

# Caries dental en adultos jóvenes en relación con características microbiológicas y fisicoquímicas de la saliva

## Dental caries in young adults regarding saliva's microbiological and physical-chemical characteristics

María C. Martínez-Pabón, Sandra M. Morales-Uchima y  
Cecilia M. Martínez-Delgado

Facultad de Odontología, Universidad de Antioquia. Medellín Colombia. macemapa@hotmail.com; sandrammu@gmail.com; cmariammar@hotmail.com

Recibido 16 Noviembre 2012/Enviado para Modificación 10 Julio 2013/Aceptado 16 Agosto 2013

### RESUMEN

**Objetivo** Determinar la relación entre características fisicoquímicas de la saliva, el recuento de microorganismos cariogénicos, bacterias anaerobias facultativas y gram negativas, con la experiencia de caries en adultos jóvenes.

**Materiales y Métodos** Se recolectó saliva total estimulada de 120 estudiantes de odontología entre 17 y 34 años de edad, para el análisis de tasa de flujo salivar, pH, concentraciones de iones de calcio y fosfato, ácido láctico, recuento de microorganismos cariogénicos, bacterias facultativas y gram negativas.

**Resultados** La tasa de flujo salivar se incluyó en el intervalo biológico de referencia y no se asoció con la presencia de caries dental, lo mismo sucedió con los niveles de ácido láctico. Se encontró relación directamente proporcional entre las concentraciones de calcio y fosfato y la presencia de caries. Los recuentos de *Streptococcus* del grupo Mutans se relacionaron con la presencia de lesiones de mancha blanca; *Lactobacillus* spp, bacterias anaerobias facultativas y gram negativas se asociaron a presencia de lesiones cavitacionales de caries.

**Conclusiones** En el grupo de adultos jóvenes evaluado, las características fisicoquímicas y microbiológicas de la saliva se relacionan de manera diferencial con la presencia de caries dental en diferentes grados de avance.

**Palabras Clave:** Caries dental, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus*, ácidoláctico, calcio, fosfato, adulto joven (fuente: DeCS, BIREME).

### ABSTRACT

**Objective** Determining the relationship between saliva's physicochemical properties, cariogenic microorganism count, facultative anaerobic and gram-

negative bacteria based on caries' experience in young adults.

**Materials and Methods** Stimulated whole saliva was collected from 120 students aged 17 to 34 years old for analysing salivary flow rate, pH, calcium and phosphate ion concentration, lactic acid, cariogenic microorganism count and facultative and gram-negative bacteria.

**Results** Salivary flow rate was included in the biological reference interval but was not found to be associated with caries; the same thing happened regarding lactic acid. A direct relationship was found between calcium and phosphate concentration and dental cavities. *Streptococcus mutans* was associated with white spot lesion whereas *Lactobacillus spp.*, facultative anaerobic and gram-negative bacteria were associated with advanced cavities.

**Conclusions** Saliva's physicochemical and microbiological characteristics in the young adult group evaluated here were differentially related to caries in different degrees of progress.

**Key Words:** Dental caries, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus*, lactic acid, calcium, phosphate, young adult (source: MeSH, NLM).

La caries dental es una enfermedad multifactorial (1) que constituye un problema de salud pública por su magnitud, ocasiona dolor, absentismo escolar y laboral, dificultades alimenticias, de fonación, estéticas y su tratamiento es costoso (2). En 2003 la OMS (3) reportó que 5 000 millones de personas padecen caries, en América Latina afecta al 98 % de la población adolescente (4) mientras que en Colombia, la prevalencia en adultos jóvenes (30-34 años) es del 76 % y en adolescentes (14-19 años) del 89,5 % (5). El índice de dientes cariados perdidos y obturados (CPO-d) presenta incrementos permanentes de 5 dientes afectados a medida que avanza la edad (5), este aumento en adolescentes sugiere que durante este período se disminuye la prevención y control de la enfermedad que se realiza en la etapa escolar (6) y las consecuencias se evidencian en la alta prevalencia en la adultez (5), por lo tanto, estudiar la experiencia de caries en adultos jóvenes, puede resultar útil para evaluar la efectividad de los programas de intervención de caries en la infancia y dirigir esfuerzos a la conservación de lo logrado en las primeras etapas de la vida en materia de prevención (7).

Microorganismos como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacillus spp.*, entre otros, contribuyen a la formación de biopelículas dentales (9). Durante el metabolismo de carbohidratos (8,9), liberan ácido láctico que se difunde de la placa dental al esmalte, disolviendo el mineral, con la pérdida neta de minerales que puede generar una cavidad (10,11). La saliva desempeña funciones protectoras como la dilución y eliminación de

azúcares, amortiguación del pH, limpieza, lubricación y mantenimiento de la integridad de las mucosas (12), acción antimicrobiana y sostenimiento del equilibrio desmineralización/remineralización (13).

Debido a la escasa información disponible sobre la salud bucal de adultos jóvenes, no se ha determinado la relación de la enfermedad en este grupo de edad con sus factores de riesgo. El objetivo de este trabajo fue explorar la relación entre características fisicoquímicas de la saliva, el recuento bacteriano de *Estreptococos* del grupo Mutans (EM), *Lactobacillus spp.*, bacterias facultativas y gram negativas con la presencia de caries en diferentes grados de avance, en adultos jóvenes estudiantes de odontología de la Universidad de Antioquia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un muestreo por conveniencia mediante convocatoria abierta entre estudiantes de odontología de la Universidad de Antioquia (Colombia). Se incluyeron sujetos con mínimo 22 dientes, sin enfermedad sistémica, aparatos de ortodoncia, consumo de antibióticos o antiinflamatorios. Las evaluaciones clínicas y la recolección de muestras de saliva fueron realizadas entre Mayo y Agosto del 2011, logrando un tamaño muestral de 120 individuos entre 17 y 34 años. El propósito y procedimientos del trabajo fueron explicados y posteriormente cada individuo podía decidir sobre su participación y firmar el consentimiento informado.

La experiencia de caries fue evaluada por un examinador estandarizado (*Kappa* de Cohen 0,72) (IC 0,65 a 0,78), usando un método visual-táctil (14). Los hallazgos clínicos fueron organizados en cuatro variables: mancha blanca, cavidades, caries actual (suma de mancha blanca y cavidades) y experiencia de caries (incluye las restauraciones).

Se recolectó saliva estimulada en un tubo plástico graduado de 50 mL (GreinerBio-One, Frickenhausen, Alemania), durante 5 min. Las muestras fueron procesadas dentro de los siguientes 45 min. Se calculó la tasa de secreción salivaren mL/minuto y el pH se determinó con un potenciómetro digital (Metrohm Ion Análisis, Herisau, Suiza).

La cantidad de ácido láctico en saliva fue determinada con el método de Rosenberg (15) revalidado para utilizarlo en saliva. Se realizó lectura de la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific,

Genesys 10S UV-VIS. Madiso, USA). La prueba cuantifica ácido láctico entre 0.2 a 3 mmol/L.

Para medir la concentración de calcio se siguió el método del arsenazo III (16), La absorbancia se determinó a una longitud de onda de 650 nm en un lector de microplacas (Thermo Scientific Multiskan Spectrum, Vantaa, Finlandia).

La concentración de fosfato salival se calculó según el protocolo de Fiske y Subbarow (17). La intensidad del color se midió por absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro (Beckman DU-70, Brea, CA, EE.UU).

Para los análisis microbiológicos se realizaron diluciones seriadas en caldo cerebro corazón (Merck, Darmstadt, Alemania). Las diluciones  $10^{-5}$ , y  $10^{-6}$  fueron sembradas en agar Mitis Salivarius (Difco, EE.UU) suplementado con telurito de potasio (0,001 %), bacitracina (0,2 U/mL) (Sigma, EE.UU) y sacarosa (10 %) (w/v) (CJ Co., Corea) (agar MSB) para la detección de EM; se inoculó la dilución  $10^{-3}$  y 1 mL de saliva total en agar Rogosa para la detección de *Lactobacillus spp.* (OxoidBasingstoke, Hampshire, Inglaterra). Las diluciones  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  se inocularon en agar sangre de cordero para realizar el recuento de bacterias facultativas y gram negativas. Las placas de agar se incubaron anaeróbicamente con 5 % de  $\text{CO}_2$ , 24 horas a 37°C. Los crecimientos fueron evaluados con 10-50X usando un estereomicroscopio (Stemi 2000R Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

#### Análisis estadístico

La tabulación fue realizada en el programa Excel® (Microsoft office 2007) e importada al programa SPSS® (Statistical Package for Social Sciences) for Windows, Version 19 (SPSS Inc., Chicago, IL). Las variables cuantitativas se analizaron con medidas de tendencia central y las cualitativas en frecuencias relativas. Se exploró asociación estadísticamente significativa mediante correlación de Pearson asumiendo un valor de  $p < 0,05$ , igualmente se utilizó ANOVA y análisis multivariado.

## RESULTADOS

Las características demográficas y clínicas aparecen en la Tabla 1. El 92 % de los individuos sufrían de algún tipo de caries dental, observando un

promedio de 6,45 (d.s.±6,3), con el mayor aporte dado por las lesiones de mancha blanca. La distribución de la caries según la edad y el sexo no presentó diferencias significativas estadísticamente. Las características fisicoquímicas (tasa de secreción salivar, pH, concentración de ácido láctico, concentración de calcio y fosfato iónico total), y microbiológicas (recuento de bacterias facultativas, gram negativas, EM y *Lactobacillus spp.*) se resumen en la Tabla 2.

**Tabla 1.** Características demográficas y hallazgos clínicos de los adultos jóvenes evaluados

Característica	Frecuencias y Promedio (%) (d.s.) (n=120)
Género	
Masculino	35 (29,2)
Femenino	85 (70,8)
Edad (años) <sup>a</sup>	
≤ 20	69 (57,5)
> 20	51 (42,5)
Ingesta carbohidratos <sup>a</sup>	
Hasta 3/día	30
Hasta 5/día	70
Hasta 7/día	
Experiencia de caries <sup>b,c</sup>	11,16 (d.s.±8) (0–31)
Caries actual <sup>d,c</sup>	6,45 (d.s.±6,3) (0 – 27)
Mancha blanca <sup>e,c</sup>	6,36 (d.s.±6,3) (0 – 27)
Cavitaciones <sup>f,c</sup>	0,09 (d.s.±0,37) (0 – 2)

<sup>a</sup> Valor expresado como % de sujetos; <sup>b</sup> Datos basados en el número de superficies cariadas y obturadas (DFS).

<sup>c</sup> Valores dados en promedio y desviación estándar; <sup>d</sup> Valores basados en el número de superficies cariadas (mancha blanca y cavidades).

<sup>e</sup> Valores basados en el número de superficies con caries de mancha blanca (scores 1 y 2 de ICDAS).

<sup>f</sup> Valores basados en el número de superficies con caries cavitacional (scores 3,4,5 y 6 de ICDAS).

No se encontraron diferencias entre la frecuencia del consumo de carbohidratos y los hallazgos clínicos, ni entre el grado de avance de la caries por género y edad.

Fueron evidenciadas diferencias significativas estadísticamente (correlación de Pearson,  $p < 0,05$ ), entre la concentración de calcio y fosfato con la presencia de caries actual y con mancha blanca. Los recuentos de EM y microorganismos facultativos presentaron diferencias significativas según el grado de avance de la caries; los recuentos de *Lactobacillus spp.*, se relacionaron significativamente ( $p < 0,05$ ) con la presencia de cavidades (Tabla 3).

**Tabla 2.** Características fisicoquímicas y microbiológicas de la saliva en los adultos jóvenes evaluados

Característica <sup>a</sup>	Promedio (n=120)	d.s.
Tasa flujosalivar(1-3 mL/min) <sup>c</sup>	1,3 mL/min (0,21-3)	± 0,5
pH salivar (6.5-7.5) <sup>c</sup>	7,7 (6,8-8,3)	± 0,3
Concentración Ácido Láctico	4,4 (0,17-28,8)	± 4,5
Concentración Ca (0,5-2,8 mM) <sup>c</sup>	0,4 (0,09-0,98)	± 0,18
Concentración Pi (2-22 mM) <sup>c</sup>	3,7(1,9-7,5)	± 0,9
Recuento Facultativos	1,31 x 10 <sup>9</sup> (1,5 x 10 <sup>7</sup> - 9,3 x 10 <sup>9</sup> )	± 2,1 x 10 <sup>9</sup>
Recuento Estreptococos Grupo Mutans (EM)	5,65 x 10 <sup>7</sup> (0-4,8 x 10 <sup>8</sup> )	9,3 x 10 <sup>7</sup>
Recuento <i>Lactobacillus spp.</i>	1,7 x 10 <sup>6</sup> (0-1,2 x 10 <sup>8</sup> )	1,1 x 10 <sup>7</sup>
Variable	Frecuencia (%) <sup>b</sup>	
Recuento bacterias Gram-negativas	8,73 (0 - 43)	

a. Valores dados en promedio, valor máximo y mínimo, y desviación estándar.

b. Valores expresados en frecuencias (%).

c. Valores de referencia

Mediante el análisis de Varianzas (ANOVA,  $p > 0,05$ ) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre pH salivar y flujo salivar con la experiencia de caries.

**Tabla 3.** Análisis bivariado entre caries y características fisicoquímicas y microbiológicas de la saliva

Variables	Experiencia de caries(a)	Cavitaciones(a)	Mancha blanca(a)	Caries actual(a)
Tasa de secreción	0,13	0,053	0,99	0,96
pH salivar	0,92	1,0	0,26	0,60
Concentración ácido Láctico (mM)	0,6	0,24	0,7	0,5
Concentración Ca (mM)	0,4	0,4	0,3	0,05*
Concentración Pi (mM)	0,6	0,2	0,03*	0,02*
Recuento <i>Lactobacillus spp.</i>	0,00*	0,000*	0,574	0,566
Recuento Estreptococos grupo Mutans (EM)	0,7	0,001*	0,000*	0,000*
Recuento bacterias Gram negativas (%)	0,6	0,024*	0,150	0,162
Recuento Facultativos	0,3	0,000*	0,006*	0,006*

a. Correlación de Pearson ( $p < 0,05$ )

En el análisis multivariado, asumiendo como variables fijas la tasa de flujo salivar y el pH de la saliva; como variables dependientes el avance de la caries (mancha blanca, cavitaciones y experiencia de caries) y como covariables el recuento de EM y *Lactobacillus spp.*, se presentaron diferencias significativas estadísticamente ( $p < 0,05$ ); esto quiere decir que el recuento microbiológico y las características fisicoquímicas observadas en las muestras de saliva, se asocian positivamente con la presencia de caries.

## DISCUSIÓN

Involucrar como sujetos de estudio a estudiantes de odontología sugiere posibles factores protectores que llevarían a una prevalencia de caries menor, sin embargo los hallazgos no soportan tal supuesto y por el contrario, concuerdan con los estudios de García *et al.*, en jóvenes de México, Kruger *et al.*, en adolescentes de Nueva Zelanda, González *et al.*, en jóvenes de Venezuela, (18-20), donde encontraron prevalencias de caries en adultos jóvenes cercanas al 90 %. En Colombia, el ENSAB III reportó una prevalencia de caries en adultos jóvenes del 76 %, inferior a la encontrada en este estudio, posiblemente porque el presente trabajo utilizó el Sistema Internacional de Diagnóstico y Valoración de Caries Dental (ICDAS), el cual incluye la evaluación de caries incipiente (14).

La lesión de mancha blanca fue la más frecuente en los individuos evaluados (6,36 superficies por individuo); sin embargo, en este estudio no se indagó si el paciente tuvo anteriormente tratamiento de ortodoncia, como posible factor de riesgo (21).

Un hallazgo importante es la correlación positiva entre la concentración de calcio y las lesiones de caries actual, acorde con los resultados obtenidos por Sewon *et al.*, (1998) (22) quienes afirman que la alta concentración de calcio está vinculada con presencia de placa bacteriana, debido a que por su afinidad puede ser fácilmente tomado y utilizado por los microorganismos (23), además la desmineralización durante el progreso de la caries libera iones de calcio a la saliva (24). Otro factor es la edad de los individuos analizados ya que la concentración de calcio salivar es significativamente más alta en jóvenes que están finalizando su maduración esquelética y dental (25). Además los niveles de calcio en saliva también pueden reflejar las variaciones de este mineral en la dieta (26), pero este estudio no evaluó el consumo de calcio por lo cual no se puede demostrar esta relación. Los resultados obtenidos difieren con lo encontrado por Duckworth *et al.*, (1993) y Jawed *et al.*, (2012) (27,28) quienes indican que a mayor cantidad de calcio menor experiencia de caries, sugiriendo que el calcio iónico tiene un papel protector.

Los niveles de fosfato iónico mostraron correlación con los diferentes grados de avance de caries, indicando que el fosfato influye en el desarrollo de la placa dental, explicado por la función inhibitoria de los fosfatos libres que disminuyen la unión de proteínas antimicrobianas como la apo-lactoferrina (29).

Varios autores han mostrado controversias cuando se refieren a que el ion fosfato tiene un efecto inhibitor de la caries, debido a que actúa disminuyendo la pérdida de fósforo del diente y de esta manera, la desmineralización del esmalte (30).

A pesar de la relación que muestran varias investigaciones (31,32) entre la concentración de ácido láctico y la caries dental, en este estudio no se encontró evidencia suficiente para asociarlas.

El promedio de pH de las muestras se encontró levemente aumentado comparado con el intervalo de referencia (33,34), revelando que es posible que la capacidad buffer de la saliva de los individuos estudiados mantenga el pH bucal elevado y por esto no se observó correlación con la presencia de caries.

En la etiología de la caries numerosos estudios (35,36) han notificado la participación de EM y *Lactobacillus spp.* Sin embargo, esto no es una verdad absoluta, ya que se han descrito casos de caries en ausencia de estos microorganismos (9) y también se han encontrado haciendo parte de la flora normal de personas sin caries (37,38), ratificando que la caries es un proceso dinámico donde interactúan varios factores, algunos de los cuales pueden ser utilizados como indicadores de pronóstico o de enfermedad (39).

La presencia de caries en diferentes grados de avance estuvo correlacionada significativamente con el recuento de EM ( $p < 0,05$ ), microorganismos considerados cariogénicos gracias a su capacidad de sintetizar glucosil y fructosiltransferasas a partir de carbohidratos, los cuales facilitan la formación de biopelículas (35). *Streptococcus mutans* se ha identificado en las lesiones de mancha blanca (40) y en lesiones cavitadas, lo que señala una asociación de esta especie con el progreso de caries (41). La significancia estadística encontrada entre el recuento de *Lactobacillus spp.*, y la presencia de cavidades ( $p < 0,05$ ) es acorde con otros estudios (42,43) que informan una relación entre el recuento alto de este microorganismo y la presencia de lesiones avanzadas. Una posible explicación para esta afirmación es la incapacidad de *Lactobacillus spp.*, de adherirse a superficies lisas para lo cual aprovecha fisuras, fosas o cavitaciones para colonizar. Entre las especies predominantes en lesiones cavitarias se incluyen *L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus*, entre otros (43,44). Este género es considerado acidógeno y acidúrico, en presencia de

hidratos de carbono dietarios produce sustancias como etanol, CO<sub>2</sub> y ácido láctico por la acción de la enzima lactato deshidrogenasa, dando como resultado la acidificación del pH salivar (10,45).

Aunque el promedio de bacterias gram negativas constituyeron un porcentaje bajo se pudo evidenciar una relación estadísticamente significativa con la presencia de cavidades ( $p < 0,05$ ), lo cual tiene concordancia si se tiene en cuenta que microorganismos como *Prevotella spp.*, *Actinobacillus spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Leptotrichia spp.*, *Porphyromona ssp.* aprovechan para su crecimiento lesiones de caries avanzadas atravesando la dentina y llegando cerca a la pulpa (44,46).

El recuento de bacterias anaerobias facultativas es un reflejo de la cantidad de microorganismos existentes en cavidad oral y que pueden hacer parte o no de la placa dental (47). En este estudio se encontró una relación significativa estadísticamente ( $p < 0,05$ ) entre el recuento de facultativos y los grados de avance de caries evaluados, indicando que en este recuento se encuentran gran cantidad de microorganismos involucrados en la génesis de la caries.

Los resultados obtenidos permiten decir que algunas características fisicoquímicas y microbiológicas de la saliva deben ser tomadas en cuenta y evaluadas a futuro como probables indicadores de la enfermedad de manera diferencial según sus distintos grados de avance. Los adultos jóvenes deben ser estudiados con mayor profundidad no solo en sus características socio-epidemiológicas sino también biológicas en relación con las enfermedades bucales ♣

**Agradecimientos:** Agradecemos a Juan Lopera, Lina Patiño, Gloria Pabón y Diana Isaza por sus aportes al proyecto.

**Conflicto de intereses:** Ninguno

## REFERENCIAS

1. Harris R, Nicoll A, Adair P, Pine C. Risk factors for dental caries in young children: a systematic review of the literature. Community Dent Health. [Meta-Analysis Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. 2004;21(1 Suppl):71-85.
2. Petersen P, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan D, Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. Bull World Health Organ. 2005;83(9):661-9.

3. Petersen P. World Health Report 2003. Continuous improvement of oral health in the 21st century the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2003;31:3-24.
4. Bönecker M, Cleaton-Jones P. Trends in dental caries in Latin American and Caribbean 5-6- and 11-13-year-old children: a systematic review. *Oral Epidemiol.* 2003;31(2):152-7.
5. Ministerio de la Protección Social. Estudio Nacional de Salud Bucodental (ENSAB III). Bogotá-Colombia; 1994.
6. Franco A, Guzmán I, Gómez A, Ardila C. Reemergencia de la caries dental en adolescentes. *Av odontostomatol.* 2010;26:263-70.
7. Peres A, Peres G, Traebert J, Zabot E, de Lacerda, Josimari T. Prevalence and severity of dental caries are associated with the worst socioeconomic conditions: A Brazilian cross-sectional study among 18-year-old males. *J Adolesc Health.* 2005;37(2):103-9.
8. Peltroche H, Hauk C, Kock R, Lampert F, Ltickenl R. Assessment of Acid Production by Various Human Oral Micro-organisms when Palatinose or Leucrose is Utilized. *J Dent Res.* 2001;80(1):378-84.
9. Thenisch N, Bachmann L, Imfeld T, Leisebach T, Steurer J. Are mutans streptococci detected in preschool children a reliable predictive factor for dental caries risk? A systematic review. *Caries Res.* 2006;40(5):366-74.
10. Bretz W, Corby P, Costa S, Quadros M, Tavares V, Moreira G, et al. Microbial acid production (ClinproCario L-Pop) and dental caries in infants and children. *Quintessence Int.* 2007;38(4):213-7.
11. Fejerskov O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1997;25(1):5-12.
12. Jankowska A, Waszkiel D, Kowalczyk A. Saliva as a main component of oral cavity ecosystem. Part I. Secretion and function. *Wiad Lek.* 2007;60(3-4):148-54.
13. Mandel I. The functions of saliva. *J Dent Res.* 1987;6(623):7.
14. Ismail A, Sohn W, Tellez M, Amaya A, Sen A, Hasson H, et al. The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2007;35:170-8.
15. Rosenberg J, Rush B. An Enzymatic-Spectrophotometric Determination of Piruvic and lactic Acid in Blood. *Clin Chem.* 1957;12(5):299-307.
16. Smith H, Bauer P. Light-induced permeability changes in sonicated bovine disks: arsenazo III and flow system measurements. *Biochemistry.* 1979;18:5067-73.
17. Fiske C, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem.* 1925;66:375-400.
18. García J, Medina C, Loyola J, Mejía J, Medina E, Patiño N, et al. Dental caries' experience, prevalence and severity in Mexican adolescents and young adults. *Rev Salud Publica (Bogotá).* 2009;11(1):81-91.
19. Kruger E, Thomson W, Poulton R, Davies S, Brown R, Silva P. Dental caries and changes in dental anxiety in late adolescence. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1998;26:355-9.
20. González A, Martínez T, Alfonzo N, Rodríguez J, Morales A. Dental caries and risk factors present in young adults. *Rev Cubana Estomatol.* 2009;46(3):30-7. 41.
21. Barrero L. White spots: associated to enamel lesion after orthodontic treatment. *Rev Estomat.* 2005;13(1):30-5.
22. Sewon L, Karjalainen S, Soderling E, Lapinleimu H, Simell O. Associations between salivary calcium and oral health. *J Clin Periodontol.* 1998;25:915-9.
23. Leitao T, Tenuta L, Ishi G, Cury J. Calcium binding to S. mutans grown in the presence or absence of sucrose. *Braz Oral Res.* 2012;26(2):100-5.
24. Tanaka M, Kadoma Y. Comparative reduction of enamel demineralization by calcium and phosphate in vitro. *Caries Res.* 2000;34(3):241-5.
25. Shatha H, Tahani S, Rafidain A. Salivary calcium concentration in patients with high incidence of calculus formation. *Dent J.* 2005;5(1).

26. Nupur S, Shobha P, Hemant B. Estimation and comparison of salivary calcium levels in healthy subjects and patients with gingivitis and periodontitis: a cross-sectional biochemical study. *Archives of Oral Sciences & Research*. 2012;2(1):13-6.
27. Duckworth R. Minimal intervention dentistry: A new focus for dental hygiene. "The science behind caries prevention". *Int Dent J* 1993;43(6):529-39.
28. Jawed M, Khan RN, Shahid SM, Azhar A. Protective effects of salivary factors in dental caries in diabetic patients of pakistan. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:947304.
29. Lassiter M, Newsome A, Sams L, Arnold R. Characterization of lactoferrin interaction with *Streptococcus mutans*. *J Dent Res*. 1987;66(480).
30. Shaw L, Murray J, Burchell C, Best J. Calcium and phosphorus content of plaque and saliva in relation to dental caries. *Caries Res*. 1983;17(6):543-8.
31. Carter W, Dunn J, Fosdick L, Moore B. The formation of lactic acid in dental plaques. I. Caries-active individuals. *J Dent Res*. 1956;35(5):778.
32. Llana M, Almerich S, Forner J, Navarro L R. Lingual surface lactic acid assessment. Its relation with the presence of active caries. *RCOE*. 2004;9(3):303-8.
33. Axelsson P. Internal codifying factors involved in dental caries. In: Axelsson P. *Diagnosis and risk prediction of dental caries*. Chicago, USA. Quintessence Publishing Company; 2000. p 93.
34. Preethi P, Dodawad R, Pyati A. Evaluation of Flow Rate, pH, Buffering Capacity, Calcium, Total Proteins and Total Antioxidant Capacity Levels of Saliva in Caries Free and Caries Active Children: An In Vivo Study. *Indian J ClinBiochem*. 2010;25(4):425-8.
35. Figueroa M, Alonso G, Acevedo A. Microorganismos presentes en las diferentes etapas de la progresión de la lesión de caries dental. *Acta Odonto Venez*. 2009;47(1):1-13.
36. Van Houte J, Jordan H, Laraway R, Kent R, Soparkar P, DePaola P. Association of the microbial flora of dental plaque and saliva with human root-surface caries. *J Dent Res*. 1990;69(8):1463-8.
37. Kleinberg I. A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: an alternative to *Streptococcus mutans* and specific-plaque hypothesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(2):108-25.
38. Bowden G. The microbial ecology of dental caries. *Microb Ecol Health D*. 2000;12:138-48.
39. Bratthall D, Hånsel G. Cariogram-a multifactorial risk assessment model for a multifactorial disease. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2005;33(4):256-64.
40. Arneberg P, Øgaard B, Scheie A, Rølla G. Selection of *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli* in an Intra-oral Human Caries Model. *J Dent Res* 1984;63(10):1197-200.
41. Becker M, Paster B, Leys E, Moeschberger M, Kenyon S, Galvin J, et al. Molecular Analysis of Bacterial Species Associated with Childhood Caries. *J Clin Microbiol*. 2002;40(3):1001-9.
42. Charlotte M, Claes E, Grahn E, Jacobs C, Roos K, Stig H. *Lactobacillus*-mediated interference of *mutans streptococci* in caries-free vs. caries-active subjects. *Eur J Oral Sci*. 2007;115(4):308-14.
43. Byun R, Nadkarni M, Chhour K, Martin F, Jacques N, Hunter N. Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. *Clin Microbiol*. 2004;42(7):3128-36.
44. Munson M, Banerjee A, Watson T, Wade W. Molecular Analysis of the Microflora Associated with Dental Caries. *J Clin Microbiol*. 2004;42(7):3023-9.
45. Estela W, Rychtera M, Melzoch K, Quillama E, Egoavil E. Production of lactic acid by *Lactobacillus plantarum* L10 on batch and continuous cultivation. *Rev peru biol*. 2007;14(2):271-5.
46. Scheie A, Petersen F. The biofilm concept: consequences for future prophylaxis of oral diseases? . *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(1):4-12.
47. Babaahmady K, Marsh P, Challacombe S, Newman H. Variations in the predominant cultivable microflora of dental plaque at defined subsites on approximal tooth surfaces in children. *Archs oral Biol*. 1997;42(2):101-11.