UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDAE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Trabalho de Conclusão de Curso

Aluno(a): Vanessa de Souza Linhares

Orientador(a): Marinês Nobre dos Santos Uchôa

Ano de Conclusão do Curso: 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Anidrase Carbônica VI

Vanessa de Souza Linhares

PIRACICABA

2011

Vanessa de Souza Linhares

Anidrase Carbônica VI

Monografia apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para conclusão do curso de graduação.

Orientadora: Profa. Dra. Marinês Nobre dos Santos Uchôa

PIRACICABA

2011

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

L648a

Linhares, Vanessa de Souza, 1988-
Anidrase carbônica VI / Vanessa de Souza Linhares. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Marinês Nobre dos Santos Uchôa.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Cáries. 2. Saliva. 3. Isoenzimas. I. Nobre dos Santos, Marinês, 1956- II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Dedico esse trabalho aos meus pais e irmão por todo amor, saudade e dedicação.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Marinês Nobre dos Santos Uchôa pela atenção, orientação e dedicação na realização desse trabalho.

As minhas amigas “Izumi”, “Neusa”, Darlle, “Mari”, “Mocoquinha”, “Line”, Mayra, “Cida” e “Mimi” pelo apoio e pelos bons e eternos momentos compartilhados nesses anos.

Ao meu namorado Max, pela paciência e amor.

SUMÁRIO

RESUMO ---------- 6

ABSTRACT ---------- 7

1-INTRODUÇÃO ---------- 8

2-DESENVOLVIMENTO ---------- 10

3-CONCLUSÃO ---------- 20

REFERÊNCIAS ---------- 21

RESUMO

A cárie é uma conseqüência da dissolução dos tecidos duros dos dentes quando da presença de condições cariogênicas. A desmineralização dos tecidos dentais (esmalte, dentina ou cemento) é causada por ácidos, especialmente o ácido lático, produzido pela fermentação bacteriana dos carboidratos da dieta, geralmente a sacarose. A saliva desempenha um importante papel na homeostasia oral e as alterações quantitativas na secreção salivar tendem a desencadear efeitos adversos locais como infecções orais e cárie. A capacidade tampão da saliva é a propriedade da saliva manter o pH do meio bucal constante (6,2 a 7,2), sendo o sistema de tamponamento do bicarbonato/fosfato o mais relevante da cavidade bucal. Este sistema é diretamente influenciado por uma proteína salivar, a isoenzima anidrase carbônica VI (ACVI), que penetra no biofilme dental e facilita a neutralização ácida pelo bicarbonato salivar. A ACVI catalisa a reação reversível do dióxido de carbono na reação $CO_2 + H_2O \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$ promovendo uma maior neutralização do biofilme dental. Assim, este trabalho teve como objetivo descrever aspectos relacionados à atividade da ACVI pela sua concentração na saliva e sua relação com a ocorrência de lesão de cárie.

Palavras chaves: Anidrase carbônica VI, saliva, cárie.

ABSTRACT

Tooth decay is a consequence of the dissolution of the teeth hard tissues when there is the presence of cariogenic conditions. The demineralization of dental tissues (enamel, dentin or cementum) is caused by acids, especially lactic acid produced by bacterial fermentation of the carbohydrates in the diet, usually sucrose. Saliva plays an important role in oral homeostasis and the quantitative changes in salivary secretion tend to trigger adverse local effects such as oral infections and caries. The saliva buffer capacity is the property of the saliva that consist in maintaining a constant pH (6.2 to 7.2), being the buffering system bicarbonate / phosphate the most relevant in the oral cavity. This system is directly influenced by a salivary protein, carbonic anhydrase isoenzyme VI (ACVI), which penetrates the biofilm and facilitates the acid neutralization by salivary bicarbonate. The CAVI catalyzes the reversible reaction of carbon dioxide in the reaction $CO_2 + H_2O \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$ promoting greater neutralization of the biofilm. This work aimed to discuss issues related to the activity of CAVI in respect to it's concentration in saliva and it's relationship with the occurrence of dental caries.

Key words: Carbonic anhydrase VI, saliva, dental caries.

1- INTRODUÇÃO

A anidrase carbonica VI é uma isoenzima produzida pelas células acinares serosas das glândulas submandibular e parótida de onde é secretada para a saliva para desempenhar o papel de uma proteína anti-carie (Kimoto *et al .,*2006) . A secreção da ACVI pela saliva é caracterizada por uma periodicidade circadiana, na qual a concentração na saliva mantém-se muito baixa durante o sono e aumenta rapidamente durante o dia, principalmente ao acordar (Parkkila et al., 1995; Kivelä et al.,1997b). A ACVI catalisa a reação reversível do dióxido de carbono na reação $CO_2 + H_2O \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$ (Kivelä, 2003). Dessa forma, acredita-se que pela catalisação dessa reação, essa enzima seja capaz de prover uma maior neutralização dos ácidos do biofilme dental (Kimoto, 2006), por meio da penetração na placa dental. Assim, um biofilme com maior capacidade tampão poderia ter um efeito protetor contra a cárie dental. A ACVI além de proteger os dentes dos efeitos da cárie, também protege o epitélio esofágico e gástrico da injuria pela acidez (Parkkila et al. 1997). A ACVI é entregue ao trato alimentar em grandes quantidades na saliva e particularmente no leite colostral (Karhumaa et al. 2001).

A importância da ACVI é evidenciada pelo seu envolvimento em várias disfunções. A queda na secreção salivar da ACVI pode estar associada à perda do paladar (hipogeusia) e olfato (hiposmia), e distorção do sabor (disgeusia) e olfato (disosmia) (Henkin RI , 1999).

O sistema bicarbonato é o principal tampão que contribui para a capacidade tampão total da saliva. Íons bicarbonato podem neutralizar os ácidos lático e acético produzidos pelas bactérias e reduzir a desmineralização do esmalte dental. A ACVI pode adsorver-se aos cristais de hidroxiapatita do

esmalte dental (Bardow A et al. 2000, Vitorino R et al. 2004). A capacidade tamponante salivar parece ser um fator determinante para a erosão dental, que está se tornando um grande problema para adultos e crianças. Baixas concentrações de ACVI na saliva foram associadas com a prevalência de cárie dentaria, principalmente em indivíduos com higiene bucal deficiente (Kivela J et al. 1993).

Embora a ACVI tenha sido originalmente prevista para regular a capacidade tampão e o pH salivar, alguns estudos indicam que essas variáveis não estão diretamente associadas com a concentração de ACVI na saliva. Portanto é possível que além de estar concentrada em determinado meio, a atividade da ACVI salivar também pode ser influenciada por outras variáveis, como por polimorfismos genéticos (Feldstein JB et al 1984; Kadoya Y, 1987; Parkkila S et al. 1993; Kivelä J, 1997).

Esta monografia como primeiro trabalho revisional da literatura sobre anidrase carbônica VI teve como objetivo descrever a literatura sobre as variáveis que podem afetar o desempenho da ACVI como, pH, capacidade tampão e fluxo salivar nos microambientes bucais (saliva, placa dental e película de esmalte) associando a atividade dessa isoenzima com a prevalência de cárie.

2- DESENVOLVIMENTO

É sabido há muitos anos que a saliva contém a isoenzima anidrase carbônica VI (Becks e Wainwright, 1939; Leiner, 1942). Entretanto desde o final da década de 30 nenhum estudo havia tentado mensurar a concentração da ACVI na saliva humana, até que Rapp (1946), em seu estudo com saliva estimulada obteve os primeiros conceitos sobre as variáveis que envolvem a ação da ACVI; quantidade, papel fisiológico, significância e enfim, atividade.

Szabó (1970) foi um pouco além, ela realizou testes com saliva humana e concluiu que, na saliva não estimulada havia baixa concentração de anidrase carbônica VI, que a parótida produzia significativamente mais ACVI e concluiu que crianças de 7-14 anos livres de cárie apresentaram concentrações mais altas da isoenzima na saliva do que aquelas com cárie. Observaram também que não havia diferença na concentração da isoenzima em indivíduos de gênero diferente em uma mesma faixa etária.

Kivelä et al. (1997) propôs em seu estudo determinar como a isoenzima anidrase carbônica VI é passada para a circulação sanguínea e detectada no soro humano. Primeiramente eles mediram a concentração sérica e salivar de quatro indivíduos a cada 3h durante 24h em um ensaio de imunofluorescência, e para confirmarem a presença de ACVI no soro, usaram um teste de Western blot sensível. Todas as amostras de soro continham ACVI a uma concentração 22 vezes menor do que nas amostras de saliva correspondentes. No teste de Western blot detectaram uma banda correspondente a parte monomérica da ACVI, sugerindo-se que a ACVI estava

associada a alguma outra proteína sérica, e ao isolarem o complexo IgG-ACVI do soro juntamente com a proteína A-sepharose encontraram a mesma banda relacionada à anti-ACVI, indicando que ACVI estava associada à IgG no soro, enquanto comportava-se como enzima monomérica na saliva. Essa associação com o IgG protege a isoenzima da degradação ou a impede de se tornar alvo de alguma célula que não expressa ACVI.

Uma pequena quantidade de ACVI extravasa das glândulas salivares e é absorvida pelo tubo digestivo pela corrente sanguínea devida sua alta expressividade e secreção.

Esse estudo forneceu base para estudos posteriores para determinar a concentração sérica de ACVI em pacientes com diferentes distúrbios das glândulas salivares.

Kivelä et al. (1999) em seu estudo com adultos jovens, para relacionar a baixa concentração de anidrase carbônica VI e prevalência de cárie determinou a concentração salivar de ACVI, o fluxo de secreção salivar, pH, capacidade tampão, fase de atividade da α-amilase e a contagem de lactobacillus e *Streptococcus mutans* na saliva. Os valores da concentração salivar de ACVI, pH e capacidade tampão mostraram correlação negativa com o índice CPO-D. A correlação entre concentração de ACVI e o índice CPO-D foi maior em pacientes com higiene oral deficiente. Nenhuma correlação foi encontrada entre concentração salivar de ACVI e a contagem de lactobacillus ou *Streptococcus mutans*, mas como foi previsto a contagem de lactobacillus e *Streptococcus mutans* mostrou uma correlação positiva com o índice CPO-D. Por outro lado, nenhuma correlação foi vista entre a taxa de secreção salivar ou atividade da amilase salivar e o índice CPO-D. Dessa forma, os autores sugeriram que a ACVI

desempenhava um papel específico no sistema de defesa natural contra a cárie dental. A concentração salivar de ACVI mostrou ser um fator mais importante que o pH e a capacidade tampão na redução de susceptibilidade individual à cárie. Esse estudo concluiu que a baixa concentração salivar da anidrase carbônica VI estava associada com o aumento da prevalência de carie, particularmente em indivíduos com higiene oral negligenciada.

Kivelä et al. (1999), comprovaram a presença da isoenzima ACVI na película de esmalte. Eles estudaram a localização e a atividade da ACVI na película de esmalte, sugerindo que a presença dessa isoenzima poderia acelerar a remoção de ácidos pela atividade local.

Nesse estudo utilizaram dentes humanos livres de cárie, os quais foram extraídos por motivos ortodônticos. Para tanto, incubaram amostras de esmalte dental em saliva ou em solução purificada de ACVI in vitro.

Os resultados mostraram que realmente a ACVI estava vinculada à película de esmalte, em sítio local que pode catalisar a conversão de bicarbonato salivar e produtos microbianos (H^+) em dióxido de carbono e água conforme ilustrado na Figura 1.

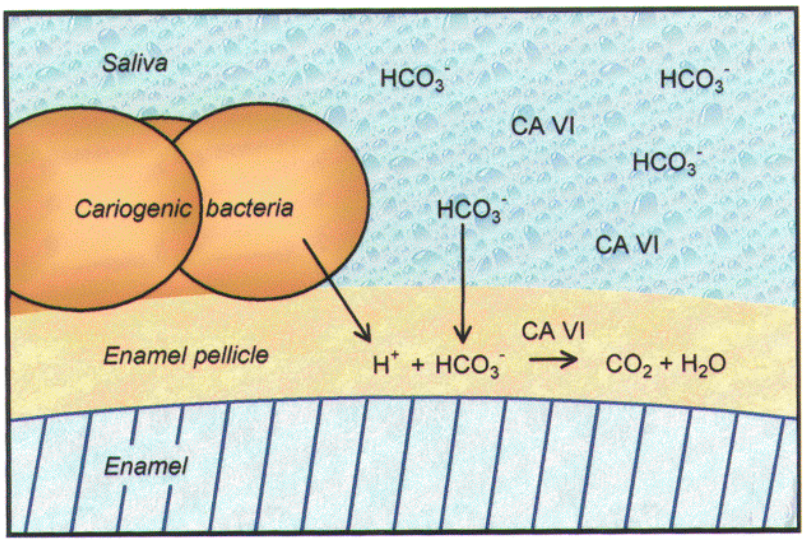

Fig. 1. Modelo ilustrativo sugerindo o papel da ACVI na neutralização dos produtos ácidos microbianos na superfície da película dental.

A ACVI possui propriedades importantes que a torna compatível com as funções desempenhadas no microambiente local da superfície de esmalte; primeiramente ela é uma enzima estável, e mantém sua atividade em meio ácido; segundo, possui cadeias de oligossacarídeos que estão envolvidos nas interações proteína-proteína e/ou proteína-hidroxiapatita que a ligam a película de esmalte; terceiro, sua secreção segue uma periodicidade circadiana (baixas taxas durante o sono, que aumentam rapidamente ao acordar), podendo rapidamente neutralizar a ação ácida na superfície dental.

Em 1999 Kivelä et al. em um tópico revisional sugeriram que a concentração de íons HPO_4^{-2} na saliva é relativamente independente da taxa de secreção salivar, e, portanto, a capacidade do sistema tampão fosfato não aumenta durante a ingestão de alimentos ou durante a mastigação. O teste de

Western blot da ACVI indicou que esta isoenzima estava associada ao IgG sérico, enquanto se comportava como uma enzima monomérica na saliva. A associação com o IgG protege a enzima da degradação proteolitica ou destina-as à células as quais não expressam ACVI. A correlação negativa entre a concentração salivar de ACVI e o índice CPO-D foi muito maior em grupos de indivíduos com higiene oral deficiente. Esse achado juntamente com a observação de que a concentração salivar de ACVI não se correlaciona com o pH e a capacidade tampão, levou a uma busca para encontrar o sitio de ação da ACVI na saliva.

Na película de esmalte, ACVI está localizada no sitio ideal para catalisar a conversão de bicabonato salivar , produtos bacterianos e íons de hidrogênio ao dióxido de carbono e água. Esses achados sugeriram que a ACVI poderia proteger os dentes, catalisando o sistema tampão mais importante na cavidade oral, acelerando assim a remoção do ácido do microambiente local da superfície do dente.

A ACVI foi encontrada na mucosa gástrica onde poderia contribuir para a manutenção do pH na superfície de células epiteliais. Pacientes com esofagite ou úlceras esofágicas, gástricas ou duodenal, possuíam relativamente baixa concentração de ACVI quando comparados com pacientes sem nenhuma alteração péptica. Os autores concluíram que a baixa concentração salivar de ACVI parecia estar associada com o aumento da prevalêcia de cárie e doenças gástro-intestinais.

Kivelä et al. (2003) analisaram a relação entre a taxa de secreção salivar e a capacidade tampão com a anidrase carbônica VI em mulheres grávidas e não grávidas com o objetivo de obter informções sobre a influência dos hormônios femininos na saúde bucal. Eles usaram saliva estimulada de nove mulheres grávidas coletadas um mês antes do parto, e

dois meses depois, durante a amamentação. O grupo controle era composto de 17 mulheres saudáveis e não grávidas. Os achados não evidenciaram diferença estatisticamente significante na concentração de ACVI entre as amostras coletadas no final da gravidez e no pós parto, mas a capacidade tampão foi significativamente menor durante a gravidez. Nenhuma mudança foi encontrada na taxa de secreção salivar. Pequenas variações na capacidade tampão e taxa de secreção salivar intra-indivíduos foram encontradas em mulheres não gravidas.

Nem a concentração salivar de ACVI nem a taxa de secreção salivar foram afetados pela gravidez, a concentração da anidrase carbônica VI apresentou uma pequena, mas satisfatória correlação positiva com a taxa de secreção salivar durante a gravidez, mas não no pós parto. O valor da capacidade tampão mostrou-se mais baixo durante a gravidez do que no pós parto em seis mulheres e manteve-se inalterado em outra três mulheres. A gravidez afeta o equilíbrio acido-base do plasma, e não é impossivel que a queda do bicarbonato no plasma possa contribuir para a queda da concentração do bicarbonato salivar. Esse estudo concluiu então que ACVI não é responsável pela variação da capacidade tampão durante a gravidez, e confirmou estudos anteriores, de que ACVI não está envolvida diretamente na regulação do pH e da capacidade tampão. Entretanto nenhuma explicação foi encontrada para a queda do pH e da capacidade tampão durante a gravidez. Além disso as possíveis alterações no plasma modificaram a capacidade tampão, isso é possível porque as variações no status hormonal podem alterara a expressão da ACVI nas glândulas salivares e isso pode modificar a secreção de bicarbonato na saliva.

Kimoto (2006) realizou uma pesquisa com o objetivo de confirmar a presença da ACVI na saliva. Nove pessoas saudáveis participaram dessa pesquisa, e o pH da placa dental foi monitorado depois de uma lavagem com solução de sacarose 10% com ou sem acetazolamida a 10^{-5}M um inibidor específico da anidrase carbônica, que quando usada em 10^{-4}M ou menos não tem efeito sobre qualquer outra enzima.

O bicarbonato difunde-se na saliva e na placa e combina com o H^+ para formar ácido carbônico essencial e instantaneamente. Por sua vez o H_2CO_3, desidrata à CO_2 e água em uma reação muito lenta. Nesse estudo a acetazolamida aumentou a queda do pH da placa induzida pela sacarose . Os resultados mostraram que o pH da placa caiu drasticamente após a lavagem com solução de sacarose, alcançando o valor mínimo após 5', seguidos do retorno gradual dos valores de antes da lavagem. O efeito salivar sobre o pH da placa dental foi atribuído a água que lava os açúcares, ácidos e agentes tamponantes que neutralizaram os ácidos.

A análise de Western blot demonstrou que a placa continha ACVI mas não ACI ou ACII. Portanto, os autores concluíram que a ACVI da placa provinha da saliva e não do sangue. A ACVI mostrou atividade em pH menor que 2,2.

Em conclusão, ACVI demonstrou contribuir para a neutralização da acidez da placa. A contribuição é muito melhor na saliva estimulada, cujo tampão for o bicarbonato, sendo considerada uma proteína anti-cárie da saliva.

Portanto o aumento da queda do pH pôde ser atribuída a inibição da AC catalisada por tampão bicarbonato.A inibição completa da ACVI pela acetozolamida causa queda do pH da placa, tendo efeito deteriorante ao dente.

Öztürk et al. (2008) propuzeram em seu estudo associar a saúde dental em jovens adultos com os níveis da glutationa

salivar (antioxidante, cuja queda está associada ao aumento de doenças periodontais), peroxidação lipídica (indicador de dano oxidativo, que causa a degeneração da membrana celular do tecido oral na ocorrência de doenças inflamatórias) , taxa de ácido siálico (mediador para adesão bacteriana) e atividade da anidrase carbônica VI (enzima chave para o sistema fisiológico bucal).

A amostra foi composta por 18 indivíduos jovens, divididos em dois grupos, um com cárie e o outro livre de cárie. Esses indivíduos foram orientados a não fumar, beber e comer apenas 12h antes da coleta e a escovar os dentes pela manhã. As amostras de saliva foram coletadas entre 8:30 e 11:00 h. Proteína total na saliva não estimulada, glutationa, níveis de peroxidação lipídica e ácido siálico, atividade da anidrase carbônica, capacidade tampão e pH foram determinados por métodos padronizados.

Os resultados de uma análise clínica mostraram que o índice de placa e o índice gengival não apresentaram diferença significativa entre os dois grupos. Já o índice CPO-D foi bem significativo, sendo de zero para os livres de cárie e 5,6 para os com cárie.

Os níveis de glutationa foram significativamente menores em indivíduos com cárie (1,6 ± 0,75) em relação aos indivíduos livres de cárie (2,2 ±0,8). Além disso, os níveis de glutamina apresentaram correlação negativa com o índice CPO-D, podendo ser atribuído ao efeito antioxidante da glutationa salivar contra a ação da cárie. A taxa de peroxidação lipídica mostrou-se semelhante nos dois grupos (0,33± 0,28 livre de cárie, 0,3± 0,15 com cárie), bem como os níveis de ácido siálico (36,3 ± 12, 8 livre de cárie, 36 ± 14,56 com cárie).

Nesse estudo também não foi detectada diferença significativa na atividade da anidrase carbônica VI para os dois

grupos (26,8 ± 6,8 livre de cárie, 27,2 ± 11,03 com cárie). Além disso, não encontrarem nenhuma correlação negativa entre o índice CPO-D e a atividade da ACVI no grupo com cárie. Isto possivelmente ocorreu devido à boa higiene bucal e gengival dos indivíduos analisados.

Peres et al. (2010) propuseram analisar a distribuição do alelo e do genótipo de três poliformismos no código sequencial do gene da ACVI e checar a possibilidade dessa associação com a capacidade tampão salivar, índice CPO-D em dentes decíduos e permanentes, índice de placa e a variação do pH da placa em 245 crianças com idade de 7 a 9 anos residentes em cidade com fornecimento de água fluoretada. As crianças foram divididas em dois grupos: livres de cárie e com cárie.

As amostras foram coletadas 2h depois da primeira refeição para mensurar a capacidade tampão, e o pH da placa foi medido imediatamente e após 5' do bochecho com solução de sacarose a 10%.

Os resultados indicaram que o índice de placa e a variação do pH da placa nos dentes superiores e inferiores foi significativamente maior no grupo de crianças com cárie comparado ao grupo controle. Já a capacidade tampão não apresentou diferença entre os grupos.

Os testes para associar os alelos e genótipos dos três polimorfismos do gene AC6 não mostraram associação com a experiência de cárie. Uma correlação positiva foi encontrada entre a capacidade tampão e o polimorfismo rs2274327 quando as crianças foram divididas em três grupos para capacidade tampão: alto (pH 8,0 – 7,45), intermediario (pH 7,24 – 6,78) e baixo (ph 6,77 – 3,77). O alelo T e o genótipo TT apresentaram frequência menor em indivíduos com capacidade tampão alta.

Esse estudo também confirmou que os valores da capacidade tampão não estavam relacionados com a cárie dental. Embora parecesse óbvio que a capacidade tampão salivar fosse um fator que contribuísse para a degradação do esmalte, esse efeito pode ter sido ofuscado por outros fatores importantes que também contribuíram para o desenvolvimento da cárie; higiene oral,presença de bactérias cariogênicas, consumo de açúcar e exposição a agentes fluoretados. Esse raciocínio pode explicar a falta de associação entre o polimorfismo ACVI e a cárie, como observado nesse estudo.

3- CONCLUSÃO

A análise da literatura sugere que existe uma correlação positiva entre a concentração da isoenzima anidrase carbônica VI na saliva e a prevalência de cárie.

REFERÊNCIAS

1- Bardow A, Moe D, Nyvad B, Nauntofte B. The buffer capacity and buffersystems of human whole saliva measured without loss of CO2. Arch Oral Biol 2000; 45: 1–12.15 Vitorino R, Lobo MJ, Duarte

2- Becks, H. and Wainwright, W.: Human saliva. J. dent. Res. 1939; 18: 447-456.

3- Feldstein JB, Silverman DN. Purification and characterization of carbonic anhydrase from the saliva of the rat. J Biol Chem 1984; 259: 5447–5453.

4- Henkin RI, Martin BM, Agarwal RP. Decreased parotid saliva gustin/ carbonic anhydrase VI secretion: an enzyme disorder manifested by gustatory and olfactory dysfunction. Am J Med Sci 1999; 318: 380–391.

5- Kadoya Y, Kuwahara H, Shimazaki M, Ogawa Y, Yagi T. Isolation of a novel carbonic anhydrase from human saliva and immunohistochemical demonstration of its related isozymes in salivary gland. Osaka City Med J 1987; 33: 99–109.

6- Karhumaa P, Leinonen J, Parkkila S, Kaunisto K, Tapanainen J, Rajaniemi H. The identification of secreted carbonic anhydrase VI as a constitutive glycoprotein of human and rat milk. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 11604–11608.

7- Kimoto M, Kishino M, Yura Y, Ogawa Y. A role of salivary carbonic anhydrase VI in dental plaque. Arch Oral Biol 2006; 51: 117–122.

8- Kivela J, Laine M, Parkkila S, Rajaniemi H: Salivary carbonic anhydrase VI and its relation to salivary flow rate and buffer capacity in pregnant and nonpregnant women. Arch Oral Biol 2003;48: 547-551.

9- Kivela J, Parkkila S, Parkkila A-K, Rajaniemi H, Leinonen J. Topical review; Salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI. J. of Physiology 1999; 520.2: 315-320

10- Kivela J, Parkkila S, Parkkila A-K, Rajaniemi H. A low concentration of carbonic anhydrase isoenzyme VI is associated with caries prevalence. Caries Res 1999; 33: 178–184

11- Kivelä J, Parkkila S, Waheed A, Parkkila AK, Sly WS, Rajaniemi H: Secretory carbonic anhydrase isoenzyme (CA VI) in human serum. Clin Chem 1997b Dec;43;12: 2318-2322.

12- Kivela¨ J, Parkkila S, Metteri J, Parkkila A-K, Toivanen A, Rajaniemi H. Salivary carbonic anhydrase VI concentration and its relation to basic characteristics of saliva in young men. Acta Physiol Scand 1997; 161:221–225.

13- Leiner, M.: Die Arbeiten der letzten Jahre über das Ferment Kohlensäure-anhydratase. Fermentforsgung 1942; 16: 503-505.

14- Leinonen J, Kivela J, Parkkila S, Parkkila A-K, Rajaniemi H. Salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI is located in the human enamel pellicle. Caries Res 1999; 33: 185–190.

15- Oztürk LK, Furuncuoglu H, Atala MH, Uluk_l` OS, Aky`z S, YARAT, A: Association between dental-oral health in young adults and salivary glutathione, lipid peroxidation and sialic acid levels and carbonic anhydrase activity . Brazilian Journal of Medical and Biological Research 2008;4: 956-959.

16- Parkkila S, Parkkila A-K, Lehtola J, Reinila¨ A, So¨dervik H-J, Rannisto M et al. Salivary carbonic anhydrase protects gastroesophageal mucosa from acid injury. Dig Dis Sci 1997; 42: 1013–1019.

17- Peres RCR, Camargo G, Mofatto LS, Cortellazzi KL, Santos MCLG, Santos MN, Bergamaschi CC and Line SRP: Association of polymorphisms in the carbonic anhydrase 6 gene with salivary buffer capacity, dental plaque pH, and caries índex in children aged 7-9 years . The Pharmacogenomics J 2010; 10: 114-119.

18- Rapp, G. W.: The biochemistry of oral calculus. II. The presence of carbonic anhydrase in human saliva. J. amer. dent. Ass. 1946; 33: 191-194.

19- Szabó I. Carbonic anhydrase activity in the saliva of children and its relation to caries activity. Caries Res 1974; 8:187–191.

20- Vitorino R, Lobo MJ, Duarte J, Ferrer-Correia AJ, Tomer KB, Dubin JR et al. In vitro hydroxyapatite adsorbed salivary proteins. Biochem Biophys Res Commun 2004; 320: 342–346.