

Proteínas salivares e cárie na primeira infância: revisão de literatura

Salivary proteins and early childhood caries: literature review

Proteínas salivares y caries en la primera infancia: revisión de la literatura

Recebido: 13/10/2021 | Revisado: 27/10/2021 | Aceito: 31/03/2022 | Publicado: 07/04/2022

Iohanna Karen Albuquerque Alves

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3047-2730>
Universidade Federal do Ceará, Brasil
E-mail: iohannakaren@hotmail.com

Sarah Florindo de Figueiredo Guedes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6330-9262>
Universidade Federal do Ceará, Brasil
E-mail: sarahffguedes@yahoo.com.br

Myrna Maria Arcanjo Frota Barros

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7689-175X>
Universidade Federal do Ceará, Brasil
E-mail: myrnaarcanjo@ufc.br

Wanessa Fernandes Matias Regis

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2755-7672>
Universidade Federal do Ceará, Brasil
E-mail: wanessaregis1@gmail.com

Marthana de Maria Araújo Miranda

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7550-1027>
Universidade Federal do Ceará, Brasil
E-mail: marthanamiranda@gmail.com

Lidiany Karla Azevedo Rodrigues

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8060-8531>
Universidade Federal do Ceará, Brasil
E-mail: lidianykarla@ufc.br

Beatriz Gonçalves Neves

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9599-0662>
Universidade Federal do Ceará, Brasil
E-mail: beatrizneves@ufc.br

Resumo

Introdução: A cárie dentária é a doença crônica mais prevalente na infância, sendo um problema significativo de saúde pública. A saliva é considerada um dos fatores hospedeiros mais importantes e um modulador biológico essencial que controla a velocidade e progressão da cárie. **Objetivo:** Realizar uma revisão da literatura sobre cárie na primeira infância (CPI) e sua possível relação com proteínas e peptídeos salivares. **Métodos:** Uma busca eletrônica foi realizada nas bases de dados Scopus, SciELO e PubMed Medline, aplicando a combinação dos termos "cárie na primeira infância", "saliva", "peptídeos" e "proteínas". Foram incluídos nesta pesquisa estudos que visam relacionar proteínas e peptídeos salivares e cárie dentária, indivíduos com idade entre 0-71 meses, estudos publicados na língua inglesa, ensaios randomizados e ensaios clínicos que demonstram a relação entre cárie na primeira infância e proteínas salivares. Estudos realizados com pacientes com síndromes congênitas e/ou cromossômicas, distúrbios sistêmicos ou deficiências motoras, bem como estudos em animais, estudos de revisão, cartas ao editor ou relatos de caso não foram incluídos nesta revisão. **Resultados:** Dos 48 estudos identificados, 13 foram selecionados para esta revisão. A maioria dos estudos mostrou associação entre proteínas e peptídeos salivares e a presença ou ausência de cárie. Seis estudos mostraram um alto nível de qualidade, enquanto o restante dos estudos foi classificado como de qualidade moderada. **Conclusão:** Embora a associação entre proteínas salivares e CPI seja estabelecida, mais evidências são necessárias para que os biomarcadores salivares sejam considerados preditores de risco de CPI.

Palavras-chave: Cárie dentária; Saliva; Peptídeos; Proteínas.

Abstract

Introduction: Dental caries is the most prevalent chronic disease in childhood, being a significant public health problem. Saliva is considered one of the most important host factors and an essential biological modulator that controls the speed and progression of caries. **Objective:** To perform a literature review on early childhood caries (ECC) and its possible relationship with salivary proteins and peptides. **Methods:** An electronic search was performed in the Scopus, SciELO and PubMed Medline databases, applying the combination of the terms "early childhood caries", "saliva", "peptides" and "proteins". This research included studies that aim to relate salivary proteins and peptides and dental caries, individuals aged 0-71 months, studies published in the English language, randomized trials

and clinical trials that demonstrate the relationship between early childhood caries and salivary proteins. Studies conducted with patients with congenital and / or chromosomal syndromes, systemic disorders or motor disabilities, as well as studies in animals, review studies, letters to the editor or case reports were not included in this review. Results: Of the 48 studies identified, 13 were selected for this review. Most studies have shown an association between salivary proteins and peptides and the presence or absence of caries. Six studies showed a high level of quality, while the rest of the studies were classified as of moderate quality. Conclusion: Although the association between salivary proteins and ECC is established, more evidence is needed for salivary biomarkers to be considered predictors of ECC risk.

Keywords: Dental caries; Saliva; Peptides; Proteins.

Resumen

Introducción: La caries dental es la enfermedad crónica más prevalente en la infancia, siendo un importante problema de salud pública. La saliva se considera uno de los factores del huésped más importantes y un modulador biológico esencial que controla la velocidad y progresión de la caries. Objetivo: Realizar una revisión de la literatura sobre caries infantil temprana (CPI) y su posible relación con proteínas y péptidos salivales. Métodos: Se realizó una búsqueda electrónica en las bases de datos Scopus, SciELO y PubMed Medline, aplicando la combinación de los términos "caries infantil temprana", "saliva", "péptidos" y "proteínas". Esta investigación incluyó estudios que tienen como objetivo relacionar proteínas y péptidos salivales y caries dental, individuos de 0 a 71 meses, estudios publicados en el idioma inglés, ensayos aleatorizados y ensayos clínicos que demuestran la relación entre la caries infantil temprana y las proteínas salivales. Los estudios realizados con pacientes con síndromes congénitos y/o cromosómicos, trastornos sistémicos o discapacidades motoras, así como estudios en animales, estudios de revisión, cartas al editor o informes de casos no se incluyeron en esta revisión. Resultados: De los 48 estudios identificados, 13 fueron seleccionados para esta revisión. La mayoría de los estudios demostraron una asociación entre proteínas y péptidos salivales y la presencia o ausencia de caries. Seis estudios mostraron un alto nivel de calidad, mientras que el resto de los estudios se clasificaron como calidad moderada. Conclusión: Aunque se establece la asociación entre proteínas salivales e IPC, se necesita más evidencia para que los biomarcadores salivales se consideren predictores de riesgo de CPI.

Palabras clave: Caries dental; Saliva; Péptidos; Proteínas.

1. Introdução

A cárie dentária é uma doença caracterizada pela desmineralização dos tecidos dentários, resultante da produção de ácidos pelas bactérias do biofilme dentário durante a fermentação de açúcares da dieta, sendo considerada, portanto, uma doença biofilme-açúcar dependente e, quando não controlada, pode levar à destruição dentária (Fejerskov, 1997). No Brasil, de acordo com os dados do levantamento epidemiológico de Saúde Bucal de 2010 (SB Brasil), apenas 46,6% das crianças aos 5 anos de idade estão livres de cárie na dentição decídua e 56,5% das crianças brasileiras de 12 anos de idade têm pelo menos um dente permanente com experiência de cárie (Roncalli, 2011).

Quando esta desordem acomete uma ou mais superfícies dentárias cavitadas ou não, perdidas ou restauradas, em crianças menores de 71 meses de idade é denominada cárie na primeira infância (CPI) (American Academy of Pediatrics, 2008), a qual pode trazer sérias consequências para as crianças como dor, infecções e abscessos e, ainda, atraso no crescimento, problemas nutricionais e de sono, baixa autoestima, além de prejuízo no rendimento escolar (Ramos-Gomez *et al.*, 2004).

Fatores externos como condições socioeconômicas, nível de educação e acesso à saúde representam um papel importante na etiologia da doença cárie (Oliveira *et al.*, 2008). Além disso, fatores locais como dieta rica em açúcares, acesso ao flúor, uso de substâncias antimicrobianas, e fatores inerentes ao próprio paciente podem estar relacionados à alteração dos padrões de desenvolvimento e ao estado de atividade das lesões (Thylstrup *et al.*, 1994; Piovesan *et al.*, 2014). A interação complexa entre esses fatores ao longo do tempo desempenha um papel decisivo no desenvolvimento da doença (Lertsirivorakul *et al.*, 2015).

A saliva é considerada um fator determinante na velocidade e desenvolvimento da cárie, devido a importantes constituintes e propriedades, como eletrólitos, taxa de fluxo salivar, capacidade tampão e pH (De Sousa *et al.*, 2020). Além disso, como o sangue, a saliva é um líquido complexo que contém uma variedade de enzimas, hormônios, anticorpos, citocinas

e constituintes antimicrobianos (Rehak et al., 2000), tais como imunoglobulinas, peroxidases, aglutininas, mucinas, lactoferrina e lisozima, que interagem com bactérias cariogênicas por meio de diversos mecanismos, tais como a prevenção da agregação e adesão bacteriana, a inibição do seu metabolismo e multiplicação e a quebra da parede celular de algumas bactérias (Lertsirivorakul *et al.*, 2015).

O uso de amostras de saliva humana para rastreamento e diagnóstico de doenças é promissor, uma vez que sua análise é simples, segura, de baixo custo e não-invasiva (To *et al.*, 2020). Nesse sentido, a saliva pode ser usada como uma importante ferramenta para o diagnóstico de cárie em populações com alta prevalência da doença, em que a presença de biomarcadores salivares poderia facilitar a detecção precoce e aplicação de formas de prevenção para reduzir o desenvolvimento da cárie na primeira infância, bem como os custos com medidas terapêuticas (Hu et al., 2007). Considerando a importância do diagnóstico precoce da doença cárie em crianças, bem como o aumento considerável do número de estudos tentando relacionar proteínas salivares e cárie dentária, o presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão da literatura sobre cárie na primeira infância e sua relação com proteínas e peptídeos salivares.

2. Métodos

2.1 Estratégia de busca e critérios de seleção

Esse trabalho foi elaborado por meio de uma revisão integrativa da literatura, a qual trata-se de um método que possibilita realizar a síntese do conhecimento científico sobre determinada temática a partir da coleta de dados por meio de levantamento bibliográfico (Souza *et al.*, 2010). A pergunta norteadora deste estudo foi verificar a relação de peptídeos e proteínas salivares com cárie na primeira infância, a partir de consulta às bases de dados PubMed, Scopus e SciELO. Foram incluídos estudos relacionados a proteínas salivares, peptídeos salivares e cárie dentária, em crianças de 0 a 71 meses de idade, com e sem atividade de cárie, encontrados através de uma estratégia de busca on-line utilizando os seguintes descritores: *cárie na primeira infância*, *saliva*, *proteínas* e *peptídeos* e seus correspondentes em inglês. Foram utilizados artigos originais, publicados entre 2000 e 2020. Os estudos selecionados nesta revisão obedeceram aos seguintes critérios de inclusão: (a) estudos com o objetivo de relacionar proteínas e peptídeos salivares e cárie dentária; (b) indivíduos com idade de 0 a 71 meses; (c) estudos randomizados e ensaios clínicos que demonstrem a relação entre cárie na primeira infância e proteínas salivares.

Foram excluídos os estudos com amostra de crianças com síndromes congênitas e/ou cromossômicas, distúrbios sistêmicos, deficiências motoras e indivíduos que estivessem fazendo uso de medicação capaz de alterar a composição salivar. Além disso, não foram admitidos estudos com animais, estudos de revisões, cartas ao editor, relatos de casos ou séries de casos, capítulos de livros e estudos *in vitro*.

2.2 Avaliação de risco de viés

Uma ferramenta de avaliação crítica foi utilizada para análise de qualidade dos estudos selecionados. O guia do Instituto Joanna Briggs foi utilizado para a avaliação da qualidade de estudos selecionados. A lista é composta de 10 itens, em que os revisores responderam "Sim", "Não" ou "Não está claro" para cada item (quadro 1). Para categorizar os estudos de acordo com a qualidade, uma pontuação geral para cada estudo foi calculada com base no número de respostas "Sim", os escores apresentaram uma variação de modo que os escores variassem de 0 a 10. Finalmente, os estudos foram categorizados de acordo com suas pontuações em: baixa qualidade (pontuação entre 0 e 3); qualidade moderada (4-6); ou de alta qualidade (7-10) (Peters *et al.*, 2015; Nascimento *et al.*, 2016).

Quadro 1. Avaliação de qualidade dos estudos selecionados a partir do Manual de Revisões do Instituto Joanna Briggs, 2017

Autor/Ano	Farias <i>et al.</i> , 2003	Zehetbauer <i>et al.</i> , 2009	Bhalla <i>et al.</i> , 2010	Ribeiro <i>et al.</i> , 2013	Moslemi <i>et al.</i> , 2015	Si <i>et al.</i> , 2015	Jurczak <i>et al.</i> , 2015	Lertsiriyarakul <i>et al.</i> , 2015	Sun <i>et al.</i> , 2016	Colombo <i>et al.</i> , 2016	Ao <i>et al.</i> , 2017	Wang <i>et al.</i> , 2018	Guedes <i>et al.</i> , 2020
A amostra foi representativa da população-alvo?	Não	Não	Não está claro	Não está claro	Não está claro	Não	Não está claro	Sim	Não	Não está claro	Não	Sim	Sim
Os participantes do estudo foram recrutados de forma adequada?	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim
O tamanho da amostra era adequado?	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	Sim
Os sujeitos do estudo e metodologia foi descrita em detalhes?	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
A análise de dados foi realizada com cobertura suficiente da amostra identificada?	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não está claro	Sim	Sim	Sim	Sim
Foram critérios objetivos, padrão, utilizados para a medição da condição?	Não está claro	Não está claro	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não está claro	Sim	Sim	Sim	Sim
A condição foi medida de forma confiável?	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não está claro	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Existe uma análise estatística apropriada?	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim
Todos os fatores / subgrupos / fatores de confusão importantes são identificados e contabilizados?	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não

Fonte: Autores.

3. Resultados

Um total de 15 referências foram identificadas na base de dados PubMed, 18 referências na base de dados Scopus e 15 referências identificadas na base SciELO, resultando em um total de 48 referências para a leitura de títulos e resumos. Seis referências foram excluídas por apresentarem objetivos não relevantes para este estudo. Quatorze foram excluídas por estarem em duplicata. Uma outra referência não foi incluída nessa revisão por ser um estudo realizado com pacientes que apresentavam desnutrição. Dois estudos foram excluídos por se tratar de revisões de literatura. Assim, vinte e cinco artigos foram cuidadosamente lidos e destes, treze foram selecionados como elegíveis.

A distribuição dos artigos é detalhada no quadro 2, que mostra os estudos incluídos, seus objetivos, suas principais características metodológicas bem como seus resultados. Todos os estudos incluíram crianças em idade pré-escolar saudáveis, no entanto dois estudos não esclareceram qual a idade das crianças das amostras (Zehetbauer *et al.*, 2009; Jurczak *et al.*, 2015). No estudo de Bhalla *et al.* (2010), a idade dos indivíduos da amostra variou de 4 a 6 anos, embora por definição a cárie na primeira infância acomete crianças de 0 a 71 meses.

A maioria das amostras de saliva foram coletadas através do método não estimulado (UWS). Nos estudos de Ao *et al.* (2017), Sun *et al.* (2016) e Guedes *et al.* (2020) foi utilizada saliva estimulada (SWS) e no estudo de Ribeiro *et al.* (2013) a coleta de saliva foi realizada por ambos os métodos (UWS e SWS). A maioria dos estudos teve seus grupos divididos em crianças com experiência de cárie na primeira infância (CPI) ou livre de cárie (LC) e alguns estudos incluíram o grupo de crianças acometidas por cárie severa na infância (S-CPI). A maior parte dos estudos apresentou delineamento transversal, apenas os estudos de Ao *et al.* (2017) e Sun *et al.* (2016) foram longitudinais.

O quadro 2 mostra os peptídeos e/ou proteínas salivares citadas nos artigos, em que os peptídeos IgA, IgG, PRP IB-4, HST-5, β -defensina-2, hBD-2, HTN-5, LL-37, hBD-2 foram avaliados como fatores de risco à CPI, e os peptídeos amilase salivar IgM, 3.186,2, 3.195,8, 3.324,8, segmentos da histatina-1 e o peptídeo 1346,6, rico em histatina foram relacionados como fatores de proteção à CPI. Enquanto a lisozima salivar foi avaliada como fator de risco e fator de proteção.

Quadro 2. Estudos selecionados para verificação de associação entre proteínas/peptídeos.

Autor e ano	Objetivo	Tamanho da amostra (n)	Idade	Grupos amostrais	Tipo de saliva	Coleta e preparação da saliva	Parâmetros salivares	Resultados
Farias et al., 2003	Analisar a composição orgânica da saliva de crianças sem cárie dentária e crianças com CPI	40	12 a 47 meses	Grupo I - crianças livres de cárie (n=20). Grupo II - crianças com CPI (n = 20).	Não estimulada	Duas amostras de saliva foram coletadas do assoalho da boca de cada criança usando uma pipeta de plástico descartável para aspiração. Todas as amostras foram coletadas entre 8 e 11 horas da manhã. As amostras foram armazenadas em tubos de plástico a 0°C e transportadas imediatamente para o laboratório, onde os ensaios imunológicos e bioquímicos foram realizados	IgA, IgG e IgM Atividade de amilase Concentrações de proteína total	As crianças com CPI apresentaram níveis significativamente maiores de IgA e IgG salivares totais, enquanto os valores médios de atividade da amilase, concentrações totais de proteína e IgM total foram semelhantes entre os grupos.
Zehlbauer et al., 2009	Investigar o envolvimento de proteínas salivares na etiologia da CPI, realizando uma comparação qualitativa dos perfis proteicos salivares entre crianças com CPI e crianças controle livres de cárie.	50	Não informada	Crianças com cárie severa na primeira infância (S-CPI) (n=22) Crianças com cárie na primeira infância (CPI) (n=08) Crianças livres de cárie (LC) (n=20)	Não estimulada	A saliva foi coletada em um frasco de polipropileno estéril no momento do exame. Para aqueles que não conseguiram cuspir, a saliva foi coletada por sucção manual com pipetas descartáveis Pasteur. As amostras foram armazenadas em gelo e posteriormente processadas até 30 minutos após a coleta.	Reagente de proteína de ácido bicinônico (BCA) Eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)	As concentrações totais de proteína na saliva foram semelhantes em todos os grupos experimentais com medidas variando de 1,0 a 1,1 mg/ml. Os dendrogramas obtidos após a comparação de todas as amostras mostraram um alto grau de similaridade para os grupos experimentais. Todas as análises adicionais resultaram em coeficientes de correlação semelhantes, variando de 0,93 a 0,98.

<p>Bhalla et al., 2010</p>	<p>Comparar as características salivares humanas em repouso em crianças com CPI e com crianças livres de cárie (LC), em relação ao pH salivar total, taxa de fluxo salivar, composição proteica e padrão das proteínas em eletroforese em gel.</p>	<p>100</p>	<p>4 a 6 anos</p>	<p>CPI (n=50) LC (n=50)</p>	<p>Não estimulada</p>	<p>As amostras de saliva foram coletadas pela manhã e armazenadas em tubos estéreis. Depois de utilizar parte da saliva de cada indivíduo para a avaliação do pH, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e armazenado a -80°C para posterior processamento.</p>	<p>Eletroforese em gel de poliacrilamida - sulfato de sódio - poliacrilamida (SDS-PAGE)</p>	<p>O grupo LC apresentou maior número de bandas de proteínas ricas em prolina, comprovando o papel protetor dessa proteína. Observou-se uma correlação inversa entre a concentração média de proteína e a taxa de fluxo salivar total em ambos os grupos.</p>
<p>Ribeiro et al., 2013</p>	<p>Avaliar o perfil peptídico salivar de crianças com e sem CPI e sua associação com a experiência de cárie.</p>	<p>106</p>	<p>10 a 71 meses</p>	<p>LC (n=58) CPI (n=58)</p>	<p>Não estimulada Estimulada</p>	<p>A saliva não estimulada foi coletada durante 60s, depois liofilizada e armazenada a -80° C para análises peptídicas adicionais. A saliva estimulada foi coletada após mastigação de um pedaço padrão de parafilme por 60s. As amostras de saliva foram coletadas 1h após a rotina de escovação e em um período de jejum de pelo menos 3 horas.</p>	<p>Cromatografia líquida Espectrometria de massa - monograia (LC-MS)</p>	<p>A presença de peptídeos ricos em prolina PRP IB-4 foi positivamente relacionada à cárie dentária. HNP-3 (α-defensina- 3) e HBD-3 (β-defensina 3) foram relacionados ao grupo LC.</p>

Si et al., 2013	Investigar a expressão diferencial da proteína salivar entre crianças com cárie severa na infância (S-CPI) e LC com idade de 3 anos.	20	3 anos	S-CPI (n=10) LC (n=10)	Estimulada	Os indivíduos foram instruídos a enxaguar a cavidade oral após o café da manhã e esperar 10 minutos para a coleta de saliva estimulada, coletada por 5 minutos. Os tubos de saliva foram armazenados em gelo até serem centrifugados e a atividade da protease foi inibida.	MALDI-TOF MS Método Lowry ELx808 Protein Assay	Em comparação com os outros peptídeos identificados, os peptídeos 3.186,2, 3.195,8 e 3.324,8 Da tendem a ser regulados de forma descendente sem o grupo S-CPI e formam uma linha quase reta indicando que eles podem ter origem em proteínas potenciais. Então os picos mais conhecidos foram escolhidos como biomarcadores e candidatos. Os peptídeos 3.186,2, 3.195,8 e 3.324,8 Da foram selecionados para a criação de um modelo de diagnóstico S-CPI.

Molesmi et al., 2015	Investigar a associação das concentrações de lisozima salivar e lactoferrina em crianças com CPI	42	36 a 71 meses	LC (n=21) CPI (n=21)	Não estimulada	A coleta ocorreu no tumor da manhã, com seringas descartáveis. A saliva coletada foi transferida para microtubos e armazenada em uma caixa de gelo para evitar hidrólise de proteínas salivares. Uma nova coleta de saliva não estimulada foi realizada após 3 meses nas crianças remanescentes do estudo.	Lisozima humana, ELISA Lactoferrina Humana, ELISA	A concentração média de lisozima salivar no grupo CPI foi de 2180 ng/ml, enquanto a concentração média de lisozima foi de 9573,81 ng/ml no grupo LC (p=0,04). Já em comparação com as concentrações médias de lactoferrina salivar, não houve diferença significativa entre os grupos (p=0,06).
Jurczak et al., 2015	Determinar o papel da histatina-5 e β-defensina-2 como marcador de diagnóstico da progressão da cárie infantil	82	Não informada	CPI Moderada (ICDAS 1-2) – (n=17) Severa (ICDAS >3) – (n=24) Controle – LC (n=41)	Não estimulada	As amostras de saliva e biofilme foram obtidas de ambos os grupos. As amostras foram coletadas de crianças com CPI ou LC. As amostras de saliva foram coletadas em tubos de plástico esteréis pela manhã antes da escovação. As amostras foram homogeneizadas e clarificadas por centrifugação	ELISA (Bio-RAD, Hercules, CA, EUA) Teste STREPTO 24 (Lachem, pliva)	Os níveis salivares de HST-5 e β-defensina-2 em pacientes CPI aumentaram significativamente em relação ao controle (grupo saudável). Quando os resultados foram analisados de acordo com o escore de gravidade da cárie, os níveis de HST-5 salivar e β-defensina-2 foram significativamente maiores no grupo com CPI severa em comparação com o grupo moderado. Não houve correlação entre β-defensina-2 e idade, sexo, hábitos sociais, dietas, medicamentos ou outros fatores.

<p>Lertsivorakul et al., 2015</p>	<p>Analisar os níveis e atividades da lisozima salivar em pré-escolares tailandeses com diferentes estágios de cárie dentária</p>	<p>64</p>	<p>4 a 5 anos e 11 meses</p>	<p>LC- (n=32) S-CPI -(n=32)</p>	<p>Não estimulada</p>	<p>As amostras foram coletadas entre as 09:00 e as 11:00 horas. Imediatamente após a coleta, as taxas de fluxo salivar foram calculadas. Em seguida, as amostras de saliva foram centrifugadas a 3000 rpm durante 2 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi armazenado congelado a -80°C até a análise.</p>	<p>Método Lowry Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)</p>	<p>A análise densitométrica revelou que a intensidade dessas bandas de lisozima foi aproximadamente 30% maior no grupo S-CPI em comparação com o grupo não-cárie (p <0,001) indicando o conteúdo de lisozima significativamente maior neste grupo. As análises de lisoplate demonstraram que a atividade da lisozima é mantida na saliva colhida dos dois grupos investigados. A atividade da lisozima na saliva do grupo S-CPI foi aproximadamente 30% maior que a do grupo LC (p = 0,008, respectivamente). Não houve correlação significativa entre o conteúdo de lisozima salivar e os parâmetros de cárie dentária.</p>
<p>Sun et al., 2016</p>	<p>Aplicar a espectrometria de massa assistida por matriz tempo de massa e biomassa assistida por matriz para avaliar os biomarcadores candidatos desta doença, a fim de estabelecer perfis de proteínas e modelos de diagnóstico de S-CPI.</p>	<p>16</p>	<p>3 a 5 anos</p>	<p>CPI antes do tratamento (n=16) CPI 1 semana após o tratamento (n=16) CPI 4 semanas após o tratamento (n=16)</p>	<p>Estimulada</p>	<p>As amostras de saliva estimulada foram coletadas após o café da manhã e depois de lavar a boca com água limpa. Após centrifugação a 10000 xg durante 10 min a 4 °C, obteve-se o sobrenadante e adicionou-se ácido etilendiaminotetracético 1 mM com fluoreto de fenilmetilsulfônico 1 mM para inibir a atividade de protease. A concentração de proteína foi medida pelo método Lowry e ELx808 Protein Assay. Em</p>	<p>Método de Lowry e ensaio de proteína ELx808 MALDI-TOF MS Espectrometria de Massa de Orbitatina em Massa Linear (LTQ -orbitrao-MS)</p>	<p>Para os 3 grupos, a intensidade do pico diferiu significativamente para 7 peptídeos, que eram abundantes. Dois deles eram maiores nos bebês s-CPI antes do tratamento, enquanto os outros 5 peptídeos eram maiores nos grupos tratados durante 1 e 4 semanas. A sensibilidade e especificidade do modelo de diagnóstico foi de 83,3%. Dois desses peptídeos foram</p>

						seguida, estes sobrenadantes foram armazenados a - 80°C		identificados como segmentos da histatina-1.
Colombo <i>et al.</i>, 2016	Examinar os níveis de MPA (peptídeos antimicrobianos) na saliva de crianças com cárie CPI e S-CPI e LC para determinar os níveis de peptídeos antimicrobianos salivares individualmente ou em combinações, relacionados à gravidade da cárie e níveis de estreptococos.	83	36 a 60 meses	LC (n=29) CPI (n=25) S-CPI (n=29)	Não estimulada	As amostras de saliva foram coletadas durante 5 a 10 minutos em tubos estéreis. A coleta foi realizada pelo menos 1 hora após a alimentação. Os tubos foram armazenados em gelo e processados em 1 hora. A saliva foi clarificada e 100 µl de alíquotas de cada amostra foram congeladas a -70°C até serem utilizadas para a medição de níveis de peptídeos antimicrobianos.	Ensaio imunoenzimático, ELISA	LL-37, hBD-2, hBD-3 e HTN-5 foram detectados em amostras de saliva. A concentração salivar das AMPs não diferiu entre os grupos LC, CPI e S-CPI. Houve correlações positivas entre os níveis salivares de hBD-2 e HTN-5 com contagens de estreptococos mutans salivares. Não houve relação entre os níveis de MS e outros AMPs testados. Houve associações positivas fracas entre dmfs e LL-37, e entre dmfs e hBD-2. Uma combinação de hBD-2, hBD-3, LL-37 e HTN-5 também estava mal correlacionada com dmfs). Além disso, houve correlações positivas entre hBD-2, hBD-3 e LL-37. HTN-5 foi associado apenas com LL-37 e hBD-2.

Ao et al., 2017	Investigar os peptídeos salivares expressos no desenvolvimento da cárie da primeira infância (CPI) em crianças de 3-4 anos de idade, em diferentes segmentos	30	3 a 4 anos	CPI (n=15) LC (n=15)	Estimulada	As amostras de saliva estimuladas foram recolhidas durante 5 min. As amostras, de 1,5ml foram imediatamente colocadas em gelo. O material insolúvel, as células e detritos foram removidos por centrifugação. Os sobrenadantes foram recolhidos e adicionou-se ácido etilenodiaminotetracético 1mM e fluoreto de fenilmetilsulfonilo 1mM para inibir a atividade da protease. Os sobrenadantes foram mantidos a -80°C separadamente até nova análise.	Método de Lowry ELx808 Protein Assay Fração de WCX MALDI-TOF MS	Foram observados nove picos potencialmente relacionados ao desenvolvimento de cárie. Os níveis de três peptídeos aumentam ao longo do tempo, enquanto os outros seis diminuem gradualmente. Três peptídeos com a melhor capacidade de classificação (1346.6, 2603.5 e 3192.8 Da) foram escolhidos para estabelecer um modelo para crianças com alto risco de cárie. Um peptídeo (1346.6) foi identificado como peptídeo salivar rico em histatina.
Wang et al., 2018	Caracterizar o proteoma salivar saudável e cariogênico e determinar as alterações na expressão de proteínas salivares de crianças com graus variados de cárie ativa, além de estabelecer perfis de proteoma salivar com potencial uso terapêutico contra cárie dentária.	30	10 -12 anos	LC (n = 10) Cárie (n = 10) Cárie severa (n = 10)	Não estimulada	3 ml de saliva total não estimulada espontânea foi coletada em um tubo cônico livre de enzimas estéril, entre 9:00 e 11:00 da manhã. Os sujeitos foram instruídos a evitar beber e comer por pelo menos 2 horas antes da amostra.	Nano-cromatografia líquida de alto desempenho (Nano - HPLC – MS / MS)	As proteínas: S100 A9, mucina 7, mucina 5B, estaterina, histatina 1, cistatina S, cistatina SN, expressas na saliva, apresentaram função anticariogênica potencial. Mais estudos devem investigar os efeitos dessas proteínas como agentes preventivos da cárie dentária para estratégias preventivas individualizadas no futur.

<p>Guedes et al., 2020</p>	<p>Realizar uma análise comparativa dos perfis proteicos da saliva de pacientes com CPI em diferentes níveis de gravidade e em indivíduos LC</p>	<p>126</p>	<p>2 - 6 anos</p>	<p>CPI-Esmalte (n = 42) CPI-Dentina (n = 42) LC (n = 42) Cárie em esmalte (n = 42) CPI-Dentina Cárie dentinária (n = 42) LC (n = 42)</p>	<p>Estimulada</p>	<p>Uma hora antes da coleta de saliva, os pacientes escovavam os dentes com creme dental não abrasivo e permaneciam sem ingestão de qualquer alimento ou líquido. As amostras de saliva foram coletadas entre os horários de 9:00-11:15. Antes da coleta foi realizado um enxágue oral com água potável. Para o procedimento de coleta, foi utilizado um Swab infantil do tipo SalivaBio (SCS) (Salimetrics LLC Company), deixado na boca da criança por 90 segundos. Após este tempo, o swab foi transferido para um tubo de armazenamento e imediatamente centrifugado. Em seguida, o sobrenadante foi retirado do tubo e colocado em frasco criogênico devidamente identificado. Os frascos criogênicos foram imediatamente armazenados em gelo seco e congelados a - 80 ° C até a análise.</p>	<p>Análise proteômica</p>	<p>Um total de 306 proteínas (≈6 peptídeos) foram identificadas. Entre elas, 122 foram expressas de forma diferente em comparação entre crianças com diferentes <i>status</i> de cárie. Das 122 proteínas, as proteínas E2AK4 e SH3L2 estavam exclusivamente presentes nos grupos LC e CPI-Esmalte, respectivamente. . 8 proteínas (HAUS4, CAH1, IL36A, IL36G, AIMP1, KLHL8, KLH13 e SAA1) eram proteínas reguladas positivamente nos grupos de cárie (cárie em esmalte e cárie em dentina.</p>
-----------------------------------	--	------------	-------------------	---	-------------------	--	---------------------------	---

Fonte: Autores.

4. Discussão

A saliva humana é a primeira linha de defesa para a cárie dentária, uma vez que sua composição e fisiologia influenciam a saúde bucal (Ganz, 2003). Por esta razão, alguns constituintes, principalmente as proteínas e peptídeos salivares, estão sendo amplamente investigados para explorar sua relação com a cárie dentária, especialmente a cárie na primeira infância (CPI) (Ao *et al.*, 2017). Alguns estudos apontam que a análise composicional salivar pode ser muito importante para avaliar a gravidade da doença (Kornman *et al.*, 1997; Baughan *et al.*, 2000).

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) constituem uma importante classe de moléculas pertencentes ao sistema imune inato através da participação em reações de defesa de primeira linha em vários locais do corpo humano (Ganz, 2003). Inúmeros AMPs, α - e β -defensinas, catelicidina humana LL-37 e histatinas foram observadas na literatura quanto às suas atividades bactericidas e /ou bacteriostáticas contra patógenos orais (Gorr, 2000).

Nesse sentido, o estudo de Colombo *et al.* (2016) mostrou que não houve diferenças entre as concentrações totais de AMPs entre os grupos avaliados, mas houve correlações positivas entre hBD-2 e HTN-5 com os níveis salivares de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*). Outra associação foi observada entre os níveis de hBD-2 e LL-37 e a extensão de cárie (dmfs). Esses resultados sugerem que peptídeos antimicrobianos, podem reagir à presença de *S. mutans* e sua produção é aumentada na presença de cárie dentária. Além disso, os resultados mostraram correlações positivas entre hBD-2, HBD-3, LL-37 e HTN-5 (exceto para a combinação de HTN-5 e HBD-3), sugerindo que pode haver uma ação combinada destes peptídeos na resposta do hospedeiro possivelmente para patógenos de cárie.

O papel da histatina-5 e β -defensina como marcadores de diagnóstico de progressão da cárie na primeira infância foi avaliado no estudo de Jurczak *et al.* (2015) que verificaram que os níveis salivares da histatina-5 e da β -defensina-2 aumentaram significativamente na saliva de crianças com CPI quando comparado ao grupo controle. Essa diferença continuou significativa quando comparado o grupo com CPI severa em relação ao grupo com CPI leve.

Zehetbauer *et al.* (2009) buscaram investigar o envolvimento de proteínas na etiologia da CPI, através de uma comparação qualitativa dos perfis de proteínas salivares entre crianças com CPI e crianças livres de cárie, observou-se um alto grau de similaridade entre os indivíduos desse estudo. Não houve diferenças significativas por comparação das proteínas salivares de crianças com cárie na primeira infância e crianças livres de cárie. De acordo com os autores, é possível que a análise realizada por SDS-PAGE não tenha sido sensível o suficiente para detectar sutis diferenças entre algumas proteínas salivares menos abundantes. Esses resultados demonstram a importância do emprego de técnicas cada vez mais avançadas e específicas para a expressão diferencial de proteínas salivares relevantes.

No estudo de Ribeiro *et al.* (2013), a identificação de massas moleculares em cromatogramas sugeriu a presença de nove peptídeos, dos quais apenas três estavam relacionados à cárie. A presença de α -defensina-3 e β -defensina-3 esteve associada à diminuição das chances de detecção de cárie, enquanto o peptídeo rico em Prolina IB-4 foi positivamente associado com a cárie, diferindo do resultado apresentado pelo estudo de Bhalla *et al.* (2010) onde um maior número de bandas proteicas ricas em prolina foram identificadas no grupo livre de cárie. Dessa forma, embora no estudo de Colombo *et al.* (2016) os AMPs individuais não estejam associados à cárie, como nos estudos de Ribeiro *et al.* (2013) e Jurczak *et al.* (2015), as correlações de AMPs, principalmente com LL-37, foram positivamente correlacionados com os níveis de cárie, sugerindo uma possível reação local do hospedeiro à cárie em crianças. Além disso, apesar de Ribeiro *et al.* (2013) e Zehetbauer *et al.* (2009) terem apresentado objetivos semelhantes, vários fatores podem ter influenciado os diferentes resultados. O tamanho da amostra foi bastante diferente nos dois estudos, os critérios para avaliar a presença ou ausência de cárie e o grau de gravidade das lesões não foram bem estabelecidos, o tipo de saliva e como a coleta de saliva foi realizada nos dois estudos diferiram. Também é possível que a análise de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) utilizada para Zehetbauer *et al.*

(2009) possa não ser suficientemente sensível para detectar diferenças sutis putativas entre algumas proteínas menos abundantes.

Os níveis e atividades da lisozima salivar se mostraram aumentados no grupo portador de CPI severa no estudo de Lertsirivorakul *et al.* (2015), quando comparados ao grupo controle (livre de cárie), corroborando com o estudo realizado com adultos jovens de Jentsch *et al.*, (2004), em que níveis mais baixos de lisozima salivar estiveram relacionados com portadores de baixo índice de cárie. Já no estudo de Moslemi *et al.* (2015), os níveis de lisozima apresentaram-se significativamente maiores no grupo livre de cárie, quando comparado ao grupo com CPI. A divergência apresentada entre os resultados dos dois estudos (Lertsirivorakul *et al.*, 2015; Moslemi *et al.* 2015), sugerem que pode haver ou não uma conexão entre a lisozima salivar e a imunidade oral em resposta à cárie dentária na primeira infância. Assim, são necessários mais estudos com métodos padronizados, amostragem representativa e com tamanho adequado, para que assim seja possível definir o verdadeiro papel da lisozima salivar na patogênese da CPI.

Os perfis proteicos de crianças portadoras de S-CPI foram avaliados no estudo longitudinal de Sun *et al.* (2016) antes do tratamento, uma semana e quatro semanas após o tratamento das lesões cariosas, através de uma técnica de ionização utilizada em espectrometria de massa (MALDI-TOF MS), obtendo como resultados que, para os três grupos avaliados, a intensidade de pico diferiu significativamente para 7 peptídeos que se apresentavam em abundância. Dois desses peptídeos foram mais elevados nas crianças S-CPI antes do tratamento, enquanto os outros 5 peptídeos foram maiores nos grupos tratados durante 1 e 4 semanas. Dois destes peptídeos foram identificados como sendo segmento da histatina-1, que faz parte de um importante grupo de peptídeos antimicrobianos salivares já discutidos por muitos autores, incluindo Colombo *et al.* (2016) e Jurcza *et al.* (2015), corroborando também com os resultados do estudo realizado por Vitorino *et al.* (2005) que relatou uma forte correlação entre grandes quantidades da histatina-1 e ausência de cárie dentária.

Já no estudo de Si *et al.* (2015), que utilizou MALDI-TOF MS semelhante ao método utilizado por Sun *et al.* (2016), onze intensidades de pico diferiram significativamente entre os grupos S-CPI e LC (livres de cárie), indicando que esse método pode ser usado para analisar os perfis de peptídeos de crianças com e sem doença cárie. Os peptídeos de 3.186,2, 3.195,8 e 3.324,8 Da foram menores no grupo S-CPI, que foram escolhidos como biomarcadores potenciais. Neste caso, os três peptídeos podem vir da proteína não caracterizada, AF_2048, a qual foi assumida pelos autores como sendo uma proteína que atua como um fator positivo na saúde bucal.

No estudo longitudinal de Ao *et al.* (2017), nove picos foram identificados como potencialmente relacionados ao desenvolvimento de cárie em crianças. Os níveis de três peptídeos aumentaram ao longo do tempo, enquanto outros seis diminuíram gradualmente. Três peptídeos foram então escolhidos por apresentar a melhor capacidade para estabelecer um modelo para crianças com alto risco de cárie (1346.6, 2603.5 e 3192.8 Da). Esses três peptídeos não foram detectados no grupo controle, o que pode indicar que essas crianças eram menos sensíveis à doença. Um desses peptídeos (1346.6 Da) foi identificado como sendo um peptídeo salivar rico em histatina, corroborando ainda mais com a hipótese dos estudos de Colombo *et al.* (2016), Jurczak *et al.* (2015) e Sun *et al.* (2016) onde esse grupo de peptídeos pode estar diretamente relacionado à resposta do organismo à cárie na primeira infância e, conseqüentemente, pode vir a ser utilizado como biomarcadores para esta doença.

Dentre os autores selecionados para essa revisão, apenas De Farias & Bezerra (2003) utilizou parâmetros salivares para determinar as concentrações de IgA, IgG e IgM salivares e a atividade da amilase salivar em crianças com CPI e livres de cárie, apresentando um aumento significativo da IgA salivar total na presença de CPI.

Guedes *et al.* (2020) comparou o perfil proteico da saliva de crianças com cárie da primeira infância em diferentes níveis de gravidade com crianças livres de cárie. Os autores identificaram 306 proteínas, destas, 8 (HAUS4, CAH1, IL36A, IL36G, AIMP1, KLHL8, KLH13 e SAA1) foram identificadas somente em amostras de crianças que apresentavam lesões de

cárie e 1 (E2AK4) foi identificada somente no grupo livre de cárie, expressão dessa proteína pode estar relacionada a baixa ingestão de carboidratos e conseqüentemente ausência de cárie. Sun *et al.* (2016), também identificou proteínas que podem ser biomarcadores para cárie na infância e destacou a importância do conhecimento desses marcadores para compreensão dos mecanismos de desenvolvimento da cárie e para ajudar a prever o risco da doença, bem como seu avanço.

Cabe destacar que as discrepâncias metodológicas dos artigos selecionados, como, por exemplo, diferentes tipos de salivas coletadas e parâmetros salivares utilizados nas análises, além de diversos métodos de coleta e preparação das amostras, dificultam uma comparação mais adequada entre os resultados.

Diante dos pontos abordados na classificação de qualidade dos artigos é importante ressaltar que em nenhum estudo foi realizada randomização ou os participantes foram recrutados de forma aleatória e apenas três dos dez autores realizaram cálculo para determinar o tamanho da amostra a ser estudada, influenciando assim negativamente sua representatividade. Além disso, a maioria dos estudos não apresentou uma análise estatística adequada (ajustada a diferentes variáveis), afetando negativamente a confiabilidade dos resultados desses estudos, uma vez que existe risco de viés.

5. Conclusão

A maioria dos estudos mostrou associações positivas entre proteínas/peptídeos salivares e a presença ou ausência de cárie na primeira infância, o que pode fornecer uma nova visão sobre o perfil proteico salivar de crianças com cárie na primeira infância e, assim, levar ao desenvolvimento de uma nova estratégia para o diagnóstico precoce e avaliação de risco em crianças. É importante ressaltar que embora uma relação entre proteínas salivares e a presença ou ausência de cárie esteja pré-estabelecida na literatura, ainda são necessárias mais evidências científicas para que biomarcadores salivares específicos possam ser considerados preditores de risco de cárie dentária em pré-escolares. Assim, mais estudos clínicos são necessários para verificar essa possível relação.

Referências

- American Academy of Pediatrics (2008). Policy on early childhood caries (ECC): classifications, consequences, and preventive strategies. *Pediatric dentistry*, 30, 40-43.
- Ao, S., Sun, X., Shi, X., Huang, X., Chen, F., & Zheng, S. (2017). Longitudinal investigation of salivary proteomic profiles in the development of early childhood caries. *Journal of dentistry*, 61, 21-27.
- Baughan, L. W., Robertello, F. J., Sarrett, D. C., Denny, P. A., & Denny, P. C. (2000). Salivary mucin as related to oral Streptococcus mutans in elderly people. *Oral microbiology and immunology*, 15(1), 10-14.
- Bhalla, S., Tandon, S., & Satyamoorthy, K. (2010). Salivary proteins and early childhood caries: A gel electrophoretic analysis. *Contemporary clinical dentistry*, 1(1), 17.
- Cirioni, O., Giacometti, A., Ghiselli, R., Orlando, F., Kamysz, W., D'Amato, G., & Scalise, G. (2004). Potential therapeutic role of histatin derivative P-113d in experimental rat models of Pseudomonas aeruginosa sepsis. *The Journal of infectious diseases*, 190(2), 356-364.
- Colombo, N. H., Ribas, L. F., Pereira, J. A., Kreling, P. F., Kressirer, C. A., Tanner, A. C., & Duque, C. (2016). Antimicrobial peptides in saliva of children with severe early childhood caries. *Archives of oral biology*, 69, 40-46.
- de Farias, D. G., & Bezerra, A. C. B. (2003). Salivary antibodies, amylase and protein from children with early childhood caries. *Clinical oral investigations*, 7(3), 154-157.
- de Sousa, E. T., Lima-Holanda, A. T., & Nobre-dos-Santos, M. (2020). Changes in the salivary electrolytic dynamic after sucrose exposure in children with Early Childhood Caries. *Scientific reports*, 10(1), 1-8.
- Fejerskov, O. (1997). Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. *Community dentistry and oral epidemiology*, 25(1), 5-12.
- Ganz, T. (2003). Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature reviews immunology*, 3(9), 710-720.
- Gorr, S. U. (2009). Antimicrobial peptides of the oral cavity. *Periodontology 2000*, 51(1), 152-180.

- Guedes, S. F., Neves, B. G., Bezerra, D. S., Souza, G. H., Lima-Neto, A. B., Guedes, M. I. F., & Rodrigues, L. K. (2020). Saliva proteomics from children with caries at different severity stages. *Oral diseases*, 26(6), 1219-1229.
- Hu, S., Loo, J. A., & Wong, D. T. (2007). Human saliva proteome analysis and disease biomarker discovery. *Expert review of proteomics*, 4(4), 531-538.
- Jentsch, H., Beetke, E., & Göcke, R. (2004). Salivary analyses and caries increment over 4 years: an approach by cluster analysis. *Clinical oral investigations*, 8(3), 156-160.
- Jurczak, A., Kościelniak, D., Papież, M., Vyhouskaya, P., & Krzyściak, W. (2015). A study on β -defensin-2 and histatin-5 as a diagnostic marker of early childhood caries progression. *Biological research*, 48(1), 1-9.
- Kornman, K. S., Crane, A., Wang, H. Y., Giovine, F. S. D., Newman, M. G., Pirk, F. W., ... & Duff, G. W. (1997). The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *Journal of clinical periodontology*, 24(1), 72-77.
- Lertsirivorakul, J., Petsongkram, B., Chaiyarit, P., Klaynongsruang, S., & Pitiphat, W. (2015). Salivary lysozyme in relation to dental caries among Thai preschoolers. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 39(4), 343-347.
- Moslemi, M., Sattari, M., Kooshki, F., Fotuhi, F., Modarresi, N., Sadrabad, Z. K., & Shadkar, M. S. (2015). Relationship of salivary lactoferrin and lysozyme concentrations with early childhood caries. *Journal of dental research, dental clinics, dental prospects*, 9(2), 109.
- Nascimento, G. G., Leite, F. R. M., Conceição, D. A., Ferrua, C. P., Singh, A., & Demarco, F. F. (2016). Is there a relationship between obesity and tooth loss and edentulism? A systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews*, 17(7), 587-598.
- Oliveira, L. B., Sheiham, A., & Bönecker, M. (2008). Exploring the association of dental caries with social factors and nutritional status in Brazilian preschool children. *European journal of oral sciences*, 116(1), 37-43.
- Peters, M., Godfrey, C. M., McInerney, P., Soares, C., Khalil, H., & Parker, D. (2015). The Joanna Briggs Institute Reviewers' Manual 2015. Methodology for JBI Scoping Reviews. Adelaide: Joanna Briggs Institute, 9-10.
- Piovesan, C., Tomazoni, F., Del Fabro, J., Buzzati, B. C. S., Mendes, F. M., Antunes, J. L. F., & Ardenghi, T. M. (2014). Inequality in dental caries distribution at noncavitated and cavitated thresholds in preschool children. *Journal of public health dentistry*, 74(2), 120-126.
- Ramos-Gomez, F., Weintraub, J., Gansky, S., Hoover, C., & Featherstone, J. (2003). Bacterial, behavioral and environmental factors associated with early childhood caries. *Journal of clinical pediatric dentistry*, 26(2), 165-173.
- Rehak, N. N., Cecco, S. A., & Csako, G. (2000). Biochemical composition and electrolyte balance of "unstimulated" whole human saliva. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 38(4), 335-343.
- Ribeiro, T. R., Dria, K. J., de Carvalho, C. B. M., Monteiro, A. J., Fonteles, M. C., de Moraes Carvalho, K., & Fonteles, C. S. R. (2013). Salivary peptide profile and its association with early childhood caries. *International journal of paediatric dentistry*, 23(3), 225-234.
- Roncalli, A. G. (2011). Projeto SB Brasil 2010-pesquisa nacional de saúde bucal revela importante redução da cárie dentária no país.
- Souza, M. T., Silva, M. D., & Carvalho, R. (2010). Revisão integrativa: o que é e como fazer. *Einstein (São Paulo)*, 8(1), 102-106.
- Sun, X., Huang, X., Tan, X., Si, Y., Wang, X., Chen, F., & Zheng, S. (2016). Salivary peptidome profiling for diagnosis of severe early childhood caries. *Journal of translational medicine*, 14(1), 1-11.
- Tabak, L. A. (2006). In defense of the oral cavity: the protective role of the salivary secretions. *Pediatric dentistry*, 28(2), 110-117.
- Thylstrup, A., Bruun, C., & Holmen, L. (1994). In vivo caries models-mechanisms for caries initiation and arrestment. *Advances in dental research*, 8(2), 144-157.
- To, K. K. W., Tsang, O. T. Y., Leung, W. S., Tam, A. R., Wu, T. C., Lung, D. C., ... & Yuen, K. Y. (2020). Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(5), 565-574.
- Vitorino, R., Lobo, M. J. C., Duarte, J. R., Ferrer Correia, A. J., Domingues, P. M., & Amado, F. M. (2005). The role of salivary peptides in dental caries. *Biomedical Chromatography*, 19(3), 214-222.
- Zehetbauer, S., Wojahn, T., Hiller, K. A., Schmalz, G., & Ruhl, S. (2009). Resemblance of salivary protein profiles between children with early childhood caries and cariesfree controls. *European journal of oral sciences*, 117(4), 369-373.