



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**POTENCIAIS BIOMARCADORES SALIVARES DA CÁRIE
DENTÁRIA**

Trabalho submetido por
Teresa Joana de Jesus Alves Canadas Gomes
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

junho de 2018



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**POTENCIAIS BIOMARCADORES SALIVARES DA CÁRIE
DENTÁRIA**

Trabalho submetido por
Teresa Joana de Jesus Alves Canadas Gomes
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Professora Doutora Maria Fernanda de Mesquita

junho de 2018

DEDICATÓRIA

*Dedico esta Tese aos meus pais que
são os melhores do mundo.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora por toda a ajuda, dedicação e tempo despendido para que o resultado deste trabalho em conjunto fosse o melhor.

Aos meus pais, que são a minha maior inspiração, como profissionais na área de Medicina Dentária, mas acima de tudo como pessoas. Infinidamente grata por tudo.

À minha avó, por todo o carinho e amor.

A toda a minha família, o meu maior obrigada, por terem estado sempre presentes em todas as etapas que me trouxeram até aqui.

À melhor pessoa e colega de box que podia ter encontrado nesta caminhada, Joana.

Aos melhores amigos do mundo Joana, Alexandra, Bárbara, Beatriz, Carolina, Pedro e Sofia, por terem estado ao meu lado em todos os momentos e por fazerem parte das melhores recordações deste percurso.

A todos os meus colegas que me acompanharam nesta aventura que é apenas o início de uma aventura ainda maior.

RESUMO

A cárie dentária é a doença mais prevalente a nível mundial afetando uma grande porção da população. A cárie dentária é causada por microrganismos cariogénicos presentes no biofilme que, ao fermentarem os carboidratos provenientes da dieta, produzem ácidos. Estes ácidos baixam o pH do meio e são determinantes para o processo de desmineralização da superfície dentária. Uma deteção precoce desta doença pode tornar-se muito útil para o controlo da mesma, a fim de reduzir a sua severidade e a necessidade de recorrer a tratamentos mais invasivos, mais extensos, mais morosos e com maior custo.

A utilização da saliva como meio de diagnóstico para a cárie dentária tem sido estudada ao longo das últimas décadas. Este fluido, é uma ótima fonte de diagnóstico, uma vez que contém um grande número de biomarcadores e a sua colheita é fácil, não invasiva e de baixo custo. Através da avaliação dos biomarcadores presentes na saliva é possível obter um diagnóstico precoce e uma avaliação do risco de cárie dos doentes, podendo assim definir-se um plano de medidas preventivas e de controlo adequadas. Torna-se essencial atuar na prevenção e no controlo da cárie de forma a diminuir a sua incidência e minimizar as suas consequências.

No futuro, é crucial desenvolver métodos mais específicos e mais sensíveis, que permitam utilizar o estudo dos biomarcadores salivares de modo a obter resultados mais rigorosos. Padronizar *guidelines* e resultados é também de extrema importância pelas mesmas razões, a fim de cada vez mais se poder utilizar estes componentes salivares para avaliação do risco de cárie na prática clínica diária e conseguir ter um papel importante no diagnóstico e prognóstico da cárie dentária, permitindo assim uma intervenção nas fases mais iniciais da doença.

Palavras-chave: cárie dentária, saliva, biomarcadores, diagnóstico precoce

ABSTRACT

Dental caries is the most prevalent disease worldwide affecting a large portion of the population. Dental caries is caused by cariogenic microorganisms that are present in the biofilm which, by fermenting dietary carbohydrates, produce acids. These acids, lower the pH level and they are determinant for the process of demineralization of the tooth surface. An early detection of this disease could be very useful to control it in order to reduce its severity and the necessity for more invasive, more extent, more time consuming and more expensive treatments.

The use of saliva as a diagnostic tool for dental caries has been studied over the past decades. This fluid is a great source of diagnosis since it contains a large number of biomarkers and its collection is easy, noninvasive and not expensive. Through the evaluation of these biomarkers present in saliva, it is possible to obtain an early diagnosis and a caries risk assessment of the patients in order to define a plan of adequate preventive and management measures. It becomes essential to act in prevention and in the control of dental caries in order to reduce its incidence and minimize its consequences.

In the future, it is crucial to develop more specific and more sensitive methods, that allow the use of this salivary biomarkers study in order to obtain more rigorous results. Standardization of guidelines and results is also extremely important, for the same reasons, so that the use of these salivary components in caries risk assessment in the daily clinical practice increases and to also be able to play an important role in the diagnosis and prognostic of dental caries, allowing an intervention in the earlier stages of the disease.

Key words: dental caries, saliva, biomarkers, early diagnosis

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABELAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
1. INTRODUÇÃO	13
2. DESENVOLVIMENTO.....	15
2.1. Cárie dentária.....	15
2.1.1. Etiologia da cárie dentária	15
2.1.2. Progressão e controlo da cárie dentária	17
2.1.3. Avaliação do risco de cárie.....	18
2.2. Saliva e os seus potenciais biomarcadores na cárie dentária	22
2.2.1. Características e constituição salivar	22
2.2.2 Potenciais biomarcadores salivares da cárie dentária.....	23
2.2.2.1 Microrganismos	24
2.2.2.2 Taxa de fluxo salivar	28
2.2.2.3 pH salivar, capacidade tampão e taxa de <i>clearence</i> salivar.....	29
2.2.2.4 Proteínas salivares.....	29
2.2.2.5 Eletrólitos salivares e radicais livres.....	35
2.2.2.6 Considerações finais sobre os potenciais biomarcadores salivares e a sua associação com a cárie dentária	35
2.2.3 Funções dos biomarcadores salivares na manutenção da saúde oral: função no diagnóstico e na prevenção da cárie dentária	37
3. CONCLUSÃO.....	45
4. BIBLIOGRAFIA	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.1- Imagem ilustrativa dos diferentes nichos ecológicos presentes na cavidade oral.....	17
Fig.2- Diagrama ilustrativo dos fatores determinantes, fatores de risco e indicadores e preditores de risco que contribuem para o desenvolvimento da cárie dentária.....	21
Fig.3- Diagrama ilustrativo da diversidade e riqueza das comunidades microbianas diretamente relacionadas com o risco de cárie.	22
Fig.4- Diagrama ilustrativo dos caminhos chave da passagem de moléculas entre o sangue e a saliva	39

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I- Fatores de risco na avaliação do risco de cárie	19
Tabela II- Indicadores de risco na avaliação do risco de cárie	20
Tabela III- Potenciais biomarcadores salivares e a sua associação com a cárie dentária.....	36
Tabela IV- Vantagens dos testes salivares	41

LISTA DE ABREVIATURAS

CD14: *cluster* de diferenciação 14

FDA: *Food and Drug Administration*

IgA: Imunoglobulina A

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

IL-1 β : Interleucina beta

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

MG1: Mucina de alto peso molecular

MG2: Mucina de baixo peso molecular

MUC7: Mucina 7

NIH: *National Institutes of Health*

PRoBE: *prospective specimen collection and retrospective blinded evaluation*

sIgA: Imunoglobulina secretada

SOD: Superoxidismutase

TLR-2: Recetor tipo toll 2

TLR-4: Recetor tipo toll 4

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

UFC: Unidades formadoras de colónias

1. INTRODUÇÃO

A cárie dentária é a patologia crónica mais prevalente a nível mundial. Na maioria dos países industrializados 60 a 90% das crianças em idade escolar e quase 100% da população adulta é afetada por esta doença (Petersen, Bourgeois, Ogawa, Estupinan-Day, & Ndiaye, 2005).

A cárie dentária é caracterizada por uma destruição dos tecidos dentários, que ocorre por ação dos produtos ácidos resultantes da fermentação bacteriana dos carboidratos da dieta (Ruby, Cox, Akimoto, Meada, & Momoi, 2010). Bactérias endógenas (maioritariamente *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus*) que se encontram no biofilme, são as principais responsáveis pela produção destes ácidos. Os ácidos produzidos levam a que o pH local baixe para valores inferiores aos valores críticos resultando na desmineralização de tecido dentário (Featherstone, 2004). O processo de desmineralização consiste na dissolução dos cristais de hidroxiapatite dos tecidos dentários. Estes tecidos podem, no entanto, ser remineralizados pelo cálcio, fosfato e flúor presentes na saliva. Estes processos de desmineralização e remineralização estão constantemente a ocorrer na cavidade oral. A evolução da cárie depende do equilíbrio entre estes processos. Assim, todos os fatores que possam fazer com que a percentagem de remineralização seja superior à de desmineralização são muito importantes para a manutenção deste equilíbrio (Chen & Wang, 2010).

A saliva é considerada um indicador de saúde ou doença uma vez que, através do estudo dos seus componentes, é possível avaliar o estado fisiológico do corpo (Pink et al., 2009). Atualmente, a saliva é vista como um reservatório de um grande número de biomarcadores muito úteis nesta avaliação (C. Zhang, Cheng, Li, P. Zhang, Yi, Xu & Zhou, 2016). Por esse motivo apresenta um elevado potencial na deteção precoce e diagnóstico da doença cárie (Chen & Wang, 2010; Lee & Wong, 2009).

Os dentes encontram-se constantemente banhados por saliva, pelo que os seus constituintes representam um fator determinante quer na ocorrência quer na progressão da cárie. A saliva é, assim, tida como um dos principais fatores do hospedeiro e um mediador essencial no controlo desta doença. Muitos componentes mensuráveis da saliva podem ser utilizados como potenciais biomarcadores para a cárie dentária. Estes biomarcadores permitem estudar a previsibilidade, diagnóstico, prognóstico e controlo

da cárie dentária, bem como avaliar o resultado de determinadas terapêuticas (Gao, Jiang, Koh, & Hsu, 2016).

A interação entre microrganismos, dieta e suscetibilidade do hospedeiro determina se a cárie vai ou não ocorrer (Selwitz, Ismail, & Pitts, 2007). Atualmente as opções de tratamento da cárie dentária passam essencialmente por técnicas restauradoras que nem sempre geram os resultados mais satisfatórios, tornando-se assim essencial que haja um bom controlo da doença. Através da avaliação do risco de cárie é possível estimar a probabilidade da incidência desta doença num determinado período de tempo, assim como possíveis alterações a nível do tamanho ou atividade das lesões de cárie já existentes. Uma correta avaliação do risco de cárie permite identificar doentes de alto risco, a fim de implementar terapias preventivas e melhorar a eficácia do tratamento (Guo & Shi, 2013).

Para a elaboração deste trabalho, foi realizada pesquisa bibliográfica das publicações referentes ao tema nas bases de dados *PubMed* e *Cochrane*. As palavras-chave utilizadas foram: *dental caries*, *saliva*, *biomarkers* e *early diagnosis* com e sem a associação dos vários termos. Foram selecionados artigos publicados entre 1976 e 2018 (maioritariamente entre 2000 e 2018).

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. Cárie dentária

A cárie dentária é a doença crônica mais prevalente em todo o mundo (Gomez, 2015). Ocorre através de uma interação complexa ao longo do tempo entre bactérias produtoras de ácido, carboidratos fermentáveis e diversos fatores do hospedeiro incluindo os dentes e a saliva. Desenvolve-se nas diversas partes do dente tanto na coroa como na raiz e pode ocorrer em qualquer idade, incluindo no início da infância, manifestando-se como um agressivo deterioramento da dentição primária nas crianças (Selwitz et al., 2007).

Dois tipos de perturbações à homeostase/equilíbrio fisiológico ocorrem devido a esta interação entre os fatores que estão na origem da cárie dentária, segundo Usha e R (2009):

- alteração do equilíbrio microbiano no biofilme, levando à maturação de microrganismos cariogênicos;
- alteração da homeostase mineral entre o dente e o fluido oral devido à desmineralização do esmalte derivada do ataque ácido (Usha & R, 2009).

A cárie dentária pode ser vista de duas perspectivas. Numa perspectiva mais estrita, a cárie dentária é uma cavidade mas, na realidade, esta cavidade só aparece como consequência de uma doença. A cárie dentária é então uma doença que ocorre quando se altera o equilíbrio existente na flora oral (Grigaluskienė, Slabšinskienė, & Vasiliauskienė, 2015). O risco de cárie inclui várias questões a nível físico, ambiental, biológico, comportamental e relacionadas com o estilo de vida, como por exemplo o número de bactérias cariogênicas, inadequado fluxo salivar, exposição insuficiente ao flúor, má higiene oral e dieta inadequada. A prevenção primária deve incidir sobre os fatores de risco mais comuns. No que toca à prevenção secundária e possíveis tratamentos que possam advir, caso a prevenção primária não resulte, devem focar-se no controlo do processo de cárie ao longo do tempo, com uma abordagem minimamente invasiva e que prima pela preservação dos tecidos (Selwitz et al., 2007).

2.1.1. Etiologia da cárie dentária

A cárie dentária é uma doença na qual intervêm um grande número de bactérias. Por esta razão, não só os parâmetros qualitativos e quantitativos do biofilme são de extrema importância na sua etiologia, como também são bastante relevantes as

diferentes interações entre os microrganismos e o seu efeito sinérgico. Todos estes parâmetros devem ser avaliados aquando da formulação de um plano de diagnóstico, de tratamento e de medidas preventivas (Kleinberg, 2002).

A causa principal da cárie dentária são então os microrganismos presentes na placa. Estes formam um biofilme onde ocorre a fermentação dos carboidratos e a produção de ácidos. Estes ácidos, atingem o esmalte e a dentina, levando à destruição das fibras de colagénio e à exposição de dentina mole infetada (Ruby et al., 2010). Contudo, este fator só por si não determina a ocorrência da cárie dentária. Esta é uma doença multifatorial onde apenas a presença de placa não é fator suficiente para a sua ocorrência (Grigalauskiene et al., 2015). De acordo com a “hipótese da placa ecológica”, quando a homeostase da placa é perturbada patologicamente, começa a haver uma dominância dos microrganismos. Microrganismos potencialmente cariogénicos habitam naturalmente a placa, no entanto, em condições em que o pH é neutro, estes não conseguem dominar, ocupando apenas uma pequena parte do biofilme. Se não existirem fatores adicionais, os microrganismos cariogénicos tornam-se insignificantes, o ciclo de desmineralização-remineralização encontra-se em equilíbrio e a homeostase mantém-se. Caso este equilíbrio seja perturbado, os microrganismos acidogénicos começam a predominar. O principal fator que contribui para esta perturbação é o pH baixo na placa que ocorre devido ao frequente consumo de carboidratos fermentáveis. Como consequência ocorre desmineralização da estrutura dentária. A baixa taxa de fluxo salivar é outro fator que influencia e afeta este equilíbrio (Marsh, 2006). Os princípios da “hipótese da placa ecológica” são, segundo Marsh (2006):

- a prevalência de microrganismos patológicos está relacionada com alterações no ambiente;
- nem sempre é necessário que uma doença tenha uma etiologia específica: qualquer espécie com características apropriadas tem a capacidade de induzir o processo de doença, por exemplo: *Streptococcus mutans* é a espécie melhor adaptada para viver num ambiente cariogénico, no entanto não é a única; *Streptococcus mitis* é uma espécie que apresenta características semelhantes aos *Streptococcus mutans* e contribuiu também para a desmineralização do esmalte (Marsh, 2006).

No corpo humano coexistem um grande número de diferentes tipos de microrganismos, os quais estão relacionados com a saúde do indivíduo e, através da interação entre eles, podem induzir ou não a doença. Estes microrganismos criam comunidades e ecossistemas, têm o seu próprio genótipo e fenótipo e a tudo isto dá-se o nome de microbioma (Parahitiyawa et al., 2010). De acordo com a localização da colonização, o microbioma oral pode-se dividir em biofilme que cobre várias áreas como os dentes, a língua, a gengiva, as fissuras e sulcos e os espaços proximais (como se encontra ilustrado na figura 1) (Grigalauskienė et al., 2015). Cada um destes apresenta características diferentes dependendo dos seus nichos (características que o seu meio apresenta como o pH e a disponibilidade de nutrientes) que se encontram adaptados para determinados grupos de microrganismos conseguirem subsistir (Zarco, Vess, & Ginsburg, 2012).

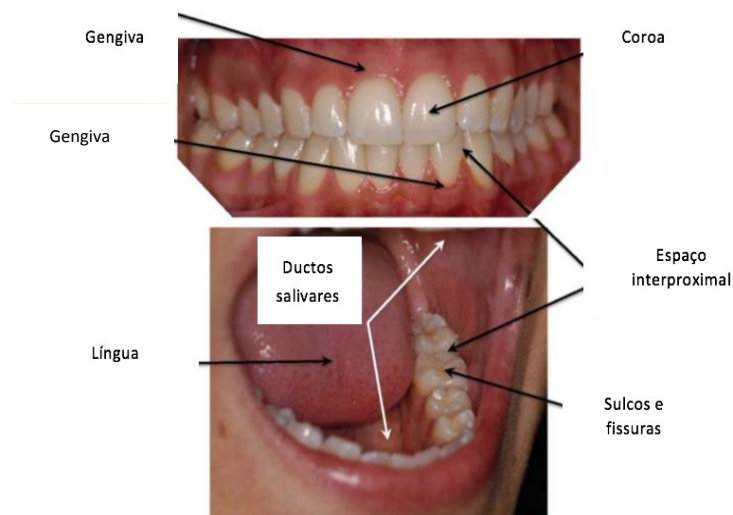


Fig.1- Imagem ilustrativa dos diferentes nichos ecológicos presentes na cavidade oral (Adaptado de Costalonga & Herzberg, 2014)

2.1.2. Progressão e controlo da cárie dentária

Uma vez que é indispensável o controlo da progressão das lesões de cárie é essencial, a fim de tentar controlar esta progressão, a deteção precoce de lesões não cavitadas e a avaliação da sua atividade. O principal objetivo é evitar a sua progressão para evitar também assim a necessidade de tratamentos mais invasivos. Para tal, torna-se essencial, segundo Grigalauskienė et al. (2015):

- diagnosticar as lesões de cárie e a sua atividade;

- avaliar o risco de cárie de cada doente;
- desenhar um plano preventivo para cada doente;
- monitorizar a atividade da cárie (Grigaluskienė et al., 2015).

Todos estes parâmetros, acima enunciados, ainda não são totalmente realizados por todos os clínicos uma vez que a maioria os toma como demasiado morosos. Por esta razão, a maioria dos clínicos foca-se em tratar as consequências da doença e não a doença em si. No entanto, uma vez que o objetivo futuro passa por avançar para um aumento das abordagens menos invasivas, estes pontos são de extrema importância e não devem ser descartados (Grigaluskienė et al., 2015).

2.1.3. Avaliação do risco de cárie

A avaliação do risco de cárie refere-se ao processo de verificação da probabilidade de um determinado doente desenvolver uma lesão ao nível da estrutura dentária, quer a nível do esmalte ou da dentina num futuro próximo (Twetman, Fontana, & Featherstone, 2013). Refere-se também à avaliação da probabilidade de lesões já existentes continuarem a estabelecer-se e desenvolver-se em tamanho e atividade (Fontana & Zero, 2006).

Como já foi referido, a cárie ao ser uma doença multifatorial, requer um modelo de controlo muito complexo onde os doentes de risco são identificados, os fatores de risco que são responsáveis pela doença são eliminados/reduzidos e são tomadas medidas que têm em vista a prevenção de um futuro desenvolvimento da doença (Usha, 2018).

O objetivo de avaliar o risco de cárie passa por, segundo Fontana e Zero (2006) e Young e Featherstone (2010):

- identificar os fatores de risco ou a combinação dos fatores responsáveis por causar a cárie dentária (como os identificados na tabela I e figura 2);
- identificar indicadores de risco que influenciam um determinado doente e o prognóstico da lesão (como os identificados na tabela II e figura 2);
- planear estratégias de prevenção centradas no doente com base nos fatores de risco e preditores de risco;
- planear decisões de tratamento com base no risco, atividade e prognóstico;
- decidir se são necessários procedimentos de diagnóstico adicionais;

- decidir a frequência de visitas futuras ao consultório por parte de cada doente e do tipo de procedimento a realizar nessas visitas (Fontana & Zero, 2006; Young & Featherstone, 2010).

O estudo de todos estes pontos é muito importante a fim de se conseguir desenvolver um plano individual para cada doente que englobe a prevenção, o diagnóstico, o tratamento e a frequência das visitas ao consultório. Os biomarcadores salivares, como será descrito mais à frente, são muito úteis para a elaboração deste plano individual, uma vez que fornecem características do estado de saúde oral de cada indivíduo (Fontana & Zero, 2006; Young & Featherstone, 2010).

Tabela I - Fatores de risco na avaliação do risco de cárie (Adaptado de Usha, 2018)

MICROFLORA CARIOGÉNICA	Placa/pH Contagem de <i>Streptococcus mutans</i> e <i>Lactobacillus</i> na saliva estimulada
DIETA	Consumo de açúcar na dieta Quantidade/frequência de consumo Dieta equilibrada Medicamentos que contêm açúcar
DENTE	Morfologia dentária suscetível Dentes recentemente erupcionados Presença/ausência de sulcos profundos (figura 3) e selantes de fissura
SALIVA	Fluxo salivar/capacidade tampão/pH/viscosidade Medicação/doença ou tratamentos das glândulas salivares/quimioterapia/radioterapia que alterem o fluxo salivar
EXPOSIÇÃO AO FLÚOR OU OUTROS AGENTES PROTETORES	Comunidade fluoretada Pasta dentífrica fluoretada Frequência de escovagem/dosagem de flúor Elixir fluoretado/fluoretos tópicos

<p>EXPOSIÇÃO AO FLÚOR OU OUTROS AGENTES PROTETORES (continuação)</p>	<p>Pastas dentífricas que contenham fosfato de cálcio Elixir antibacteriano/aplicação tópica Pastilhas elásticas à base de xilitol</p>
---	--

Tabela II - Indicadores de risco na avaliação do risco de cárie (Adaptado de Usha, 2018)

<p>INDICADORES CLÍNICOS</p>	<p>Lesões de cárie ativas cavitadas/lesões brancas (detetáveis visualmente ou radiograficamente) Extrações prematuras por lesão de cárie Restaurações múltiplas por lesão de cárie Cáries nos dentes anteriores, superfícies proximais e superfícies lisas que usualmente não são locais comuns para o desenvolvimento de cárie Índice de higiene oral (placa/cálculo e índice de hemorragia gengival) História de repetidas restaurações Restaurações defeituosas (debordantes/margem aberta/contacto aberto) Tratamento ortodôntico Próteses parciais fixas Exposição das superfícies radiculares</p>
<p>ESTATUTO SOCIOECONÓMICO</p>	<p>Privação social Educação Estatuto económico História familiar de cáries em irmãos</p>
<p>SAÚDE GERAL</p>	<p>Doentes medicamente comprometidos (problemas de saúde mental/física)</p>

ATITUDE	<p>Consciência dentária</p> <p>Motivação em relação aos cuidados de saúde oral</p> <p>Visitas irregulares à clínica dentária</p>
HÁBITOS DE VIDA	<p>Consumo de snacks/doces entre as refeições</p> <p>Horas de trabalho irregulares</p> <p>Tabagismo/álcool/uso de drogas</p> <p>Pastilhas elásticas à base de açúcar/refrescantes da cavidade oral/pastilhas</p>



Fig. 2 - Diagrama ilustrativo dos fatores determinantes, fatores de risco e indicadores e preditores de risco que contribuem para o desenvolvimento da cárie dentária (Adaptado de Usha, 2018)

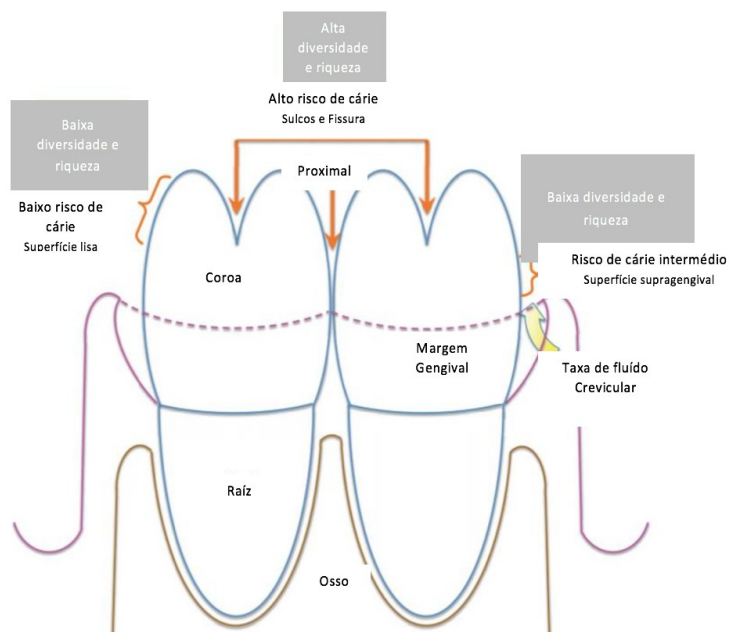


Fig. 3- Diagrama ilustrativo da diversidade e riqueza das comunidades microbianas diretamente relacionadas com o risco de cárie (Adaptado de Costalonga & Herzberg, 2014)

2.2. Saliva e os seus potenciais biomarcadores na cárie dentária

2.2.1. Características e constituição salivar

A saliva, apresenta-se como uma solução hipotónica. Cerca de 90% da saliva é segregada a partir das glândulas salivares. As glândulas salivares major são a parótida, submandibular e sublingual. As glândulas salivares com alta permeabilidade encontram-se circundadas por um grande número de capilares, sangue e ácidos e conseguem fazer trocas moleculares, possibilitando a passagem das moléculas para a saliva, passando estas a fazer parte da sua composição (Zhang et al., 2016).

A saliva é um líquido sem cor, sem odor e tem uma densidade relativa entre os 1.004-1.009 e o seu pH varia entre 6.6 e 7.1. Normalmente um indivíduo produz cerca de 600 ml de saliva por dia. A constituição da saliva é feita por 99% de água e o restante 1% envolve moléculas orgânicas como a amilase salivar, mucopolissacáridos, mucina e lisozimas e alguma matéria inorgânica como o flúor e o cálcio. Inclui ainda na sua composição, ureia, amónia, ácido úrico, glucose, colesterol, ácidos gordos, triglicéridos, lípidos neutros, glicolípidos, aminoácidos, hormonas esteroides, lectina, glicoproteínas,

peroxidase e lactoferrina. Para além destes elementos, a saliva contém ainda mais de 700 microrganismos que se encontram relacionados com doenças orais e sistémicas (Zhang et al., 2016). Muitos dos componentes presentes na saliva que podem ser medidos como a concentração de eletrólitos, microrganismos, pH, capacidade tampão, taxa de fluxo salivar e proteínas salivares são utilizados como biomarcadores, como será descrito mais pormenorizadamente em seguida, que nos dão indicações da probabilidade que a doença cárie tem de se instalar e desenvolver (Gao et al., 2016).

2.2.2 Potenciais biomarcadores salivares da cárie dentária

De acordo com o *National Institutes of Health* (NIH), um biomarcador é um indicador, que pode ser objetivamente mensurado e avaliado, dos processos biológicos normais, dos processos patológicos e das respostas farmacológicas a intervenções terapêuticas. Os biomarcadores existem numa variedade de formas, incluindo anticorpos, microrganismos, ácidos nucleicos, lípidos, metabolitos e proteínas. Alterações nas suas concentrações podem ser associadas à instalação, progressão ou até mesmo regressão de uma doença em particular ou da resposta que o corpo dá a essa mesma doença. A utilização clínica de qualquer biomarcador ou conjunto de biomarcadores utilizados para avaliar o risco ou prognóstico de uma determinada doença é uma caminhada árdua, sujeita a muito escrutínio. Potenciais biomarcadores descobertos são sujeitos a avaliações extensas, incluindo validações pré-clínicas e académicas, antecedendo a avaliação e aprovação por parte do *Food and Drug Administration* (FDA) (Yoshizawa et al., 2013).

Para reforçar a significância, estudos de *Prospective specimen collection and retrospective blinded evaluation* (PRoBE) foram desenhados e implementados. Os protocolos, que pedem estas colheitas prospetivas e análises prévias ao diagnóstico, requerem grandes populações de doentes e a aquisição e categorização das suas amostras e informações clínicas. Cada amostra é avaliada para determinar a especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade dos biomarcadores em questão. Avaliações mais profundas, exploram a capacidade de detetar e medir corretamente os marcadores em concentrações relativamente baixas (Yoshizawa et al., 2013). Por fim, para um biomarcador ser utilizado num ensaio clínico, é necessário respeitar os seguintes pontos, segundo Bonassi, Neri e Puntoni (2001):

1. Durante os testes pré-clínicos, os biomarcadores devem ser desenvolvidos usando amostras dos doentes e confirmados com os níveis *in vitro* ou *in vivo*.
2. Durante as análises de viabilidade, os biomarcadores devem ser testados usando pequenas subpopulações de indivíduos para demonstrar a sua capacidade, através da análise das suas concentrações (que indiquem a sua maior presença ou ausência), de discriminar entre o conceito doença e saúde.
3. Durante o processo de validação os biomarcadores devem ser avaliados de forma rigorosa.
4. Análises estatísticas devem ser feitas para avaliar a precisão discriminatória dos biomarcadores em grandes populações de doentes.
5. Após a validação de um biomarcador, devem ser feitos esforços para investigar as suas funções bioquímicas respetivas. Perceber a relevância dos biomarcadores providencia não só informação relativa à patogénese da doença e à sua progressão, assim como suporta a sua posição como avaliadores de saúde (Bonassi et al., 2001).

Como já foi referido, muitos dos componentes mensuráveis da saliva podem ser potenciais biomarcadores da cárie dentária. Estes biomarcadores que se encontram descritos em seguida podem então ser utilizados para a previsão, diagnóstico, prognóstico e para o desenvolvimento de técnicas e estratégias de controlo da cárie dentária, assim como para avaliação de resultados de terapêuticas que possam ter sido implementadas (Gao et al., 2016).

2.2.2.1 Microrganismos

Um fator etiológico primário da cárie dentária é a produção de ácido a partir dos carboidratos presentes na dieta pelas bactérias presentes na saliva e na placa. Bactérias potencialmente cariogénicas estão normalmente presentes em quantidades relativamente pequenas na saliva. No entanto, quando se verificam perturbações biológicas e ambientais, como por exemplo o aumento da frequência do consumo de carboidratos fermentáveis, as condições proporcionadas pela baixa do pH favorecem a proliferação de bactérias tolerantes ao ácido. Quando as bactérias cariogénicas passam a dominar a saliva e a placa, são produzidas maiores quantidades de ácidos e a um ritmo mais

rápido, aumentando então assim a prevalência destas bactérias cariogênicas (Marsh, 2003).

Os *Streptococcus*, como os *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) são as espécies associadas à cárie mais prevalentes nos humanos. Estas espécies caracterizam-se pela capacidade de sintetizarem os polissacáridos da sacarose o que contribui para a sua firme ligação ao dente promovendo assim um apertado agrupamento celular, rápida fermentação dos carboidratos em ácidos e capacidade de tolerarem baixos níveis de pH (Banas, 2004; Tanzer, Livingston, & Thompson, 2001).

Há uma prevalência consideravelmente maior de *S. mutans* em sujeitos que apresentam cáries do que em sujeitos que não as apresentam (Marsh, 2003). Os *S. mutans* encontram-se normalmente associados à iniciação e progressão da cárie dentária e são considerados o principal agente para o aparecimento da cárie dentária em humanos. A sua prevalência varia entre 70 a 100% (Loesche, 1986).

Os *Lactobacillus* contribuem também bastante para a cárie dentária, segundo Aas et al. (2008) não havendo, no entanto, relação identificada entre estes e o início da cárie dentária, sendo sobretudo identificados em lesões de cárie pré-estabelecidas. Há também evidência que sugere uma relação entre *Actinomyces* spp. e o aparecimento de cáries nas superfícies radiculares (van Houte, 1994).

A presença de *Candida* na cavidade oral encontra-se correlacionada com má higiene oral e alto consumo de carboidratos, tendo mais recentemente sido associada à cárie dentária (de Carvalho, Silva, Hebling, L. Spolidorio, & D. Spolidorio, 2006). O seu potencial cariogénico provem do facto desta espécie exibir propriedades acidogénicas especialmente na presença de carboidratos (Klinke et al., 2009). Alguns estudos demonstraram que sujeitos que tinham presentes lesões de cárie ativas apresentavam maior frequência de *Candida* do que indivíduos que não as apresentavam. Estes estudos mostraram também uma correlação entre *Candida* e o aumento de cárie a um ano (Russell, MacFarlane, Aitchison, Stephen, & Burchell, 1991).

Assim sendo, apesar dos *Streptococcus mutans* serem a espécie primariamente implicada no surgimento da cárie dentária, outros microrganismos não *mutans* contribuem também para a doença (Guo & Shi, 2013).

Níveis de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* na saliva

Um estudo resumiu cerca de 981 artigos que avaliavam a associação de *Streptococcus mutans* e a presença de cáries em crianças em idade pré-escolar. Concluíram que, a presença de *S.mutans* na saliva de crianças que não tinham cáries, parece estar associada com um aumento do risco de surgimento de cárie (Thenisch, Bachmann, Imfeld, Leisebach Minder, & Steurer, 2006).

No que toca à relação entre o aparecimento de cáries precocemente na infância e a presença de *S.mutans*, foi também feita uma revisão sistemática onde se concluiu, corroborando os outros resultados, que a presença de *S.mutans* na saliva é um forte indicador de risco para o desenvolvimento de cáries na infância (Parisotto, Steiner-Oliveira, Silva, Rodrigues, & Nobre-dos-Santos, 2010). Sujeitos com restaurações em várias superfícies apresentavam níveis significativamente superiores de *S.mutans* na saliva e um potencial para uma continuidade da atividade da cárie quando comparados com os que não apresentavam qualquer tipo de restaurações e que estavam livres de cárie (Powell, Leroux, Martin, & White, 2000).

Em relação aos *Lactobacillus*, estes não apresentam um papel significativo na iniciação do processo de cárie, no entanto, quando a lesão está estabelecida, as suas proporções aumentam estando então relacionados com a progressão da cárie (Van Houte, 1993).

Em relação aos valores que se podem entender como valores elevados da presença de *S. mutans*, estes dependem das características dentárias de cada indivíduo. Foi proposto por Krasse e Fure (1994) que valores de *S. mutans* na ordem de 10^6 unidades formadoras de colónias (UFC)/ml podiam ser considerados valores altos em pessoas com poucos dentes ou sem nenhuma restauração, no entanto 10^6 UFC/ml pode não ser considerado um valor extremamente alto numa pessoa que tenha um grande número de restaurações. No que se refere aos *Lactobacillus*, contagens de 10^4 UFC/ml na saliva são considerados valores baixos. Valores altos consideram-se aqueles iguais ou superiores a 10^6 UFC/ml na saliva (Krasse & Fure, 1994).

Foram feitos variados estudos relativos a estes microrganismos, nomeadamente relativos à sensibilidade e especificidade. A sensibilidade entende-se como a probabilidade que indivíduos que apresentam cáries ativas tenham valores elevados de *S. mutans* ou *Lactobacillus* e a especificidade define-se como a probabilidade que indivíduos sem cáries ou com baixa incidência de cárie tenham valores também eles baixos destas espécies. No que toca à sensibilidade, os valores variaram entre 44 e 71%.

No que toca à especificidade, os valores obtidos foram mais elevados com percentagens que variavam entre os 56 e os 100% (Krasse, 1988; Pienihäkkinen, 1988). Estes resultados sugerem que estas contagens, em termos de previsibilidade, apresentam um valor mais elevado para a especificidade do que para a sensibilidade. Isto significa que são melhores para selecionarem pessoas que não irão desenvolver a doença cárie do que para identificarem pessoas que a irão desenvolver. Tendo em conta que a cárie é uma doença multifatorial, esta previsibilidade de risco deve aumentar quando outros fatores relevantes, como por exemplo uma experiência passada de cárie, estiverem incluídos (Tamaki et al., 2009).

Apesar destes não poderem ser os únicos valores a ter em conta, Larmas (1992) e Messer (2000) sugeriram que:

- Testes relativos ao *S.mutans* deveriam ser utilizados para:
 - demonstrar a presença de infeção cariogénica;
 - avaliar a eficácia dos bochechos com colutórios terapêuticos e
 - providenciar uma medida objetiva para avaliar os resultados dos tratamentos.
- Testes relativos aos *Lactobacillus* deveriam ser utilizados para:
 - planejar os intervalos em que os doentes devem visitar o consultório;
 - avaliar o consumo da sacarose e
 - avaliar indivíduos comprometidos a nível da saúde e indivíduos com lesões de cárie ou com bandas ortodônticas (Larmas, 1992; Messer, 2000).

Níveis de outras bactérias salivares associadas à cárie

Relativamente à correlação entre níveis salivares de *Streptococcus* não *mutans* ou *Actinomyces* spp. e a sua contribuição para a iniciação e progressão da cárie ainda não há resultados que evidenciem que é possível fazer uma associação inequívoca entre estas espécies e o desenvolvimento da doença (Guo & Shi, 2013).

O papel das leveduras salivares no risco de cárie também ainda não foi suficientemente estudado, no entanto, estes organismos podem contribuir para a produção acídica microbiana geral (Klinke et al., 2009). Produção acídica esta que contribui para a progressão da cárie. Um dos exemplos desta associação é entre o aumento do número de cáries e a presença de *Candida* na saliva que pode ser observada

em crianças. Sugere-se então que, determinados níveis salivares de leveduras podem ser utilizados como fator de previsibilidade em crianças, ou seja, podemos concluir que há alguma relação entre a presença de leveduras e o risco aumentado de cárie. (Larmas, 1992).

Avaliação do risco de cárie através da análise dos níveis de bactérias cariogénicas na saliva

Foram identificadas mais de 700 espécies microbianas presentes na constituição da flora oral fazendo desta uma das mais complexas comunidades microbianas presentes em todo o corpo (Zhang et al., 2016).

A saliva atua como um fluido que facilita a circulação das bactérias, sendo também um reservatório para a colonização destas que vão utilizar os constituintes presentes na saliva para conseguirem subsistir (Greenstein & Lamster, 1997). Há cerca de 10^8 to 10^9 UFC/ml de microrganismos orais presentes na saliva (Loesche, 1986). Estas espécies refletem a composição da comunidade microbiana oral servindo assim de biomarcadores que indicam o estado de saúde ou doença da cavidade oral. A saliva consegue, através da sua capacidade de *clearence*, fazer com que as próprias bactérias possam ser removidas da placa (Lee, Li, & Bowden, 1996). Estudos anteriores mostraram uma correlação significativa entre a concentração salivar de *Streptococcus mutans* e a sua proporção na placa (Larmas, 1992; Van Houte, 1993). Os níveis de espécies cariogénicas na saliva têm sido alvo de investigação como um potencial biomarcador útil para a avaliação do risco de cárie (Van Houte, 1993).

2.2.2.2 Taxa de fluxo salivar

O tempo de *clearence* salivar é muito menor do que o tempo que as células bacterianas precisam para se dividir. Assim, as bactérias não conseguem sobreviver na boca a não ser que tenham capacidade de se ligar aos dentes e à mucosa oral (Dawes, 2003). Na cavidade oral encontramos um equilíbrio entre o número de bactérias livres e o número de bactérias que se encontram ligadas aos dentes ou às células epiteliais orais. Um baixo nível de fluxo salivar é então considerado um fator de risco para a incidência das cáries, sendo por isso utilizado como biomarcador (Pedersen et al., 1999). As alterações mais comuns no fluxo salivar estão relacionadas com uma secreção reduzida que pode ser influenciada, segundo Meurman e Rantonen (1994) por fatores como:

- medicação;

- alterações patológicas nas glândulas salivares;
- idade (Meurman & Rantonen 1994).

Em relação à taxa de fluxo salivar, os valores de risco diferem caso estejamos a referir-nos a saliva estimulada ou não estimulada, sendo considerado um fator de risco quando:

- a saliva não estimulada apresenta um fluxo inferior a 0.30 ml/min (Fenoll-Palomares et al., 2004)
- a saliva estimulada apresenta um fluxo inferior a 0.70 ml/min (Silla & Company, 2013)

2.2.2.3 pH salivar, capacidade tampão e taxa de *clearence* salivar

Vários estudos mostram que se verifica maior quantidade e níveis mais rápidos de produção de ácidos (que baixam o pH salivar) em indivíduos que apresentam lesões de cárie ativas do que em indivíduos que não apresentam qualquer tipo de lesão de cárie (Loesche, 1986).

A capacidade tampão é definida como a resistência às alterações do pH. Há evidência de que a capacidade tampão consegue proteger os dentes da cárie dentária, impedindo que o pH salivar baixe para valores críticos (Leone & Oppenheim, 2001). Considera-se um valor crítico de pH quando este é inferior a 5.5 (Ferrer & Jiménez, 2013). Baixa capacidade tampão está por isso associada ao desenvolvimento de cárie devido à impossibilidade de neutralização dos ácidos da placa e reduzida remineralização de lesões iniciais que afetam o esmalte (Tukia-Kulmala & Tenovu, 1993). Foi demonstrada então uma relação direta entre o baixo nível de cáries e uma alta capacidade tampão, podendo então ser utilizado como biomarcador para a avaliação do risco de cárie. Indivíduos que apresentam uma elevada capacidade tampão são normalmente resistentes à cárie (Larmas, 1992).

Em relação à taxa de *clearence* salivar, não há uma associação significativa com a incidência da cárie dentária, não havendo evidência que suporte esta taxa como um biomarcador valioso para o risco de cárie (Gao et al., 2016).

2.2.2.4 Proteínas salivares

Alguns estudos não encontraram diferença nos níveis de proteínas salivares entre adultos que não apresentavam lesões de cárie ou aqueles que apresentavam lesões de

cárie ativas. No entanto, noutros estudos foi possível observar que num grupo que apresentava cáries de rampante (cáries com início agressivo e evolução rápida), se verificava uma redução significativa do nível salivar de proteínas básicas e um aumento significativo de amilase comparando com um grupo que não apresentava qualquer tipo de cárie. Verificou-se também que, as proteínas salivares de indivíduos que apresentam lesões de cárie ativas tinham maior capacidade de suportarem o crescimento de *S. mutans* do que comparando com as proteínas salivares oriundas de indivíduos que não as apresentavam (Guo & Shi, 2013).

Imunoglobulinas

As imunoglobulinas presentes na saliva pertencem maioritariamente à subclasse das imunoglobulinas A (IgA) (>85%) e, em menor escala, às subclasses das imunoglobulinas G (IgG) e imunoglobulinas M (IgM) (van Nieuw Amerongen, Bolscher & Veerman, 2004). As imunoglobulinas, representam no seu conjunto, 5-15% do total de proteínas salivares. O seu papel antibacteriano passa pelo facto destas interferirem com a aderência da flora microbiana à superfície dentária, pela inibição do metabolismo bacteriano assim como pela neutralização das toxinas bacterianas e das enzimas e aglutinação de bactérias (van Nieuw Amerongen et al., 2004).

Com base na reunião dos resultados dos estudos que têm sido realizados nos últimos anos, não é possível estabelecer uma relação direta entre as imunoglobulinas salivares e a cárie dentária. É necessário encontrar evidência mais clara que dê valor às imunoglobulinas como biomarcadores da cárie (Gao et al., 2016).

Outras proteínas e péptidos de defesa do hospedeiro

Na constituição da saliva estão presentes um grande número de proteínas e péptidos em concentrações variáveis. Estas apresentam propriedades antibacterianas e/ou antifúngicas *in vitro* e podem contribuir para o sistema de defesa do hospedeiro (Mungia, Cano, Johnson, Dang, & Brown, 2008). Os seus mecanismos de defesa passam pela inibição da aderência, metabolismo e viabilidade dos microrganismos cariogénicos e promoção da agregação, eliminando assim bactérias. Estas proteínas serão descritas em seguida (Scannapieco, 1994; van Nieuw Amerongen et al., 2004).

Citoquinas

As bactérias colonizam a cavidade oral e originam processos inflamatórios. Estas lesões induzem respostas imunes inatas e adaptativas por parte do hospedeiro (Featherstone, 2004). Na resposta inata, há uma ativação das respostas inflamatórias com a liberação de citocinas como IL-1 β (interleucina 1 beta), IL-6 (interleucina 6), IL-8 (interleucina 8), e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), que desempenham um papel importante na imunidade da cavidade oral. Verificou-se que os níveis destas moléculas se encontravam mais elevados em pacientes com cárie, podendo então serem biomarcadores úteis para o diagnóstico e monitorização da cárie dentária (Gornowicz et al., 2012).

Recetores tipo toll

Estes recetores são proteínas capazes de reconhecer agentes patogénicos. Ao reconhecerem estes agentes patogénicos, induzem respostas de defesa do organismo. Dois dos recetores tipo toll mais comuns são TLR-2 (recetor tipo toll 2) e TLR-4 (recetor tipo toll 4). Estes reconhecem o peptidoglicano das bactérias gram positivas e o lipopolissacárido das bactérias gram negativas. São capazes de fazer este reconhecimento dos microrganismos patogénicos sozinhos, ou associados a um co-recetor como é o caso do CD14 (*cluster* de diferenciação 14). Existe então associação entre estes e a cárie dentária, uma vez que é possível verificar-se a presença de um maior número destes recetores ou co-recetores na saliva em indivíduos que apresentam lesões de cárie (Zhao, Blackburn, Chin, & Srinivasan, 2014).

Proteínas acídicas ricas em prolina

Estas proteínas ricas em prolina são uma classe de proteínas não estruturadas intrinsecamente que contêm várias repetições de uma sequência curta rica em prolina. Proteínas ricas em prolina podem ser divididas em famílias acídicas ou básicas. Na família acídica, as proteínas contêm um domínio N-terminal com 30 aminoácidos que é rico em aspartato e glutamato. Este domínio adere firmemente às superfícies dentárias recentemente limpas e expõe um local de ligação para as bactérias no domínio C-terminal (Levine, 2011). As proteínas acídicas ricas em prolina constituem cerca de 25 a 30% de todas as proteínas salivares e desempenham um papel muito importante na formação da película aderida e influenciam a colonização microbiana inicial na

superfície dentária podendo então consequentemente afetar a composição microbiana da placa (Ashby, 2008).

Um grande número de estudos apoia a associação entre o baixo número ou a ausência de proteínas acídicas ricas em prolina e a alta taxa de lesões de cárie (Tandon, Satyamoorthy, & Bhalla, 2010).

Glicoproteínas mucosas

As mucinas salivares, constituinte muito importante presente na cavidade oral, apresentam-se como uma família constituída por dois membros. As mucinas de alto peso molecular (MG1) e as mucinas de baixo peso molecular (MG2). (Amerongen & Veerman, 2002) As mucinas ao interagirem com os *Streptococcus*, promovem a sua aglutinação e aceleram assim a *clearence* de bactérias da cavidade oral (Levine et al., 1978). Como componentes major da película adquirida, as mucinas também interagem com os tecidos duros dentários, influenciando a adesão de bactérias específicas à superfície dentária afetando assim a composição microbiana (Slomiany, Murty, Piotrowski, & Slomiany, 1996). A mucina 7 (MUC7), uma das mucinas mais predominantes na saliva, interage com os *Streptococcus* de forma a promover a sua aglutinação (Levine et al., 1978). Baixos níveis de MUC7 foram fortemente associados a elevadas concentrações de *S.mutans*, o que corrobora a possibilidade que níveis muito baixos de MUC7 podem ser úteis na avaliação do risco de cárie em adultos numa idade mais avançada (Baughan, Robertello, Sarrett, P.A. Denny, & P.C. Denny, 2000).

O efeito protetor das mucinas foi suportado por estudos que revelaram que altas concentrações de *S.mutans* se encontravam associadas a níveis reduzidos de mucinas (Baughan et al., 2000; Mungia et al., 2008). No entanto, houve também um estudo que não revelou qualquer correlação entre os níveis de mucinas e a prevalência da cárie. (Tandon et al., 2010).

Aglutininas

As aglutininas salivares são glicoproteínas mucina-like que são responsáveis por mediar a agregação de muitas bactérias orais *in vitro*. Interação com bactérias que não se encontram ligadas promovendo a sua agregação fazendo com que sejam mais facilmente eliminadas da cavidade oral (Tenovuo, Jentsch, Soukka, & Karhuvaara, 1992).

Embora exista evidência entre estas e a cárie há muito poucos estudos epidemiológicos feitos acerca deste assunto devido à baixa concentração destas proteínas na saliva (Gao et al., 2016).

Amílase

A alfa-amílase é a enzima salivar mais abundante e representa cerca de 40 a 50% das proteínas salivares produzidas pelas glândulas. Apresenta várias funções biológicas que podem permitir ou inibir a ocorrência da cárie dentária (Scannapieco, Torres, & Levine, 1993).

A amílase é encontrada na película adquirida e tem a capacidade de modular a adesão de bactérias. A ligação da amílase às bactérias da placa facilita a hidrólise do amido presente na dieta que produz glucose utilizada para o metabolismo dos microrganismos da placa que se encontram perto da superfície dentária. A amílase pode também ligar-se com grande afinidade a determinados grupos de *Streptococcus* e contribuir para a *clearence* bacteriana. Os estudos feitos em relação a esta enzima são bastante contraditórios. Alguns mostram relação entre o número de dentes com cárie, perdidos ou obturados e a presença da amílase na saliva e na película (Vitorino et al., 2006). Outros estudos mostram exatamente o contrário, em que a amílase se encontra negativamente correlacionada com a perda de mineral mostrando um efeito protetor da amílase contra as cáries (Bardow et al., 2005).

Lactoferrina e lisozima

A lactoferrina apresenta atividade bacteriostática, bactericida, fungicida, antivírica e anti-inflamatória e a lisozima consegue ativar a autólise bacteriana e a destruição das paredes celulares. Os resultados são mais uma vez contraditórios. Num estudo foi encontrada uma correlação positiva entre o número de dentes cariados, perdidos ou obturados e a quantidade de lactoferrina na saliva e película (Vitorino et al., 2006). Num outro estudo foi sugerida uma relação entre o baixo número de lesões de cárie e um baixo número de lactoferrina e lisozima na saliva não estimulada (Jentsch, Beetke & Göcke, 2004).

Péptidos antimicrobianos

Estes péptidos são componentes essenciais da imunidade inata, participando na primeira linha de defesa contribuindo para a resistência à cárie dentária (Gao et al., 2016).

Aminoácidos livres

Estes aminoácidos podem ser potenciais substratos metabólicos para a microflora ou produtos do metabolismo dos microrganismos. Algumas destas moléculas desempenham um papel essencial no processo da cárie. Foram identificados cerca de 40 aminoácidos livres presentes na saliva e um estudo descobriu ainda que a glicina livre reduz o risco de cárie dentária enquanto que a prolina aumenta esse risco (Fonteles et al., 2009). Noutro estudo, os níveis de arginina e lisina livres foram significativamente maiores em adultos que não apresentavam lesões de cárie do que em indivíduos que tinham elevada suscetibilidade para a cárie dentária. Não havia também correlação entre os níveis destes aminoácidos e o número de dentes cariados, perdidos e obturados dentro do grupo suscetível à cárie (VanWuyckhuysse et al., 1995).

Nível total de proteínas

Tanto um número aumentado, segundo Preethi, Reshma e Anand (2010), como reduzido, segundo Bardow et al. (2005) do nível de proteínas total foram encontrados em sujeitos que apresentavam lesões de cárie ativas (Preethi et al., 2010; Bardow et al., 2005). Os valores médios de proteínas totais aparentam ser similares entre crianças com ou sem lesões de cárie ativas (Gonçalves de Farias & Barreto Bezerra, 2003). Uma revisão sistemática recente não encontrou relação entre a cárie dentária e as proteínas salivares relativamente à concentração total de proteínas e ao peso molecular dessas proteínas (Martins, Buczynski, Maia, Siqueira, & Castro, 2013).

Proteínas e péptidos com efeitos no fosfato de cálcio

Muitas proteínas como a estaterina e proteínas ricas em prolina apresentam propriedades multifuncionais na regulação do risco de cárie (Gibbons, Hay, & Schlesinger, 1991). Para além do seu efeito antimicrobiano, elas são também capazes de inibir a precipitação espontânea dos sais de fosfato de cálcio e manter um estado supersaturado de hidroxiapatite salivar (Gibbons et al., 1991). Com este mecanismo,

elas desempenham um papel essencial na reparação e proteção do ambiente, sendo um fator importantíssimo na manutenção da integridade dentária (Gao et al., 2016).

2.2.2.5 Eletrólitos salivares e radicais livres

Dos vários eletrólitos presentes na saliva o flúor, o cálcio e o bicarbonato apresentam um papel muito importante na proteção dos dentes contra a cárie. O bicarbonato, com o seu efeito tampão, é o agente mais determinante para a neutralização dos ácidos (Dawes, 2008). Os íons flúor, cálcio e fosfato, mantêm a saliva supersaturada no que respeita à hidroxiapatite e oferecem um ambiente reparador e protetor para a manutenção dos tecidos dentários (García-Godoy & Hicks, 2008). No que concerne ao flúor, apesar da grande evidência dos seus efeitos anti-cariogénicos quando os agentes fluoretados são aplicados topicamente, a influência do flúor que está presente naturalmente na saliva (normalmente a sua presença é inferior a 1 micromol/l) no seu efeito contra as cáries permanece incerta (Gao et al., 2016).

Em relação aos radicais livres, a sua presença na saliva sofre alterações de acordo com a atividade da cárie dentária. Estes radicais são muito instáveis e reagem rapidamente com outros compostos para conseguirem ganhar estabilidade. Os antioxidantes são capazes de neutralizar estes radicais livres. A capacidade antioxidante aumenta com o aumento da atividade da cárie. A superoxidismutase (SOD) é uma enzima antioxidante que age contra estes radicais livres, catalisando a dismutação do superóxido em oxigénio e peróxido de hidrogénio. Esta ação da superoxidismutase vem acompanhada pelos seus co-fatores, o cobre e o zinco. Em adultos que apresentam lesões de cárie ativas, há um aumento da atividade da SOD, quando comparado com aqueles que não apresentam qualquer cárie, indicando a sua associação com a cárie dentária (M. Hegde, N. Hegde, Ashok & Shetty, 2014).

2.2.2.6 Considerações finais sobre os potenciais biomarcadores salivares e a sua associação com a cárie dentária

Os biomarcadores salivares apresentam um papel potencialmente importante tanto a nível do diagnóstico como do controlo da cárie dentária. No entanto, como é possível ver na tabela III, a associação entre muitos destes biomarcadores e a cárie dentária ainda não foi totalmente estabelecida. A maioria da evidência destas relações entre os biomarcadores e a cárie dentária não é consensual, fazendo com que a maioria dos parâmetros apresente uma evidência limitada. Nenhum dos parâmetros salivares

identificados até então é capaz de selecionar doentes que são suscetíveis à cárie dentária com alta sensibilidade e especificidade, sendo necessário então a conjugação de vários elementos e não de apenas um isolado (Gao et al., 2016). O estudo destes biomarcadores necessita de ser aprofundado, precisando de maior validação de modo a que a evidência aumente e que seja possível estabelecer uma relação mais direta entre cada biomarcador, as suas concentrações e a relação que as suas variações têm com a cárie dentária (Pfaffe, Cooper-White, Beyerlein, Kostner, & Punyadeera, 2011).

Tabela III- Potenciais biomarcadores salivares e a sua associação com a cárie dentária (Adaptado de Gao et al., 2016)

POTENCIAIS BIOMARCADORES SALIVARES	ASSOCIAÇÃO COM A CÁRIE
Microrganismos na saliva	
<i>Streptococcus Mutans</i>	Evidência modesta na associação entre a cárie e a colonização inicial e a concentração salivar de <i>S.mutans</i> Sensibilidade e especificidade altamente variável na previsão da cárie
<i>Lactobacillus</i>	Associação inconsistente Níveis de <i>Lactobacillus</i> na saliva reflete o consumo abundante de carboidratos simples Sensibilidade e especificidade altamente variável na previsão da cárie
Outros microrganismos	Evidência fraca ou equívoca na relação entre a cárie e outros microrganismos (<i>Streptococcus sanguis</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Actinomyces</i> spp e <i>Candida albicans</i>)
Diversidade de microbiomas	Área recente com evidência limitada
Eletrólitos salivares	
Cálcio, fosfato, bicarbonato e flúor	Evidência limitada quanto ao efeito

	anticariogénico destes eletrólitos
Proteínas salivares e péptidos	
Imunoglobulinas (IgA, IgG e IgM)	Evidência que suporta e que refuta a relação encontra-se igualmente dividida
Outras proteínas e péptidos de defesa do hospedeiro	Evidência fraca ou inconsistente
Proteínas e péptidos com efeitos na química do fosfato de cálcio	Pouca evidência
Propriedades funcionais da saliva	
Baixa taxa de fluxo salivar	Evidência forte na elevada prevalência de cáries, incidência e atividade relacionada com níveis patológicos baixos de fluxo salivar Entre pessoas com fluxo salivar normal, a associação entre o fluxo salivar e a cárie é questionável
pH salivar e capacidade tampão	Achados inconsistentes
Taxa de <i>clearence</i> salivar dos açúcares	Evidência limitada

2.2.3 Funções dos biomarcadores salivares na manutenção da saúde oral: função no diagnóstico e na prevenção da cárie dentária

A saliva e os seus biomarcadores apresentam um grande número de funções, uma das principais é como meio de diagnóstico (Gao et al., 2016). Para além da sua utilização no diagnóstico, a saliva é ainda responsável pela limpeza da cavidade oral, retirando as bactérias e restos alimentares presentes e refrescando o hálito. Um dos seus constituintes, a amílase salivar é responsável por catalisar a hidrólise do amido na cavidade oral. Outros constituintes, como as lisozimas desempenham um papel bactericida, fazendo com que a saliva seja um elemento essencial do sistema imunitário do ser humano (Zhang et al., 2016).

A cárie entende-se como o resultado de um processo de desmineralização da superfície dentária iniciada pela produção de ácidos a partir de bactérias cariogénicas (Kutsch & Young, 2011). Este processo pode, em último caso, comprometer de tal forma a estrutura dentária que leva à perda do dente. Segundo um grande número de

estudos, há evidência de que os *S. mutans* desempenham um papel muito importante na iniciação da cárie dentária enquanto que os *Lactobacillus* têm o seu papel na progressão das lesões de cárie (Tanzer et al., 2001). Altos níveis salivares destes dois biomarcadores, utilizando um teste comercialmente disponível (CRT bacteria[®], Ivoclar-Vivadent Inc., Amherst, U.S.A.), mostraram associação positiva com a presença de cáries tanto em crianças como em adultos (Nishikawara et al., 2006).

Por outro lado, sabe-se que a saliva desempenha um papel protetor determinante contra a cárie uma vez que contem um elevado número de agentes antibacterianos, consegue fazer uma limpeza mecânica dos agentes patogénicos e tem uma capacidade tampão que é capaz de reduzir a concentração acídica que se encontra na superfície dentária (Hicks, Garcia-Godoy, & Flaitz, 2003). Tanto o elevado número de agentes antibacterianos como a capacidade tampão da saliva são dois biomarcadores muito importantes na avaliação do risco de cárie, uma vez que oferecem proteção contra o desenvolvimento da doença (Gao et al., 2016). Por isso, alterações tanto na quantidade como na composição da saliva podem fornecer dados relevantes para a deteção e monitorização da cárie. Devido ao envolvimento de um grande número de fatores de risco quer locais quer sistémicos que interferem no processo de desenvolvimento da cárie, é importante a avaliação conjunta dos vários parâmetros (Javaid, Ahmed, Durand, & Tran, 2016).

Os biomarcadores, para além de desempenharem uma função protetora, são muito utilizados na avaliação do risco de cárie, sendo úteis para aferir considerações a nível do diagnóstico, do tratamento e do prognóstico da cárie dentária. Atualmente, quando nos referimos à cárie dentária, esta é essencialmente tratada com uma abordagem restauradora que nem sempre produz os resultados mais satisfatórios. A avaliação do risco de cárie é de extrema importância uma vez que permite estimar a probabilidade da incidência da cárie, ou seja, permite avaliar o número de novas lesões de cárie ou lesões incipientes num determinado período de tempo, assim como a probabilidade de alterações no tamanho e atividade de lesões de cárie (Fontana & Zero, 2006).

Uma correta avaliação deste risco pode ser muito útil na identificação de doentes que tenham alto risco de cárie, mudando assim a abordagem, passando esta a ter um ponto de vista mais preventivo, focado no desenvolvimento de medidas preventivas adequadas a cada individuo e às suas características (Zhang et al., 2016).

Um dos métodos para avaliarmos este risco de cárie é então, como foi descrito, através da presença maior ou menor de cada um dos biomarcadores salivares, uma vez que uma maior ou menor concentração de um determinado biomarcador pode ser um indicador muito útil para avaliar o risco de cárie específico de cada indivíduo a fim de construirmos o melhor plano, individualizado, para cada doente (Gao et al., 2016).

A saliva é então um meio de diagnóstico muito útil uma vez que contem um grande número de moléculas biomarcadoras indicativas do estado de doença ou saúde do hospedeiro. Como podemos ver pela figura 4, muitos destes constituintes entram na saliva através do sangue via difusão passiva, transporte ativo ou ultrafiltração. Por esta razão, a saliva pode ser vista como um reflexo da função fisiológica do corpo (Pfaffe et al., 2011).

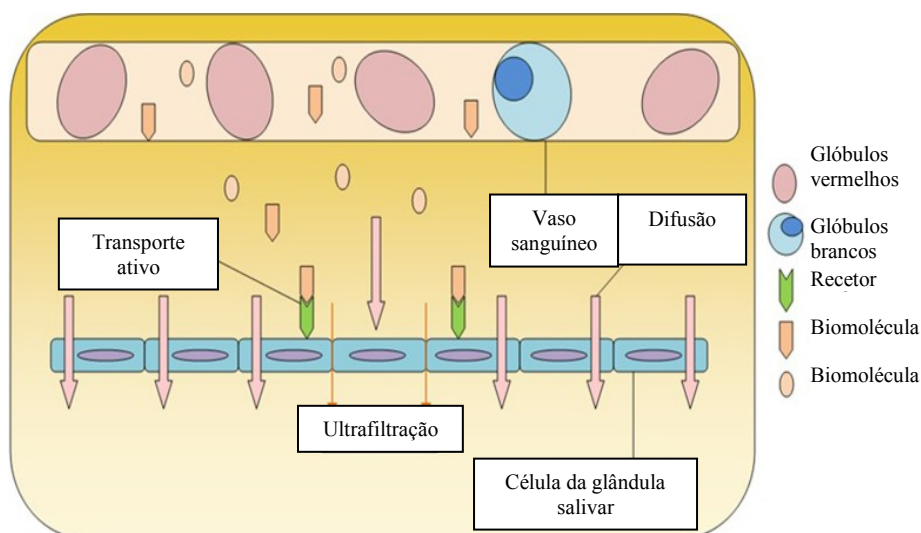


Fig. 4 - Diagrama ilustrativo dos caminhos chave da passagem de moléculas entre o sangue e a saliva (Adaptado de Javaid et al., 2016)

O caminho mais comum para a migração de substâncias do sangue para a saliva é via difusão passiva. Os capilares que envolvem as glândulas salivares são bastante porosos para diversas moléculas pequenas. Para uma molécula fazer esta migração para a saliva através de difusão tem de ultrapassar cinco barreiras, segundo Haeckel e Hänecke (1996):

- a parede dos capilares;
- o espaço intersticial;
- a membrana celular basal dos ácinos ou dos ductos;
- o citoplasma dos ácinos ou dos ductos;
- a membrana luminal das células (Haeckel & Hänecke, 1996)

A capacidade que as moléculas têm de se difundir passivamente pelas membranas celulares depende do tamanho da partícula e também da sua carga elétrica. Moléculas polares, ou aquelas que se separam em iões com carga em solução, têm a sua passagem dificultada pelos ductos das membranas celulares, uma vez que estes são compostos por fosfolípidos. O tamanho das moléculas condiciona a sua passagem através da membrana: as hormonas esteroides, por exemplo, que são relativamente pequenas e compostas por ácidos gordos, utilizam este meio de passagem; outras moléculas que estão ligadas a grandes proteínas transportadoras, como a albumina sérica, são demasiado grandes para passarem por esta via (Yoshizawa et al., 2013).

A IgA secretada (sIgA) atravessa a membrana por transporte ativo. Por exemplo a IgA polimérica, que é secretada pelos linfócitos B próximos das células salivares, liga-se aos recetores IgA presentes nos ácinos, sendo depois libertada para a saliva (Yoshizawa et al., 2013).

A ultrafiltração é o terceiro meio de transporte das moléculas da corrente sanguínea para a saliva, através dos espaços entre os ácinos e os ductos. As moléculas que utilizam este tipo de transporte têm de ser relativamente pequenas. Os esteroides sulfatados, que não conseguem ultrapassar a dupla camada fosfolipídica das membranas celulares, devido à sua carga elétrica, entram essencialmente por esta via, demorando mais tempo para entrar na saliva do que as hormonas esteroides neutras (Yoshizawa et al., 2013).

A saliva é um ótimo meio de diagnóstico devido ao grande número de vantagens que apresenta em relação a outros meios de diagnóstico (como o sangue e a urina) como é possível ver na tabela IV. É devido a todas as vantagens apresentadas (como o facto de não ser um método invasivo, de baixo custo, fácil colheita, baixo risco de contaminação cruzada, entre outras apresentadas na tabela) que a saliva tem cada vez mais sido uma escolha indicada para o diagnóstico, nomeadamente da cárie dentária (Javaid et al., 2016).

Tabela IV- Vantagens dos testes salivares (Adaptado de Javaid et al., 2016)

Não invasivo, fácil utilização, baixo custo
Mais seguro de administrar do que uma amostra de soro (dado que não implica o uso de agulhas)
Valores de diagnóstico em tempo real
Não é necessário haver treino da equipa médica
É possível obter facilmente várias amostras
A colheita e rastreio podem ser feitos em casa
Risco de contaminação cruzada é mínimo
Recolha das amostras, o seu envio e o seu armazenamento são mais económicos do que quando comparando com o soro
Necessita de menos manipulação durante os procedimentos de diagnóstico do que quando comparado com o soro
Disponibilidade comercial de ensaios de rastreio

A nível da prevenção e manutenção da saúde oral, a saliva contém um grande número de elementos (estudados como biomarcadores) que são responsáveis por um efeito anti-cariogénico (Gao et al., 2016). A saliva é uma mistura complexa de fluídos orais composta pelas secreções das glândulas salivares, fluído crevicular gengival, secreções que provêm dos brônquios e nariz, derivados do sangue a partir de feridas na cavidade oral, bactérias e produtos bacterianos, vírus, fungos, células epiteliais descamadas, outros componentes celulares assim como detritos alimentares (Kaufman & Lamster, 2002; Mandel & Wotman, 1976).

A saliva desempenha um grande número de papéis muito importantes na manutenção de uma boa saúde oral. van Nieuw Amerongen et al., (2004) resumiram as várias funções protetoras da saliva na integridade dos dentes, incluindo:

- limpeza dentária;
- proteção contra os fenómenos de abrasão e atrição;
- retardamento do processo de desmineralização assim como a promoção da remineralização;

- neutralização rápida dos ácidos e proteção da cavidade oral contra infecções (van Nieuw Amerongen et al., 2004).

A saliva, sendo tão importante na avaliação do risco de cárie, faz com que a sua ausência represente um maior risco de deterioramento dentário atípico, como por exemplo lesões ao nível cervical, incisal ou nas pontas das cúspides assim como lesões radiculares (Fox, 1998).

Edgar e Higham (1995), categorizaram os efeitos anti-cariogénicos da saliva como estáticos ou dinâmicos. Os efeitos estáticos são tidos como, segundo Edgar e Higham (1995):

- efeitos contínuos exercidos na composição microbiana da placa por fatores antimicrobianos ou metabólicos;
- efeitos protetores da formação de película;
- efeitos dos eletrólitos salivares (incluindo o flúor) na manutenção de um ambiente supersaturado para os minerais dentários (Edgar & Higham, 1995).

Os efeitos dinâmicos são aqueles que estão correlacionados com a taxa de fluxo após estimulação salivar e são mobilizados ao longo do tempo. Estes incluem, segundo Mandel (1987):

- *clearance* dos produtos ácidos do metabolismo da placa após ingestão de açúcares;
- capacidade tampão para a neutralização do pH salivar (Mandel, 1987).

A saliva contém fatores que aumentam o pH salivar como por exemplo a sialina, arginina e ureia (Tenovuo, 1997).

O ácido produzido pelas bactérias após a fermentação dos carboidratos faz com que os valores do pH da placa baixem para níveis inferiores ao valor crítico resultando na desmineralização da superfície dentária (Featherstone, 2004). No entanto, o fenómeno de desmineralização pode ser revertido nas suas fases mais iniciais. A supersaturação da saliva com cálcio, fosfato e flúor permite a remineralização do dente nesta fase inicial (Featherstone, 1999).

A prevenção da cárie dentária envolve um conjunto de fatores muito importantes dos quais fazem parte a dieta, a higiene oral e o flúor (Grigalauskienė et al., 2015). O controlo destes três parâmetros contribui bastante para o próprio controlo da cárie dentária. Os biomarcadores, apresentam-se como um conjunto de dados, que podem ser

avaliados e que dão informações ligadas ao risco de desenvolvimento da cárie dentária. Tanto a dieta, como a higiene oral e como o flúor contêm indicadores que servem de biomarcadores para avaliação do risco de cárie dentária como será descrito a seguir (Gao et al., 2016).

No que diz respeito ao flúor, um dos biomarcadores salivares que se encontra na secção relacionada com a presença de eletrólitos na cavidade oral como o fósforo e o cálcio, segundo muitos estudos, quanto maior for a sua proporção na saliva maior será a proteção que o hospedeiro tem contra o desenvolvimento da cárie dentária (Gao et al., 2016). A sua utilização pode ser local ou sistémica. Sistémica por exemplo através de água fluoretada e sal fluoretado. Atualmente, está comprovado, que o efeito cariostático do flúor começa a fazer-se sentir logo quando ocorre a erupção dentária ou quando se faz uma aplicação localizada do mesmo. Por este motivo, apesar da sua correlação com a cárie dentária não ser ainda inequívoca, este biomarcador é de extrema importância uma vez que este efeito cariostático é bastante importante para a prevenção do aparecimento da cárie (Grigalauskiene et al., 2015).

A dieta e a higiene oral são os principais fatores envolvidos na prevenção da cárie dentária. Os microrganismos que atuam sobre os constituintes da dieta e aqueles que estão presentes na cavidade oral são fatores de risco, que podem ser úteis como biomarcadores salivares, que se encontram intimamente relacionados com o favorecimento do aparecimento da cárie dentária como será descrito em seguida (Gao et al., 2016). A desmineralização dentária é uma consequência da dieta uma vez que ocorre a produção de ácidos que resultam da fermentação bacteriana dos carboidratos presentes na placa dentária. Estes carboidratos, só conseguem exercer o seu efeito quando são metabolizados em ácidos pelos microrganismos, caso contrário, só por si não conseguem afetar os dentes diretamente. Ao haver esta produção acídica, o pH diminui e conseqüentemente a solubilidade da hidroxiapatite aumenta. Assim, o processo de desmineralização inicia-se (Featherstone, 2004).

A forma em que os alimentos são ingeridos é o que determina o tempo em que os carboidratos se mantêm na superfície dentária. Do tempo em que o estadio acidúrico se mantém, depende a seleção induzida pelo ácido, ou seja, subsistem as espécies que se encontram mais adaptadas a um pH mais baixo, sendo esta a principal razão para a alteração da composição da microflora (Takahashi & Nyvad, 2011). Alimentos aderentes, com mais dificuldade em serem removidos da superfície dentária, como caramelos ou batatas fritas devem ser evitados (Grigalauskiene et al., 2015).

Outros fatores como por exemplo a avitaminose têm um impacto muito grande na cavidade oral também. A vitamina D é um dos exemplos, uma vez que há uma associação entre a vitamina D e o metabolismo de cálcio e conseqüente mineralização dos tecidos duros do dente, uma carência desta vitamina provoca hipoplasia do esmalte e a hipoplasia deste tecido está relacionada com um risco aumentado de cárie (Hong, Levy, Warren, & Broffitt, 2009).

Numa perspectiva biológica, uma dieta rica em carboidratos é considerada um dos principais fatores de risco que altera o equilíbrio microbiano. O seu impacto em doentes que apresentam alto risco de cárie pode ser decisivo (Grigaluskienė et al., 2015).

Em relação à higiene oral, sabe-se que uma completa eliminação do biofilme é uma tarefa impossível, uma vez que mesmo que haja uma higienização perfeita da cavidade oral, o biofilme começa imediatamente a desenvolver-se. Uma higiene oral diária destrói a maior parte da comunidade dos microrganismos presentes no biofilme, estes perdem a sua atividade e verifica-se uma diminuição do potencial patogénico. A higiene oral entende-se então como um dos principais fatores ambientais que mais influencia o equilíbrio microbiano. É recomendada a escovagem dos dentes num mínimo duas vezes ao dia durante dois minutos. Aliar a higiene oral à utilização de uma pasta fluoretada, principalmente em doentes que apresentam elevado risco de cárie é uma medida preventiva essencial para evitar o desenvolvimento da cárie dentária (Grigaluskienė et al., 2015).

Uma análise pormenorizada dos fatores de risco de cada individuo, incluindo avaliação dos biomarcadores, permite a definição de estratégias e planos preventivos. Estas estratégias devem ser desenvolvidas tendo em conta as necessidades de cada doente. Para tal, a avaliação da constituição da dieta de cada individuo (mais ou menos rica em carboidratos) e os hábitos de higiene oral de cada um devem ser sempre tidos em conta de forma a que seja possível identificar o perfil de risco de cada doente. Mediante a formulação deste perfil, a modificação ou introdução de novas práticas pode ser muito benéfica de modo a conseguir melhorar o controlo da cárie e melhorar a saúde oral de cada individuo (Grigaluskienė et al., 2015).

3. CONCLUSÃO

Existe um grande número de potenciais biomarcadores salivares que podem ser instrumentos úteis tanto na prevenção como no diagnóstico e no controlo da cárie dentária. A cárie dentária apresenta uma origem infecciosa e multifatorial, pelo que o seu diagnóstico, prevenção e controlo são bastante complexos devido à existência de um grande número de elementos envolvidos. O estabelecimento de uma associação direta entre alguns dos biomarcadores salivares e a sua influência na iniciação, progressão ou controlo da cárie dentária é ainda bastante difícil. Os biomarcadores com maior associação à cárie dentária são os *Streptococcus mutans* e a baixa taxa de fluxo salivar. Relativamente aos *Lactobacillus*, às proteínas salivares e ao pH salivar e capacidade tampão não há consenso na associação destes biomarcadores com a cárie dentária. Os biomarcadores com evidência limitada são os eletrólitos salivares, a taxa de *clearance* salivar dos açúcares e também outros microrganismos à exceção dos *Streptococcus mutans* e dos *Lactobacillus*.

A avaliação dos biomarcadores, nomeadamente daqueles que apresentam maior evidência de associação à cárie dentária, é muito útil para determinar a suscetibilidade para a cárie de cada indivíduo. As vantagens da utilização da saliva como meio de diagnóstico passam pelo seu elevado número de biomarcadores. Para uma estimativa mais precisa do risco de cárie de cada indivíduo, os parâmetros salivares devem ser conjugados com outros como por exemplo, parâmetros sociodemográficos, parâmetros relativos ao comportamento e também clínicos.

No futuro, espera-se um desenvolvimento nesta área, de forma a tornar este método de diagnóstico mais preciso e com *guidelines* melhor definidas, de forma a tornar a utilização da saliva, através da avaliação dos seus biomarcadores, um meio de diagnóstico de eleição para a cárie dentária.

Através de um diagnóstico precoce e do estabelecimento do risco individual é possível a formulação de um plano para cada doente, de forma a apostar cada vez mais em medidas preventivas e minimamente invasivas, a fim de preservar ao máximo as estruturas dentárias. Serão necessários mais estudos para determinar com maior exatidão quais os biomarcadores com maior associação à cárie dentária, de forma a que a sua interpretação seja mais fácil e direta. Desta forma, uma maior evidência relativa à correlação dos biomarcadores com a cárie dentária, permitirá que os fluídos orais sejam

cada vez mais utilizados como meio de diagnóstico, podendo assim ajudar a mudar o panorama atual da prevalência da cárie dentária.

4. BIBLIOGRAFIA

- Aas, J. A., Griffen, A. L., Dardis, S. R., Lee, A. M., Olsen, I., Dewhirst, F. E., Leys, E.J., & Paster, B. J. (2008). Bacteria of Dental Caries in Primary and Permanent Teeth in Children and Young Adults. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(4), 1407–1417. <https://doi.org/10.1128/JCM.01410-07>
- Amerongen, A. V. N., & Veerman, E. C. I. (2002). Saliva--the defender of the oral cavity. *Oral Diseases*, 8(1), 12–22. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11936451>
- Ashby, M. T. (2008). Inorganic Chemistry of Defensive Peroxidases in the Human Oral Cavity. *Journal of Dental Research*, 87(10), 900–914. <https://doi.org/10.1177/154405910808701003>
- Banas, J. A. (2004). Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 9, 1267–1277. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14977543>
- Bardow, A., Hofer, E., Nyvad, B., ten Cate, J. M., Kirkeby, S., Moe, D., & Nauntofte, B. (2005). Effect of Saliva Composition on Experimental Root Caries. *Caries Research*, 39(1), 71–77. <https://doi.org/10.1159/000081660>
- 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. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11155158>
- Bonassi, S., Neri, M., & Puntoni, R. (2001). Validation of biomarkers as early predictors of disease. *Mutation Research*, 480–481, 349–358. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11506827>
- Chen, F., & Wang, D. (2010). Novel technologies for the prevention and treatment of dental caries: a patent survey. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 20(5), 681–694. <https://doi.org/10.1517/13543771003720491>
- Costalonga, M., & Herzberg, M. C. (2014). The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunology Letters*, 162(2 Pt A), 22–38. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.08.017>
- Dawes, C. (2003). Estimates, from salivary analyses, of the turnover time of the oral mucosal epithelium in humans and the number of bacteria in an edentulous mouth. *Archives of Oral Biology*, 48(5), 329–336. Disponível em

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12711376>
- Dawes, C. (2008). Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 139 Suppl, 18S–24S. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18460676>
- de Carvalho, F. G., Silva, D. S., Hebling, J., Spolidorio, L. C., & Spolidorio, D. M. P. (2006). Presence of mutans streptococci and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. *Archives of Oral Biology*, 51(11), 1024–1028. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2006.06.001>
- Edgar, W. M., & Higham, S. M. (1995). Role of Saliva in Caries Models. *Advances in Dental Research*, 9(3), 235–238. <https://doi.org/10.1177/08959374950090030701>
- Featherstone, J. D. (1999). Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 27(1), 31–40. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10086924>
- Featherstone, J. D. B. (2004). The continuum of dental caries--evidence for a dynamic disease process. *Journal of Dental Research*, 83 Spec No C, C39-42. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15286120>
- Fenoll-Palomares, C., Muñoz-Montagud, J. V., Sanchiz, V., Herreros, B., Hernández, V., Mínguez, M., & Benages, A. (2004). Unstimulated salivary flow rate, pH and buffer capacity of saliva in healthy volunteers. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. <https://doi.org/10.4321/S1130-01082004001100005>
- Ferrer, T. J., & Jiménez, A. G. (2013). Defectos y traumatismos dentales: Diagnóstico y prevención. In E. C. Sala & P. B. García (Eds.), *Odontología preventiva y comunitaria* (4th ed., p. 196). Barcelona: Elsevier España.
- Fontana, M., & Zero, D. T. (2006). Assessing patients' caries risk. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 137(9), 1231–1239. <https://doi.org/10.14219/JADA.ARCHIVE.2006.0380>
- Fonteles, C. S. R., Guerra, M. H., Ribeiro, T. R., Mendonça, D. N., de Carvalho, C. B. M., Monteiro, A. J., Toyama, D. O., Toyama, M.H., & Fonteles, M. C. (2009). Association of free amino acids with caries experience and mutans streptococci levels in whole saliva of children with early childhood caries. *Archives of Oral Biology*, 54(1), 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2008.07.011>
- Fox, P. C. (1998). Acquired salivary dysfunction. Drugs and radiation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 842, 132–137. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9599303>

- Gao, X., Jiang, S., Koh, D., & Hsu, C.-Y. S. (2016). Salivary biomarkers for dental caries. *Periodontology 2000*, 70(1), 128–141. <https://doi.org/10.1111/prd.12100>
- García-Godoy, F., & Hicks, M. J. (2008). Maintaining the integrity of the enamel surface: the role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 139 Suppl, 25S–34S. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18460677>
- Gibbons, R. J., Hay, D. I., & Schlesinger, D. H. (1991). Delineation of a segment of adsorbed salivary acidic proline-rich proteins which promotes adhesion of *Streptococcus gordonii* to apatitic surfaces. *Infection and Immunity*, 59(9), 2948–2954. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1879920>
- Gomez, J. (2015). Detection and diagnosis of the early caries lesion. *BMC Oral Health*, 15(S1), S3. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-15-S1-S3>
- Gonçalves de Farias, D., & Barreto Bezerra, A. C. (2003). Salivary antibodies, amylase and protein from children with early childhood caries. *Clinical Oral Investigations*, 7(3), 154–157. <https://doi.org/10.1007/s00784-003-0222-7>
- Gornowicz, A., Bielawska, A., Bielawski, K., Grabowska, S. Z., Wójcicka, A., Zalewska, M., & Maciorkowska, E. (2012). Pro-inflammatory cytokines in saliva of adolescents with dental caries disease. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM*, 19(4), 711–716. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23311795>
- Greenstein, G., & Lamster, I. (1997). Bacterial Transmission in Periodontal Diseases: A Critical Review. *Journal of Periodontology*, 68(5), 421–431. <https://doi.org/10.1902/jop.1997.68.5.421>
- Grigalauskiene, R., Slabšinskienė, E., & Vasiliauskiene, I. (2015). Biological approach of dental caries management. *Stomatologija*, 17(4), 107–112. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27189495>
- Guo, L., & Shi, W. (2013). Salivary biomarkers for caries risk assessment. *Journal of the California Dental Association*, 41(2), 107–109, 112–118. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23505756>
- Haeckel, R., & Hänecke, P. (1996). Application of saliva for drug monitoring. An in vivo model for transmembrane transport. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry: Journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies*, 34(3), 171–191. Disponível em

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8721405>
- Hegde, M. N., Hegde, N. D., Ashok, A., & Shetty, S. (2014). Biochemical Indicators of Dental Caries in Saliva: An in vivo Study. *Caries Research*, 48(2), 170–173. <https://doi.org/10.1159/000355580>
- Hicks, J., Garcia-Godoy, F., & Flaitz, C. (2003). Biological factors in dental caries: role of saliva and dental plaque in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 1). *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 28(1), 47–52. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14604142>
- Hong, L., Levy, S. M., Warren, J. J., & Broffitt, B. (2009). Association between Enamel Hypoplasia and Dental Caries in Primary Second Molars: A Cohort Study. *Caries Research*, 43(5), 345–353. <https://doi.org/10.1159/000231571>
- Javid, M. A., Ahmed, A. S., Durand, R., & Tran, S. D. (2016). Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6(1), 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.08.006>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00784-004-0263-6>
- Kaufman, E., & Lamster, I. B. (2002). The diagnostic applications of saliva--a review. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine: An Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, 13(2), 197–212. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12097361>
- Kleinberg, I. (2002). A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: an alternative to Streptococcus mutans and the specific-plaque hypothesis. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine: An Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, 13(2), 108–125. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12097354>
- Klinke, T., Kneist, S., de Soet, J. J., Kuhlisch, E., Mauersberger, S., Förster, A., & Klimm, W. (2009). Acid Production by Oral Strains of *Candida albicans* and Lactobacilli. *Caries Research*, 43(2), 83–91. <https://doi.org/10.1159/000204911>
- Krasse, B. (1988). Biological factors as indicators of future caries. *International Dental Journal*, 38(4), 219–225. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3063665>
- Krasse, B., & Fure, S. (1994). Root surface caries: a problem for periodontally

- compromised patients. *Periodontology 2000*, 4, 139–147. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9673202>
- Kutsch, V. K., & Young, D. A. (2011). New directions in the etiology of dental caries disease. *Journal of the California Dental Association*, 39(10), 716–721. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22132583>
- Larmas, M. (1992). Saliva and dental caries: diagnostic tests for normal dental practice. *International Dental Journal*, 42(4), 199–208. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1399036>
- Lee, S. F., Li, Y. H., & Bowden, G. H. (1996). Detachment of *Streptococcus mutans* biofilm cells by an endogenous enzymatic activity. *Infection and Immunity*, 64(3), 1035–1038. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8641755>
- Lee, Y.-H., & Wong, D. T. (2009). Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. *American Journal of Dentistry*, 22(4), 241–248. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19824562>
- Leone, C. W., & Oppenheim, F. G. (2001). Physical and chemical aspects of saliva as indicators of risk for dental caries in humans. *Journal of Dental Education*, 65(10), 1054–1062. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11699977>
- Levine, M. (2011). Susceptibility to Dental Caries and the Salivary Proline-Rich Proteins. *International Journal of Dentistry*, 2011, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2011/953412>
- Levine, M. J., Herzberg, M. C., Levine, M. S., Ellison, S. A., Stinson, M. W., Li, H. C., & van Dyke, T. (1978). Specificity of salivary-bacterial interactions: role of terminal sialic acid residues in the interaction of salivary glycoproteins with *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity*, 19(1), 107–115. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/415001>
- Loesche, W. J. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiological Reviews*, 50(4), 353–380. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3540569>
- Mandel, I. D. (1987). The Functions of Saliva. *Journal of Dental Research*, 66(2_suppl), 623–627. <https://doi.org/10.1177/00220345870660S203>
- Mandel, I. D., & Wotman, S. (1976). The salivary secretions in health and disease. *Oral Sciences Reviews*, (8), 25–47. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/790252>
- Marsh, P. D. (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes?

- Microbiology*, 149(2), 279–294. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26082-0>
- Marsh, P. D. (2006). Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC Oral Health*, 6 Suppl 1(Suppl 1), S14. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-6-S1-S14>
- Martins, C., Buczynski, A. K., Maia, L. C., Siqueira, W. L., & Castro, G. F. B. de A. (2013). Salivary proteins as a biomarker for dental caries—A systematic review. *Journal of Dentistry*, 41(1), 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2012.10.015>
- Messer, L. B. (2000). Assessing caries risk in children. *Australian Dental Journal*, 45(1), 10–16. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10846266>
- Meurman, J. H., & Rantonen, P. (1994). Salivary flow rate, buffering capacity, and yeast counts in 187 consecutive adult patients from Kuopio, Finland. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 102(4), 229–234. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8091123>
- Mungia, R., Cano, S. M., Johnson, D. A., Dang, H., & Brown, J. P. (2008). Interaction of age and specific saliva component output on caries. *Aging Clinical and Experimental Research*, 20(6), 503–508. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19179832>
- Nishikawara, F., Katsumura, S., Ando, A., Tamaki, Y., Nakamura, Y., Sato, K., Nomura, Y., & Hanada, N. (2006). Correlation of cariogenic bacteria and dental caries in adults. *Journal of Oral Science*, 48(4), 245–251. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17220624>
- Parahitiyawa, N., Scully, C., Leung, W., Yam, W., Jin, L., & Samaranayake, L. (2010). Exploring the oral bacterial flora: current status and future directions. *Oral Diseases*, 16(2), 136–145. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2009.01607.x>
- Parisotto, T. M., Steiner-Oliveira, C., Silva, C. M., Rodrigues, L. K., & Nobre-dos-Santos, M. (2010). Early childhood caries and mutans streptococci: a systematic review. *Oral Health & Preventive Dentistry*, 8(1), 59–70. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20480056>
- Pedersen, A. M., Reibel, J., Nordgarden, H., Bergem, H. O., Jensen, J. L., & Nauntofte, B. (1999). Primary Sjögren's syndrome: salivary gland function and clinical oral findings. *Oral Diseases*, 5(2), 128–138. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10522209>
- Petersen, P. E., Bourgeois, D., Ogawa, H., Estupinan-Day, S., & Ndiaye, C. (2005). The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bulletin of the World Health*

- Organization*, 83(9), 661–669. <https://doi.org/S0042-96862005000900011>
- Pfaffe, T., Cooper-White, J., Beyerlein, P., Kostner, K., & Punyadeera, C. (2011). Diagnostic Potential of Saliva: Current State and Future Applications. *Clinical Chemistry*, 57(5), 675–687. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.153767>
- Pienihäkkinen, K. (1988). Salivary lactobacilli and yeasts in relation to caries increment. Annually repeated measurements versus a single determination. *Acta Odontologica Scandinavica*, 46(1), 57–62. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3164164>
- Pink, R., Simek, J., Vondrakova, J., Faber, E., Michl, P., Pazdera, J., & Indrak, K. (2009). Saliva as a diagnostic medium. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 153(2), 103–110. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19771133>
- Powell, V., Leroux, B. G., Martin, J. A., & White, B. A. (2000). Identification of adult populations at high risk for dental caries using a computerized database and patient records: a pilot project. *Journal of Public Health Dentistry*, 60(2), 82–84. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10929565>
- Preethi, B. P., Reshma, D., & Anand, P. (2010). Evaluation of Flow Rate, pH, Buffering Capacity, Calcium, Total Proteins and Total Antioxidant Capacity Levels of Saliva in Caries Free and Caries Active Children: An In Vivo Study. *Indian Journal of Clinical Biochemistry : IJCB*, 25(4), 425–428. <https://doi.org/10.1007/s12291-010-0062-6>
- Ruby, J. D., Cox, C. F., Akimoto, N., Meada, N., & Momoi, Y. (2010). The Caries Phenomenon: A Timeline from Witchcraft and Superstition to Opinions of the 1500s to Today's Science. *International Journal of Dentistry*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/432767>
- Russell, J. I., MacFarlane, T. W., Aitchison, T. C., Stephen, K. W., & Burchell, C. K. (1991). Prediction of caries increment in Scottish adolescents. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 19(2), 74–77. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2049927>
- Scannapieco, F. A. (1994). Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine : An Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, 5(3–4), 203–248. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7703323>
- Scannapieco, F. A., Torres, G., & Levine, M. J. (1993). Salivary alpha-amylase: role in

- dental plaque and caries formation. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine: An Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, 4(3–4), 301–307. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8373987>
- Selwitz, R. H., Ismail, A. I., & Pitts, N. B. (2007). Dental caries. *The Lancet*, 369(9555), 51–59. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60031-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60031-2)
- Silla, J. A., & Company, J. M. (2013). Riesgo de caries: Evaluación y control. In Odontología preventiva y comunitaria. In E. C. Sala & P. B. García (Eds.), *Odontología preventiva y comunitaria*(4th ed., p. 110). Barcelona: Elsevier España.
- Slomiany, B. L., Murty, V. L., Piotrowski, J., & Slomiany, A. (1996). Salivary mucins in oral mucosal defense. *General Pharmacology*, 27(5), 761–771. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8842677>
- Takahashi, N., & Nyvad, B. (2011). The Role of Bacteria in the Caries Process. *Journal of Dental Research*, 90(3), 294–303. <https://doi.org/10.1177/0022034510379602>
- Tamaki, Y., Nomura, Y., Katsumura, S., Okada, A., Yamada, H., Tsuge, S., Kadoma, Y., & Hanada, N. (2009). Construction of a dental caries prediction model by data mining. *Journal of Oral Science*, 51(1), 61–68. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19325201>
- Tandon, S., Satyamoorthy, K., & Bhalla, S. (2010). Salivary proteins and early childhood caries: A gel electrophoretic analysis. *Contemporary Clinical Dentistry*, 1(1), 17. <https://doi.org/10.4103/0976-237X.62515>
- Tanzer, J. M., Livingston, J., & Thompson, A. M. (2001). The microbiology of primary dental caries in humans. *Journal of Dental Education*, 65(10), 1028–1037. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11699974>
- Tenovuo, J. (1997). Salivary parameters of relevance for assessing caries activity in individuals and populations. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 25(1), 82–86. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.1997.tb00903.x>
- Tenovuo, J., Jentsch, H., Soukka, T., & Karhuvaara, L. (1992). Antimicrobial factors of saliva in relation to dental caries and salivary levels of mutans streptococci. *Journal de Biologie Buccale*, 20(2), 85–90. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1644785>
- Thenisch, N. L., Bachmann, L. M., Imfeld, T., Leisebach Minder, T., & Steurer, J. (2006). Are Mutans Streptococci Detected in Preschool Children a Reliable Predictive Factor for Dental Caries Risk? A Systematic Review. *Caries Research*, 40(5), 366–374. <https://doi.org/10.1159/000094280>

- Tukia-Kulmala, H., & Tenovuo, J. (1993). Intra- and inter-individual variation in salivary flow rate, buffer effect, lactobacilli, and mutans streptococci among 11- to 12-year-old schoolchildren. *Acta Odontologica Scandinavica*, *51*(1), 31–37. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8451921>
- Twetman, S., Fontana, M., & Featherstone, J. D. B. (2013). Risk assessment - can we achieve consensus? *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, *41*(1), e64–e70. <https://doi.org/10.1111/cdoe.12026>
- Usha, C. (2018). Caries Risk Assessment: A Critical Look. *Journal of Operative Dentistry & Endodontics*, *3*(1), 22–27. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10047-0051>
- Usha, C., & R, S. (2009). Dental caries - A complete changeover (Part I). *Journal of Conservative Dentistry: JCD*, *12*(2), 46–54. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.55617>
- van Houte, J. (1994). Role of Micro-organisms in Caries Etiology. *Journal of Dental Research*, *73*(3), 672–681. <https://doi.org/10.1177/00220345940730031301>
- Van Houte, J. (1993). Microbiological Predictors of Caries Risk. *Advances in Dental Research*, *7*(2), 87–96. <https://doi.org/10.1177/08959374930070022001>
- van Nieuw Amerongen, A., Bolscher, J. G. M., & Veerman, E. C. I. (2004). Salivary Proteins: Protective and Diagnostic Value in Cariology? *Caries Research*, *38*(3), 247–253. <https://doi.org/10.1159/000077762>
- VanWuyckhuysse, B. C., Perinpanayagam, H. E. R., Bevacqua, D., Raubertas, R. E., Billings, R. J., Bowen, W. H., & Tabak, L. A. (1995). Association of Free Arginine and Lysine Concentrations in Human Parotid Saliva with Caries Experience. *Journal of Dental Research*, *74*(2), 686–690. <https://doi.org/10.1177/00220345950740021001>
- Vitorino, R., de Moraes Guedes, S., Ferreira, R., Lobo, M. J. C., Duarte, J., Ferrer-Correia, A. J., Tomer, K. B., Domingues, P. B., & Amado, F. M. L. (2006). Two-dimensional electrophoresis study of in vitro pellicle formation and dental caries susceptibility. *European Journal of Oral Sciences*, *114*(2), 147–153. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2006.00328.x>
- Yoshizawa, J. M., Schafer, C. A., Schafer, J. J., Farrell, J. J., Paster, B. J., & Wong, D. T. W. (2013). Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clinical Microbiology Reviews*, *26*(4), 781–791. <https://doi.org/10.1128/CMR.00021-13>

- Young, D. A., & Featherstone, J. D. B. (2010). Implementing Caries Risk Assessment and Clinical Interventions. *Dental Clinics of North America*, 54(3), 495–505. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2010.04.002>
- Zarco, M., Vess, T., & Ginsburg, G. (2012). The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. *Oral Diseases*, 18(2), 109–120. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2011.01851.x>
- Zhang, C.-Z., Cheng, X.-Q., Li, J.-Y., Zhang, P., Yi, P., Xu, X., & Zhou, X.-D. (2016). Saliva in the diagnosis of diseases. *International Journal of Oral Science*, 8(3), 133–137. <https://doi.org/10.1038/ijos.2016.38>
- Zhao, A., Blackburn, C., Chin, J., & Srinivasan, M. (2014). Soluble toll like receptor 2 (TLR-2) is increased in saliva of children with dental caries. *BMC Oral Health*, 14(1), 108. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-14-108>