

Características fisicoquímicas y microbiológicas de la saliva durante y después del embarazo

The physicochemical and microbiological characteristics of saliva during and after pregnancy

María C. Martínez-Pabón¹, Cecilia M. Martínez Delgado¹, Ana M. López-Palacio¹, Lina M. Patiño-Gómez² y Eduin A. Arango-Pérez¹

¹ Facultad de Odontología, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. macemapa@hotmail.com; cmariamartinez@hotmail.com; anamarialopez@une.net.co; eduinarangoper@gmail.com
² Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia. Colombia. lina.patinog@hotmail.com

Recibido 29 Noviembre 2012/Enviado para Modificación 10 Julio 2013/Aceptado 16 Agosto 2013

RESUMEN

Objetivo Identificar las variaciones producidas en algunos parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de la saliva en un grupo de mujeres durante y después de la gestación.

Materiales y Métodos Se recolectó saliva total estimulada en una cohorte de 35 mujeres embarazadas y después del parto. A cada muestra le fueron determinadas características fisicoquímicas (tasa de secreción, pH y capacidad amortiguadora) y microbiológicas (recuentos de bacterias acidogénicas).

Resultados El pH y la capacidad amortiguadora de la saliva durante el embarazo fueron más bajos que en el posparto, mientras que la tasa de secreción salival fue más alta en el embarazo. Los recuentos de *S. mutans* y *Lactobacillus spp.* no presentaron cambios significativos estadísticamente, pero se observa una tendencia al aumento en los recuentos durante la gestación.

Conclusión Los cambios ocurridos en la saliva de las gestantes pueden llevar a un aumento del riesgo de aparición de enfermedades bucales como caries, gingivitis y enfermedad periodontal, los cuales podrían disminuirse, mediante un adecuado diagnóstico y seguimiento odontológico, que incluya educación en salud oral a la gestante.

Palabras Clave: Embarazo, saliva, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* (fuente: DeCS, BIREME).

ABSTRACT

Objectives Identify the changes in some physiological and microbiological parameters in the saliva from a group of women during and after their pregnancies.

Methods Stimulated whole saliva was collected from a cohort of 35 women during

their pregnancy and afterwards to determine each sample's physicochemical (secretion rate, pH and buffer capacity) and microbiological characteristics (acidogenic bacteria count).

Results The pH and buffer capacity of saliva during pregnancy were lower than after pregnancy. There were no statistically significant changes regarding *S. mutans* and *Lactobacillus spp.* count, but a tendency towards increased values during pregnancy was noted.

Conclusions Changes occurring in the saliva of pregnant women can lead to an increase of risk of suffering disease affecting one's oral health, such as caries, gingivitis and periodontal disease; this could be prevented by appropriate diagnosis and dental follow-up, including education regarding pregnant women's oral health.

Key Words: Pregnancy, saliva, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* (source: MeSH, NLM).

La saliva es un fluido complejo secretado por las glándulas salivares mayores y menores (1). Está compuesta por agua en cerca del 99 % (2), mientras que el 1 % restante lo constituyen compuestos inorgánicos, proteínas (3), carbohidratos (4), lípidos (5), células epiteliales descamadas, bacterias y sus productos, virus y hongos, restos de alimentos, algunas secreciones bronquiales y componentes del fluido crevicular como células sanguíneas e inmunoglobulinas (6).

La saliva cumple con múltiples funciones como la limpieza de la cavidad bucal, lubricación, conservación y reparación de las membranas mucosas (7) y de los tejidos dentales duros; gracias al mantenimiento del pH y su amortiguación, también participa en la eliminación de bacterias, la digestión (8) y el habla (6).

La saliva se puede medir a través de la tasa de secreción salivar, la cual puede variar por factores biológicos y fisiológicos que alteran su cantidad y contenido (9), pudiendo afectar la salud de los tejidos blandos y duros y modificando condiciones ambientales para los microorganismos de la cavidad bucal.

Durante el embarazo se observan numerosos cambios fisiológicos que pueden alterar tanto el metabolismo como los niveles hormonales (10). Se ha encontrado también aumento de procesos infecciosos como gingivitis, periodontitis y caries dental (11), que pueden explicarse por las variaciones en los niveles de estrógeno y progesterona, que llevan a un incremento en la permeabilidad vascular y disminución de la inmunocompetencia del hospedador, lo que aumenta a su vez la susceptibilidad a infecciones orales

(10,12). Algunos estudios sugieren que los cambios en el ambiente bucal durante la gestación producen un incremento en la incidencia de caries dental (13), explicado por la disminución de la capacidad de amortiguación salivar hacia el final del embarazo (1,14,15). Laine y Pienihakkinen identificaron valores más bajos de pH durante la gestación (16) y González et al, en el 2001 identificaron una disminución marcada en la tasa de secreción salivar de gestantes comparado con mujeres no embarazadas (17); por el contrario otros autores no encuentran tales diferencias (12,14).

Teniendo en cuenta que en la literatura consultada hay discrepancia en los valores de las características fisicoquímicas y microbiológicas durante el embarazo y que dichos cambios en esta época de la vida, pueden afectar la salud bucal, se realizó este trabajo con el propósito de identificar variaciones en tales parámetros en un grupo de mujeres durante y después de la gestación, para aportar información que a futuro permita establecer valores de referencia y estrategias preventivas que puedan aminorar la aparición de patologías bucales prevenibles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población y muestra

Se evaluó una cohorte de 35 mujeres gestantes participantes en el programa de alto riesgo gestacional, de la ARS COMFAMA (Medellín, Colombia), a quienes se les realizó un seguimiento de 18 meses. Las muestras de saliva fueron tomadas entre el segundo y tercer trimestre de embarazo y a los 7 meses después del parto, en promedio.

Este estudio fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Antioquia. A cada una de las gestantes le fueron explicados los propósitos y alcances del proyecto, después de lo cual fue diligenciado el consentimiento informado.

Por medio de la historia clínica, se evaluaron características como edad, edad gestacional, fecha probable de parto y presencia de enfermedad sistémica, consumo de medicamentos y de carbohidratos. En los dos momentos de observación, personal previamente entrenado realizó a cada participante un examen intraoral completo, en una unidad odontológica con luz artificial, después de una profilaxis dental completa.

Muestras de Saliva

Las muestras de saliva estimulada fueron recolectadas al menos una hora después de comer. La estimulación fue inducida por masticación de 1 g de parafina (Ivoclar Vivadent AG FL-9494, Schaan, Liechtenstein), se realizó muestreo durante un minuto y luego la paciente recolectaba la saliva producida durante 5 minutos en un tubo plástico estéril graduado de 50mL (GreinerBio-one®, Frickenhausen, Germany). Las muestras fueron procesadas dentro de la hora siguiente a su recolección en el Laboratorio de Microbiología Bucal de la Facultad de Odontología de la Universidad de Antioquia.

Análisis de la saliva

El total del volumen de saliva fue calculado sin tener en cuenta la espuma, con una pipeta de vidrio de 10 ml estéril. Se calculó la tasa de flujo salivar teniendo en cuenta el tiempo total de recolección y el volumen de la saliva. El pH de las muestras fue medido con un pHmetro (Metrohm Ion Analysis, Sweden). Para el cálculo de la capacidad amortiguadora, un solo examinador experimentado realizó todas las observaciones según el método de Ericsson (18); inicialmente se midió el pH basal y luego se tomó 1 ml de saliva, se mezcló con 3 ml de ácido clorhídrico 0,005N, se llevó a agitación, y se incubó 20 minutos antes de determinar los valores finales de pH.

Para los recuentos de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus spp.*, las muestras fueron agitadas en vortex por 30 segundos (IKAR VibroFix, Staufen, Germany) y luego se inoculó en el sistema CRT bacteria (Ivoclarvivadent AG FL-9494, Schaan, Liechtenstein) siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos medios de cultivo se incubaron a 37°C en atmósfera con 5-10% de CO₂ por 48 horas.

Luego de la incubación, los crecimientos fueron evaluados macroscópicamente y con aumento de 10-50X usando un estero microscopio (Stemi 2000R Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). El recuento de las UFC/mL de las especies individuales fue calculado por un investigador entrenado, teniendo en cuenta la carta de interpretación de la casa comercial.

Análisis estadístico

Los datos fueron recolectados en un instrumento precodificado; se tabularon en el programa Excel® y se importaron al Paquete Estadístico

para Ciencias Sociales (SPSS) 15.0® (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, USA). Se estimaron las frecuencias (%) para las variables cualitativas; las Medianas (Me) y Rangos Intercuartílicos (RIQ) para las variables cuantitativas, que permitieran el análisis univariado; se utilizaron pruebas paramétricas y no paramétricas en el análisis inferencial (X² de McNemar, Wilcoxon y U de Mann-Whitney).

RESULTADOS

Se evaluaron 35 gestantes, procedentes del área urbana del municipio de Medellín, de estratos 1, 2 y 3, quienes fueron beneficiarias de un programa de prevención de enfermedades bucales, para ellas y sus hijos. El promedio de edad de estas mujeres fue de 25 años (d.s. \pm 7), con un rango de 16 a 42.

Todas las variables fueron categorizadas teniendo en cuenta criterios previamente establecidos en la literatura (19) y que consideran las condiciones que predisponen a un individuo a enfermedades bucales como la gingivitis y la caries dental. En la Tabla 1 se observan las características basales de la muestra estudiada. El 51,4 % de las participantes cursaban el tercer trimestre de gestación; el 74,3 % consumía algún medicamento, de las cuales el 96,2 % consumía hierro, ácido fólico y vitaminas formuladas por el médico encargado de los controles prenatales, como parte de los protocolos que siguen las aseguradoras y prestadoras de servicios de salud durante la gestación.

Tabla 1. Características de la población de estudio

Variables	n = 35 (%)
Edad	24,6 (d.s. \pm 6,9) años
Trimestre de gestación	Segundo= 17 (48,6) Tercero = 18 (51,4)
Enfermedad sistémica	Si = 3 (8,6)
Tipo de enfermedad sistémica	Asma = 1 (2,8) Anemia = 1 (2,8) Epilepsia = 1 (2,8)
Consumo de medicamentos	Si = 26 (74,3)
Tipo de medicamentos consumidos	Anticonvulsivantes = 1 (3,8) Hierro, ácido fólico (Vit B9) y vitaminas (C y D) = 25 (96,2)
Consumo de carbohidratos	Hasta 5 veces/día = 27 (77,1) Hasta 7 veces/día = 6 (17,1) > 7 veces/día = 2 (5,7)

El consumo de carbohidratos, evaluado como frecuencia de consumo durante 24 horas, permitió identificar que el 77,1 % de las gestantes hacen

un consumo de carbohidratos de máximo 5 veces al día. Al comparar la frecuencia de consumo de carbohidratos por día, entre ambos momentos de estudio, se encontraron diferencias estadísticamente significativas a expensas de la reducción de la frecuencia de consumo después del parto (χ^2 de McNemar 25, gl 6, $p < 0,05$).

Como características fisicoquímicas se evaluaron la tasa de secreción salival, pH inicial y capacidad amortiguadora, mientras que en las variables microbiológicas se incluyeron los recuentos de *S. mutans* y de *Lactobacillus spp.*, como microorganismos indicadores de condiciones ambientales ácidas.

En la Tabla 2 se presenta la comparación de los valores promedio de las variables fisicoquímicas de la saliva en los dos momentos de evaluación y de los recuentos bacterianos.

Tabla 2. Comparación de medianas de variables fisicoquímicas y microbiológicas de la saliva durante el embarazo y en el postparto

VARIABLES FISIQUÍMICAS	Evaluación 1* Mediana (RIQ)	Evaluación 2** Mediana (RIQ)	Valor p
Tasa de secreción salivar	1,5 (1,0-3,0)	1,0 (0,5-3,0)	>0,05
pH	7,5 (6,1-8,1)	7,7 (6,6-8,5)	<0,05
Capacidad amortiguadora	6,1 (3,6-7,0)	6,8 (5,7-7,6)	<0,05
VARIABLES MICROBIOLÓGICAS	n (%)	n (%)	
Recuento <i>S. mutans</i> (UFC/mL)			
Negativo	0	5,6	
< 10 ⁵	66,7	61,1	>0,05
≥ 10 ⁵	33,3	33,3	
Recuento <i>Lactobacillus spp</i> (UFC/mL)			
Negativo	27,8	33,3	
< 10 ⁵	50	50	>0,05
≥ 10 ⁵	22	16,7	

*Durante el periodo de gestación; **Durante el posparto.

Se encontró una diferencia significativa estadísticamente en el pH y en la capacidad amortiguadora de la saliva (U de Mann-Whitney, $p < 0,05$), con incremento de ambas después del parto.

Los recuentos de los microorganismos indicadores de acidez (*S. mutans* y *Lactobacillus spp.*) no presentaron diferencias estadísticamente significativas. Aunque el 100 % de las gestantes tuvieron recuentos positivos de *S. mutans*; el 66,7 % presentaron recuentos menores de 10⁵ UFC/mL y en el postparto este porcentaje descendió levemente (61,1 %). Los recuentos de *Lactobacillus spp.* fueron negativos en el 27,8 % durante el embarazo y 33,3% en el postparto.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio fueron obtenidos en una muestra pequeña de mujeres, sin compromisos sistémicos que puedan ser asociados con el funcionamiento de las glándulas salivales, con lo cual se obtuvo información sobre las diferencias de algunas características fisicoquímicas y microbiológicas de la saliva ocurridas en dos momentos: durante y después del embarazo.

En el trabajo de González et al (17), se encontró relación estadísticamente significativa entre el embarazo y la disminución de la tasa de secreción salival, con un aumento de esta en el posparto, dando como posible explicación el factor hormonal, el cual juega un papel importante en la secreción salivar. En el presente estudio aunque no hubo diferencia estadísticamente significativa durante y después del embarazo, se observa la tendencia contraria.

Esta diferencia en los resultados puede ser causada por factores como la hora de recolección de las muestras, el tipo de saliva recogida (estimulada o no estimulada), el estímulo usado para la recolección de las muestras, entre otros.

Cabe anotar que las variaciones del volumen salivar pueden repercutir en el estado de salud oral, pues tiene una relación directa con la composición de la saliva (17). Los resultados de investigaciones como las de Rockenbach et al (12) y Kivelä et al (14), apoyan la no existencia de diferencias marcadas en las tasas de secreción salivar entre mujeres embarazadas y no embarazadas. Estas diferencias pueden ser explicadas por el diseño de cada estudio, por ejemplo en el trabajo de González et al se comparan dos grupos de mujeres (embarazadas y no embarazadas) (17), mientras que en este trabajo se realizó el seguimiento de una cohorte. Por otro lado, es bien conocido que múltiples factores pueden influir en la tasa de secreción salivar, incluyendo el consumo de medicamentos y la presencia de enfermedades sistémicas, las cuales en el grupo de pacientes evaluado en el presente estudio fue del 74 % y 9 % respectivamente. Sin embargo del 74 % de las mujeres que consumían medicamentos, solo una (3,8 %) consumía alguno con efecto conocido sobre la tasa de secreción salival, mientras que el 70,2 % restante consumía medicamentos como vitaminas y suplementos nutricionales. Otros factores como la alimentación (20), hidratación (21) y el peso corporal (22), no fueron evaluados en este

estudio y también pueden influir en la tasa de secreción salivar y explicar parcialmente las variaciones entre mujeres de distintas poblaciones con condiciones climáticas y costumbres diversas.

Con relación al pH inicial de la saliva, en el presente estudio se encontraron menores valores durante el período de gestación, concordante con lo encontrado por Rockenbach et al (12), Laine y Pienihakkinen (16), González et al (17), y Rosenthal et al (23), quienes reportaron una disminución a finales del embarazo, y un aumento inmediatamente después del parto (4). Factores hormonales, así como la hora de recolección de la saliva y el estímulo usado, juegan un papel preponderante en el pH salival (17). Se ha sugerido que el daño bucal durante el embarazo se debe a los cambios que ocurren en las secreciones salivales como causa de las variaciones hormonales, pero es claro también el papel de los estrógenos en la mejora de la secreción salivar (24), de tal manera que en la gestación no debe ocurrir un descenso en el volumen por cuanto los valores de los estrógenos están elevados.

Otros autores afirman que el pH salivar también se ve afectado durante el embarazo por el aumento en la acidez debido a la exposición de la cavidad bucal a los jugos gástricos, por la hiperémesis y el reflujo gástrico lo que puede ocasionar abrasión del esmalte dental y deja los dientes susceptibles al daño producido por los ácidos bacterianos (25).

La boca humana se encuentra a menudo expuesta a componentes cuyo pH es diferente al pH normal de la saliva (26). Estos componentes pueden causar daños al diente o a las superficies mucosas, mientras que la función amortiguadora de la saliva trata de restablecer el pH a los rangos normales de forma eficiente.

Estudios realizados por Kivela et al y Laine et al indican que la capacidad amortiguadora disminuye a finales del embarazo (14-16), igual que en el presente estudio, en el que se encontraron valores significativamente más bajos durante el embarazo comparado con el posparto. Silk (25) sugiere que para controlar las posibles complicaciones que puede ocasionar esta disminución de la función salivar pueden ser utilizados enjuagues bucales domésticos compuestos de una cucharadita (aproximadamente 5 g) de bicarbonato disuelta en un vaso de agua (aproximadamente 250 mL), lo cual es suficiente para neutralizar los ácidos, siendo una solución económica, segura y fácil para las gestantes.

La alta frecuencia de ingesta de alimentos, especialmente carbohidratos y una limitada atención en salud bucal, como características de las gestantes de este estudio, son riesgos que deben valorarse. Respecto al consumo de carbohidratos, en la cohorte evaluada se encontró que durante el embarazo hay mayor frecuencia de consumo, debido a la recomendación médica de seguir una dieta fraccionada; no obstante, es necesario tener presente que cualquier cambio en los hábitos, que lleve a incrementar la frecuencia de ingesta de carbohidratos fermentables y almidones, puede favorecer el crecimiento de microorganismos acidogénicos que desmineralizan el esmalte (11). Otro factor importante que se debe tener en cuenta respecto a la alimentación es el aspecto socioeconómico. Debido a que las mujeres evaluadas son de estratos 1, 2 y 3, la dieta puede tener un mayor predominio de alimentos que son menos costosos como los carbohidratos, lo cual se ve agravado por la falta de educación sobre la necesidad de aumentar los momentos de higiene oral de igual manera que los momentos de ingesta.

Aunque no se encontraron diferencias estadísticas en los recuentos de microorganismos en el embarazo y el posparto, se notó una tendencia que concuerda con estudios previos los cuales han mostrado que los niveles de *S. mutans* y *Lactobacillus spp.* son más altos durante la gestación (27,28). Esto es consistente con la disminución del pH y la capacidad amortiguadora encontrada durante la gestación y reitera la necesidad de educar en salud bucal a este grupo poblacional, no solo por el aumento de la susceptibilidad, sino también por las implicaciones en salud bucal y general que tiene para ella y para su hijo o hija.

La literatura reconoce que durante los primeros meses de vida, se establece la microbiota bucal y que estará determinada por procesos de transmisión, en los cuales la madre es la fuente principal de microorganismos, incluyendo especies cariogénicas y periodontopatógenas, cuya presencia es considerada como un factor predisponente (29-31). Por otro lado, los primeros años de vida de los niños y niñas son fundamentales para el establecimiento de hábitos adecuados de salud oral, para lo cual es fundamental la educación de las mujeres durante la gestación y la lactancia, como modelo a seguir.

Debido a la naturaleza multicausal de las enfermedades orales, no existe un único factor que por sí solo sea definitivo para el desarrollo de caries, gingivitis o periodontitis. Una combinación de factores como el incremento en la acidez en la cavidad oral, alto consumo de carbohidratos, falta de acceso a la atención en salud y de higiene bucal adecuada, ponen

en mayor riesgo a las gestantes a tal punto que algunas publicaciones (32-34) asocian la presencia de enfermedades bucales y los microorganismos relacionados con la aparición de complicaciones como parto prematuro y bajo peso al nacer ♦

Agradecimientos: El grupo de trabajo agradece a la ARS Comfama por facilitar el proceso de captación de las pacientes que hicieron parte del estudio entre sus afiliadas y beneficiarias, y a la empresa Colgate–Palmolive por la financiación parcial de este trabajo. Este proyecto fue financiado parcialmente por la empresa Colgate-Palmolive a través del concurso de investigación realizado en el marco del encuentro de investigación de ACFO (Academia Colombiana de Facultades de Odontología) del año 2008 y por la Facultad de Odontología de la Universidad de Antioquia.

Conflicto de intereses: Los autores declaramos que durante la ejecución del trabajo o la redacción del manuscrito, no ha incidido ningún interés distinto a los relacionados con el buen desarrollo de la investigación.

REFERENCIAS

1. Edgar WM. Saliva: its secretion, composition and functions. *Br Dent J*. 1992;172:305-12.
2. Sreebny LM. Saliva: Its role in health and disease. Working group 10 of the commission on oral health, research and epidemiology (CORE). *International dental journal*. 1992;42(4):291-304.
3. Rudney JD. Does variability in salivary protein concentrations influence oral microbial ecology and oral health?. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1995;6(4):343-67.
4. Fábíán TK, Fejérdy P, Csermely P. Saliva in Health and Disease, *Chemical Biology of Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*. 2008:1-9.
5. Larsson BB, Olivecrona GG, Ericson TT. Lipids in human saliva. *Arch Oral Biol*. 1996;41(1):105-10.
6. 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.p. 91-146.
7. Mandel ID. The functions of saliva. *J Dent Res*. 1987;66:623-7.
8. Pedersen AM, Bardow A, Beier Jensen S, Nauntofte B. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Diseases*. 2002;8(3):117-29.
9. Banderas JA, Gonzalez M, Sanchez M, Millan E, Lopez A, Vilchis A. Flujo y concentración de proteínas en saliva total humana. *Salud Publica Mex*. 1997;39:433-41.
10. Adriaens LM, Alessandri R, Spörri S, Lang NP, Persson GR. Does pregnancy have an impact on the subgingival microbiota?. *J Periodontol*. 2009;80(1):72-81.
11. Laine MA. Effect of pregnancy on periodontal and dental health. *Acta Odontol Scand*. 2002;60:257-64.
12. Rockenbach MI, Marinho SA, Veeck EB, Lindemann L and Shinkai RS. Salivary flow rate, pH, and concentrations of calcium, phosphate, and sIgA in Brazilian pregnant and non-pregnant women. *Head Face Med*. 2006;28(2):44-49.

13. Rakchanok N, Amporn D, Yoshida Y, Harun-Or-Rashid MD, Sakamoto J. Dental caries and gingivitis among pregnant and non-pregnant women In Chiang Mai, Thailand. *J Med Sci.* 2010;72:43-50.
14. 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 non-pregnant women. *Arch Oral Biol.* 2003;48:547-51.
15. Laine M, Tenovuo J, Lehtonen OP, Ojanotko-Harri A, Vilja P, Tuohimaa P. Pregnancy-related changes in human whole saliva. *Arch Oral Biol.* 1988;33:913-7.
16. Laine M, Pienihakkinen K. Salivary buffer effect in relation to late pregnancy and postpartum. *Acta Odontol Scand.* 2000;58:8-10.
17. González M, Montes de Oca L, Jiménez G. Cambios en la composición de la saliva de pacientes gestantes y no gestantes. *Perinatol Reprod Hum.* 2001;15:195-201.
18. Ericsson Y, Hellstrom I, Jared B, Stjernstrom L. Investigations into the relationship between saliva and dental caries. *Acta Odontol Scand.* 1954;11:179-94.
19. Bratthall D, Hansel PG. Cariogram-a multifactorial risk assessment model for a multifactorial disease. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2005;33:256-64.
20. Sheiham A. Dietary effects on dental diseases. *Public Health Nutrition.* 2001;4(2B):569-91.
21. Ship JA, Fischer DJ. Metabolic indicators of hydration status in the prediction of parotid salivary-gland function. *Arch Oral Biol.* 1999;44(4):343-50.
22. Pannunzio E, Silverio OM, Souza MS, Nesadal D, Medeiro F, Nicolau J. Analysis of the stimulated whole saliva in overweight and obese school children. *Rev Assoc Med Bras.* 2010;56(1):32-6.
23. Rosenthal S, Rowen R, Vazakas A. Comparative analysis of saliva in pregnant and non-pregnant women. I. Calcium and pH. *J Dent Res.* 1959;38:883-7.
24. Leimola R, Salo T, Toikkanen S, Pulkkinen J, Syrjanen S. Expression of estrogen receptor (ER) in oral mucosa and salivary glands. *Maturitas.* 2000;36(2):131-7.
25. Silk H, Douglass AB, Douglass JM, Silk L. Oral Health during Pregnancy. *American Family Physician.* 2008;77(8):1139-44.
26. Dural S, Cagirankaya LB. Does menstrual cycle effect buffer capacity of stimulated saliva?. *Clin Oral Invest.* 2007;11:207-9.
27. Orosz M, Vasco A, Gabris K, Banoczy J. Changes in salivary pH and lactobacilli count in pregnant women. *Proc Finn Dent Soc.* 1980;76:204-7.
28. Laine M, Tenuovo J, Lehtonen OP. Pregnancy-related increase in salivary *Streptococcus mutans*, *Lactobacilli* and IgA. In: Cimasoni G, Lehner T (Ed.). *Borderland between caries and periodontal disease.* 3rd Edition. Genève: Editions Médecine Hygiène;1986. p.p. 193-200.
29. Mitchell SC, Ruby JD, Moser S, Momeni S, Smith A, Osgood R, et al. Maternal transmission of *Streptococcus mutans* in severe-early childhood caries. *Pediatr Dent.* 2009;31:193-201.
30. Ercan E, Turkselç, Yildirim I, Dalli M. Prevention of maternal bacterial transmission on children's dental-caries-development: 4-year results of a pilot study in a rural-child population. *Arch Oral Biol.* 2007;52:748-52.
31. Martínez MC, Rodríguez A. Estudio de las cepas de *Streptococcus mutans* del grupo mutans presentes en binomios madre-hijo. *Rev Fac Odontol Univ Antioq.* 2009; 21(2):177-85.
32. Bansal J, Bansal A, Kukreja N, Kukreja U. Periodontal diseases as an emerging potential risk factor for adverse pregnancy outcomes: A review of concepts. *J Turkish-German Gynecol Assoc.* 2011;12:176-80.
33. Uslu H, Seydaoglu G, Kurklu S, Guzeldemir E, Arpak N. Periodontal health and adverse pregnancy outcome in 3,576 Turkish women. *J Periodontol.* 2007;78:2081-94.
34. Volpato FC, Jeremias F, Spolidorio DM, Silva SR, Valsecki A, Rosell FL. Effects of Oral Environment Stabilization Procedures on *Streptococcus mutans* Counts in Pregnant Women. *Braz Dent J.* 2011; 22(4):280-4.