidante total mais alta, quando comparados com indivíduos com baixos níveis de CPO (99). Na maioria dos estudos utilizados neste trabalho, componentes antioxidantes individuais na saliva foram relacionados com a experiência de cárie, mas apenas um resultado reportado foi estatisticamente significativo (*superoxide dismutase*). Provavelmente, a análise da capacidade antioxidante total das amostras salivares é de maior relevância em relação ao desenvolvimento de cáries dentárias do que cada constituinte individualmente (99).

Também um número estatisticamente aumentado de proteínas com funções de *receptor activity* é registado em cárie dentária, sendo que, de entre as proteínas identificadas ao longo deste estudo, se salientam na bibliografia os papéis da *toll like receptor-2* (TLR-2) e de TNF- α . TLR-2 é um “*germ line encoded receptor*” capaz de reconhecer o peptidoglicano e o ácido lipoteicóico de bactérias Gram positivas, como *Streptococcus mutans*, (a bactéria cariogénica mais comum) (100). Valores de TLR-2 aumentados na saliva de indivíduos com cáries ativas poderão representar uma medida do

hospedeiro de forma a combater o aumento de bactérias Gram positivas características do desenvolvimento da lesão. Zhao *et al* (2014), consideraram ainda que a variação da concentração de TLR-2 na saliva de indivíduos com cáries poderá variar de acordo com a extensão das mesmas, representando um potencial e eficiente biomarcador de atividade cariiosa (71). Relativamente ao TNF- α , o seu papel na defesa do hospedeiro e nos processos de resposta inflamatória é bem conhecido: para além dos seus efeitos citostáticos e citotóxicos nalgumas células tumorais, TNF- α , maioritariamente secretado por macrófagos no local da infeção/inflamação, influencia o crescimento, diferenciação e/ou função da maioria dos tipos celulares investigados, pensando-se que poderá fazer parte de uma cadeia integral de sinais interativos que orquestram processos inflamatórios e imunológicos (101–103).

Uma análise mais detalhada foi feita das subcategorias (PANTHER) relativas às proteínas identificadas com atividade de regulação enzimática, a fim de esclarecer o aumento da sua representação em pacientes com cárie (Figura 24).

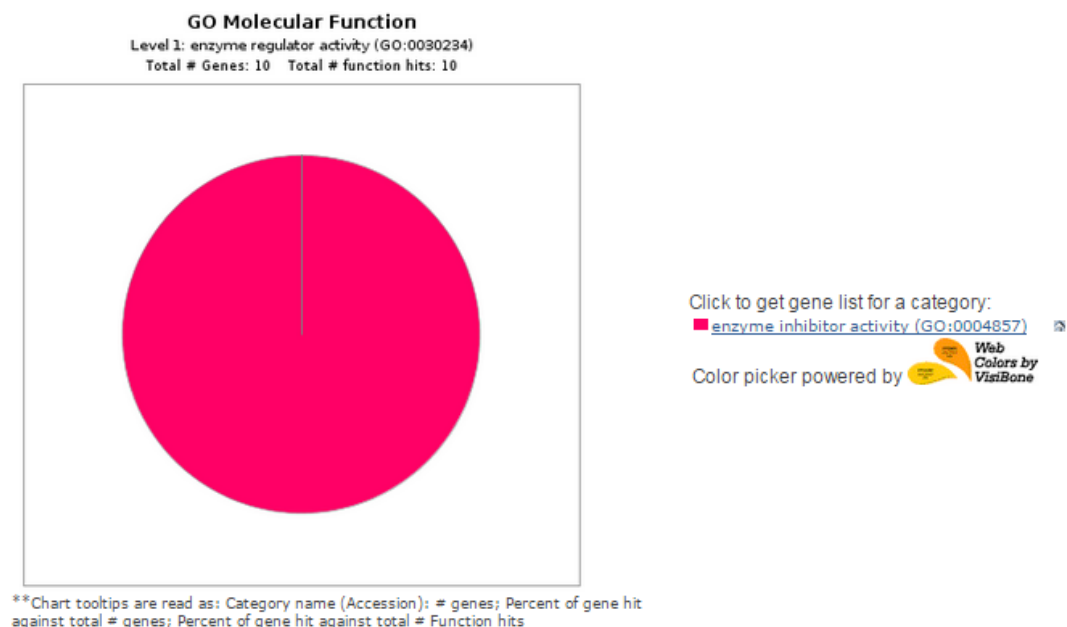


Figura 24 – Gráfico representativo da distribuição das proteínas de cárie dentária anotadas no nível 1 da ontologia “Molecular Function” do PANTHER como tendo atividade de regulação enzimática.

A análise da Figura 24 indica que a totalidade das proteínas identificadas como ativas na regulação enzimática, apresentam funções de inibição dessas mesmas enzimas. Avaliando a subdivisão (PANTHER) das proteínas que apresentam estas atividades inibitórias obtemos o seguinte gráfico (Figura 25)

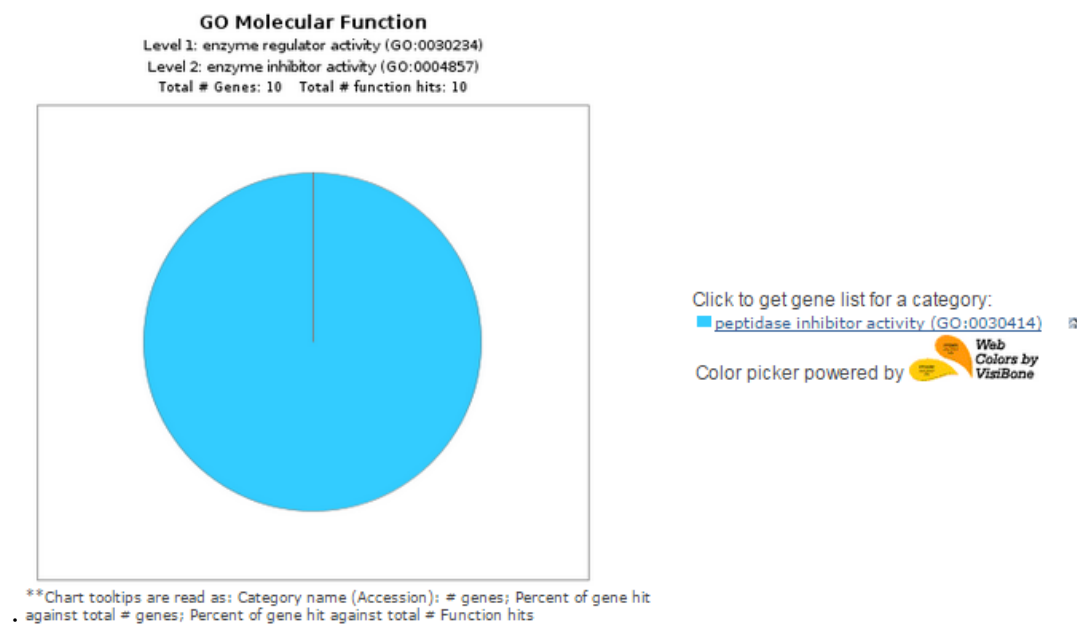


Figura 25 – Gráfico representativo da distribuição das proteínas de cárie dentária anotadas no nível 2 da ontologia “Molecular function” do PANTHER como tendo função inibitória.

A análise da Figura 25 permite inferir que a totalidade das proteínas identificadas como ativas na inibição enzimática, apresentam funções específicas de inibição de peptidases. A presença destas proteínas tem sido descrita como positiva em eventos inflamatórios, com valores que podem elevar-se 2 a 5 vezes durante a fase aguda da reação (61). Avaliando a subdivisão (PANTHER) das proteínas que apresentam atividade inibitória da peptidase obtemos o seguinte gráfico (Figura 26):

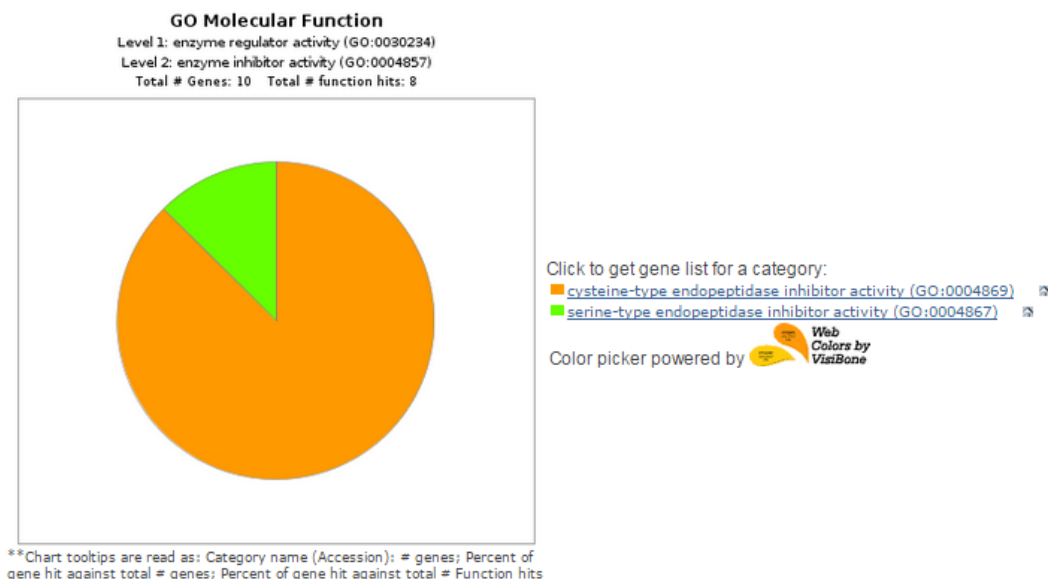


Figura 26 – Gráfico representativo da distribuição de proteínas de cárie dentária anotadas no nível 3 da ontologia “Molecular function” do PANTHER como tendo atividade inibitória de peptidases.

A análise da Figura 26 indica que a vasta maioria das proteínas identificadas apresentam atividade de inibição de endopeptídates de cisteína, neste caso, representadas por proteínas da família das cistatinas (SN, SA, C, S, D, A e B) (Anexo A). A proteção dos tecidos orais conferida pelas cistatinas deve-se à inibição da atividade proteolítica associada às cisteína-peptidases, o que se traduz em fortes propriedades bactericidas e anti-virais (55,92). Estudos apontam para o envolvimento destas proteínas na formação da película aderida através da sua interação com a hidroxiapatite presente nos tecidos dentários, com funções potenciadoras da remineralização do esmalte, ajuste da adesão microbiana e metabolismo da placa na interface dente-saliva (45,55). Vitorino *et al*, num estudo de eletroforese bidimensional da formação de película dentária *in vitro* relacionada com suscetibilidade à cárie, verificaram aumento dos valores de *lipocalin* e *cystatins S* e *SN* nas amostras de indivíduos livres de cárie o que sugere que a inibição dos eventos proteolíticos de outras proteínas salivares, constituam um mecanismo indireto de proteção dentária (92).

Assim, a análise destes resultados corrobora o estatisticamente significativo aumento de número de proteínas envolvido em processos biológicos de *immune system process* anteriormente discutidos.

Apesar de a maioria dos estudos quantitativos da composição salivar e atividade cariiosa tenham sido inconclusivos, existem ainda evidências de que proteínas similares em indivíduos com e sem cáries apresentam diferentes níveis de atividade biológica, o que poderá constituir uma nova abordagem ao estudo das proteínas salivares como biomarcadores de suscetibilidade à cárie dentária (95).

4.3. INTERACTOMA ORAL DE CÁRIE DENTÁRIA

O conhecimento do papel das interações do proteoma oral do hospedeiro com o proteoma oral em cárie dentária, seja microbiano ou humano, tem uma importância vital para o entendimento dos mecanismos moleculares verificados nos tecidos orais dos indivíduos. Estas interações são importantes não apenas no estabelecimento e manutenção da flora oral capaz de desencadear a formação de placa bacteriana, responsável pelo desenvolvimento das lesões, mas também, como discutido anteriormente, nos próprios mecanismos de defesa do hospedeiro a estímulos.

A identificação do proteoma oral de cárie dentária permitiu fazer o levantamento das interações que estas possuem com as proteínas do OralOma normal, através do algoritmo OralInt. A figura que se segue expõe essas mesmas interações em detalhe, através da ferramenta de visualização Cytoscape:

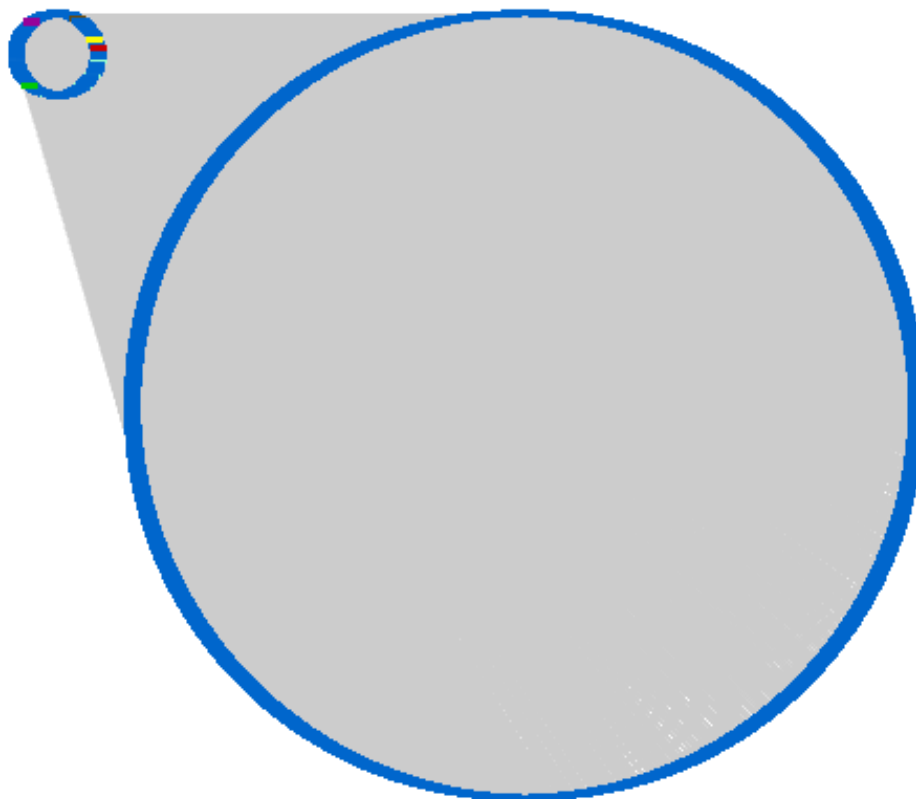


Figura 27 – Rede de interações das proteínas orais de cárie dentária (círculo da esquerda) com as proteínas presentes no OralOma humano (círculo da direita), gerada através do algoritmo OralInt e visualizada com recurso à ferramenta Cytoscape. Na imagem são apenas apresentadas interações com $score \geq 0,9$.

Na Figura 27 os pontos com coloração azul localizados no círculo mais à esquerda representam as proteínas identificadas ao longo deste estudo como pertencentes ao OralOma em cárie dentária. Estas proteínas interagem (interação representada pelas linhas a cinzento) com as proteínas do OralOma Humano total, representadas a azul no círculo da esquerda, com base na determinação do algoritmo OralInt. A grande condensação de linhas a cinzento confirma a existência de uma enorme rede de interações existente entre as proteínas do OralOma de cárie com as do OralOma Humano total: ao todo foram contabilizadas 22.826 interações entre 8488 proteínas, das quais 2886 humanas e 5554 microbianas.

Da análise do Interactoma de cárie dentária salientámos as 3 proteínas do OralOma de cárie envolvidas no maior número de interações: a verde a proteína *Transcobalamin-1*, a

amarelo *Peptidylprolyl cis-transisomeraseB*, a lilás *Small proline-rich protein 3* e a azul *histone 4* (Figura 28). Pela grande interação com todas as proteínas da cavidade oral, as proteínas *actin*, *citokeratin-14* e *Hemoglobin subunit alpha* foram descartadas nesta análise mais específica.

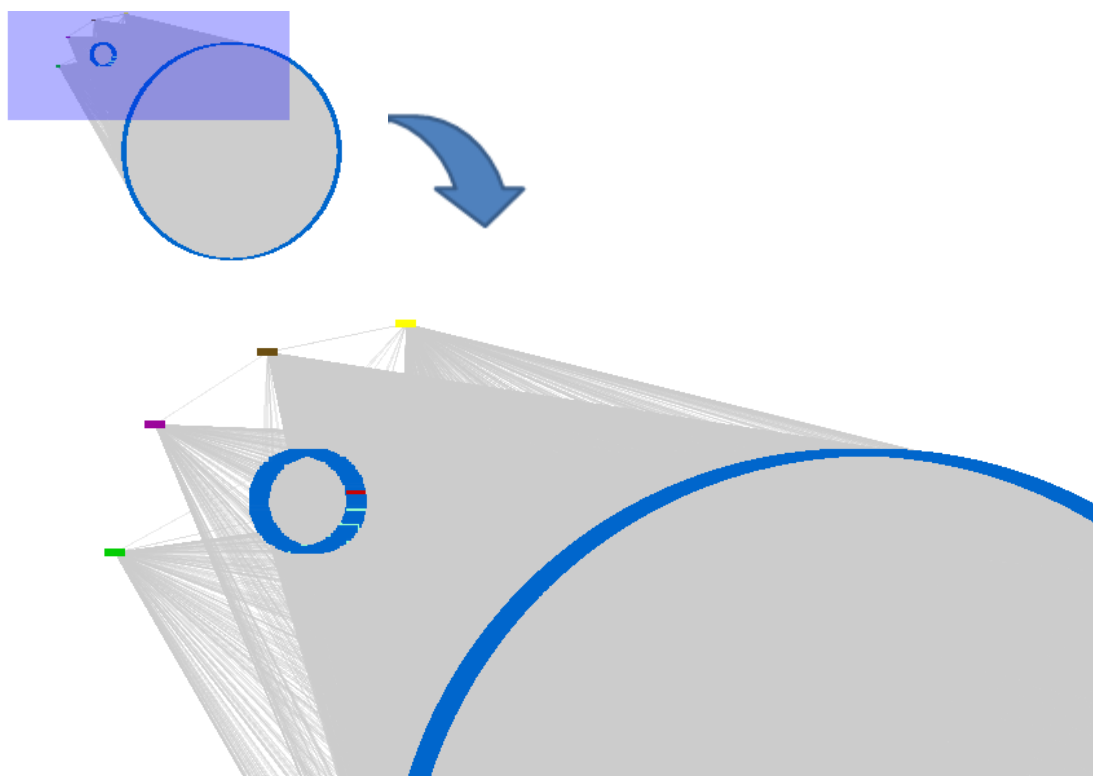


Figura 28 – Destaque das proteínas *Transcobalamin-1* (a verde), *Peptidylprolyl cis-transisomeraseB* (a amarelo), *Small proline-rich protein 3* (a lilás) e *histone 4* (a castanho), a partir da rede de interações das proteínas orais de cárie dentária (círculo da esquerda) com as proteínas presentes no OralOma humano (círculo da direita), gerada através do algoritmo OralInt e visualizada com recurso à ferramenta Cytoscape.

Histone 4 (representada na Figura 28 a azul) está envolvida em 3634 interações tendo sido, nos últimos anos, associada a mecanismos antimicrobianos do hospedeiro contra organismos gram-positivos e gram-negativos (55). Vários estudos têm indicado que alguns péptidos e proteínas bem caracterizados, exibem atividade antimicrobiana para além das suas funções fisiológicas estabelecidas; exemplo disso é a *histone 4* que, sendo um importante componente na cromatina, consegue diretamente ligar-se ao ácido lipoteicoico (LTA) da superfície de bactérias gram-positivas e LPS superficiais de gram-negativos,

resultando na rutura da membrana bacteriana e na redução do TNF- α , previamente discutido, e produção de oxido nítrico, respetivamente (55,104).

Small proline-rich protein 3 é uma proteína da família de glicoproteínas ricas em prolina cujas funções foram já bastante debatidas na literatura ao longo do último meio século (45). Esta proteína foi identificada em indivíduos com e sem cárie dentária por Preza *et al* (85) e sabe-se que tem uma função importante na agregação bacteriana. Este processo de aglutinação reduz a capacidade bacteriana de adesão às superfícies dos tecidos orais, sugerindo uma via de controlo da colonização bacteriana por parte destas glicoproteínas.

Sabe-se que *transcobalamin-1* é a proteína responsável pela ligação à cobalamina (ou Vitamina B12) protegendo-a, no estômago, do ambiente ácido característico (105). Esta proteína foi identificada no estudo de Preza *et al* (85), com valores de regulação positivos, o que pode sugerir que em ambientes ácidos, como os característicos de situações de cárie dentária, esta proteína possa estar sobreexpressa de forma a proteger a cobalamina da ação deste ambiente, no entanto não existem dados que suportem esta suposição. A *transcobalamin-1* realiza também o transporte de iões cobalto, cuja presença na saliva pode ocorrer durante episódios de desmineralização-remineralização do esmalte (106), sendo atualmente a única informação consistente com a relação da proteína à cárie dentária.

Peptidylprolyl cis-transisomerase B (PPIB) é uma isomerase, responsável pela aceleração do processo de *folding* das proteínas, através da catalização dos mecanismos de isomerização cis-trans de péptidos de prolina em oligopeptidos (107). Um estudo recente demonstrou a função de PPIB na fagocitose de organismos patogénicos invasores na presença de IL-8, uma proteína cujas concentrações se mostraram elevadas na presença de cárie dentária, como abordado anteriormente (107). PPIB foi também associada a patologias como aterosclerose, artrite reumatoide e disfunção endotelial, sendo a sua produção levada a cabo por macrófagos após estimulação por LPS, reforçando o seu possível envolvimento em processos de mediação inflamatória (108–110). No entanto, embora PPIB tenha demonstrado *in vitro* a capacidade de iniciar a migração de macrófagos, a mesma não induz a produção de citocinas inflamatórias, tendo sido responsável pelo retrotransporte de *prolactin*, crescimento e proliferação celular, reduzindo inclusivamente a expressão de TNF- α após estimulação por LPS (111). Para além desta ambígua relação de

PPIB com os mecanismos de resposta imune do hospedeiro, esta proteína desempenha um papel importante nos mecanismos de *folding* do colagénio (112), cuja atividade foi anteriormente discutida como estando envolvida na adesão bacteriana à superfície dentária e podendo constituir um potencial biomarcador de suscetibilidade à doença. Uma análise de proteómica de duas camadas mucosas do colon, demonstrou uma forte ligação entre o seu maior componente, a proteína MUC-2, e a PPIB, tendo sido sugerida uma função antibacteriana a esta interação (113). Uma vez que a proteína MUC-2 foi igualmente identificada ao longo deste estudo, realizou-se uma análise específica das interações existentes entre as proteínas identificadas no OralOma de cárie (Figura 29).

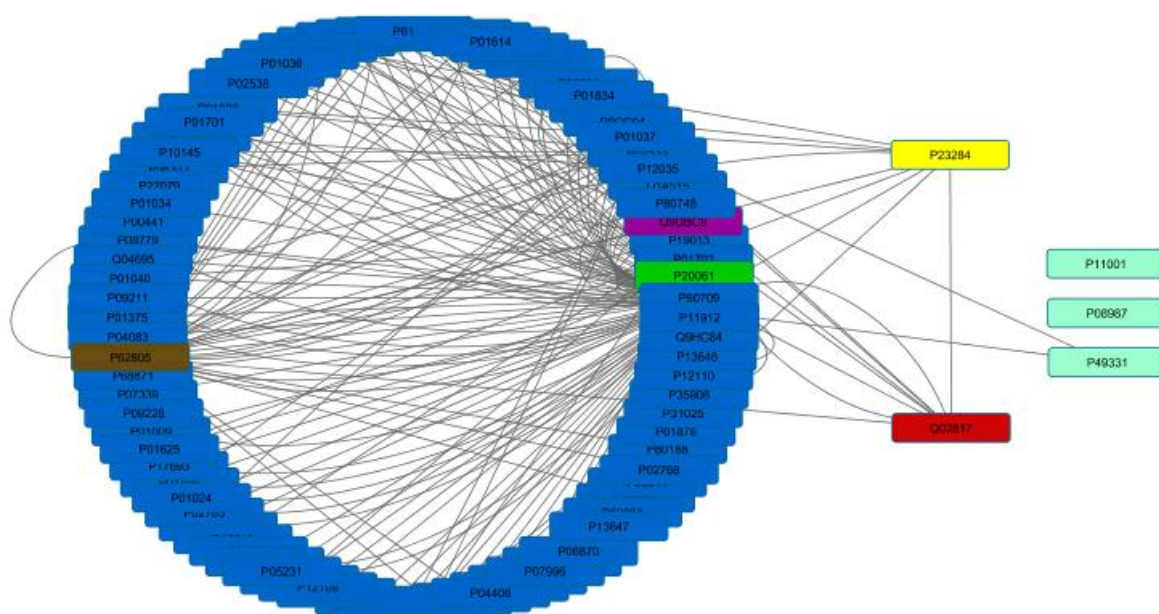


Figura 29 – Interações das proteínas orais de cárie dentária, gerada através do algoritmo OralInt, cuja visualização foi realizada com recurso à ferramenta Cytoscape.

Pela análise da Figura 29, verifica-se a existência de interação entre a proteína PPIB, assinalada a amarelo (P23284), com a proteína MUC-2, assinalada a vermelho (Q02817), sugerindo que, à semelhança do que acontece a nível intestinal, esta interação a nível da cavidade oral, possa constituir um mecanismo de defesa antibacteriano, considerando o facto de MUC-2 ter sido apenas identificada em indivíduos com cárie dentária (73).

É ainda possível verificar que, das 4 proteínas microbianas identificadas, representadas a azul claro (Figura 29), apenas 3 surgem no conjunto de interações das proteínas orais de cárie dentária. A proteína *GTF-C*, produzida por *S. mutans*, não surge nos resultados gerados através do algoritmo OralInt, cuja visualização foi realizada com recurso à ferramenta Cytoscape. Na origem deste resultado o facto do *score* obtido para a interação desta proteína microbiana com proteínas salivares ser inferior a 0,9 e, como tal, ter sido eliminado aquando da aplicação dos critérios de exclusão de pares de interação, como exposto em “Material e Métodos – secção Interactoma oral em cárie dentária”.

Observa-se ainda que, das proteínas microbianas identificadas, apenas *GTF-D* (P49331) apresenta interações com outras proteínas presentes em cárie dentária, especificamente com *citokeratin-14* e *citokeratin-16*. A esta interação poderão associar-se atividades com ação no desenvolvimento e/ou progressão das lesões de cárie dentária, no entanto, estudos futuros específicos deverão ser realizados para averiguar a natureza destas interações.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi realizada uma análise de resultados de estudos de proteômica oral, com amostras obtidas da cavidade oral de indivíduos com cárie dentária, tendo sido realizada uma anotação manual de informações consideradas essenciais para a interpretação dos dados catalogados. Esta pesquisa permitiu a atualização da base de dados do OralCard.

A análise de estudos de proteômica no âmbito de cárie dentária permitiu a identificação de um total de 98 proteínas salivares o que, quando comparado com o número de proteínas estudadas no âmbito da doença periodontal (cerca de 2000) demonstra a necessidade de realização de novos estudos de proteômica de forma a identificar um maior número de proteínas associadas a esta patologia e, consequentemente, facilitar a identificação de biomarcadores de suscetibilidade à cárie.

Deve ser tido em conta que muitas variáveis podem influenciar a comparação entre os estudos selecionados e os próprios resultados neles descritos. Por exemplo, a idade e o tipo de origem das amostras (saliva total, parótida, submandibular ou biofilme) variaram entre os estudos selecionados, bem como a própria metodologia de recolha e análise: enquanto alguns estudos referem a recolha de saliva por estimulação, outros registam recolhas de saliva sem estimulação; se alguns autores referem análises de amostras recorrendo a espectrometria de massa, outros recorreram à eletroforese ou a anticorpos.

Outro fator que dificulta o estabelecimento de variáveis preditivas de cárie dentária pode também dever-se à sua etiologia multifatorial. A possível exposição ao flúor durante o desenvolvimento dentário dos indivíduos dadores de amostras para cada estudo, pode também considerar-se uma influência nos resultados obtidos, no entanto, nenhum estudo apresentava referência a este facto.

Diversos estudos realizados com o objetivo de relacionar uma variação individual nas concentrações proteicas salivares com diferentes estados de saúde dentária têm registado resultados inconsistentes, possivelmente resultantes da considerável redundância funcional das proteínas salivares ou até mesmo da heterogeneidade das metodologias de estudo aplicadas.

No entanto, considerando a composição salivar, deve enfatizar-se que a complexidade das proteínas presentes neste fluido define e é definido por uma série de

intrincadas funções moleculares e processos biológicos que poderão estar, direta ou indiretamente relacionados com o desenvolvimento de lesões de cárie.

A caracterização funcional do OralOma de cárie dentária permitiu inferir a presença de uma relação entre a cárie dentária e a presença de um elevado número de proteínas com ação antioxidante na saliva, nomeadamente associadas ao sistema da peroxidase salivar. Assim, e corroborando a sugestão de Kumar *et al* (99) num estudo recente, propomos a futura análise da capacidade antioxidante total de amostras salivares para inferência da sua potencialidade como indicador de suscetibilidade à cárie dentária.

A análise interatómica de cárie confirmou a existência de uma grande rede de interações existentes entre as proteínas do OralOma de cárie com as do OralOma Humano total, salientando-se *Peptidylprolyl cis-transisomeraseB*, *Small proline-rich protein 3* e *histone 4* pelo elevado número de interações com todas as proteínas orais. A avaliação aprofundada do interactoma de cárie poderá constituir a chave na futura identificação de biomarcadores de suscetibilidade, nomeadamente associados à atividade biológica decorrente, não apenas da atividade da proteína de forma individualizada, mas também da interação com as restantes proteínas orais, como sugerido para PPIB e MUC-2.

No que concerne a proteínas microbianas presentes no OralOma de cárie dentária, conclui-se que existem poucos estudos experimentais com as características necessárias para a sua identificação. Ainda assim, a presença de determinadas proteínas, como a *Glucosyltransferase-1*, identificadas exclusivamente em pacientes com cárie dentária, pode ser mais um futuro passo na identificação de biomarcadores de suscetibilidade à doença.

Desta forma, estamos de acordo com Martins *et al* (19) e Banderas-Tarabay *et al* (73) no que toca à necessidade de mais evidências que corroborem a existência de uma relação entre o papel das proteínas salivares e a modificação da suscetibilidade de um indivíduo à cárie dentária.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Selwitz R, Ismail A, Pitts N. Dental caries. *Lancet*. 2007;(4):51–9.
2. Lima J. Cárie dentária: um novo conceito. *Rev Dent Press Ortod e Ortop Facial*. 2007;12:119–30.
3. Lenander-Lumikari M, Loimaranta V. Saliva and dental caries. *Adv Dent Res*. 2000;14:40–7.
4. Petersen P. Global policy for improvement of oral health in the 21st century – implications to oral health research of World Health Assembly 2007 , World Health Organization. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2009;37:1–8.
5. Fejerskov O. Dental caries: the disease and its clinical management. 2nd ed. Fejerskov O, Kidd E, editors. Copenhagen, Denmark: Blackwell Munksgaard Ltd; 2003.
6. Pereira A. Contribuição para o estudo da prevalência e da gravidade da cárie dentária em Portugal. Universidade do Porto; 1990.
7. Cameron F, Weaver L, Wright C, Welbury R. Dietary and social characteristics of children with severe tooth decay. *Scott Med J*. 2006;51(3):26–9.
8. Alkarimi H, Watt R, Pikhart H, Sheiham A, Tsakos G. Dental caries and growth in school-age children. *Pediatrics*. 2014;133:e616–23.
9. Oliveira L, Sheiham A, Bonecker M. Exploring the association of dental caries with social factors and nutritional status in Brazilian preschool children. *Eur J Oral Sci*. 2008;116(1):37–43.
10. Acs G, Lodolini G, Kaminsky S, Cisneros G. Effect of nursing caries on body weight in a pediatric population. *Pediatr Dent*. 1992;14(5):302–5.
11. Melo P, Azevedo A, Henriques M. Cárie dentária – a doença antes da cavidade. *Acta Pediátrica Port*. 2008;253–9.
12. Melo P, Azevedo A, Henriques M. Cárie dentária – a doença antes da cavidade. *Acta Pediátrica Portuguesa*. 2008.
13. Kidd E, Fejerskov O. What Constitutes Dental Caries? Histopathology of Carious Enamel and Dentin Related to the Action of Cariogenic Biofilms. *J Dent Res*. 2004;83(C35).
14. Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: Consequences for oral health care. *Caries Res*. 2004;38(3):182–91.
15. Keyes PH. Recent advances in dental caries research. *Int Dent J*. 1962;12(4):443–64.
16. Newbrun E. Bacteriology. In: Wilkins BW&, editor. *Cariology*. 2nd ed. 1983.
17. Ritter A, Eidson R, Donovan T. Dental Caries: etiology, clinical characteristics, risk assessment and management. *Sturdevant's Art & Science of Operative Dentistry*. 6th ed. Elsevier; 2013. p. 47.
18. Simón-Soro A, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Alcaraz L, Mira A. A tissue-dependent hypothesis of dental caries. *Caries Res*. 2013;47(6):591–600.
19. Martins C, Buczynski A, Maia L, Siqueira W, Castro G. Salivary proteins as a biomarker for dental caries - a systematic review. *J Dent [Internet]*. Elsevier Ltd; 2013;41(1):2–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2012.10.015>
20. Fontana M, Zero D. Assessing patients' caries risk. *J Am Dent Assoc*. 2006;137(9):1231–9.

21. Guo L, Shi W. Salivary biomarkers for caries risk assessment. *J Calif Dent Assoc.* 2013;41(2):107–9, 112–8.
22. Petersen PE. Sociobehavioural risk factors in dental caries - International perspectives. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2005;33(4):274–9.
23. Shaffer J, Wang X, DeSensi R, Wendell S, Weyant R, Cuenco K, et al. Genetic susceptibility to dental caries on pit and fissure and smooth surfaces. *Caries Res.* 2012;46(1):38–46.
24. Belstrøm D, Fiehn N, Nielsen C, Klepac-ceraj V, Paster B, Twetman S, et al. Differentiation of salivary bacterial profiles of subjects with periodontitis and dental caries. 2015;1(6):6–10.
25. Mira A, Simo A. Solving the etiology of dental caries. *Trends Microbiol.* 2014;23(2):76–82.
26. Aas J, Griffen A, Dardis S, Lee A, Olsen I, Dewhirst F, et al. Bacteria of Dental Caries in Primary and Permanent Teeth in Children. *J Clin Microbiol.* 2008;46(4):1407–17.
27. Ma C, Chen F, Zhang Y, Sun X, Tong P, Si Y. Comparison of oral microbial profiles between children with severe early childhood caries and caries-free children using the human oral microbe identification microarray. *PLoS One.* 2015;1–12.
28. Bradshaw D, Lynch R. Diet and the microbial aetiology of dental caries: new paradigms. *Int Dent J* [Internet]. 2013;63:64–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24283286>
29. Costolonga M, Herzberg M. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunol Lett* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;162(2):22–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2014.08.017>
30. Samaranayake L. *Essential Microbiology for Dentistry*. 3rd ed. Walley S, editor. Elsevier Inc; 2006. 363 p.
31. Guillen-navarro M, Mira A, Simo A. Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions. *J Oral Microbiol.* 2014;1:1–6.
32. Nyvad B, Crielaard W, Mira A, Takahashi N, Beighton D. Dental caries from a molecular microbiological perspective. *Caries Res.* 2013;47:89–102.
33. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process : ecological perspectives. *J Dent Res.* 2011;90(3):294–303.
34. Cristina A, Romário D, Avelar S, Ferreira M, David A, Rodrigues S, et al. Salivary Diagnostics , Current Reality and Future Prospects. 2015.
35. Levine M. Susceptibility to dental caries and the salivary proline-rich proteins. *Int J Dent.* 2011;
36. Touger-decker R, Loveren C. Sugars and dental caries. *Am J Clin Nutr.* 2003;78.
37. Hara A, Zero D. The caries environment: saliva, pellicle, diet, and hard tissue ultrastructure. *Dent Clin North Am.* 2010;54(3):455–67.
38. Leme A, Koo H, Bellato C, Bedi G, Cury J. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation - new insight. *J Dent Res.* 2006;85(10):878–87.
39. Burt B. Relative Consumption of Sucrose and Other Sugars: Has it Been a Factor in Reduced Caries Experience? *Caries Res* [Internet]. 1993;27:56–63. Available from: <http://www.karger.com/DOI/10.1159/000261604>

40. Marshall T. Chairside diet assessment of caries risk. J Am Dent Assoc [Internet]. American Dental Association; 2009;140(6):670–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.14219/jada.archive.2009.0252>
41. Greabu M, Battino M, Mohora M, Totan A, Didilescu A, Spinu T, et al. Saliva: a diagnostic window to the body, both in health and in disease. J Med Life. 2009;2(2):124–32.
42. Ai J, Smith B, Wong D. Saliva Ontology: an ontology-based framework for a salivaomics knowledge base. BMC Bioinformatics. 2010;11:302.
43. Rosa NR das N. Do proteoma salivar ao oraloma. Universidade Católica Portuguesa; 2011.
44. Almeida P, Grégio M, Machado M, Lima A, Azevedo L. Saliva composition and functions: a comprehensive review. J Contemp Dent Pract. 2008;9(3):072–80.
45. Humphrey S, Williamson R. A review of saliva: normal composition, flow, and function. J Prosthet Dent. 2001;85(2):162–9.
46. Pfaffe T, Cooper-White J, Beyerlein P, Kostner K, Punyadeera C. Diagnostic potential of saliva : current state and future applications. Am Assoc Clin Chem. 2011;57(5):675–87.
47. Walsh L. Clinical aspects of salivary biology for the dental clinician. Int Dent South Africa. 2007;2(3):16–30.
48. Pandey A. Physiology of saliva : an overview. J Detistry Indones. 2014;21(1):32–8.
49. Goswami Y, Mishra R, Agrawal A, Agrawal L. Salivary biomarkers: a review of powerful diagnostic tool. IOSR J Dent Med Sci. 2015;14(3):80–7.
50. Edição N. Avanços científicos nas técnicas de diagnóstico salivar.
51. Wong DT. Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. J Am Dent Assoc [Internet]. American Dental Association; 2006;137(3):313–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.14219/jada.archive.2006.0180>
52. Edgar W, Higham S. Role of saliva in caries models. Adv Dent Res. 1995;9(3):235–8.
53. Hu S, Loo J, Wong D. Human body fluid proteome analysis. Proteomics. 2006;6(23):6326–53.
54. Amerongen A, Veerman E, Bolscher J. Salivary Proteins : Protective and Diagnostic Value in Cariology? Caries Res. 2004;38:247–53.
55. Hong S, Seo D, Baik J, Cho K, Yun C, Han S. Differential profiles of salivary proteins with affinity to Streptococcus mutans lipoteichoic acid in caries-free and caries-positive human subjects. Mol Oral Microbiol. 2014;29:208–18.
56. Hegde M, Hegde N, Ashok A, Shetty S. Biochemical indicators of dental caries in saliva: an in vivo study. Caries Res. 2014;48:170–3.
57. Hart T, Corby P, Hauskrecht M, Ryu O, Pelikan R, Valko M, et al. Identification of microbial and proteomic biomarkers in early childhood caries. Int J Dent. 2011;2011.
58. Al-tarawneh S, Border M, Dibble C, Bencharit S. Defining salivary biomarkers using mass spectrometry-based proteomics : a systematic review. J Integr Biol. 2011;15(6).
59. Felizardo K, Gonçalves R, Schwarcz W, Poli-Frederico R, Maciel S, Andrade F. An evaluation of the expression profiles of salivary proteins lactoferrin and lysozyme

- and their association with caries experience and activity. *Revista Odonto Ciência*. 2010;25(4):344–9.
60. Pereira A, Neves A, Trindade A. Imunologia da cárie dentária. *Acta Med Port*. 2010;23:663–8.
 61. Sikorska M, Mielnik-Blaszczak M, Kapeć E. The relationship between the levels of SigA, lactoferrin and alpha(1) proteinase inhibitor in saliva and permanent dentition caries in 15-year-olds. *Oral Microbiol Immunol*. 2002;17:272–6.
 62. Bielawska A. Mucin levels in saliva of adolescents with dental caries. *Med Sci Monit*. 2014;(20):72–7.
 63. Lien E, Ingalls R. Toll-like receptors. *Crit Care Med*. United States; 2002 Jan;30(1 Suppl):S1–11.
 64. Hashizume-takizawa T, Shinozaki-Kuwahara N, Tomita N, Kurita-Ochai T. Establishment of a convenient sandwich-ELISA for direct quantification of glucosyltransferase-I : application for dual diagnosis of dental caries. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. 2014;33(2):89–93.
 65. Mi H, Muruganujan A, Thomas PD. PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Res*. England; 2013 Jan;41(Database issue):D377–86.
 66. Mi H, Thomas P. PANTHER Pathway: An Ontology-Based Pathway Database Coupled with Data Analysis Tools. In: Nikolsky Y, Bryant J, editors. *Protein Networks and Pathway Analysis SE - 7* [Internet]. Humana Press; 2009. p. 123–40. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60761-175-2_7
 67. Cho R, Campbell M. Transcription, genomes, function. *Trends Genet* [Internet]. Elsevier; 2000 Sep;16(9):409–15. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)02065-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525(00)02065-5)
 68. Arrais J, Rosa N, Melo J, Coelho E, Amaral D, Correia M, et al. OralCard: a bioinformatic tool for the study of oral proteome. *Arch Oral Biol*. England; 2013 Jul;58(7):762–72.
 69. Coelho E, Arrais J, Matos S, Pereira C, Rosa N, Correia M, et al. Computational prediction of the human-microbial oral interactome. *BMC Syst Biol* [Internet]. 2014;8:24. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3975954&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 70. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga N, Wang J, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. United States; 2003 Nov;13(11):2498–504.
 71. 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* [Internet]. 2014;14(1):108. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1472-6831/14/108>
 72. Bielawska A, Jabłoński R. The assessment of sIgA , histatin-5 , and lactoperoxidase levels in saliva of adolescents with dental caries. *Med Sci Monit*. 2014;(20):1095–100.
 73. Banderas-Tarabay J, Zacarías-D’Oleire I, Garduño-Estrada R, Aceves-Luna E, González-Begné M. Electrophoretic analysis of whole saliva and prevalence of dental caries. A study in Mexican dental students. *Arch Med Res*. 2002;33:499–505.

74. Gornowicz A, Bielawska A, Bielawski K, Grabowska S, Wójcicka A, Zalewska M, et al. Pro-inflammatory cytokines in saliva of adolescents with dental caries disease. *Ann Agric Environ Med*. 2012;19(4):711–6.
75. Omar O, Khattab N, Rashed L. Glucosyltransferase B, immunoglobulin a, and caries experience among a group of Egyptian preschool children. *J Dent Child* [Internet]. 2012;79:63–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22828760>
76. Biria M, Sattari M, Vahid Golpayegani M, Kooshki F. Association of salivary sCD14 concentration levels with early childhood caries. *Iran J Immunol*. 2010;7(September):193–7.
77. Vacca Smith A, Scott-Anne K, Whelehan M, Berkowitz R, Feng C, Bowen W. Salivary glucosyltransferase B as a possible marker for caries activity. *Caries Res*. 2007;41:445–50.
78. Bergandi L, Defabianis P, Re F, Preti G, Aldieri E, Garetto S, et al. Absence of soluble CD14 in saliva of young patients with dental caries. *Eur J Oral Sci*. 2007;115:93–6.
79. Lehtonen O, Grahn E, Stahlberg T, Laitinen L. 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;43(1):308–13.
80. Stuchell R, Mandel I. A comparative study of salivary lysozyme in caries-resistant and caries-susceptible adults. *J Dent Res*. 1983;62:552–4.
81. Farias D, Bezerra A. Salivary antibodies, amylase and protein from children with early childhood caries. *Clin Oral Investig*. 2003;7:154–7.
82. Shifa S, Muthu M, Amaral D, Prabhu V. Quantitative assessment of IgA levels in the unstimulated whole saliva of cariesfree and cariesactive children. *J Indian Soc Pedod Prevntive Dent*. 2008;26(4):158–61.
83. Bagherian A, Abdullah J, Rezaeian M, Ahmadi S, Rezaity M. Comparison of the salivary immunoglobulin concentration levels between children with early childhood caries and caries free children. *Iran J Immunol J Immunol*. 2008;5(4):217–21.
84. Oliveros JC. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams [Internet]. Available from: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>
85. 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(December 2008):161–9.
86. Rieg S, Steffen H, Seeber S, Humeny A, Kalbacher H, Dietz K, et al. Deficiency of dermcidin-derived antimicrobial peptides in sweat of patients with atopic dermatitis correlates with an impaired innate defense of human skin in vivo. *J Immunol. United States*; 2005 Jun;174(12):8003–10.
87. Hannig C, Hannig M, Attin T. Enzymes in the acquired enamel pellicle. *Eur J Oral Sci*. 2005;113(1):2–13.
88. Grenklo S, Geese M, Lindberg U, Wehland J, Karlsson R, Sechi A. A crucial role for profilin–actin in the intracellular motility of *Listeria monocytogenes*. *EMBO Rep* [Internet]. 2003 May 4;4(5):523–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1319178/>
89. Angwaravong O, Pitiphat W, Bolscher J, 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* [Internet]. 2015; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00784-015-1428-1>
90. Baughan L, Robertello F, Sarrett D, Denny P, Denny P. Salivary mucin as related to oral *Streptococcus mutans* in elderly people. *Oral Microbiol Immunol*. 2000;15(1):10–4.
 91. Kirtaniya B, Chawla H, Tiwari A, Ganguly N, Sachdev V. Natural prevalence of antibody titres to GTF of *S. mutans* in saliva in high and low caries active children. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. India; 2009;27(3):135–8.
 92. Vitorino R, De Moraes Guedes S, Ferreira R, Lobo M, Duarte J, Ferrer-Correia A, et al. Two-dimensional electrophoresis study of in vitro pellicle formation and dental caries susceptibility. *Eur J Oral Sci*. 2006;114(12):147–53.
 93. Brancher J, Pecharki G, Doetzer A, Medeiros K, Cordeiro Junior C, Sotomaior V, et al. Analysis of polymorphisms in the lactotransferrin gene promoter and dental caries. *Int J Dent*. 2011;
 94. Bennett R, Mauer A, Strehler E. Calmodulin-like protein increases filopodia-dependent cell motility via up-regulation of myosin-10. *J Biol Chem*. 2007;282(5):3205–12.
 95. 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.
 96. Dodwad R, Betigeri A, Preeti B. Estimation of total antioxidant capacity levels in saliva of caries-free and caries-active children. *Contemporary Clinical Dentistry*. India; 2011. p. 17–20.
 97. Bayindir Y, Polat M, Seven N. Nitric oxide concentrations in saliva and dental plaque in relation to caries experience and oral hygiene. *Caries Res*. 2005;39(2):130–3.
 98. Uberos J, Alarcón J, Peñalver M, Molina-Carballo A, Ruiz M, González E, et al. Influence of the antioxidant content of saliva on dental caries in an at-risk community. *Br Dent J*. 2008;205(2):E5.
 99. Kumar S, Kumar R, Bagewadi N, Krishnan N. A study to correlate dental caries experience with total antioxidant levels of saliva among adolescents in Mangalore. *J Indian Assoc Public Heal Dent* [Internet]. 2015;13(2):122. Available from: <http://www.jiaphd.org/text.asp?2015/13/2/122/159045>
 100. Hong S, Baik J, Kang S, Yun C, Seo D, Han S. Lipoteichoic acid of *Streptococcus mutans* interacts with Toll-like receptor 2 through the lipid moiety for induction of inflammatory mediators in murine macrophages. *Mol Immunol*. England; 2014 Feb;57(2):284–91.
 101. Paeppe B, Creus K, De Bleecker J. The tumor necrosis factor superfamily of cytokines in the inflammatory myopathies: potential targets for therapy. *Clin Dev Immunol*. Egypt; 2012;2012:369432.
 102. Slaterry M, Lundgreen A, Bondurant K, Wolff R. Tumor necrosis factor-related genes and colon and rectal cancer. *Int J Mol Epidemiol Genet*. United States; 2011;2(4):328–38.
 103. Chang J, Zhang C, Tani-Ishii N, Shi S, Wang C. NF- κ B Activation in Human Dental Pulp Stem Cells by TNF and LPS. *J Dent Res* [Internet]. 2005 Nov 1;84(11):994–8. Available from: <http://jdr.sagepub.com/content/84/11/994.abstract>

104. Morita S, Tagai C, Shiraishi T, Miyaji K, Iwamuro S. Peptides differential mode of antimicrobial actions of arginine-rich and lysine-rich histones against Gram-positive *Staphylococcus aureus*. *Peptides* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;48:75–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2013.07.025>
105. Lin J, Borregaard N, Liebman H, Carmel R. Deficiency of the specific granule proteins, R-binder/transcobalamin I and lactoferrin, in plasma and saliva: a new disorder. *Am J Med Genet. United States*; 2001 Apr;100(2):145–51.
106. Marquis R. Oxygen metabolism, oxidative stress and acid-base physiology of dental plaque biofilms. *J Ind Microbiol.* 1995;15(3):198–207.
107. Nath P, Isakov N. Insights into peptidyl-prolyl cis – trans isomerase structure and function in immunocytes. *Immunol Lett* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;163(1):120–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2014.11.002>
108. Kim S, Lessner S, Sakurai Y, Galis Z. Cyclophilin A as a novel biphasic mediator of endothelial activation and dysfunction. *Am J Pathol. United States*; 2004 May;164(5):1567–74.
109. Sanchez-Tillo E, Wojciechowska M, Comalada M, Farrera C, Lloberas J, Celada A. Cyclophilin A is required for M-CSF-dependent macrophage proliferation. *Eur J Immunol. Germany*; 2006 Sep;36(9):2515–24.
110. Sherry B, Yarlett N, Strupp A, Cerami A. Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A. UNITED STATES*; 1992 Apr;89(8):3511–5.
111. Marcant A, Denys A, Melchior A, Martinez P, Deligny A, Carpentier M, et al. Cyclophilin B attenuates the expression of TNF-alpha in lipopolysaccharide-stimulated macrophages through the induction of B cell lymphoma-3. *J Immunol. United States*; 2012 Aug;189(4):2023–32.
112. Barnes A, Carter E, Cabral W, Weis M, Chang W, Makareeva E, et al. Lack of cyclophilin B in osteogenesis imperfecta with normal collagen folding. *N Engl J Med. United States*; 2010 Feb;362(6):521–8.
113. Johansson M, Thomsson K, Hansson G. Proteomic analyses of the two mucus layers of the colon barrier reveal that their main component, the Muc2 mucin, is strongly bound to the Fcgbp protein. *J Proteome Res. United States*; 2009 Jul;8(7):3549–57.

7. ANEXOS

Anexo A

Lista de proteínas salivares identificadas no âmbito do estudo de cárie dentária e analisadas ao longo deste trabalho (**Anexo A**).

.

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

P20061	TCO1	Transcobalamin-1	Homo sapiens	x			x	Dental Caries	68003731	+	82-98	MF	Stimulated ductal parotid gland secretion was obtained from 51 individuals: 21 elderly with carious roots (Patients), 20 elderly (Controls), and 10 adults (Young) without root caries. Saliva was collected directly from the outlet of the parotid gland with the help of a Curby cup device [19,20]. The flow of the parotid saliva was stimulated by sucking on a piece of sour lemon candy. The first minute secretion was discarded, while the volume collected in the subsequent 5 min was used.	Pooled aliquots were analyzed by liquid chromatography/tandem mass spectrometry to yield lists of major proteins present in the three groups.	Proteomics		19253063		
Q08188	TGM3	Transglutaminase 3	Homo sapiens	x			x				82-98	MF	Stimulated ductal parotid gland secretion was obtained from 51 individuals: 21 elderly with carious roots (Patients), 20 elderly (Controls), and 10 adults (Young) without root caries. Saliva was collected directly from the outlet of the parotid gland with the help of a Curby cup device [19,20]. The flow of the parotid saliva was stimulated by sucking on a piece of sour lemon candy. The first minute secretion was discarded, while the volume collected in the subsequent 5 min was used.	Pooled aliquots were analyzed by liquid chromatography/tandem mass spectrometry to yield lists of major proteins present in the three groups.	Proteomics		19253063		
O14773	TPP1	Tripeptidyl-peptidase 1	Homo sapiens	x			x				30-39	MF	Stimulated ductal parotid gland secretion was obtained from 51 individuals: 21 elderly with carious roots (Patients), 20 elderly (Controls), and 10 adults (Young) without root caries. Saliva was collected directly from the outlet of the parotid gland with the help of a Curby cup device [19,20]. The flow of the parotid saliva was stimulated by sucking on a piece of sour lemon candy. The first minute secretion was discarded, while the volume collected in the subsequent 5 min was used.	Pooled aliquots were analyzed by liquid chromatography/tandem mass spectrometry to yield lists of major proteins present in the three groups.	Proteomics		19253063		
O14773	TPP1	Tripeptidyl-peptidase 1	Homo sapiens	x			x	Dental Caries	68003731	+	82-98	MF	Stimulated ductal parotid gland secretion was obtained from 51 individuals: 21 elderly with carious roots (Patients), 20 elderly (Controls), and 10 adults (Young) without root caries. Saliva was collected directly from the outlet of the parotid gland with the help of a Curby cup device [19,20]. The flow of the parotid saliva was stimulated by sucking on a piece of sour lemon candy. The first minute secretion was discarded, while the volume collected in the subsequent 5 min was used.	Pooled aliquots were analyzed by liquid chromatography/tandem mass spectrometry to yield lists of major proteins present in the three groups.	Proteomics		19253063		
P25311	AZGP1	Zinc-alpha-2-glycoprotein	Homo sapiens	x			x				30-39	MF	Stimulated ductal parotid gland secretion was obtained from 51 individuals: 21 elderly with carious roots (Patients), 20 elderly (Controls), and 10 adults (Young) without root caries. Saliva was collected directly from the outlet of the parotid gland with the help of a Curby cup device [19,20]. The flow of the parotid saliva was stimulated by sucking on a piece of sour lemon candy. The first minute secretion was discarded, while the volume collected in the subsequent 5 min was used.	Pooled aliquots were analyzed by liquid chromatography/tandem mass spectrometry to yield lists of major proteins present in the three groups.	Proteomics		19253063		
P25311	AZGP1	Zinc-alpha-2-glycoprotein	Homo sapiens	x			x	Dental Caries	68003731	+	82-98	MF	Stimulated ductal parotid gland secretion was obtained from 51 individuals: 21 elderly with carious roots (Patients), 20 elderly (Controls), and 10 adults (Young) without root caries. Saliva was collected directly from the outlet of the parotid gland with the help of a Curby cup device [19,20]. The flow of the parotid saliva was stimulated by sucking on a piece of sour lemon candy. The first minute secretion was discarded, while the volume collected in the subsequent 5 min was used.	Pooled aliquots were analyzed by liquid chromatography/tandem mass spectrometry to yield lists of major proteins present in the three groups.	Proteomics		19253063		
P01833	PIGR	Poly-Ig receptor (IgA secretory chain)	Homo sapiens			x		Dental Caries	68003731		18-29	Male	Unstimulated WS was collected from 32 male subjects (aged 18–29 yr), at 08:00 h with fasting. The 32 male subjects had previously been characterized, according to the DMFT index, into two groups: CF (n¼ 16, DMFT ¼ 0) and caries susceptible (n¼ 16, DMFT ranging from 3 to 12) with treated caries.	Two-dimensional electrophoresis, than protein spots were identified by mass spectrometry	Proteomics		16630307		
P02788	LTF	Lactoferrin	Homo sapiens			x		Dental Caries	68003731		18-29	Male	Unstimulated WS was collected from 32 male subjects (aged 18–29 yr), at 08:00 h with fasting. The 32 male subjects had previously been characterized, according to the DMFT index, into two groups: CF (n¼ 16, DMFT ¼ 0) and caries susceptible (n¼ 16, DMFT ranging from 3 to 12) with treated caries.	Two-dimensional electrophoresis, than protein spots were identified by mass spectrometry	Proteomics		16630307		
P04745	CA6	Human salivary a-amylase	Homo sapiens			x		Dental Caries	68003731		18-29	Male	Unstimulated WS was collected from 32 male subjects (aged 18–29 yr), at 08:00 h with fasting. The 32 male subjects had previously been characterized, according to the DMFT index, into two groups: CF (n¼ 16, DMFT ¼ 0) and caries susceptible (n¼ 16, DMFT ranging from 3 to 12) with treated caries.	Two-dimensional electrophoresis, than protein spots were identified by mass spectrometry	Proteomics		16630307		
P01036	CST4	Cystatin S	Homo sapiens			x		x			18-29	Male	Unstimulated WS was collected from 32 male subjects (aged 18–29 yr), at 08:00 h with fasting. The 32 male subjects had previously been characterized, according to the DMFT index, into two groups: CF (n¼ 16, DMFT ¼ 0) and caries susceptible (n¼ 16, DMFT ranging from 3 to 12) with treated caries.	Two-dimensional electrophoresis, than protein spots were identified by mass spectrometry	Proteomics		16630307		
P31025	LCN1	Lipocalin-1 (von Ebner's gland protein)	Homo sapiens			x		x	Dental Caries	68003731	18-29	Male	Unstimulated WS was collected from 32 male subjects (aged 18–29 yr), at 08:00 h with fasting. The 32 male subjects had previously been characterized, according to the DMFT index, into two groups: CF (n¼ 16, DMFT ¼ 0) and caries susceptible (n¼ 16, DMFT ranging from 3 to 12) with treated caries.	Two-dimensional electrophoresis, than protein spots were identified by mass spectrometry	Proteomics		16630307		
P01037	CST1	Cystatin-SN	Homo sapiens			x		x			18-29	Male	Unstimulated WS was collected from 32 male subjects (aged 18–29 yr), at 08:00 h with fasting. The 32 male subjects had previously been characterized, according to the DMFT index, into two groups: CF (n¼ 16, DMFT ¼ 0) and caries susceptible (n¼ 16, DMFT ranging from 3 to 12) with treated caries.	Two-dimensional electrophoresis, than protein spots were identified by mass spectrometry	Proteomics		16630307		
P09228	CST2	Cystatin-SA	Homo sapiens			x		x			18-29	Male	Unstimulated WS was collected from 32 male subjects (aged 18–29 yr), at 08:00 h with fasting. The 32 male subjects had previously been characterized, according to the DMFT index, into two groups: CF (n¼ 16, DMFT ¼ 0) and caries susceptible (n¼ 16, DMFT ranging from 3 to 12) with treated caries.	Two-dimensional electrophoresis, than protein spots were identified by mass spectrometry	Proteomics		16630307		
P01036	CST4	Cystatin SA-III pellicle precursor (Sap1)	Homo sapiens			x		x			18-29	Male	Unstimulated WS was collected from 32 male subjects (aged 18–29 yr), at 08:00 h with fasting. The 32 male subjects had previously been characterized, according to the DMFT index, into two groups: CF (n¼ 16, DMFT ¼ 0) and caries susceptible (n¼ 16, DMFT ranging from 3 to 12) with treated caries.	Two-dimensional electrophoresis, than protein spots were identified by mass spectrometry	Proteomics		16630307		
P06702	S100A9	Calgranulin B (S100 calcium-binding protein A9)	Homo sapiens			x		x	Dental Caries	68003731	18-29	Male	Unstimulated WS was collected from 32 male subjects (aged 18–29 yr), at 08:00 h with fasting. The 32 male subjects had previously been characterized, according to the DMFT index, into two groups: CF (n¼ 16, DMFT ¼ 0) and caries susceptible (n¼ 16, DMFT ranging from 3 to 12) with treated caries.	Two-dimensional electrophoresis, than protein spots were identified by mass spectrometry	Proteomics		16630307		
Q9HC84	MUC5B	Mucin-5B	Homo sapiens			x		Dental Caries	68003731	na	18	MF	Unstimulated whole saliva samples were collected for 10 min by a spitting method from two groups of young subjects: Eight subjects with DMF=3 (control group) and 27 adolescents with DMF >11 (research group)	Enzyme-linked immunosorbent assay was used to quantitate MUC5B, MUC7, and MUC1	Non-proteomics		24441930	Não é usado grupo sem cárie no entanto o estudo indica um aumento estatisticamente significativo para DMFs mais elevados	
P15941	MUC1	Mucin-1	Homo sapiens					Dental Caries	68003731	na	18	MF	Unstimulated whole saliva samples were collected for 10 min by a spitting method from two groups of young subjects: Eight subjects with DMF=3 (control group) and 27 adolescents with DMF >11 (research group)	Enzyme-linked immunosorbent assay was used to quantitate MUC5B, MUC7, and MUC2	Non-proteomics		24441930	Não é usado grupo sem cárie no entanto o estudo indica um aumento estatisticamente significativo para DMFs mais elevados	
Q8TAX7	MUC7	Mucina-7	Homo sapiens			x		Dental Caries	68003731	na	18	MF	Unstimulated whole saliva samples were collected for 10 min by a spitting method from two groups of young subjects: Eight subjects with DMF=3 (control group) and 27 adolescents with DMF >11 (research group)	Enzyme-linked immunosorbent assay was used to quantitate MUC5B, MUC7, and MUC3	Non-proteomics		24441930	Não é usado grupo sem cárie	
O60603	sTLR-2	Toll-like receptor 2	Homo sapiens			x		x	Dental Caries	68003731	1,19	5-13	MF	Unstimulated whole saliva was collected from twenty caries free and twenty caries active children between the ages of 5 and 13 years	Enzyme linked immunosorbent assay was used to assessed the concentration of sCD14 and sTLR-2 together with that of the cytokine IL-8 reported to be increased in dental caries	Non-proteomics	x	25174416	
P10145	IL-8	Interleukin-8	Homo sapiens			x		x	Dental Caries	68003731	obs	5-13	MF	Unstimulated whole saliva was collected from twenty caries free and twenty caries active children between the ages of 5 and 13 years	Enzyme linked immunosorbent assay was used to assessed the concentration of sCD14 and sTLR-2 together with that of the cytokine IL-8 reported to be increased in dental caries	Non-proteomics		25174416	concentration didn't differ significantly between both groups
P08571	CD14	Soluble CD14	Homo sapiens			x		x	Dental Caries	68003731	obs	5-13	MF	Unstimulated whole saliva was collected from twenty caries free and twenty caries active children between the ages of 5 and 13 years	Enzyme linked immunosorbent assay was used to assessed the concentration of sCD14 and sTLR-2 together with that of the cytokine IL-8 reported to be increased in dental caries	Non-proteomics		25174416	concentration equivocal in both groups
P11912	IGA	Salivary immunoglobulin A	Homo sapiens			x		Dental Caries	68003731	na	18	MF	Unstimulated whole saliva was collected by a standard method from thirty-five adolescents (age 18 years) divided in two groups: Group I was composed of 8 adolescents with DMF=3 (low intensity of dental caries) and Group II was 27 adolescents with DMF>11 (high intensity of dental caries)	Enzyme linked immunosorbent assay was used to assessed the concentration of sIgA, histatin-5 and lactoperoxidase	Non-proteomics		24974109	Não é usado grupo sem cárie The median of sIgA was 8,10 mg.dl. in Group I and it was lower in comparison with adolescents from Group II, in which the median was 13 mg.dl.	
P15516	HTN3	histatin-3	Homo sapiens			x		Dental Caries	68003731	na	18	MF	Unstimulated whole saliva was collected by a standard method from thirty-five adolescents (age 18 years) divided in two groups: Group I was composed of 8 adolescents with DMF=3 (low intensity of dental caries) and Group II was 27 adolescents with DMF>11 (high intensity of dental caries)	Enzyme linked immunosorbent assay was used to assessed the concentration of sIgA, histatin-5 and lactoperoxidase	Non-proteomics		24974109	Não é usado grupo sem cárieThe level of histatin-5 was significantly higher in Group II	
P22079	LPO	Lactoperoxidase	Homo sapiens			x		Dental Caries	68003731	na	18	MF	Unstimulated whole saliva was collected by a standard method from thirty-five adolescents (age 18 years) divided in two groups: Group I was composed of 8 adolescents with DMF=3 (low intensity of dental caries) and Group II was 27 adolescents with DMF>11 (high intensity of dental caries)	Enzyme linked immunosorbent assay was used to assessed the concentration of sIgA, histatin-5 and lactoperoxidase	Non-proteomics		24974109	Não é usado grupo sem cárieThe median of LPO was 2148 nmol/L in Group I and it was lower compared to Group II, in which the median of LPO was 3047 nmol/L.	
Q9HC84	MUC5B	High molecular weight salivary mucin MG1	Homo sapiens			x		Dental Caries	68003731	na	17-24	MF	Unstimulated whole saliva was collected by a standard method from 120 healthy dental students (60M+60F)	Electrophoretic profile analysis qualitatively by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)	Proteomics		12459324	Não é usado grupo sem cárie	
Q02817	MUC2	Mucin-2	Homo sapiens			x		Dental Caries	68003731	na	17-24	MF	Unstimulated whole saliva was collected by a standard method from 120 healthy dental students (60M+60F)	Electrophoretic profile analysis qualitatively by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)	Proteomics		12459324	Não é usado grupo sem cárie	
P04280	PRP-1	Proline-rich protein-1	Homo sapiens			x		Dental Caries	68003731	na	17-24	MF	Unstimulated whole saliva was collected by a standard method from 120 healthy dental students (60M+60F)	Electrophoretic profile analysis qualitatively by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)	Proteomics		12459324	Não é usado grupo sem cárie	

P08987	gtfB	Glucosyltransferase-B	<i>S.mutans</i>					x		Dental Caries	68003731	+	20-27	MF	Oral samples of brushing plaque were collected from 28 healthy volunteers (age 20 to 27 years) 2h after eating. After gargling once, plaque was taken by vigorous brushing for 1 min with a sterile toothbrush, collected in a sterile bottle after mouth rinsing for 30 s with 5ml. PBS, and used as brushing plaque samples.	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system targeting glucosyltransferase (GTF)-B derived from <i>Streptococcus mutans</i>	Non- proteomics	x	24746149	In all subjects from the caries-susceptible group (A-C), both GTF-B and GTF-F were detected at high levels. By contrast, all subjects from the caries-free group (G-I) showed no GTF-B or GTF-F.
P11001	gtfI	Glucosyltransferase-I	<i>S.sobrinus</i>					x		Dental Caries	68003731	+	20-27	MF	Oral samples of brushing plaque were collected from 28 healthy volunteers (age 20 to 27 years) 2h after eating. After gargling once, plaque was taken by vigorous brushing for 1 min with a sterile toothbrush, collected in a sterile bottle after mouth rinsing for 30 s with 5ml. PBS, and used as brushing plaque samples.	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system targeting glucosyltransferase (GTF)-B derived from <i>Streptococcus mutans</i>	Non- proteomics	x	24746149	In all subjects from the caries-susceptible group (A-C), both GTF-B and GTF-F were detected at high levels. By contrast, all subjects from the caries-free group (G-I) showed no GTF-B or GTF-F.
P00441	SOD-1	Superoxide dismutase	Homo sapiens				x		x	Dental Caries	68003731	1,84	25-50	MF	Unstimulated saliva was collected from a patient who was not involved in any masticatory function in the last 2 h prior to saliva collection and was seated in an ordinary chair and not on any dental/surgical chair to avoid anxiety. Stimulated saliva was collected by chewing paraffin wax.	Atomic nitro blue tetrazolium chloride reduction method	Non- proteomics		24504381	
P01375	TNFA	Tumor necrosis factor	Homo sapiens				x		x	Dental Caries	68003731	4,99	18	MF	Unstimulated whole saliva was collected 26 patients with dental caries, as well as 10 healthy persons, by standard method	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system targeting IL-6, IL-8 and TNF- α	Non- proteomics		23311795	
P05231	IL6	Interleukin-6	Homo sapiens				x		x	Dental Caries	68003731	6,90	18	MF	Unstimulated whole saliva was collected 26 patients with dental caries, as well as 10 healthy persons, by standard method	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system targeting IL-6, IL-8 and TNF- α	Non- proteomics		23311795	
P10145	IL8	Interleukin-8	Homo sapiens				x		x	Dental Caries	68003731	2,41	18	MF	Unstimulated whole saliva was collected 26 patients with dental caries, as well as 10 healthy persons, by standard method	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system targeting IL-6, IL-8 and TNF- α	Non- proteomics		23311795	
P08987	gtfB	Glucosyltransferase-B	<i>S.mutans</i>				x		x	Dental Caries	68003731	+	3-6	MF	Unstimulated whole saliva (3 ml) was collected 2 hours after breakfast (from 9-11 a.m.) from 45 child (3-6 years old)	Enzyme-linked immunosorbent assay system targeting sIgA and GtfB	Non- proteomics	x	22828760	In general the level of GtfB enzyme showed a significant increase with the increase of caries experience (P<0.01).
P11912	IGA	Salivary Immunoglobulin A	Homo sapiens				x		x	Dental Caries	68003731	-	3-6	MF	Unstimulated whole saliva (3 ml) was collected 2 hours after breakfast (from 9-11 a.m.) from 45 child (3-6 years old)	Enzyme-linked immunosorbent assay system targeting sIgA and GtfB	Non- proteomics		22828760	sIgA levels decreased with the increase in caries experience, except for Group 1 (low caries experience).
P08571	CD14	Soluble CD14	Homo sapiens				x		x	Dental Caries	68003731	1,81	3-6	MF	Unstimulated whole saliva was collected 1 hours after breakfast (from 8-11 a.m.) from 40 child (33-71 months)	Enzyme-linked immunosorbent assay system targeting sCD14	Non- proteomics		20876990	3 months after the study, 7 of the children with caries were treated and evaluated again under the same procedure and the levels of CD14 were: 57.82 \pm 37.675 (before the treatment) and 11.3834 \pm 8.32 (after the treatment).
P08987	gtfB	Glucosyltransferase-B	<i>S.mutans</i>				x		x	Dental Caries	68003731	+	3-6	MF	Unstimulated whole saliva was collected from 50 children, 25 of whom were diagnosed as having ECC and 25 were clinically caries-free, at the time of their dental examination.	Enzyme-linked immunosorbent assay system targeting GtfB, GtfC and Gtf D	Non- proteomics		17827962	
P13470	gtfC	Glucosyltransferase-C	<i>S.mutans</i>				x		x	Dental Caries	68003731	+	3-6	MF	Unstimulated whole saliva was collected from 50 children, 25 of whom were diagnosed as having ECC and 25 were clinically caries-free, at the time of their dental examination.	Enzyme-linked immunosorbent assay system targeting GtfB, GtfC and Gtf D	Non- proteomics		17827962	
P49331	gtfD	Glucosyltransferase-D	<i>S.mutans</i>				x		x	Dental Caries	68003731	-	3-6	MF	Unstimulated whole saliva was collected from 50 children, 25 of whom were diagnosed as having ECC and 25 were clinically caries-free, at the time of their dental examination.	Enzyme-linked immunosorbent assay system targeting GtfB, GtfC and Gtf D	Non- proteomics		17827962	
P68871	HBB	Hemoglobin subunit beta	Homo sapiens				x		x	Dental Caries	68003731		-	MF	Unstimulated whole saliva was collected from ten caries-free and 10 caries-positive subjects. The subjects fasted for at least 2 h before saliva collection and then brushed their teeth for 2 min without toothpaste. All individuals rinsed their mouths with water for 10 min, and then 10 ml of saliva was collected in 50 ml conical tubes.	To compare the protein profiles in saliva from caries-free and caries-positive subjects, the quantities of proteins in saliva samples were determined using a bicinchoninic acid assay kit (Pierce, Rockford, IL) and 10 lg of proteins from each sample were mixed with sample buffer [8% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% 2-mercaptoethanol, 30% glycerol, and 0.02% bromophenol blue in 0.25 M Tris-HCl, pH 6.8] and boiled at 100°C for 10 min. The samples were loaded on 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gels, electrophoresed and stained with Coomassie blue.	Non- proteomics		24848678	
P12273	PIP	Prolactin-inducible protein	Homo sapiens				x		x	Dental Caries	68003731		-	MF	Unstimulated whole saliva was collected from ten caries-free and 10 caries-positive subjects. The subjects fasted for at least 2 h before saliva collection and then brushed their teeth for 2 min without toothpaste. All individuals rinsed their mouths with water for 10 min, and then 10 ml of saliva was collected in 50 ml conical tubes.	To compare the protein profiles in saliva from caries-free and caries-positive subjects, the quantities of proteins in saliva samples were determined using a bicinchoninic acid assay kit (Pierce, Rockford, IL) and 10 lg of proteins from each sample were mixed with sample buffer [8% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% 2-mercaptoethanol, 30% glycerol, and 0.02% bromophenol blue in 0.25 M Tris-HCl, pH 6.8] and boiled at 100°C for 10 min. The samples were loaded on 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gels, electrophoresed and stained with Coomassie blue.	Non- proteomics		24848678	
P69905	HBA1	Hemoglobin subunit alpha	Homo sapiens				x		x	Dental Caries	68003731		-	MF	Unstimulated whole saliva was collected from ten caries-free and 10 caries-positive subjects. The subjects fasted for at least 2 h before saliva collection and then brushed their teeth for 2 min without toothpaste. All individuals rinsed their mouths with water for 10 min, and then 10 ml of saliva was collected in 50 ml conical tubes.	To compare the protein profiles in saliva from caries-free and caries-positive subjects, the quantities of proteins in saliva samples were determined using a bicinchoninic acid assay kit (Pierce, Rockford, IL) and 10 lg of proteins from each sample were mixed with sample buffer [8% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% 2-mercaptoethanol, 30% glycerol, and 0.02% bromophenol blue in 0.25 M Tris-HCl, pH 6.8] and boiled at 100°C for 10 min. The samples were loaded on 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gels, electrophoresed and stained with Coomassie blue.	Non- proteomics		24848678	
P62805	H4	Histone H4	Homo sapiens				x		x				-	MF	Unstimulated whole saliva was collected from ten caries-free and 10 caries-positive subjects. The subjects fasted for at least 2 h before saliva collection and then brushed their teeth for 2 min without toothpaste. All individuals rinsed their mouths with water for 10 min, and then 10 ml of saliva was collected in 50 ml conical tubes.	To compare the protein profiles in saliva from caries-free and caries-positive subjects, the quantities of proteins in saliva samples were determined using a bicinchoninic acid assay kit (Pierce, Rockford, IL) and 10 lg of proteins from each sample were mixed with sample buffer [8% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% 2-mercaptoethanol, 30% glycerol, and 0.02% bromophenol blue in 0.25 M Tris-HCl, pH 6.8] and boiled at 100°C for 10 min. The samples were loaded on 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gels, electrophoresed and stained with Coomassie blue.	Non- proteomics		24848678	

P06702	S100A9	Protein S100-A9	Homo sapiens			x		x	Dental Caries	68003731		-	MF	Unstimulated whole saliva was collected from ten caries-free and 10 caries-positive subjects. The subjects fasted for at least 2 h before saliva collection and then brushed their teeth for 2 min without toothpaste. All individuals rinsed their mouths with water for 10 min, and then 10 ml of saliva was collected in 50 ml conical tubes.	To compare the protein profiles in saliva from caries-free and caries-positive subjects, the quantities of proteins in saliva samples were determined using a bicinchoninic acid assay kit (Pierce, Rockford, IL) and 10 lg of proteins from each sample were mixed with sample buffer [8% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% 2-mercaptoethanol, 30% glycerol, and 0.02% bromophenol blue in 0.25 M Tris-HCl, pH 6.8] and boiled at 100°C for 10 min. The samples were loaded on 15% SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gels, electrophoresed and stained with Coomassie blue.	Non-proteomics		24848678	
P07737	PFN1	Profilin-1	Homo sapiens			x		x				-	MF	Unstimulated whole saliva was collected from ten caries-free and 10 caries-positive subjects. The subjects fasted for at least 2 h before saliva collection and then brushed their teeth for 2 min without toothpaste. All individuals rinsed their mouths with water for 10 min, and then 10 ml of saliva was collected in 50 ml conical tubes.	To compare the protein profiles in saliva from caries-free and caries-positive subjects, the quantities of proteins in saliva samples were determined using a bicinchoninic acid assay kit (Pierce, Rockford, IL) and 10 lg of proteins from each sample were mixed with sample buffer [8% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% 2-mercaptoethanol, 30% glycerol, and 0.02% bromophenol blue in 0.25 M Tris-HCl, pH 6.8] and boiled at 100°C for 10 min. The samples were loaded on 15% SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gels, electrophoresed and stained with Coomassie blue.	Non-proteomics		24848678	
P59665	DEFA1	Neutrophil defensin-1	Homo sapiens			x		x				-	MF	Unstimulated whole saliva was collected from ten caries-free and 10 caries-positive subjects. The subjects fasted for at least 2 h before saliva collection and then brushed their teeth for 2 min without toothpaste. All individuals rinsed their mouths with water for 10 min, and then 10 ml of saliva was collected in 50 ml conical tubes.	To compare the protein profiles in saliva from caries-free and caries-positive subjects, the quantities of proteins in saliva samples were determined using a bicinchoninic acid assay kit (Pierce, Rockford, IL) and 10 lg of proteins from each sample were mixed with sample buffer [8% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% 2-mercaptoethanol, 30% glycerol, and 0.02% bromophenol blue in 0.25 M Tris-HCl, pH 6.8] and boiled at 100°C for 10 min. The samples were loaded on 15% SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gels, electrophoresed and stained with Coomassie blue.	Non-proteomics		24848678	
Q96DR5	BPIFA2	BPI fold-containing family A member 2	Homo sapiens			x		x	Dental Caries	68003731		-	MF	Unstimulated whole saliva was collected from ten caries-free and 10 caries-positive subjects. The subjects fasted for at least 2 h before saliva collection and then brushed their teeth for 2 min without toothpaste. All individuals rinsed their mouths with water for 10 min, and then 10 ml of saliva was collected in 50 ml conical tubes.	To compare the protein profiles in saliva from caries-free and caries-positive subjects, the quantities of proteins in saliva samples were determined using a bicinchoninic acid assay kit (Pierce, Rockford, IL) and 10 lg of proteins from each sample were mixed with sample buffer [8% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% 2-mercaptoethanol, 30% glycerol, and 0.02% bromophenol blue in 0.25 M Tris-HCl, pH 6.8] and boiled at 100°C for 10 min. The samples were loaded on 15% SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gels, electrophoresed and stained with Coomassie blue.	Non-proteomics		24848678	
P01034	CST3	Cystatin-C	Homo sapiens			x			Dental Caries	68003731		-	MF	Unstimulated whole saliva was collected from ten caries-free and 10 caries-positive subjects. The subjects fasted for at least 2 h before saliva collection and then brushed their teeth for 2 min without toothpaste. All individuals rinsed their mouths with water for 10 min, and then 10 ml of saliva was collected in 50 ml conical tubes.	To compare the protein profiles in saliva from caries-free and caries-positive subjects, the quantities of proteins in saliva samples were determined using a bicinchoninic acid assay kit (Pierce, Rockford, IL) and 10 lg of proteins from each sample were mixed with sample buffer [8% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% 2-mercaptoethanol, 30% glycerol, and 0.02% bromophenol blue in 0.25 M Tris-HCl, pH 6.8] and boiled at 100°C for 10 min. The samples were loaded on 15% SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gels, electrophoresed and stained with Coomassie blue.	Non-proteomics		24848678	
P01037	CST1	Cystatin-SN	Homo sapiens			x			Dental Caries	68003731		-	MF	Unstimulated whole saliva was collected from ten caries-free and 10 caries-positive subjects. The subjects fasted for at least 2 h before saliva collection and then brushed their teeth for 2 min without toothpaste. All individuals rinsed their mouths with water for 10 min, and then 10 ml of saliva was collected in 50 ml conical tubes.	To compare the protein profiles in saliva from caries-free and caries-positive subjects, the quantities of proteins in saliva samples were determined using a bicinchoninic acid assay kit (Pierce, Rockford, IL) and 10 lg of proteins from each sample were mixed with sample buffer [8% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% 2-mercaptoethanol, 30% glycerol, and 0.02% bromophenol blue in 0.25 M Tris-HCl, pH 6.8] and boiled at 100°C for 10 min. The samples were loaded on 15% SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gels, electrophoresed and stained with Coomassie blue.	Non-proteomics		24848678	
P01036	CST4	Cystatin-S	Homo sapiens			x			Dental Caries	68003731		-	MF	Unstimulated whole saliva was collected from ten caries-free and 10 caries-positive subjects. The subjects fasted for at least 2 h before saliva collection and then brushed their teeth for 2 min without toothpaste. All individuals rinsed their mouths with water for 10 min, and then 10 ml of saliva was collected in 50 ml conical tubes.	To compare the protein profiles in saliva from caries-free and caries-positive subjects, the quantities of proteins in saliva samples were determined using a bicinchoninic acid assay kit (Pierce, Rockford, IL) and 10 lg of proteins from each sample were mixed with sample buffer [8% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% 2-mercaptoethanol, 30% glycerol, and 0.02% bromophenol blue in 0.25 M Tris-HCl, pH 6.8] and boiled at 100°C for 10 min. The samples were loaded on 15% SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gels, electrophoresed and stained with Coomassie blue.	Non-proteomics		24848678	

P61626	LYZ	Lysozyme C	Homo sapiens			x			Dental Caries	68003731	-	MF	Unstimulated whole saliva was collected from ten caries-free and 10 caries-positive subjects. The subjects fasted for at least 2 h before saliva collection and then brushed their teeth for 2 min without toothpaste. All individuals rinsed their mouths with water for 10 min, and then 10 ml of saliva was collected in 50 ml conical tubes.	To compare the protein profiles in saliva from caries-free and caries-positive subjects, the quantities of proteins in saliva samples were determined using a bicinchoninic acid assay kit (Pierce, Rockford, IL) and 10 lg of proteins from each sample were mixed with sample buffer [8% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% 2-mercaptoethanol, 30% glycerol, and 0.02% bromophenol blue in 0.25 M Tris-HCl, pH 6.8] and boiled at 100°C for 10 min. The samples were loaded on 15% SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gels, electrophoresed and stained with Coomassie blue.	Non-proteomics		24848678		
P28325	CST5	Cystatin-D	Homo sapiens			x			Dental Caries	68003731	-	MF	Unstimulated whole saliva was collected from ten caries-free and 10 caries-positive subjects. The subjects fasted for at least 2 h before saliva collection and then brushed their teeth for 2 min without toothpaste. All individuals rinsed their mouths with water for 10 min, and then 10 ml of saliva was collected in 50 ml conical tubes.	To compare the protein profiles in saliva from caries-free and caries-positive subjects, the quantities of proteins in saliva samples were determined using a bicinchoninic acid assay kit (Pierce, Rockford, IL) and 10 lg of proteins from each sample were mixed with sample buffer [8% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% 2-mercaptoethanol, 30% glycerol, and 0.02% bromophenol blue in 0.25 M Tris-HCl, pH 6.8] and boiled at 100°C for 10 min. The samples were loaded on 15% SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gels, electrophoresed and stained with Coomassie blue.	Non-proteomics		24848678		
P27482	CALML3	Calmodulin-like protein 3	Homo sapiens			x			Dental Caries	68003731	-	MF	Unstimulated whole saliva was collected from ten caries-free and 10 caries-positive subjects. The subjects fasted for at least 2 h before saliva collection and then brushed their teeth for 2 min without toothpaste. All individuals rinsed their mouths with water for 10 min, and then 10 ml of saliva was collected in 50 ml conical tubes.	To compare the protein profiles in saliva from caries-free and caries-positive subjects, the quantities of proteins in saliva samples were determined using a bicinchoninic acid assay kit (Pierce, Rockford, IL) and 10 lg of proteins from each sample were mixed with sample buffer [8% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% 2-mercaptoethanol, 30% glycerol, and 0.02% bromophenol blue in 0.25 M Tris-HCl, pH 6.8] and boiled at 100°C for 10 min. The samples were loaded on 15% SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gels, electrophoresed and stained with Coomassie blue.	Non-proteomics		24848678		
P60709	ACTB	Beta-actin	Homo sapiens			x			Dental Caries	68003731	-	MF	Unstimulated whole saliva was collected from ten caries-free and 10 caries-positive subjects. The subjects fasted for at least 2 h before saliva collection and then brushed their teeth for 2 min without toothpaste. All individuals rinsed their mouths with water for 10 min, and then 10 ml of saliva was collected in 50 ml conical tubes.	To compare the protein profiles in saliva from caries-free and caries-positive subjects, the quantities of proteins in saliva samples were determined using a bicinchoninic acid assay kit (Pierce, Rockford, IL) and 10 lg of proteins from each sample were mixed with sample buffer [8% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% 2-mercaptoethanol, 30% glycerol, and 0.02% bromophenol blue in 0.25 M Tris-HCl, pH 6.8] and boiled at 100°C for 10 min. The samples were loaded on 15% SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gels, electrophoresed and stained with Coomassie blue.	Non-proteomics		24848678		
P08571	CD14	Soluble CD14	Homo sapiens			x		x			-	6-12	MF	Unstimulated human whole saliva (5 ml) was collected between 08:00 and 10:00 h from forty unrelated Italian healthy children, aged 6–12 yr : 20 CF and 20 CA	Western blotting analysis of whole saliva from 20 healthy caries-free children showed the presence of the soluble form of CD14	Non-proteomics		17451497	
P17693	HLA-G	Immunoglobuline G	Homo sapiens			x		x	Dental Caries	68003731	+	18-22	M	Stimulated whole saliva samples were collected between 9 and 11 a.m., at least 2 h after the last meal, in a quiet room, from 24 recruits serving at Turku Naval Base, divided in two groups: 12 highcaries-susceptibility group and 12 lowares-susceptibility. The subjects chewed a 5-g piece of paraffin wax. The saliva secreted ithin the first 30 s was swallowed and saliva was collected for the next 5 min.	The total amount of IgA and IgG in saliva was assayed by using a "trapping antibody"-type enzyme immunoassay.	Non-proteomics		6690406	nss
P11912	IGA	Immunoglobulin A	Homo sapiens			x		x	Dental Caries	68003731	+	18-22	M	Stimulated whole saliva samples were collected between 9 and 11 a.m., at least 2 h after the last meal, in a quiet room, from 24 recruits serving at Turku Naval Base, divided in two groups: 12 highcaries-susceptibility group and 12 lowares-susceptibility. The subjects chewed a 5-g piece of paraffin wax. The saliva secreted ithin the first 30 s was swallowed and saliva was collected for the next 5 min.	The total amount of IgA and IgG in saliva was assayed by using a "trapping antibody"-type enzyme immunoassay.	Non-proteomics		6690406	nss
P61626	LYZ	Lysozyme	Homo sapiens	x				x	Dental Caries	68003731	+	>25	MF	Stimulated parotid saliva was collected with the aid of a modified Lashley cup.Salivation was stimulated with a sour lemon candy or with 2% citric acid applied to the lateral borders of the tongue with a cotton-tipped applicator three times per min.	Briefly, a commercial antiserum was employed. The antiserum was carbamylated and was incorporated into a gel containing 1% agarose and TEMED-acetic acid buffer, pH 5, at an antiserum/agarose gel ratio of 1:75. Electrophoresis was done in TEMED-acetic acid buffer, pH 5, using 4 V/cm for eight h at 40C. The plates were dried, washed, and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250, and the rocket heights were measured. Human leukemic urinary lysozymet served as the standard.	Non-proteomics		6573370	nss
P61626	LYZ	Lysozyme	Homo sapiens		x			x	Dental Caries	68003731	1,00	>25	MF	The submandibular-sublingual saliva was collected either with the collector in place and no external stimulation (unstimulated) or with 2% citric acid applied to the lateral borders of the tongue with a cotton-tipped applicator three times per min (stimulated).	Briefly, a commercial antiserum was employed. The antiserum was carbamylated and was incorporated into a gel containing 1% agarose and TEMED-acetic acid buffer, pH 5, at an antiserum/agarose gel ratio of 1:75. Electrophoresis was done in TEMED-acetic acid buffer, pH 5, using 4 V/cm for eight h at 40C. The plates were dried, washed, and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250, and the rocket heights were measured. Human leukemic urinary lysozymet served as the standard.	Non-proteomics		6573370	nss
P01009	SERPINA1	Alpha-1-antitrypsinase	Homo sapiens			x			Dental Caries	68003731	na	15	MF	Unstimulated whole saliva was collected into sterile test tubes on ice in the morning and maintained at 4°C during centrifugation. The saliva was not collected in fractions.	Radial immunodiffusion was used to determine the level of alpha-1 proteinase inhibitor.	Non-proteomics		12354207	Não é usado grupo sem cárie
P02788	LTF	Lactoferrin	Homo sapiens			x			Dental Caries	68003731	na	15	MF	Unstimulated whole saliva was collected into sterile test tubes on ice in the morning and maintained at 4°C during centrifugation. The saliva was not collected in fractions.	Enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA) was used targeting the StgA level (at a dilution of 1: 40, according to the instructions of the Medical & Biological Laboratories Co., Ltd, USA) and the level of lactoferrin [at a dilution of 1: 75, established according to the extent of determination of the test, and the mean level of lactoferrin in the saliva of healthy individuals (Calbiochem, Nova Biochem Corporation, San Diego, CA)].	Non-proteomics		12354207	Não é usado grupo sem cárie

P11912	IGA	Salivary immunoglobulin A	Homo sapiens			x			Dental Caries	68003731	na	15	MF	Unstimulated whole saliva was collected into sterile test tubes on ice in the morning and maintained at 4°C during centrifugation. The saliva was not collected in fractions.	Enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA) was used targeting the sIgA level (at a dilution of 1: 40, according to the instructions of the Medical & Biological Laboratories Co., Ltd, USA) and the level of lactoferrin [at a dilution of 1: 75, established according to the extent of determination of the test, and the mean level of lactoferrin in the saliva of healthy individuals (Calbiochem, Nova Biochem Corporation, San Diego, CA)].	Non- proteomics		12354207	Não é usado grupo sem cárie
P11912	IGA	Immunoglobulin A	Homo sapiens			x		x	Dental Caries	68003731	1,55	1-4	MF	Two samples of unstimulated whole saliva, 1.5 ml each, were collected from the floor of the mouth of each child using a soft, disposable plastic pipette for aspiration. All samples were collected between 8:00 and 11:00 a.m., and the time spent on the procedure did not exceed 25 min. Forty children, varying in age from 12 to 47 months, were selected and divided into two groups of 20 each: Group I (GI), caries-free children; Group II (GII), children with early childhood caries (ECC).	The total concentrations of salivary IgA, IgG, and IgM were determined using a nephelometric technique as described by Botey and co-workers [5], processed in the nephelometric LASER System—Behring BNII (Dade Behring Marburg, Germany)	Non- proteomics		12915963	
P17693	HLA-G	Immunoglobuline G	Homo sapiens			x		x	Dental Caries	68003731	3,52	1-4	MF	Two samples of unstimulated whole saliva, 1.5 ml each, were collected from the floor of the mouth of each child using a soft, disposable plastic pipette for aspiration. All samples were collected between 8:00 and 11:00 a.m., and the time spent on the procedure did not exceed 25 min. Forty children, varying in age from 12 to 47 months, were selected and divided into two groups of 20 each: Group I (GI), caries-free children; Group II (GII), children with early childhood caries (ECC).	The total concentrations of salivary IgA, IgG, and IgM were determined using a nephelometric technique as described by Botey and co-workers [5], processed in the nephelometric LASER System—Behring BNII (Dade Behring Marburg, Germany)	Non- proteomics		12915963	
P11912	CD79A	Immunoglobuline M	Homo sapiens			x		x	Dental Caries	68003731	-	1-4	MF	Two samples of unstimulated whole saliva, 1.5 ml each, were collected from the floor of the mouth of each child using a soft, disposable plastic pipette for aspiration. All samples were collected between 8:00 and 11:00 a.m., and the time spent on the procedure did not exceed 25 min. Forty children, varying in age from 12 to 47 months, were selected and divided into two groups of 20 each: Group I (GI), caries-free children; Group II (GII), children with early childhood caries (ECC).	The total concentrations of salivary IgA, IgG, and IgM were determined using a nephelometric technique as described by Botey and co-workers [5], processed in the nephelometric LASER System—Behring BNII (Dade Behring Marburg, Germany)	Non- proteomics		12915963	ns
P61626	LYZ	Lysozyme	Homo sapiens			x		x	Dental Caries	68003731	-	12	MF	Stimulated whole saliva (1ml) was collected from each student using disposable syringes. Immediately following lunch, each student brushed his/her teeth. Two hours later, the students chewed on a Parafilm “M” pellicle (Laboratory Film; American National Can. Chicago, IL, USA) of 3.0 x 3.0 cm for one minute, without swallowing, to stimulate salivation. For caries experience analysis, the students were placed into two groups: Group 1 – students with dental caries (CPO-D≥1) and Group 2 – students without dental caries (CPO-D=0)	Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was conducted according to Laemmli (17) with a 15% bis-acrylamide concentration using the vertical system Bio-Rad/Miniprotein 3 cell 600 VDC/13W/USA	Non- proteomics		“An evaluation of the expression profiles of salivary proteins lactoferrin and lysozyme and their association with caries experience and activity”	ns
P02788	LTF	Lactoferrin	Homo sapiens			x		x	Dental Caries	68003731	+	12	MF	Stimulated whole saliva (1ml) was collected from each student using disposable syringes. Immediately following lunch, each student brushed his/her teeth. Two hours later, the students chewed on a Parafilm “M” pellicle (Laboratory Film; American National Can. Chicago, IL, USA) of 3.0 x 3.0 cm for one minute, without swallowing, to stimulate salivation. For caries experience analysis, the students were placed into two groups: Group 1 – students with dental caries (CPO-D≥1) and Group 2 – students without dental caries (CPO-D=0)	Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was conducted according to Laemmli (17) with a 15% bis-acrylamide concentration using the vertical system Bio-Rad/Miniprotein 3 cell 600 VDC/13W/USA	Non- proteomics		“An evaluation of the expression profiles of salivary proteins lactoferrin and lysozyme and their association with caries experience and activity”	
P11912	IGA	Salivary Immunoglobulin A	Homo sapiens			x		x	Dental Caries	68003731	-	3-6	MF	Unstimulated whole salivary samples were collected two hours after any oral or visual exposure to food stuffs. All the salivary samples were collected in sterile vials between 10 and 11 am in order to prevent any bias in the concentration of the saliva due to the circadian rhythm. The unstimulated whole salivary samples were collected by the method suggested by Colin Dawes. Children were asked to pool the saliva in the floor of their oral cavity and spit into a sterile vial intermittently. Group I included ten children who had active carious lesions with DMFT scores of ≥5. Group II included ten children who were caries-free (DMFT=0)	Immunoturbidimetry with the help of SpinReact (SpinReact , SA, Girona , Spain) was used to determine the levels of sIgA	Non- proteomics		19008624	ns
P11912	IGA	Salivary Immunoglobulin A	Homo sapiens			x		x	Dental Caries	68003731	+	3-6	MF	Unstimulated saliva was collected in special tubes using the method described by Scully (11). (In this method children were asked to spit in the tubes once a minute for ten minutes). All samples were collected between 10 to 11 a.m., and the time spent on each procedure did not exceed 30 minutesForty five randomly selected ECC and 45 caries-free children matched with respect to age, sex and body mass index.	Salivary sIgA level was quantified by ELISA method (12), using a commercial sIgA ELISA kit (Immunodiagnostik, Bensheim, Germany)	Non- proteomics		19098366	ns
P17693	sIgG	Salivary Immunoglobulin G	Homo sapiens			x		x	Dental Caries	68003731	+	3-6	MF	Unstimulated saliva was collected in special tubes using the method described by Scully (11). (In this method children were asked to spit in the tubes once a minute for ten minutes). All samples were collected between 10 to 11 a.m., and the time spent on each procedure did not exceed 30 minutesForty five randomly selected ECC and 45 caries-free children matched with respect to age, sex and body mass index.	Salivary IgG concentration level was determined using IgG-LC kit (Biogene, Mashhad, Iran) with Single Radial Immunodiffusion method (13), using specific antibodies to form precipitation rings in agarose gels.	Non- proteomics		19098366	ns