

Lila Susana Cornejo^I

Mabel Brunotto^{II}

Elena Hilas^I

Factores salivales asociados a prevalencia e incremento de caries dental en escolares rurales

Salivary factors associated to the prevalence and increase of dental caries in rural schoolchildren

RESUMEN

OBJETIVO: Evaluar la asociación de la saliva y la prevalencia de caries.

MÉTODOS: Estudio longitudinal de dos años, en una población de niños escolares rural de Cruz del Eje, Córdoba-Argentina, entre los años 2000 y 2002. La población de estudio comprendió la totalidad de escolares asistentes (N=196) a ocho escuelas rurales de 5 a 14 años de edad, ambos sexos. Se estudiaron tres momentos (N=46): base, 12 y 24 meses. Se evaluaron los componentes salivales y los índices CPOD y ceod. Se crearon las variables nominales, "caries" y "caries nueva" para evaluar riesgo de caries en el estudio base y en los tiempos 12 y 24 meses, respectivamente. Se aplicó el análisis de componentes principales para seleccionar factores salivales relacionados con la presencia de caries que a posterior se categorizaron según valor de la mediana como punto de corte.

RESULTADOS: Se observó alta prevalencia de caries (50%-90%) en los tres momentos de estudio. El incremento de caries fue significativamente mayor a los 12 meses ($p=0.000$), comparado con el observado a los 24 meses. En el estudio base se observó concentración baja y homogénea de los iones fosfato y calcio, y asociación significativa ($p<0.050$) entre calcio y fósforo y relación Ca/P con la presencia de caries.

CONCLUSIONES: Las concentraciones de iones fosfato y de la relación molar calcio/fósforo podrían ser considerados como factores de riesgo para el desarrollo de caries en poblaciones con características particulares como la estudiada.

DESCRITORES: Caries dental, epidemiología. Niño. Saliva, química. Factores de riesgo. Salud Bucal. Población rural. Argentina.

^I Equipo de Investigación en Prevención Contextualizada. Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina

^{II} Departamento de Biología Oral. Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina

Correspondencia:

Lila Susana Cornejo
Cátedra de Biología Celular
Facultad de Odontología UNC
Ciudad Universitaria
Haya de la Torre s/n
Córdoba 5000, Argentina
E-mail: lilacor@hotmail.com

Recibido: 16/10/2006

Revisado: 3/5/2007

Aprobado: 14/8/2007

ABSTRACT

OBJECTIVE: To evaluate the association between saliva and prevalence of dental caries.

METHODS: Two-year longitudinal study in rural schoolchildren at Cruz del Eje, Argentina between 2000 and 2002. The study population comprised all schoolchildren (N=196) aged 5 to 14 years of both sexes attending eight rural schools. They were assessed at three different time points (N=46): baseline, 12 and 24 months. Salivary components and DMFT and dmft indexes were used. Nominal variables, "decay" and "new decay", were created to assess risk of decay at baseline, 12, and 24 months, respectively. Principal component analysis was applied to select salivary factors associated to decay and then they were categorized according to the median as a cutoff value.

RESULTS: High prevalence of decay (50%–90%) was found at the three time points of study. There was significantly increase in caries at 12 months ($p=0.000$) compared to that seen at 24 months. At baseline there were homogeneous low levels of calcium and phosphate and a significant association ($p<0.050$) between calcium and phosphorus and calcium/phosphorus molar ratio and decay.

CONCLUSIONS: Phosphorus levels and calcium/phosphorus molar ratio can be considered risk factors for the development of caries in populations with characteristics similar to those studied.

KEY WORDS: Dental caries, epidemiology. Child. Saliva, chemistry. Risk factors. Oral health. Rural population. Argentina.

INTRODUCCIÓN

Numerosas investigaciones han puesto en evidencia la importancia de la saliva en la protección de los tejidos orales. La función protectora de la saliva no se limita a la lubricación de los tejidos y a la remoción de microorganismos, se ha observado que tanto las variaciones en el flujo salival como en la composición química de la saliva pueden alterar considerablemente el estado de salud buco-dental.^{1,3,20}

No obstante ello, el rol específico de los distintos componentes salivales en relación a la enfermedad de caries no está bien definido. En este sentido, cinco décadas atrás, Ericsson et al¹² mostraron asociación del flujo y pH salival con la prevalencia de caries. Más recientemente se han descrito múltiples y variadas funciones salivales asociadas a la caries dental, mediada tanto por componentes inorgánicos como orgánicos. Entre estos últimos, existen componentes de naturaleza proteica de tipo inmunológico (IgA) o no (lisozima, lactoferrina, sialoperoxidasas, proteínas con actividad aglutinante y proteínas ricas en prolina, estaterina) cuyas concentraciones en la cavidad bucal podrían influir en la resistencia o susceptibilidad a la caries dental.⁴

Respecto a los componentes salivales inorgánicos, Shaw et al²⁴ informaron la presencia de altas concentraciones de calcio (Ca) y fosfato (P) en sujetos libres

de caries. Kedjarune et al¹⁶ mostraron asociación entre altas concentraciones de calcio y fosfato en saliva total y baja prevalencia de caries en niños residentes en áreas rurales. Por el contrario, Kargul et al¹⁵ no detectaron diferencias en la composición inorgánica de la saliva entre niños que presentaban o no caries. Otros autores²³ observaron correlación positiva entre altos niveles de calcio salival y el estado de salud dental y gingival. Respecto a la relación Ca/P, estudios realizados en niños de cuatro y cinco años por Cornejo et al⁸ mostraron relación entre valores menores de Ca/P y el incremento de caries en un año de estudio.

A pesar de la vasta investigación realizada, la información disponible no permite definir claramente la influencia de los componentes salivales en la enfermedad de caries. A tal indefinición contribuye probablemente el hecho de que la posible asociación de algunos componentes salivales con la enfermedad de caries en muchos casos surge de extrapolar características observadas *in vitro*. Por otra parte los trabajos realizados *in vivo*, en general proveen información generada de estudios de carácter transversal. Existen escasos estudios orientados a dilucidar la relación entre las concentraciones de los componentes salivales y la condición de salud-enfermedad en el transcurso del tiempo.

En un análisis transversal realizado en escolares rurales,¹⁸ fue observada la influencia de la concentración de proteínas, calcio y fosfato salival en los niños con experiencia de caries tanto para la dentición temporaria como para la permanente ($ceod > 0$ y/o $CPOD > 0$). La caries dental es una enfermedad multifactorial cuyo desenlace debe ser considerado como el resultado del interjuego de múltiples factores biológicos, ambientales y socioculturales. Los hallazgos, antes mencionados, condujeron a realizar estudios longitudinales sobre la influencia de los factores salivales en la incidencia de la caries dental y determinar que valores de los mismos podrían conformar un factor de riesgo para la misma.

El objetivo del presente trabajo fue analizar la relación de los componentes salivales con la presentación de nuevas lesiones cariosas.

MÉTODOS

Se realizó un estudio longitudinal prospectivo en el que se consideraron tres momentos: comienzo o base (año 2000), a los 12 (año 2001) y 24 meses (año 2002) posteriores en ocho escuelas rurales de Cruz del Eje, Provincia de Córdoba, Argentina. Las escuelas fueron seleccionadas aleatoriamente del total de escuelas rurales utilizando una tabla de números aleatorios. Las zonas rurales a las que pertenecen las escuelas se caracterizan por baja densidad poblacional y por la existencia de familias desvinculadas entre sí, situación de incomunicación que en algunos casos se agrava por la presencia de caminos y transportes inadecuados. Por otra parte, la depresión socioeconómica es un factor que singulariza aún más estas zonas rurales.

En el momento inicial del estudio de base participaron en la investigación la totalidad de los escolares ($N=196$) de 5 a 14 años de edad, de ambos sexos asistentes a las escuelas muestreadas. A los dos años el número de escolares que permanecieron en el estudio longitudinal fue de $N=46$, sobre los cuales se evaluó la predicción de caries en relación al estado inicial de los componentes salivales. El egreso, migración o inasistencia de los niños el día de la visita del equipo odontológico, produjo el desgranamiento de la muestra.

Los niños fueron examinados por dos profesionales odontólogos previamente calibrados que realizaron los exámenes clínicos en todos los tiempos de estudio. En los tiempos 12 y 24 meses el examen clínico se realizó sin la ficha clínica del estudio anterior. Los exámenes fueron llevados a cabo en las escuelas, en habitaciones bien iluminadas con luz natural, siguiendo el procedimiento de rutina tacto-visual. Se registró el número de piezas dentarias cariadas, obturadas, perdidas o con extracción indicada en dentición temporaria o permanente. Para el diagnóstico de caries se tuvieron en cuenta los criterios de la OMS.²⁵

Se evaluaron los componentes salivales y los índices CPOD y ceo-d en el momento base, en tanto que en a los 12 y 24 meses se obtuvieron los índices CPOD y ceod.

Para evaluar el riesgo de caries en el estudio base se construyó la variable nominal "caries" (C) codificada como presencia de caries cavitada en dentición temporaria y/o permanente, estableciendo las categorías C:1 (presencia de caries) y C: 0 (ausencia de caries). El incremento de caries cavitadas al primero y segundo año de estudio fue analizado mediante la variable nominal "caries nuevas" (CN), cuyas categorías se establecieron como: CN: 0 (sin una nueva caries cavitadas en una superficie dental) y CN: 1 (con una nueva caries cavitadas en una superficie dental).

Se aplicó el análisis de componentes principales (ACP), método multivariado que permite identificar patrones y seleccionar variables. En el análisis del estudio longitudinal se utilizaron las variables seleccionadas por ACP: mg% calcio / vol. min, mg% fosfato / vol. min y flujo salival expresado como volumen minuto como factores salivales relacionados con la presencia de caries cavitadas, a partir de los coeficientes de los autovectores de los dos primeros componentes principales que acumularon el 85% de la variabilidad total y cuyo valor absoluto fuera igual o superior a 0.500. Las variables seleccionadas fueron categorizadas estableciendo como punto de corte el valor de la mediana. Valores superiores a la mediana fueron categorizados: 0 (favorables), mientras que valores inferiores o iguales a la mediana fueron categorizados: 1 (desfavorables). Contrariamente la relación calcio y fosfato fue categorizada de modo inverso ya que valores superiores a la mediana fueron considerados desfavorables. La correspondencia biológica del punto de corte establecido fue evaluada por medio de la frecuencia relativa expresada como porcentaje y de las probabilidades obtenidas por el modelo logístico de cada variable seleccionada.

En el estudio base, se tomaron muestras de saliva total estimulada con goma de mascar no azucarada libre de calcio, las mismas se recogieron por salivación directa durante cinco minutos en tubos de polietileno a 4°C. Inmediatamente se calculó el flujo salival, que se expresó en mL/min. Seguidamente la saliva fue centrifugada a 12.000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se conservó a -20°C hasta el momento de realizar los ensayos sialoquímicos.

Se realizaron determinaciones cuantitativas de Ca, P y proteínas totales en base a lo propuesto por Ray Sarkar & Chauhan,²² Chen et al⁷ y Lowry et al,¹⁷ respectivamente. Además se determinó el pH por medio de pHmetro manual y se calculó la relación Ca/P.

Las variables fueron descritas utilizando la media \pm error estándar (EE). La prevalencia de caries fue calculada como la proporción de niños con por lo menos una caries en una superficie dental. El incremento de caries en cada período de estudio fue analizada por la prueba de MacNemar fijando el valor $p < 0.050$ para indicar diferencias estadísticamente significativas. Además, se calcularon los índices de disparidad (odds ratio) y su respectivo intervalo de confianza 95% (IC) para las variables salivales seleccionadas en relación a la variable CN mediante discriminación logística. La asociación entre estas variables fue analizada por la prueba chi cuadrado con 1 grado de libertad. Los datos fueron procesados con el software Infostat profesional versión 1.1.

La investigación fue realizada de acuerdo a los lineamientos éticos establecidos por la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba, con consentimiento informado por parte de responsables de los niños.

RESULTADOS

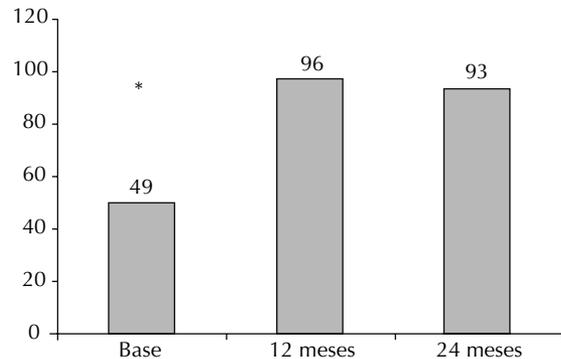
Se observó alta prevalencia de caries de un 49% en el primer momento y de 90% aproximadamente en cada uno de los otros dos momentos estudiados (Figura 1). En relación al número de caries nuevas, se observó un incremento significativamente mayor (30%) a los primeros 12 meses del estudio, comparado con el incremento observado a los 12 meses subsiguientes (17%) ($p=0,000$) (Figura 2).

Los valores de la media y el EE de los factores salivales en el estudio base se muestran en la Tabla 1 donde se observa una concentración baja y homogénea de los iones fosfato y calcio.

A los dos años de estudio la gráfica de las probabilidades obtenidas por el modelo logístico en relación a los valores de cada variable seleccionada por ACP (Tabla 2), muestra que la probabilidad de presentar caries disminuye a medida que aumentan los valores de las concentraciones de Ca y P, e inversamente al valor de la relación Ca/P (Figura 3; A, B y C).

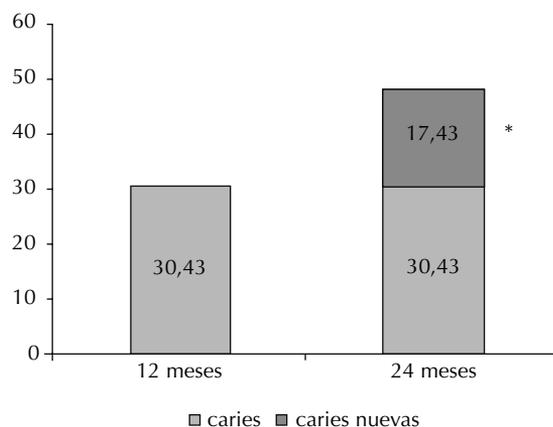
Las frecuencias relativas de niños con caries calculadas a partir del punto de corte establecido en el estudio base para cada variable mostraron valores superiores al 50% de niños con caries para las categorías desfavorables.

En el momento base de estudio se observó asociación significativa entre los valores bajos de la mediana del ión fosfato ($p=0,019$) y los valores altos de la relación Ca/P ($p=0,036$) en relación con la presencia de caries. Existiendo cuatro y media veces más posibilidad de presencia de caries cuando la condición de fosfato es



* Indica diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos estudiados fijando un valor $p < 0.050$.

Figura 1. Prevalencia de caries en niños con por lo menos una caries en una de las superficies dentales. Córdoba, Argentina, 2002. N=46



La porción en oscuro de la barra apilada indica el porcentaje de incremento de las caries nuevas, la porción gris de la barra apilada muestra el porcentaje que se mantuvo entre los períodos estudiados.

*Indica diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos estudiados fijando un valor $p < 0.050$.

Figura 2. Incremento de caries calculada como el porcentaje de superficies cariadas nuevas en cada niño a los 12 y 24 meses. Córdoba, Argentina, 2002. N=46

desfavorable (OR=4,69; IC 95%: 1,290;16,980) y de cuatro veces más con condiciones desfavorable de la relación Ca/P (OR=3,90; IC 95%: 1,100;13,800).

En los segundo y tercer momento se observó asociación significativa ($p=0,013$) entre la población de niños que presentaban valores considerados desfavorables de los factores salivales seleccionados y el incremento de caries a los 12 meses. Mientras que la condición desfavorable de la relación Ca/P estuvo asociada con el incremento de caries a los 24 meses ($p=0,027$).

Tabla 1. Media y desvío estándar de componentes salivales analizados en el momento base. Córdoba, Argentina, 2002. N=196

Componente salival	Media ± DE
Flujo salival (ml/min)	1,310 0,100
Proteína (mg%/vol min)	3,490 0,240
Relación Molar Ca/P	1,570 0,200
Fosfato (mg%/vol min)	0,090 0,010
Calcio (mg%/vol min)	0,120 0,020
pH	7,200 0,030

Ca: Calcio
P: Fosfato

Tabla 2. Valores de los autovectores 1 y 2 obtenidos por análisis de componentes principales. Córdoba, Argentina, 2002. N=46

Componente salival	Autovector 1	Autovector 2
Calcio (mg%/vol min)	0,560*	0,080
Fosfato (mg%/vol min)	0,370	0,390
Flujo salival (vol/min)	0,510*	-0,260
pH	0,140	-0,100
Relación molar Ca/P	0,480	0,690(*)
Proteína (mg%/vol min)	0,200	-0,500

*Se fijó un valor del coeficiente $0 > 0,500$ para seleccionar la/s variable/s con mayor implicancia en la condición de salud bucal

DISCUSIÓN

Si bien es conocido que la enfermedad de caries es multifactorial y depende en gran medida de las condiciones socioculturales, también resulta de gran importancia la influencia de la saliva en el inicio y la evolución de esta enfermedad.

El tamaño de la población en el estudio longitudinal representó un 25% de la población inicial. La principal causa de esta disminución fue que la población presenta una condición socioeconómica deprimida, a lo que se le suma la falta de comunicación con ciudades más importantes, trayendo como consecuencia la migración de familias en busca de una mejor condición de vida. Estas condiciones particulares de la población estudiada hicieron imposible realizar cualquier tipo de acción para impedir una alta tasa de pérdida. Por otra parte, el número de niños inasistentes a la escuela al momento del examen clínico fue de un 2%, siendo este un porcentaje de pérdida de niños prevista. El desgranamiento fue independiente del sexo y edad de los niños.

La alta prevalencia (50%-90%) de caries observada en todos los tiempos estudiados podría ser atribuida a las condiciones socioeconómicas y culturales de la población en estudio.² Es conocido que la biología humana, la calidad de vida, el medio ambiente y los servicios de salud generan un fuerte impacto sobre la

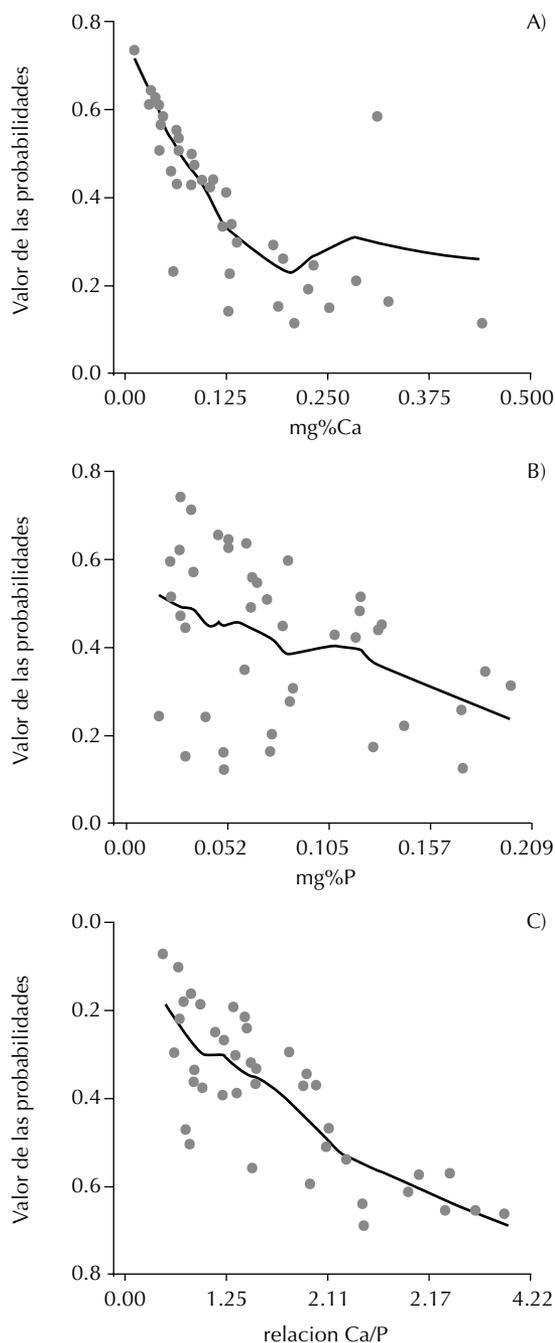


Figura 3. Diagrama de dispersión de los valores de las probabilidades obtenidas discriminación logística en relación de cada una de las variables seleccionadas por análisis de componentes principales. Córdoba, Argentina, 2002. N=46

vulnerabilidad de las poblaciones.² Grindford¹³ sugiere que entre los múltiples factores involucrados en el desarrollo de la caries, los factores sociodemográficos y las condiciones socioeconómicas son uno de los principales aspectos relacionados con el comienzo de la caries. Los escolares estudiados viven en áreas rurales económicamente deprimidas con inaccesibilidad¹¹ geográfica y cultural; hechos que afectan la calidad de vida

de los mismos. Cornejo et al¹¹ mostraron que los hábitos de higiene oral y las variaciones de los componentes salivales fueron los principales factores que afectaron la condición de salud oral en los niños estudiados. En poblaciones como las estudiadas, donde las características socioculturales se presentan de modo homogéneo hacen que los factores biológicos individuales impacten principalmente en el riesgo de la enfermedad.

En relación a dichos factores, en el estudio base, los valores medios de las concentraciones de calcio y fosfato fueron menores que los que presentaron niños que viven en zonas urbanizadas.⁶ Las altas concentraciones de fosfato que se observaron podrían impactar sobre la relación molar entre el calcio y el fosfato. Esta relación fue evidentemente mayor que la observada en otros niños escolares de la misma edad en otra población rural.⁵

La concentración de proteínas salivales mostró un perfil adecuado a los niños de esa edad.⁸ Las bajas concentraciones de los iones encontradas en la saliva de los niños escolares podrían estar relacionadas con su estado nutricional. Investigaciones realizadas en animales han mostrado que las condiciones nutricionales afectan la secreción de las glándulas salivales y generan alteraciones en la calidad y cantidad del flujo salival.¹⁴

La bibliografía publicada respecto a valores estándares de los componentes salivales es ambigua y por esto se aplicó el ACP. El método permite comprender las similitudes y diferencias entre datos multidimensionales sin perder información. Pero además genera autovectores cuyos coeficientes permiten identificar el aporte significativo de cada una de la variable seleccionadas.²¹ El ACP mostró que las variables que se encontraban relacionadas con la enfermedad de caries en la población estudiada fueron el calcio, fosfato y la relación Ca/P. Los resultados del presente estudio concuerdan con investigaciones realizadas en la misma población donde se observó una relación entre la caries y la concentración de calcio y fosfato en saliva.¹⁸ Autores como Show et al²⁴ observaron, también, que pacientes con experiencia de caries presentaban bajas concentraciones de estos iones, mientras que Mandel¹⁹ midió niveles similares de calcio en sujetos resistentes y no resistentes a caries.

A fin de evaluar la relación de los componentes salivales con la presencia de caries a posterior se implementaron métodos estadísticos predictivos y para lo cual se construyeron variables como "caries nueva". Esta forma de diseño es un modo nuevo de abordaje de esta problemática de enfermedades multifactoriales acorde a las nuevas metodologías aplicadas en el mundo.²¹ Por otra parte, resulta el estudio más ajustado a la realidad de países en vías de desarrollo ya que la idea primordial es realizar acciones preventivas, a nivel de salud primaria, evaluando las condiciones de los componentes relevantes del contexto sociocultural y biológico mediante metodologías sencillas, asequibles y de bajo costo a fin de poder predecir el riesgo de presentar caries en la

población. Este modo de pensar las acciones de salud pública resulta inédito y prometedor.

El incremento de caries, evaluado como la presencia de caries nuevas en el mismo niño en el transcurso de los dos años de estudio, mostró valores significativamente más bajos entre el segundo y último registro ($p=0,000$) que entre el estudio base y los dos tiempos consecutivos estudiados ($p<0,000$). Este hecho podría estar relacionado con la implementación de programas educacionales desarrollados por los maestros de cada escuela en interacción con nuestros investigadores, como estrategias de promoción de salud bucal sin intervención clínica. Dichos programas fueron diseñados teniendo en cuenta las características y potencialidades de cada comunidad educacional.¹⁰

Las concentraciones de calcio, fosfato y la relación molar Ca/P en el estudio base se mostraron relacionadas con la presencia de nuevas caries a los 12 y 24 meses ($p=0,036$), lo que evidencia la fuerte relación entre estas variables. Esta asociación puede ser explicada por el rol que el fosfato cumple en la cavidad oral, es conocido que el fosfato salival influye sobre el desarrollo de la placa dental, liberando proteínas adsorbidas a la película adquirida.¹² Por otra parte el fosfato en el medio oral previene la pérdida de fósforo del esmalte debido al efecto de ión. Fosfato, calcio y flúor conjuntamente contribuyen a la re-mineralización y desmineralización del esmalte.²⁴ La actividad del sistema fosfato se ve disminuido y compensado por altas concentraciones del sistema bicarbonato/ácido carbónico.²⁴ En relación a esto, se observó que el pH salival no varió mayormente, presentando valores promedios favorables. Este estudio fue realizado en muestras de saliva estimulada donde la menor actividad del sistema fosfato puede estar compensada por la naturalmente más alta concentración sistema bicarbonato/ácido carbónico y la actividad de otros sistemas buffer presentes en la saliva.²⁴

Las encuestas alimentarias realizadas a los niños en estudio mostraron que éstos presentan una dieta pobre en cereales y queso, alimentos que contienen altas concentraciones de fosfato y calcio⁹ hecho que podría actuar como un factor de riesgo de caries.

Los hallazgos del presente estudio muestran que en poblaciones con características particulares como la estudiada las concentraciones de ciertos componentes salivales se comportan como factores de riesgo sumados a los componentes socioculturales y geográficos. Las concentraciones de P y de la relación molar Ca/P podrían ser considerados como factores de riesgo para el desarrollo de caries en poblaciones con características particulares como la estudiada. Por lo tanto, se concluye que la concentración salival de P y la relación Ca/P se encuentran asociadas a la aparición de nuevas caries.

Concluyendo, el desarrollo de programas de salud oral deben planificarse basados en estudios previos de todos los componentes relevantes del contexto sociocultural y biológico en que se desarrolla la enfermedad.

REFERENCIAS

1. Afonsky D. Saliva and its relation to oral health. A survey of the literature. Alabama: University of Alabama Press; 1961.
2. Al Mohammadi SM, Rugg-Gunn AJ, Butler TJ. Caries Prevalence in boys aged 2,4 and 6 years according to socio-economic status in Riyadh, Saudi Arabia. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1997;25(2):184-6.
3. Almståhl A, Wikström M. Electrolytes in stimulated whole saliva in individuals with hyposalivation of different origins. *Arch Oral Biol.* 2003;48(5):337-44.
4. Amerongen AV, Veerman EC. Saliva - the defender of the oral cavity. *Oral Dis.* 2002;8(1):12-22.
5. Azcurra A, Battellino LJ, Calamari SE, Cattoni ST, Kremer M, Lamberghini FC. Estado de salud bucodental de escolares residentes en localidades abastecidas con agua de consumo humano de muy alto y muy bajo contenido en fluoruros. *Rev Saude Publica.* 1995;29(5):364-75.
6. Calamari SE, Cornejo LS, Bautroni L, Toledo S, Bojanich A, Cattoni STD. Consumo de nutrientes y salud bucodental según condición socioeconómica en niños de 3 años de edad de la ciudad de Córdoba. *Estudio Clacyd. Rev Vasca Odontoestomatol.* 2001;12(1):30-9.
7. Chen PS, Toribara TY, Warner H. Microdetermination of phosphorus. *Anal Chem.* 1956;28(11):1756-8.
8. Cornejo LS, Calamari S, Sabulsky J, Bojanich A, Dorransoro de Cattoni SD. Evolución de Componentes salivales y salud bucodental en niños de tres a cuatro años de edad. Estudio CLACYD, Córdoba, Argentina. *Pract Odontol.* 2000;21(7):18-24.
9. Cornejo LS, Hilas E, Moncunill I. Evaluation of Factors of Caries Risk in Rural Students. *J Dent Res.* 2003; 82(Spec No C):67.
10. Cornejo LS, Hilas E, Moncunill I. Integración de las dimensiones clínico-odontológicas, sialoquímicas, microbiológicas, físico-ambientales, nutricionales y socioculturales para el diseño de estrategias de promoción de Salud Bucal. *Claves de Odontol.* 2003;10(53):9-12.
11. Cornejo LS, Moncunill I, Molina G, Hilas E, Romeggio G. Salud dental, flujo y capacidad buffer de saliva total en escolares de comunidades rurales con fuentes de agua con diferente tenor de fluoruros. *Arch Odonto Estomatol.* 2004;20(3):161-8.
12. Ericsson Y, Hellstrom I, Jared B, Stjernstrom L. Investigations into the relationship between saliva and dental caries. *Acta Odont Scand.* 1954;11(3-4):179-94.
13. Grindefjord M, Dahllöf G, Nilsson B, Modeér T. Stepwise prediction of dental caries in children up to 3.5 years of age. *Caries Res.* 1996;30(4):256-66.
14. Johansson I, Ericsson T, Bowen W, Cole M. The effect of malnutrition on caries development and saliva composition in the rat. *J Dent Res.* 1985;64(1):37-43.
15. Kargül B, Yarat A, Tanboga I, Emekli N. Salivary protein and some inorganic element levels in healthy children and their relationship to caries. *J Maramara Univ Dent Fac.* 1994;2(1):434-40.
16. Kedjarune U, Migasena P, Changbumrung S, Pongpaew P, Tungtronchitr R. Flow rate and composition of whole saliva in children from rural and urban Thailand with different caries prevalence and dietary intake. *Caries Res.* 1997;31(2):148-54.
17. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
18. Malberti AI, Brunotto MN, Gait MT, Crosa ME, Hilas E, Cornejo LS. Oral Health and Salivary Factors in Rural Schoolchildren. *Acta Odontol Latinoam.* 2004;17(1-2):29-38.
19. Mandel ID. Relation of saliva and plaque to caries. *J Dent Res.* 1974;53(2):246-66.
20. Mandel ID. The role of saliva in maintaining oral homeostasis. *J Am Dent Assoc.* 1989;119(2):298-304.
21. Moysés ST, Moysés SJ, Watt RG, Sheiham A. Associations between health promoting schools' policies and indicators of oral health in Brazil. *Health Promot Int.* 2003;18(3):209-18.
22. Ray Sarkar BC, Chauhan VPS. A new method for determination microquantities of calcium in biological materials. *Anal Biochem.* 1967;20:155-66.
23. Sewón LA, Karjalainen SM, Söderling E, Lapinleimu H, Simell O. Associations between salivary calcium and oral health. *J Clin Periodontol.* 1998;25(11 Pt 1):915-9.
24. Shaw L, Murray JJ, Burchell CK, Best JS. Calcium and phosphorus content of plaque and saliva in relation to dental caries. *Caries Res.* 1983;17(6):543-8.
25. World Health Organization. Oral health surveys: basic method. 3.ed. Geneva; 1988.