



**CATOLICA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA**

---

VISEU

**MICROBIOMA ORAL HUMANO**  
**Protocolos de recolha de dados**

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa  
para obtenção de grau de Mestre em Medicina Dentária

Por:  
Bruno Cecilio de Moura

Viseu, 2022



CATÓLICA  
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

---

VISEU

MICROBIOMA ORAL HUMANO  
Protocolos de recolha de dados

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa  
para obtenção de grau de Mestre em Medicina Dentária

Por:

Bruno Cecilio de Moura

Orientadora: Professora Doutora Maria José Correia

Coorientadora: Professora Doutora Ana Sofia Duarte

Viseu, 2022

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá”

Ayrton Senna

## Dedicatória

Dedico essa conquista à toda a minha família, em especial ao meu irmão Cacio de Moura Netto (*in memoriam*), que tive o privilégio de conviver e aprender que o desafio só é grande se você se mostrar pequeno e que no final sempre ficará tudo bem. Você é um gigante! Que sorte ter sido seu “aluno” nessa vida. Obrigado meu herói!

Aos amores de todas as minhas vidas Priscilla e Téo que definem o que sou e o que serei. Vocês me dão todos os dias o que muitos passam a vida inteira a procurar: A FELICIDADE!

Às minhas 4 meninas: Babou, Anna Bia, Cacá e Fefê. Vocês são meus tesouros e SEMPRE estaremos juntos. Amo vocês!

À minha mãe Eliane por ser um exemplo de força e coragem e estar sempre ao meu lado. Ao meu pai Abílio (*in memoriam*) que está todos os dias no meu pensamento. Amo vocês!

À minha sogra D. Silvia e meu sogro tio Galvão, que são meus pais de coração e estão presentes em todos os momentos.

Enfim, essa jornada não seria possível sem vocês na minha vida.

OBRIGADO!

## **Agradecimentos**

Algumas pessoas se tornaram muito especiais ao longo desta caminhada e por isso quero deixar o registo do carinho que tenho por elas:

Minha Orientadora, Prof. Maria José Correia que vai muito além de ser uma excelente professora. É um exemplo de ser humano. Obrigado pelo acolhimento e pela amizade. Conte comigo sempre.

Prof. Nélio Veiga obrigado por ser sempre muito atencioso em todo o meu percurso dentro da Universidade. É para mim também um grande exemplo.

A todos os professores, em especial o Prof. Jorge Perdigão por compartilhar tamanho conhecimento e mostrar a verdadeira satisfação em ensinar.

Aos amigos que mesmo sem perceberem, me ajudaram nos momentos que mais precisei: Rafael Beolchi, Gustavo Fernandes, Sergio Allegrini, Ligia Neto, Maria Garcia, Girolamo Raso, Samuelle Fuda, Mayssa Holanda e Susana Alonso.

À equipa do SalivaTec que fez um excelente trabalho e sempre esteve disponível a ajudar.

Agradeço a todos os colaboradores e à Professora Anna Carolina Moura pelo empenho e dedicação em fazer da Clínica Dentária da UCP sua segunda casa e permitir que os alunos tenham a melhor experiência clínica e estejam preparados para a vida profissional.

## Resumo

**Objetivos:** Testar um protocolo clínico de recolha de dados e de amostras biológicas para analisar o microbioma oral de utentes da CDU-UCP com questões específicas para portadores de prótese removível.

**Materiais e métodos:** O estudo incluiu 24 pacientes sendo 12 portadores de prótese removível e 12 não portadores. Foram recolhidas amostras de saliva, biofilme dentário, esfregaços das próteses removíveis e da mucosa oral em contato com as mesmas. As análises do ADN microbiano extraído das amostras foram feitas por PCR quantitativo e analisadas quanto à carga total bacteriana.

**Resultados:** Os pacientes observados apresentavam uma heterogeneidade de reabilitações incluindo próteses totais e parciais, esqueléticas e acrílicas. A quantidade total de carga bacteriana na saliva não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes com e sem prótese removível. No entanto, a carga bacteriana média na saliva é superior nos pacientes com prótese removível. A carga total bacteriana quantificada na saliva foi sempre superior à encontrada, no mesmo indivíduo, através da zaragatoa.

**Conclusão:** Trabalhos aliando os aspetos moleculares às descrições clínicas de saúde oral são possíveis de realizar na FMD-UCP, mas é necessário melhorar o recrutamento de pacientes para participação nos estudos. No que diz respeito à recolha de biofilme oral das próteses para análise do microbioma é recomendado alterar alguns procedimentos para aumentar a concentração de microrganismos recolhidos.

**Palavras-chave:** microbioma, biofilme, saliva, próteses removíveis.

## Abstract

**Aims:** To test a clinical protocol for data and biological samples collection for the analysis of the oral microbiome of patients at the CDU-UCP. Specific questions and sample collection protocols are tested on patients with removable dentures.

**Materials and methods:** The study included 24 patients, 12 of which were removable denture wearers and 12 non-users. Samples of saliva, dental biofilm, smears from removable dentures and oral mucosa in contact with them were collected. The analyzes of the microbial DNA extracted from the samples was performed using quantitative PCR and analyzed for the total bacterial load.

**Results:** The patients observed had heterogenous rehabilitations including complete and partial, metal and acrylic dentures. The total amount of bacterial load in saliva showed no statistically significant differences between patients with and without dentures. However, the average bacterial load was higher in patients with dentures. The total microbial load quantified in saliva was always higher than that found in the same individual using the swab.

**Conclusion:** Investigations combining molecular and clinical aspects of oral health are feasible at the FMD-UCP, but it is necessary to improve the recruitment of patients to participate in the studies. Regarding the collection of oral biofilm from dentures for microbiome analysis, it is recommended to change some procedures to increase the concentration of collected microorganisms.

**Key-words:** microbiome, biofilm, saliva, dentures.

# Índice

<b>Introdução</b> .....	1
1. Microbioma Humano .....	1
2. Microbioma Oral .....	1
3. Saúde oral e saúde sistémica .....	2
4. Portadores de próteses removíveis.....	4
<b>Materiais e métodos</b> .....	6
1. Tipo de estudo e dimensão da amostra .....	6
2. Critérios de exclusão.....	7
3. Caracterização da amostra .....	7
4. Procedimentos para recolha de dados.....	8
4.1. Anamnese e diagnóstico de saúde oral .....	8
4.2. Diagnóstico de cárie.....	8
4.3. Diagnóstico Periodontal .....	11
4.4. Recolha, acondicionamento e conservação das amostras biológicas	11
4.4.1. Colheita de saliva .....	11
4.4.2. Colheita de biofilme oral .....	12
4.4.3. Colheita do biofilme das próteses removíveis .....	13
5. Processamento das amostras biológicas e identificação do microbioma oral analisado.....	14
5.1. Pré-processamento e armazenamento das amostras.....	14
5.2. Extração do ADN das amostras .....	14
5.3. Quantificação microbiana.....	15
6. Análise de dados.....	15
<b>Resultados</b> .....	16
1. Caracterização geral da amostra .....	16
2. Quantificação do microbioma oral dos pacientes portadores de prótese dental removível.....	18
<b>Discussão</b> .....	20
1. Análise do protocolo e procedimentos .....	20
2. Análise dos resultados experimentais.....	21
<b>Conclusão</b> .....	23
<b>Referências bibliográficas</b> .....	24
<b>Anexos</b> .....	27

## Índice de Figuras

Figura 1 - Recolha de saliva não estimulada pelo método de <i>drooling</i> . ....	12
Figura 2 - Locais de recolha das amostras de biofilme oral assinaladas com setas.(Modificado de imagem obtida no GoogleSearchImages). ....	13
Figura 3 - Locais para recolha das amostras de <i>Candida</i> .(Modificado de imagem obtida no GoogleSearchImages). ....	13

## Índice de Tabelas

Tabela I - Códigos para diagnóstico de cárie (ICDAS™). ....	10
Tabela II - Caracterização geral da amostra .....	17
Tabela III - caracterização dos tipos de próteses removíveis em cada paciente. ....	18
Tabela IV - Quantificação da carga total microbiana por 16S rRNA de amostras de saliva recolhidas em pacientes com prótese e sem prótese. ....	18
Tabela V - Quantificação da carga total microbiana por 16S rRNA de amostras de saliva e zaragatoa recolhidas em pacientes com prótese. ....	19

## **Abreviaturas**

CDU-UCP – Clínica Dentária Universitária da Universidade Católica Portuguesa

CES-UCP – Comissão de Ética para a Saúde da Universidade Católica Portuguesa

CIIS – Centro de Investigação Interdisciplinar em Saúde

EP – Estomatite Protética

ICCMS - The International Caries Classification and Management System

ICDAS - International Caries Detection and Assessment System

MIH – Microbioma Intestinal Humano

NIH - National Institutes of Health

PMH - Projeto de Microbioma Humano

RGPD - Regulamento Geral de Proteção de Dados

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

FMD-UCP - Faculdade de Medicina Dentária da Universidade Católica Portuguesa

WHO – World Health Organization

# Introdução

## 1. Microbioma Humano

Não há consenso na literatura sobre a o que é o Microbioma Humano, mas muitos trabalhos citam o médico Joshua Lederberg, que em 2001, definiu o termo como uma “comunidade ecológica de microrganismos comensais, simbióticos e patogênicos que compartilham o nosso espaço corporal” (1). Independentemente do que se considera como a “definição” de Microbioma Humano, o que é um facto é que o número de bactérias no corpo humano é maior do que as células humanas e que a maioria dessas bactérias é encontrada no trato gastro intestinal. Embora a descoberta da sequência do genoma humano publicada em 2001 (2) tenha sido uma grande realização na biologia, mais importante seria a compreensão das atividades sinérgicas entre humanos e os microrganismos que os habitam (3). O reconhecimento de que só conhecendo a estrutura do Microbioma Humano seria possível compreender verdadeiramente a fisiologia e conseqüentemente os processos patológicos associados, levou a que fosse desenvolvido um esforço internacional para estudar o microbioma humano examinando vários locais do corpo. O “*National Institutes of Health*” (NIH) deu início às discussões sobre “Projeto de Microbioma Humano” (PMH) cujos os objetivos foram caracterizar de forma ampla o microbioma humano para permitir o estudo de suas variações em diferentes populações, genótipos, doenças, idade, nutrição, medicação e ambiente. Mas este projeto multicêntrico com a colaboração de vários especialistas mundiais teve ainda como objetivos fornecer recursos de dados padronizados e novas abordagens tecnológicas para permitir que os mesmos sejam amplamente realizados na comunidade científica (3–5).

## 2. Microbioma Oral

O microbioma oral foi observado pela primeira vez pelo holandês Antony Van Leeuwenhoek em 1670. Por meio de um microscópio de própria confecção, observou que diferentes formas de microrganismos estavam presentes na placa

aderida aos dentes. Ele percebeu que diferenças individuais de microbiomas interferiam na saúde oral (4).

Embora muito tenha sido estudado sobre a diversidade e alterações do microbioma intestinal, as interações hospedeiro-microrganismo na saúde e doenças e o impacto do microbioma no bem-estar dos hospedeiros, muito menos informação está disponível para o microbioma oral. A literatura mais recente valida a noção, geralmente aceita, de que o microbioma oral tem a segunda maior diversidade taxonómica do corpo humano (5) e que apesar da variação intra e inter individual da composição das espécies, existe um microbioma “*core*” ou “*central*”, que conserva determinadas características genéticas e metabólicas (6). Este microbioma “*core*” não está ainda totalmente definido e a sua variação com características como a idade, o género, a alimentação, a zona geográfica e a relação com patologias ou condições clínicas, também não está suficientemente estudada para a maioria das populações. O conhecimento deste microbioma “*core*” é fundamental uma vez que, existem evidências que sustentam que um microbioma saudável difere na composição taxonómica de outros microbiomas que promovem a disbiose, ou seja, quando o equilíbrio do ecossistema oral é afetado, é possível que microrganismos patogénicos causem condições que afetam a saúde local e/ou sistémica (7). A cavidade oral abriga um dos mais diversos microbiomas do corpo humano e é um habitat onde se estabelecem importantes interações hospedeiro-microrganismo, que impactam a saúde oral e sistémica (8).

### **3. Saúde oral e saúde sistémica**

Muito investimento tem sido feito para o desenvolvimento de investigação voltada para a qualidade e melhoria da saúde oral por meio de investigações da patogénese e da prevenção de doenças provenientes da cavidade oral (9).

A cavidade oral humana é um ecossistema que abriga mais de 700 espécies de bactérias além de fungos, de vírus e de protozoários que interagem entre si e colonizam as superfícies duras dos dentes e os tecidos moles da mucosa oral na qual é composta por mucosa de revestimento (pavimento oral, região jugal,

região labial, palato mole), mucosa mastigatória (região gengival e palato duro) e mucosa especializada (dorso da língua) (4,6). A cavidade oral é um sistema complexo e dinâmico, influenciado pelo comportamento do hospedeiro e fatores externos como o ritmo circadiano que afeta o fluxo e a composição salivar. Os fatores comportamentais mais estudados são a dieta relacionada ao alto consumo de hidratos de carbono, que tem uma grande influência sobre o ecossistema oral e a atividade de cárie. Sabe-se por exemplo, que tabagismo é responsável por um aumento da resposta inflamatória e que condições sistêmicas e uso de medicamentos estão todos ligados às mudanças locais (8). Esse ecossistema dinâmico apresenta oportunidades para a disbiose microbiana oral e o desenvolvimento de doenças dentárias e periodontais (5).

Uma série de outros fatores podem contribuir para o equilíbrio ou também para uma disbiose promovida pelo microbioma oral. Dentre eles estão fatores anatômicos, saliva, fluído crevicular gengival, fatores microbianos, entre outros. A topografia, forma e desalinhamento dentários, qualidade deficiente de restaurações e a presença de epitélio sulcular não queratinizado são fatores anatômicos a serem considerados. A saliva influencia o ecossistema oral na modulação do pH, permitindo ou não o crescimento de células cariogênicas e possui propriedade de inibição do crescimento de organismos exógenos. Os produtos finais provenientes do metabolismo de certas bactérias baixam o pH e algumas usam esses produtos para fins nutricionais. Outros fatores como antibióticos, medicamentos em geral, tratamentos dentários e fatores iatrogênicos também alteram o ecossistema oral (8,10).

As principais patologias orais (cárie e doença periodontal) têm origem em desequilíbrios do Microbioma oral e os impactos das mesmas não se dá apenas a nível da cavidade oral mas podem ter implicações sistêmicas.

A periodontite, com alta prevalência em todo o mundo, é a patologia oral que mais causa risco e pode desencadear doenças sistêmicas. Componentes do biofilme patogênico podem entrar no organismo através da área inflamada, inalados ou ingeridos e aumenta o risco de diabetes mellitus, doença cardiovascular, endocardite, doença renal crônica, pneumonia e gastrite. Existem estudos que mostram claramente os benefícios do tratamento periodontal na redução de riscos para as doenças mencionadas (11).

Por outro lado, as doenças sistêmicas e as suas respectivas terapias medicamentosas podem afetar o controle de placa bacteriana, o fluxo salivar e a integridade dos tecidos levando à uma deterioração da saúde oral (12). A diabetes mellitus, por exemplo, está diretamente ligada ao aumento do fator de risco da doença periodontal e pode causar sintomas de xerostomia devido a redução do fluxo salivar e desidratação, elevando assim a atividade de cárie. Infecções por *Candida* são comuns em diabéticos e próteses desconfortáveis podem ser um sinal de estomatite protética subjacente. A xerostomia é um dos efeitos colaterais mais comuns de muitos medicamentos como antidepressivos, diuréticos, anti-histamínicos, agonistas e opióides (12).

Como a disbiose ao nível do microbioma acontece antes do diagnóstico clínico de doenças orais ou sistêmicas, conhecer a ecologia do microbioma oral humano tem impacto nas estratégias de diagnóstico precoce e, portanto, prognóstico e monitorização em saúde (13,14).

#### **4. Portadores de próteses removíveis**

Estimativas recentes mostram uma variação de 7 a 69 % da população mundial que possui alguma forma de edentulismo e utiliza algum tipo de prótese dentária removível apesar da melhoria com os cuidados de saúde oral. O valor mais elevado deste intervalo revela a importância do desenvolvimento de investigações que mostrem as implicações do uso de próteses para a saúde oral e sistêmica (15).

A principal condição patológica que os utilizadores de prótese removível desenvolvem chama-se Estomatite Protética (EP), ou seja, inflamação da mucosa oral associada ao uso de prótese removível. A EP está relacionada a vários fatores como próteses mal-adaptadas que causam traumas, fluxo salivar deficiente, má higiene, tabagismo, tratamento com antibióticos ou infecção microbiana. No entanto *Candida albicans* é considerado o principal agente causador afetando entre 30 e 70% dos portadores de próteses (16). A maioria dos estudos que investigam microrganismos associados às próteses removíveis foca-se apenas na *Candida* spp. como causa primária de infecção, no entanto há

evidências de que há interação com espécies bacterianas e que se formam comunidades microbianas complexas (16,17).

Embora a investigação do microbioma em superfícies orais naturais tenha gerado uma riqueza de informações, poucos estudos examinaram as comunidades microbianas que colonizam próteses e a sua relação com a saúde oral. Nos estudos que se debruçam sobre estas questões há ainda uma enorme variabilidade no tipo de amostra recolhida, nos protocolos de processamento dessas amostras e na análise realizada. Portanto, as comparações para elucidar como os microrganismos que colonizam a prótese removível influenciam a microbiota da cavidade oral, e vice-versa, ainda precisam ser aprofundadas.

Pelas razões apresentadas foi desenvolvido na Faculdade de Medicina Dentária um projeto que pretende contribuir para a definição do Microbioma Oral Saudável incluindo o Microbioma associado às próteses removíveis. Este estudo em particular constitui-se como a primeira fase do projeto em que foi realizado um estudo preliminar. O objetivo deste trabalho foi testar e validar os protocolos de recolha de dados e amostras biológicas que permitam analisar o Microbioma oral humano. Estes protocolos são aplicados na Clínica Dentária Universitária – UCP e incluem os procedimentos de recolha de dados que permitem a caracterização sumária de pacientes portadores de prótese removível.

## **Materiais e métodos**

Este estudo foi desenvolvido na Faculdade de Medicina Dentária da Universidade Católica Portuguesa (FMD-UCP) em Viseu, utilizando as infraestruturas do SalivaTec, Laboratório de Investigação Interdisciplinar em Saliva do Centro de Investigação Interdisciplinar (CIIS) da UCP e da Clínica Dentária Universitária da FMD-UCP. O processo foi iniciado em dezembro de 2020 com a submissão do projeto à CES-UCP, mas as recolhas, devido aos constrangimentos no atendimento e aulas na clínica, foram iniciadas apenas em março de 2022.

Por se tratar de um estudo clínico com seres humanos, o projeto foi submetido ao Comité de Ética em Saúde-UCP com aprovação concedida no dia 13/01/2021 (**Anexo I**). Todos os pacientes elegíveis para esta investigação preencheram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo II**). Os protocolos de recolha das amostras biológicas não conferem qualquer desconforto para o paciente e encontram-se descritos neste estudo.

### **1. Tipo de estudo e dimensão da amostra**

Para este trabalho em específico foi realizado um estudo clínico prospetivo observacional comparativo entre um grupo de utentes portadores de prótese removível e outro grupo de não portadores de prótese removível. Foi desenhado uma ficha de recolha de dados demográficos, clínicos e moleculares (com enfoque para recolha de dados relativos à reabilitação oral testado um protocolo de recolha de dados clínicos, configurando esse projeto de investigação como um protocolo clínico de análise do microbioma de pacientes portadores de prótese removível.

A amostra deste estudo preliminar incluiu um total de 24 participantes, sendo 12 portadores de próteses removíveis e outros 12 não portadores. A seleção de pacientes foi feita por amostragem não probabilística por conveniência. Os pacientes foram todos observados pelo mesmo operador (Buno Moura) que recrutou os pacientes para o estudo durante as consultas de várias unidades

curriculares, na CDU-UCP. Os dados foram recolhidos entre março e maio de 2022. A amostra deste estudo preliminar teve como finalidade avaliar a exequibilidade do projeto e fazer sugestões de melhoria do processo de recolha de dados.

## **2. Critérios de exclusão**

O estudo preliminar clínico sem intervenção inclui todos os utentes que recorrem à Clínica Dentária Universitária (CDU) da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade Católica Portuguesa (FMD-UCP) e que declarem expressamente querer participar no mesmo pela assinatura do TCLE. Assim, não houve critérios clínicos nem demográficos de exclusão dos pacientes, sendo que não participaram os pacientes que não aceitaram preencher o TCLE. Apesar de não ter acontecido nesta amostra preliminar, a inclusão de pacientes que não sejam competentes para concordar com a participação no estudo e assinar o TCLE, está prevista e só será realizada após a concordância dos seus tutores ou responsáveis legais.

## **3. Caracterização da amostra**

Foram feitas recolhas de dados demográficos e clínicos, bem como amostras biológicas de saliva e biofilme oral na CDU-UCP que obedecem às normas vigentes no RGPD. As amostras de saliva e biofilme foram analisadas exclusivamente nos laboratórios da Faculdade de Medicina Dentária da UCP (Salivatec) e garantem a manutenção da confidencialidade e anonimização dos dados recolhidos.

Foram constituídos grupos de amostras provenientes de portadores de prótese removível e grupos de amostras provenientes de pacientes sem prótese removível. As próteses removíveis foram caracterizadas quanto à sua extensão e ao material de que eram constituídas (Anexo III).

## **4. Procedimentos para recolha de dados**

### **4.1. Anamnese e diagnóstico de saúde oral**

Os utentes responderam a um questionário de saúde e passaram por uma avaliação clínica da cavidade oral para a obtenção de indicadores de experiência de cárie e de saúde periodontal. Todos os dados recolhidos foram registados em formulário eletrónico (**Anexo III**), armazenado e gerido na plataforma Qualtrics que contém as seguintes seções:

- Dados da amostra
- Dados pessoais
- Informações de saúde geral
- Covid-19
- Medicação
- Hábitos tabágicos
- Consumo de álcool
- Alterações hormonais
- Hábitos de higiene oral
- Reabilitação protética
- Saúde oral

Para o diagnóstico de saúde oral foram utilizados instrumentais clínicos como espelho de observação, sonda milimetrada WHO e equipamento de proteção individual.

### **4.2. Diagnóstico de cárie**

O presente estudo avaliou o índice de cárie dentária de acordo com os critérios do ICDAS (International Caries Detection and Assessment System), método desenvolvido para trazer a compreensão atual do diagnóstico e a progressão da cárie dentária, ou seja, é um sistema de pontuação clínica que oferece ao clínico, investigador e epidemiologista uma padronização mundial para deteção de cárie dentária (18).

A tabela a seguir foi extraída do guia desenvolvido pelo ICCMS™ (The International Caries Classification and Management System) que se baseia no sistema ICDAS baseado em evidências científicas para o estagiamento de cárie (19).

*Tabela I - Códigos para diagnóstico de cárie (ICDAS™).*

Definição de categorias mescladas de cárie do ICCMS™			
Categorias de cárie	<p><b>Superfícies sadias</b> (ICDAS™ cód. 0)</p>		<p><b>Superfícies dentárias sadias</b> não mostram evidências de cáries visíveis (nenhuma ou questionável mudança na translucidez do esmalte) quando vistas limpas e após secagem prolongada ao ar (5 segundos).</p>
	<p><b>Estágio Inicial de cárie</b> (ICDAS™ cód. 1 e 2)</p>		<p><b>Primeiras ou distintas alterações visuais no esmalte</b> vistas como uma opacidade de cárie ou descoloração visível (lesão de mancha branca e/ou descoloração de cárie castanha) não consistente com a aparência clínica de esmalte sadio (ICDAS™ 1 ou 2) e que não mostra evidência de rutura da superfície ou sombreamento de dentina subjacente.</p>
	<p><b>Cárie em estágio moderado</b> (ICDAS™ cód. 3 e 4)</p>		<p>Mancha branca ou castanha com <b>rutura localizada do esmalte</b>, sem exposição visível de dentina (ICDAS™ 3), ou <b>sombra de dentina subjacente</b> (ICDAS™ 4). (Para confirmar a rutura do esmalte, uma sonda de ponta esférica WHO pode ser usada suavemente na área do dente - uma descontinuidade limitada é detetada se a esfera cair na micro cavidade/ descontinuidade do esmalte).</p>
	<p><b>Cárie em estágio extenso</b> (ICDAS™ cód. 5 e 6)</p>		<p><b>Cavidade distinta</b> em esmalte opaco ou descolorido com <b>dentina visível</b>. (confirmar a profundidade com uma sonda WHO)</p>

### **4.3. Diagnóstico Periodontal**

Para a avaliação de saúde periodontal dos utentes foi utilizada a nova classificação das doenças e condições periodontais lançada em 2018 pela Academia Americana de Periodontologia em conjunto com a Federação Europeia de Periodontologia.

A periodontite é uma doença inflamatória crónica multifatorial associada a biofilmes de placa disbiótica e caracterizada pela destruição progressiva do suporte dentário e é classificada de acordo com seu estágio e grau (20).

A classificação de estágio é diretamente relacionada com a severidade da doença e é definida pela perda clínica de inserção óssea, sendo divididos em estágio I, II, III e IV. Por sua vez o grau reflete a progressão da doença e seus efeitos na saúde sistémica e dividem-se em grau A (progressão lenta), B (progressão moderada) e C (progressão rápida) (21).

A sondagem periodontal foi feita com uma sonda milimetrada WHO e os resultados de profundidade de sondagem, nível de inserção clínica e sangramento à sondagem foram transcritos para o periograma disponibilizado na plataforma online *perio-tools.com* para que o diagnóstico periodontal de cada paciente fosse estabelecido de forma precisa. Dado o diagnóstico o mesmo foi transcrito para a plataforma *Qualtrics*.

### **4.4. Recolha, acondicionamento e conservação das amostras biológicas**

As recolhas de amostras biológicas de saliva foram realizadas com metodologias testadas e em uso no SalivaTec (22). Relativamente às amostras de biofilme (supragengival e das próteses) este foi recolhido com estratégias desenvolvidas no SalivaTec e testadas neste estudo preliminar, mas ainda não publicadas.

#### **4.4.1. Colheita de saliva**

As amostras de saliva foram recolhidas pelo método de “*drooling*”. O utente expeliu (uma ou mais vezes) a saliva para um tubo tipo Falcon de 50 ml até

perfazer aproximadamente 2 ml. Os tubos foram bem vedados e desinfetados exteriormente com solução de hipoclorito de sódio, na concentração original de cloro livre a 5%, na diluição de 1/50 (1 parte de lixívia em 49 partes iguais de água) e de seguida com álcool a 70%. Por fim, a tampa dos tubos foi selada com película parafilme e o tubo devidamente identificado e colocado em contentor próprio. Estas medidas são especialmente importantes nesta fase de pandemia COVID-19 e são rotineiramente usadas para amostras de pacientes com diagnóstico de infeção por SARS-CoV2.

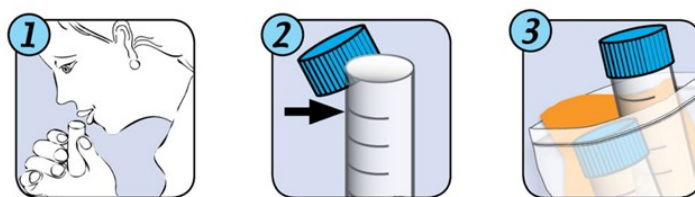
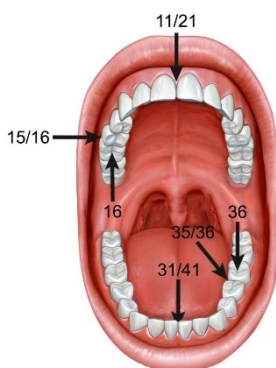


Figura 1 – Recolha de saliva não estimulada pelo método de drooling.

#### 4.4.2. Colheita de biofilme oral

As amostras de biofilme foram recolhidas por “raspagem” da placa dentária (biofilme oral) em zonas pré-definidas da cavidade oral do paciente. As amostras foram recolhidas dos seguintes locais/pontos (Figura 2):

- espaço interproximal entre os dentes 31 e 41, por lingual;
- espaço interproximal entre os dentes 11 e 21, por vestibular;
- espaço interproximal entre os dentes 15 e 16 por vestibular;
- espaço interproximal entre os dentes 35 e 36 por lingual;
- superfícies oclusais dos dentes 16 e 36.

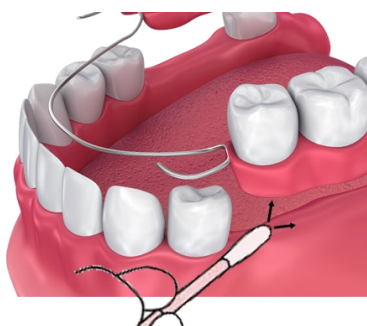


*Figura 2 – Locais de recolha das amostras de biofilme oral assinaladas com setas. (Modificado de imagem obtida no GoogleSearchImages).*

As recolhas foram feitas com palitos estéreis. O operador evitou que o palito tocasse noutros locais da cavidade oral durante a colheita. Os palitos com o biofilme recolhido foram posteriormente inseridos em tubos de plástico de 1,5 ml (tipo Eppendorf) contendo uma solução de NaCl 0,9%. Cada tubo pode conter até um máximo de 4 palitos. Os tubos foram etiquetados e desinfetados como descrito para a recolha de saliva. Este procedimento de recolha foi otimizado pelos investigadores do SalivaTec (não publicado) e está a ser aplicado de forma sistemática nas amostras de Biofilme oral analisadas no SalivaTec.

#### **4.4.3. Colheita do biofilme das próteses removíveis**

Por meio de uma zaragatoa, foram também recolhidos esfregaços da superfície interna da base da prótese removível e da mucosa oral em contato com a mesma respeitando as mesmas normas de acondicionamento descritas anteriormente com o objetivo de quantificar os microrganismos que colonizam as próteses.



*Figura 3- Locais para recolha das amostras de Candida. (Modificado de imagem obtida no GoogleSearchImages).*

As amostras biológicas de saliva, biofilme e *Candida* foram transportadas para o laboratório SalivaTec, localizado no mesmo edifício da Clínica Dentária Universitária, e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  imediatamente após a colheita. À

semelhança do protocolo para recolha de biofilme oral, este protocolo foi adaptado para utilização para recolha de amostras de colonização do Biofilme associado à prótese removível.

## **5. Processamento das amostras biológicas e identificação do microbioma oral analisado**

Após receção no laboratório SalivaTec as amostras foram processadas antes de ser armazenadas para análise posterior. Previamente à quantificação e identificação dos grupos microbianos foi necessário fazer a extração do ADN. Neste trabalho foram apenas processadas as amostras de saliva e zaragatoa (biofilme associado à prótese) uma vez que os protocolos para isolamento do ADN microbiano a partir de amostras de Biofilme estão ainda em otimização no laboratório SalivaTec. A quantificação dos grupos microbianos foi realizada apenas para bactérias uma vez que os protocolos quer para *Candida* quer para bactérias específicas ainda estão em desenvolvimento. Abaixo descrevem-se sumariamente os procedimentos que estão detalhados no Anexo IV.

### **5.1. Pré-processamento e armazenamento das amostras**

No SalivaTec as amostras de saliva recolhidas foram aliqüotadas para tubos de criopreservação (200 µL) e conservadas a -80°C até serem analisadas.

Os tubos contendo os palitos e zaragatoa com amostras de biofilme foram agitados com recurso a vortex durante 30 segundos e o volume foi distribuído em alíquotas (250 µL) para tubos de 1,5 mL e conservados a -80°C até serem analisados.

### **5.2. Extração do ADN das amostras**

O ADN microbiano foi extraído das amostras de saliva utilizando a solução QuickExtract™ (Lucigen Corporation, USA) de acordo com as instruções do fabricante descritas no Anexo IV.

### **5.3. Quantificação microbiana**

As análises do ADN microbiano obtido foram feitas por PCR quantitativo com utilização de *primers* de universais para o gene 16S rRNA. O protocolo detalhado encontra-se no ANEXO V.

## **6. Análise de dados**

Os dados obtidos foram transferidos para uma folha de cálculo do programa Microsoft Office Excel. Mais tarde, foram introduzidos no programa IBM SPSS Statistics, formando assim a base de dados onde foi realizada toda a análise estatística. Foi realizada a estatística descritiva adequada a cada variável, através da análise de frequências absolutas e relativas. Para avaliar a associação entre as variáveis recorreu-se ao teste teste-t para amostras independentes, considerando que temos variâncias iguais (através do teste de Levene para testar a igualdade de variâncias). O nível de significância considerado foi de 0,05.

## **Resultados**

### **1. Caracterização geral da amostra**

A tabela II apresenta de forma resumida o resultado deste estudo piloto. São apresentados os resultados das variáveis observadas, mas por haver uma quantidade baixa de pacientes, a análise não é estatisticamente relevante. No entanto, esta tabela pode servir como exemplo do tipo de estratificação possível de se obter quando o estudo estiver completo e houver mais amostras recolhidas. Um total de 24 amostras analisadas foram divididas entre 12 utentes não portadores de prótese removível e outros 12 portadores. A média de idade dos participantes é de 55,58 anos. Pacientes que não utilizam prótese removível apresentam idades entre 21 e 72 anos, enquanto os pacientes com próteses removíveis compreendem idades entre 35 e 79 anos. Do total de pacientes, 13 são do género feminino e 11 do género masculino e entre eles 6 mulheres e 6 homens utilizam algum tipo de prótese removível.

Hábitos tabágicos, higiene oral, condições de saúde sistémica e oral foram descritos na tabela e relacionados ao uso de próteses removíveis.

*Tabela II - Caracterização geral da amostra*

			Total	Sem prótese		Com prótese	
			N	N	%	N	%
Dados demográficos	<b>Total de Participantes</b>		24	12	50%	12	50%
	<b>Idade</b>	Média ± desvio de padrão	55,58 ± 18,04	42,41 ± 13,09		68,75 ± 11,43	
		Mínimo - Máximo	21 - 79	21 - 72		35 - 79	
	<b>Gênero</b>	Feminino	13	7	58,33%	6	50%
		Masculino	11	5	41,67%	6	50%
Hábitos	<b>Hábitos tabágicos</b>	Fumadores	1	1	8,33%	0	0%
		Ex-fumadores	9	5	41,67%	4	33,33%
		Nunca fumaram	14	6	50%	8	66,67%
	<b>Hábitos de higiene</b>	1x ou menos / dia	6	3	25%	3	25%
		2 x / dia	14	5	41,67%	9	75%
		3 x / dia	4	4	33,33%	0	0%
Saúde sistêmica	<b>Diabéticos</b>	Sim	2	0	0%	2	16,67%
		Não	22	12	100%	10	83,33%
	<b>Hipertensos</b>	Sim	11	4	33,33%	7	58,33%
		Não	13	8	66,67%	5	41,67%
Saúde oral	<b>Saúde periodontal</b>	Saudável	8	6	50%	2	16,67%
		Gengivite	3	2	16,67%	1	8,33%
		Periodontite	13	4	33,33%	9	75%
	<b>Presença de cárie</b>	Com cárie	18	8	66,67%	10	83,33%
		Sem cárie	6	4	33,33%	2	16,67%
	<b>Estomatite protética</b>	Sim	-	-	-	1	8,33%
		Não	-	-	-	11	91,67%

O tipo e extensão da prótese utilizada por cada paciente deste estudo piloto estão caracterizados na tabela III. A maioria das próteses eram acrílicas e parciais.

**Tabela III** - caracterização dos tipos de próteses removíveis em cada paciente.

Paciente	Prótese superior	Prótese inferior	Extensão da prótese Superior	Extensão da prótese Inferior
1	Acrílica	Acrílica	Parcial	Total
2	Esquelética	esquelética	Parcial	Parcial
3	Acrílica	Acrílica	Parcial	Parcial
4	Acrílica	Acrílica	Parcial	Parcial
5	Esquelética	Acrílica	Parcial	Parcial
6	Esquelética	esquelética	Total	Parcial
7	Acrílica	Acrílica	Parcial	-
8	Acrílica	-	Parcial	-
9	Esquelética	esquelética	Parcial	Parcial
10	Esquelética	-	Parcial	-
11	Acrílica	-	Total	-
12	Acrílica	Acrílica	Parcial	Parcial

## 2. Quantificação do microbioma oral dos pacientes portadores de prótese dental removível

A quantificação da carga total bacteriana foi realizada em amostras de saliva e em amostras recolhidas com uma zaragatoa passada na prótese e na mucosa oral em contacto com a mesma. Os resultados desta quantificação estão na tabela IV.

**Tabela IV** – Quantificação da carga total microbiana por 16S rRNA de amostras de saliva recolhidas em pacientes com prótese e sem prótese.

Grupo	Com Prótese	Sem Prótese
<b>N</b>	8	16
<b>Média (# de cópias 16S rRNA/μl de amostra)</b>	2,42 x 10 <sup>12</sup>	1,68 x 10 <sup>12</sup>
<b>Mínimo</b>	4,14 x 10 <sup>11</sup>	4,88 x 10 <sup>11</sup>
<b>Máximo</b>	6,59 x 10 <sup>12</sup>	4,20 x 10 <sup>12</sup>

Verifica-se que os pacientes sem reabilitação protética apresentam, em média menor quantidade de bactérias na saliva. No entanto, através da aplicação do teste-t para amostras independentes, considerando que temos variâncias iguais (através do teste de Levene para testar a igualdade de variâncias), não se verificam diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos, obtendo um valor de significância  $p=0,988$ .

Apesar de ter sido recolhida saliva a 12 pacientes, não foi possível isolar ADN de 4 deles e por isso na tabela II figuram apenas 8 pacientes com prótese. Pelo contrário, como houve vários pacientes não portadores de prótese que acederam a fazer a recolha de saliva, foram analisadas as salivas de 16 pacientes o que permitiu ter uma maior diversidade de pacientes.

Quando comparamos, nos pacientes com reabilitação protética as amostras de zaragatoa e saliva (Tabela IV), é possível verificar que nas amostras de saliva a quantificação da carga total bacteriana é mais elevada que na zaragatoa. Neste caso existem diferenças com um nível de valor de significância  $p<0,001$ .

**Tabela V** – Quantificação da carga total microbiana por 16S rRNA de amostras de saliva e zaragatoa recolhidas em pacientes com prótese.

Tipo de amostra	Saliva	Zaragatoa
<b>N</b>	8	8
<b>Média da Quantificação # de cópias / <math>\mu</math>l de amostra</b>	$2,42 \times 10^{12}$	$7,52 \times 10^{10}$
<b>Mínimo</b>	$4,14 \times 10^{11}$	$5,43 \times 10^{10}$
<b>Máximo</b>	$6,59 \times 10^{12}$	$1,51 \times 10^{11}$

## Discussão

O presente estudo configura-se como um protocolo clínico de análise do microbioma de pacientes portadores de prótese removível e será inserido na plataforma *clinicaltrials.gov*, uma base de dados *online* que permite o registo de estudos clínicos mantido pelo National Institute of Health (NIH).

A discussão dos resultados deste trabalho é analisada do ponto de vista da exequibilidade e propostas de alteração ao procedimento, seguida de uma análise dos resultados analíticos obtidos.

### 1. Análise do protocolo e procedimentos

A recolha de dados foi realizada em duas vertentes: recolha de informação e observação clínica do paciente seguida de recolha de material biológico.

O processo de recolha de informação clínica foi relativamente simples e eficaz. A maior dificuldade relacionou-se com o facto de muitos utentes não terem mostrado disponibilidade para participar no estudo. Esta recusa não estará relacionada com a extensão da recolha de dados, mas com o facto de alguns utentes terem sido abordados a meio da consulta e terem a ideia que a consulta demorará mais se se disponibilizarem a participar no estudo. Assim, para este e outros estudos que envolvam a recolha de dados será importante realizar a recolha de dados numa observação dedicada apenas a este procedimento.

Relativamente à recolha de amostras de saliva e biofilme estas foram executadas com procedimentos já validados no SalivaTec (22) e não houve dificuldades de execução. Os procedimentos de recolha dos esfregaços para análise do microbioma associado à prótese poderão ser melhorados, não no que diz respeito à facilidade de recolha, mas sim no que se refere à concentração de biofilme recolhido como será discutido mais adiante. Esta recolha pressupõe no entanto uma colaboração estreita entre o estudante de Medicina Dentária e um investigador que possa imediatamente levar as amostras para o laboratório e fazer o seu processamento.

Também neste procedimento, se se optar por fazer consultas específicas para a recolha de dados (clínicos e amostras biológicas), será possível ser o próprio estudante de Medicina Dentária a processar as amostras desde que a recolha seja feita no fim da observação oral. Isto porque as amostras biológicas não devem ficar na bancada durante muito tempo antes do processamento.

## **2. Análise dos resultados experimentais**

Foram comparadas e relacionadas as informações recolhidas (dados demográficos, saúde geral, saúde oral e hábitos de higiene oral) por meio do questionário feito ao paciente dador. Verificou-se, como era esperado, que a média de idade dos pacientes com reabilitação protética é superior aos dos pacientes sem reabilitação. A reduzida dimensão da amostra não permitiu, no entanto, uma estratificação suficiente dos pacientes para testar a associação entre os fatores demográficos e de saúde sistémica com a reabilitação protética. A continuação do estudo com o recrutamento de mais pacientes vai permitir esta estratificação no futuro e verificar a relação entre reabilitação protética e patologias sistémicas, saúde oral e hábitos de higiene oral.

Os resultados apresentados revelam uma grande heterogeneidade das reabilitações orais quer em tipo de prótese (acrílica e esquelética), quer na extensão da mesma (desde parcial a total). Apesar de serem reportadas maior satisfação dos pacientes com próteses esqueléticas *versus* acrílica (23), nesta pequena amostra isso não se verifica e as próteses acrílicas são dominantes, o que poderá estar relacionado com o estrato socioeconómico da maioria dos pacientes.

Neste trabalho foi apenas ensaiada a quantificação total bacteriana sendo objeto do projeto global fazer uma caracterização mais alargada de alguns grupos microbianos nomeadamente as leveduras.

Embora estudos recentes tenham gerado algumas informações sobre o microbioma na cavidade oral, ainda há poucas investigações que analisam o uso de próteses dentárias e sua relação com a saúde e a doença oral e sistémica. A carga bacteriana total da saliva observada em pacientes portadores de prótese

removível neste estudo é ligeiramente mais elevada que em pacientes sem prótese, embora sem significância estatística.

Apesar de neste trabalho não terem sido quantificados especificamente nenhum grupo das bactérias existe o potencial para fazê-lo com as amostras recolhidas e o ADN isolado das mesmas. Assim, foram estabelecidos os protocolos de recolha, processamento das amostras e análise laboratorial que permitirão completar este estudo no próximo ano letivo.

A análise dos resultados preliminares permite verificar que as quantificações dos microrganismos na saliva e zaragatoa são possíveis, mas que a quantidade de ADN microbiano recolhida nas amostras de zaragatoa é sempre menor quando comparada com a saliva. É proposto que seja modificado o procedimento de recolha das amostras de zaragatoa diminuindo o fluido de recolha para que a amostra possa ficar mais concentrada. Importa, no entanto, salientar que, a análise feita neste trabalho foi considerando apenas a carga bacteriana total e que, como indicado por Omori e colaboradores (2021) os microbiomas associados a diferentes tipos de recolha são inerentemente diferentes no tipo de colonização que apresentam (24).

Neste estudo preliminar não foi possível recolher um grande número de amostras uma vez que as interrupções causadas pela pandemia do COVID-19 e a consequente diminuição do fluxo de pacientes na Clínica universitária da FMD-UCP limitaram o acesso aos pacientes. Para além disso houve também a recusa de muitos pacientes em participar no estudo. Com a “normalização” do atendimento na CDU-UCP é expectável que o recrutamento de pacientes possa ser incrementado.

Devido ao ambiente complexo e as inúmeras interações e correlações que interagem com o meio oral há ainda uma dificuldade em compreender todo o seu ecossistema. Mais difícil se torna o estudo ao acrescentar a presença da prótese removível. No entanto pôde-se dar mais um passo na definição de um protocolo clínico para análise do microbioma em pacientes que utilizam prótese.

## Conclusão

Este trabalho apresenta-se como o início das recolhas do projeto Microbioma Oral na Clínica Dentária Universitária da UCP. Conclui-se deste trabalho preliminar que a ficha de recolha de dados proposta é exequível e de fácil aplicação sendo, no entanto, necessário rever os protocolos de recrutamento de pacientes para o estudo.

Conclui-se ainda que é possível a articulação com o SalivaTec para a análise molecular das amostras, sendo ainda necessário otimizar os protocolos de quantificação de microrganismos específicos e de distinção entre as várias espécies de *Candida*. Será também importante modificar a recolha de amostras das próteses aumentando a quantidade de ADN recuperado em cada amostra. Conclui-se finalmente que trabalhos aliando os aspetos moleculares às descrições clínicas são possíveis de realizar na FMD-UCP, mas que é necessário melhorar o recrutamento de pacientes para participação nos estudos.

## Referências bibliográficas

1. Lederberg J, Mccray AT. COMMENTARY 'Ome Sweet 'Omics-A Genealogical Treasury of Words [Internet]. Available from: [www.-ics.com](http://www.-ics.com)
2. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The Sequence of the Human Genome [Internet]. Vol. 291. 2001 Feb. Available from: <http://science.sciencemag.org/>
3. Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Research*. 2009 Dec;19(12):2317–23.
4. Yamashita Y, Takeshita T. The oral microbiome and human health. Vol. 59, *Journal of Oral Science*. Nihon University, School of Dentistry; 2017. p. 201–6.
5. Sedghi L, DiMassa V, Harrington A, Lynch S v., Kapila YL. The oral microbiome: Role of key organisms and complex networks in oral health and disease. Vol. 87, *Periodontology 2000*. John Wiley and Sons Inc; 2021. p. 107–31.
6. Deo PN, Deshmukh R. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. Vol. 23, *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. Wolters Kluwer Medknow Publications; 2019. p. 122–8.
7. Chimenos-Küstner E, Giovannoni ML, Schemel-Suárez M. Disbiosis como factor determinante de enfermedad oral y sistémica: importancia del microbioma. Vol. 149, *Medicina Clinica*. Ediciones Doyma, S.L.; 2017. p. 305–9.
8. Zaura E, Brandt BW, Prodan A, Teixeira De Mattos MJ, Imangaliyev S, Kool J, et al. On the ecosystemic network of saliva in healthy young adults. *ISME Journal*. 2017 May 1;11(5):1218–31.
9. Petersen PE. The World Oral 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 Dec;31 Suppl 1:3-23.

10. Sanketh D, Amrutha N. Oral Microbial Flora in Health. *World Journal of Dentistry*. 2013 Dec;4(4):262–6.
11. Dörfer C, Benz C, Aida J, Campard G. The relationship of oral health with general health and NCDs: a brief review. Vol. 67, *International Dental Journal*. Wiley-Blackwell Publishing Ltd; 2017. p. 14–8.
12. Critchlow D. Part 3: Impact of systemic conditions and medications on oral health. Vol. 22, *British Journal of Community Nursing*. 2017.
13. Zhang Y, Qi Y, Lo ECM, McGrath C, Mei ML, Dai R. Using next-generation sequencing to detect oral microbiome change following periodontal interventions: A systematic review. Vol. 27, *Oral Diseases*. John Wiley and Sons Inc; 2021. p. 1073–89.
14. Su Mun L, Wye Lum S, Kong Yuiin Sze G, Hock Yoong C, Ching Yung K, Kah Lok L, et al. Association of microbiome with oral squamous cell carcinoma: A systematic review of the metagenomic studies. Vol. 18, *International Journal of Environmental Research and Public Health*. MDPI; 2021.
15. Linabarger M, Griffin SO, Hamilton EK. Utility of State-Based Basic Screening Survey Reports for National Oral Health Surveillance in Older Adults. *Preventing Chronic Disease*. 2021;18:1–11.
16. O'Donnell LE, Robertson D, Nile CJ, Cross LJ, Riggio M, Sherriff A, et al. The oral microbiome of denture wearers is influenced by levels of natural dentition. *PLoS ONE*. 2015 Sep 14;10(9).
17. Fujinami W NKOSHYTJ. Correlation between the relative abundance of oral bacteria and *Candida albicans* in denture and dental plaques. *J Oral Biosci*. 2021 06;63(2):175-83.
18. Gupta M, Gugnani N, Pandit I. International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): A New Concept. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. 2011 Aug;4(2):93–100.
19. Pitts NB, Bds Fds Rcs Fds Rcs Ffgdp Ffph F, Ismail AI, Martignon S, Ekstrand K, A Douglas G v, et al. ICCMSS GGGde for Practitioners and Educators Contributing co-authors\* On behalf of the Participating Authors of the International Caries Classification and Management System (ICCMS TM ) Implementation Workshop, held June 2013\*\* [Internet].

2014. Available from: [www.kcl.ac.uk/sspp/kpi/projects/healthpolicy/global-caries-management.aspx](http://www.kcl.ac.uk/sspp/kpi/projects/healthpolicy/global-caries-management.aspx).
20. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018 Jun 1;89:S173–82.
  21. Tonetti MS, Sanz M. Implementation of the new classification of periodontal diseases: Decision-making algorithms for clinical practice and education. *Journal of Clinical Periodontology*. 2019 Apr 1;46(4):398–405.
  22. Rosa N, Marques J, Esteves E, Fernandes M, Mendes VM, Afonso Â, et al. Protein Quality Assessment on Saliva Samples for Biobanking Purposes. In: *Biopreservation and Biobanking*. Mary Ann Liebert Inc.; 2016. p. 289–97.
  23. Almufleh B, Emami E, Alesawy A, Rodan R, Morris M, Umebayashi M, et al. Patient-Reported Outcomes of Metal and Acrylic Resin Removable Partial Dentures: A Systematic Review and Meta-Analysis. Vol. 29, *Journal of Prosthodontics*. Blackwell Publishing Inc.; 2020. p. 378–86.
  24. Omori M, Kato-Kogoe N, Sakaguchi S, Fukui N, Yamamoto K, Nakajima Y, et al. Comparative evaluation of microbial profiles of oral samples obtained at different collection time points and using different methods. *Clinical Oral Investigations*. 2021 May 1;25(5):2779–89.

# Anexos

## Anexo I – Parecer Comité de Ética em Saúde-UCP



**Parecer sobre o projeto nº 113**  
Comissão de Ética para a Saúde da Universidade Católica Portuguesa  
Mandato 2019/2023

<p><b>Projeto de Investigação</b> Na reunião do dia 13 de janeiro de 2021 a CES-UCP esteve reunida e apreciou do ponto de vista ético os elementos submetidos pela investigadora. Sobre a apreciação redige o parecer que agora se apresenta.</p>
<p><b>Título:</b> Microbioma Oral Humano Saudável <b>Instituição/Parceria:</b> Faculdade de Medicina Dentária da UCP/Clinica Dentária Universitária da UCP Este trabalho é realizado com vista à obtenção do grau de mestre em Medicina Dentária pela Faculdade de Medicina Dentária da UCP.</p>
<p><b>Investigadores responsáveis:</b> Prof. Doutora Maria José Correia e Prof. Doutora Ana Sofia Duarte. <b>Equipa de Investigação:</b> Bruno Moura (mestrando), André Correia, Anna Moura, Cacio Moura, Pedro Campus Lopes, Nélio Veiga, Rute Rio.</p>
<p><b>Resumo:</b> Os estudos do Microbioma Humano têm atraído muita atenção desde a primeira publicação dos resultados do Projeto Microbioma Humano. Este facto decorre principalmente das imensas possibilidades previstas para a modulação do microbioma e do seu impacto na saúde e bem-estar do hospedeiro humano. A boca abriga um dos mais diversos microbiomas do corpo humano e é um habitat onde se estabelecem importantes interações hospedeiro-microrganismo, que impactam a saúde oral e sistémica. Embora muito tenha sido estudado sobre a diversidade e alterações do microbioma intestinal, as interações hospedeiro-microrganismo na saúde e doenças e o impacto do microbioma no bem-estar dos hospedeiros, muito menos informação está disponível para o microbioma oral. A literatura mais recente valida a noção, geralmente aceite, de que o microbioma oral tem a maior diversidade taxonómica do corpo humano, e que, apesar da variação intra e inter individual da composição das espécies, existe um microbioma “core” que conserva determinadas características genéticas e metabólicas. Este microbioma “core” não está ainda totalmente definido e a sua variação com características como a idade, o género, alimentação, zona geográfica e a relação com patologias ou condições clínicas, também não está suficientemente estudada para a maioria das populações. O conhecimento deste microbioma “core” é fundamental uma vez que, existem evidências que sustentam que um microbioma saudável difere na composição taxonómica de outros microbiomas que promovem a disbiose. Como a disbiose ao nível do microbioma acontece antes do diagnóstico clínico de doenças orais ou sistémicas, conhecer a ecologia do microbioma oral humano tem impacto nas estratégias de diagnóstico precoce e, portanto, prognóstico e monitorização em saúde.</p> <p><b>Objetivo Principal:</b> contribuir para a definição do microbioma oral “core” em saúde e a sua relação com diversos aspetos demográficos e clínicos. Para cumprir este objetivo serão recolhidas amostras biológicas de saliva e biofilme oral dos utentes da Clínica Dentária Universitária. As amostras de saliva e biofilme oral serão analisadas quanto a: carga total bacteriana, quantificação de filos bacterianos associados a saúde/doença e quantificação de géneros e espécies associadas a saúde e patologia oral; perfis do microbioma oral e sua relação com idade, sexo e estado de saúde oral e sistémica.</p> <p><b>Metodologia:</b> Estudo clínico sem intervenção. Os dados a ser recolhidos são dados demográficos, clínicos e amostras biológicas de saliva e biofilme oral. As recolhas decorrem na Clínica Dentária Universitária da UCP e as análises das amostras biológicas no laboratório SalivaTec do Centro de Investigação Interdisciplinar em Saúde da UCP.</p> <p><b>População e amostra:</b> Utesntes da clínica Dentária Universitária que desejem participar no estudo e assinem o Termo de Consentimento Informado e Esclarecido. O estudo inclui menores, uma vez que a idade é um fator relevante para as alterações no microbioma a inclusão de menores é fundamental para se obter uma amostra representativa.</p>



**Critérios de exclusão:** utentes da clínica que não manifestem vontade de participar no estudo.

**Riscos:** Não existem riscos associados às colheitas. Existe apenas o incómodo do tempo adicional que a consulta pode demorar. Os investigadores tudo farão para minimizar o incómodo do tempo dedicado à entrevista e à observação oral.

**Potenciais benefícios:** Os benefícios são para a comunidade em geral uma vez que o conhecimento assim adquirido tem grande potencial para gerar novas formas de diagnóstico precoce, monitorização e, portanto, prognóstico favorável de patologias orais e sistémicas utilizando estratégias não invasivas.

**RGPD:** Apenas o Investigador Principal tem acesso à correspondência entre o código gerado para o questionário e amostras biológicas e o número do processo clínico. O estudo está em conformidade com a política institucional que garante a conformidade com o RGPD na recolha dos dados pelos médicos dentistas.

**Em suma,** o Protocolo de investigação preenche os requisitos pedidos pela CES. Foram enviados os CVs dos investigadores responsáveis, do investigador mestrando, da equipa de investigação e do respetivo investigador orientador bem como o respetivo parecer. Foi enviado o formulário de submissão à CESUCP devidamente preenchido, foi enviado o protocolo do trabalho e a respetiva calendarização. Foram também enviados os documentos relativos ao Parecer do Conselho Científico da FMDUCP e foi enviada a Declaração de Autorização de recolha de dados na Clínica Dentária Universitária da UCP. Relativamente à confidencialidade e à RGPD, o projeto inclui a declaração de compromisso do orientador responsável que se encontra em conformidade com as exigências previstas pela CESUCP. O projeto inclui o documento para o consentimento informado livre e esclarecido, no entanto, uma vez que a investigação também será feita com menores, pede-se ainda o envio de documento relativo ao processo de assentimento dos menores.

**Estiveram presentes na reunião nº 25 da CES-UCP**

Presidente: Doutora Mara de Sousa Freitas  
Vice-Presidente: Doutora M<sup>a</sup> Teresa Marques  
Doutor Jerónimo Santos Trigo  
Doutor Pedro Garcia Marques  
Dr. Eugénio Fonseca  
Doutora Ana Mineiro Zaky  
Doutora Marta Brites  
Mestre Ivone Gaspar

**Conclusão**

Ouvido o Relator, e o plenário da reunião do dia 13 de janeiro de 2021 realizada por videoconferência, esta CES delibera, por unanimidade, a emissão de **Parecer Favorável** desde que seja enviado documento relativo ao processo de assentimento dos menores.

Esta CES solicita à Investigadora Principal que, aquando da conclusão do estudo, lhe seja enviada uma síntese dos resultados obtidos e respetivas conclusões, via eletrónica, para o correio eletrónico da CES UCP.

A Presidente,

*Mara de Sousa Freitas*

Mara de Sousa Freitas

13/01/2021

## **Anexo II – Consentimento Informado**

### **CONSENTIMENTO INFORMADO, ESCLARECIDO E LIVRE PARA PARTICIPAÇÃO EM ESTUDOS DE INVESTIGAÇÃO**

*(de acordo com a Declaração de Helsínquia e a Convenção de Oviedo)*

**Título do estudo:** Microbioma Oral Humano

**Objetivo:** Estudar os microrganismos da cavidade oral dos utentes da Clínica Dentária Universitária através da recolha de saliva e de biofilme oral. Relacionar a presença de grupos de microrganismos com fatores demográficos e condições clínicas dos utentes.

**Descrição do Estudo:** Os microrganismos são parte integrante do nosso corpo. Na cavidade oral esses microrganismos formam a placa dentária que apesar de existir em simbiose connosco, pode nalgumas circunstâncias estar associada a patologias orais como cárie dentária, doença periodontal e até de perdas total de dentes.

O estudo proposto é composto por três momentos distintos. Numa primeira fase será realizado um questionário para recolha de alguns dados demográficos e clínicos incluindo a experiência de cárie pelo índice ICDAS (este exame tem a duração aproximadamente de 15 minutos). Seguidamente proceder-se-á à recolha das amostras de saliva e biofilme oral. Este procedimento demora apenas cerca de 5 minutos e é absolutamente indolor e não apresenta nenhum desconforto para o dador, nem interferem com a consulta. As amostras, depois de totalmente anonimizadas serão tratadas por técnicas de metagenómica.

**Vantagens e riscos na participação solicitada:** Este estudo não envolve procedimentos que não se enquadrem na prática clínica normal nem pretende testar novos produtos ou medicamentos. A participação neste estudo é totalmente voluntária e anónima, não acarretando quaisquer custos. É fundamental que perceba que pode retirar o seu consentimento em qualquer etapa do estudo. Não precisa para tal de apresentar explicações aos

responsáveis pela investigação, nem terá qualquer prejuízo, assistenciais ou outros, caso não queira participar. Ao decidir participar pode colocar todas as questões que considerar necessárias para o seu esclarecimento. Mesmo depois de assinado o documento de consentimento esclarecido e informado, pode em qualquer altura solicitar a sua exclusão do estudo. Para tal basta contactar o investigador principal cuja identificação está no fim deste formulário. A sua contribuição com dados e amostras para este estudo permitirá conhecer melhor a relação entre os microrganismos da cavidade oral e a saúde dos indivíduos. Este estudo não é financiado e a participação não implica qualquer remuneração ou encargo económico para o participante. Os participantes colaboram de forma voluntária, livre e esclarecida.

**Medidas de Mitigação dos Riscos Reais ou Potenciais:** Uma vez que neste estudo não existem riscos para o paciente não estão previstas medidas de mitigação. Ainda assim é importante referir que os investigadores responsáveis garantem aos participantes o exercício dos seus direitos em relação aos dados recolhidos (como o acesso, a retificação ou a eliminação), bastando o mesmo ser solicitado à Encarregada da Proteção de Dados deste estudo (*contactos no final do documento*). Para além do referido, o participante pode efetuar uma reclamação junto do Encarregado de Proteção de Dados (DPO - Data Protection Officer) da UCP, que a encaminhará para a Comissão Nacional de Proteção de Dados (CNPd), caso considerem que existe um incumprimento legal à proteção de dados por parte equipa de investigação (*contactos no final do documento*).

**Confidencialidade e anonimato:** Os investigadores garantem o anonimato e a confidencialidade dos dados recolhidos. A informação é recolhida apenas pelo Investigador Principal, num momento único de observação, em ambiente de privacidade, não permite a identificação do participante e é usada apenas para os fins científicos do presente estudo. Os dados são registados e armazenados no computador pessoal do Investigador, com acesso protegido e apenas durante o estudo. Concluída a investigação, os dados armazenados serão eliminados e é garantido que a identificação do participante nunca se torne pública.

**Medidas de Partilha de Benefícios:**

Os resultados deste estudo serão partilhados com a comunidade científica através de publicações em revistas com revisão por pares e constituirão parte do corpo de informação e conhecimento científico que permite desenvolver novas formas de diagnóstico precoce e monitorização da saúde com a utilização de amostras não invasivas.

**Recolha de Dados:**

Os dados a recolher neste estudo são de duas naturezas: dados da sua história clínica que serão recolhidos do seu processo clínico confirmados por entrevista e amostras biológicas de saliva e biofilme oral (placa dentária). As recolhas das amostras biológicas são não invasivas e totalmente indolores.

Os dados recolhidos são totalmente anonimizados e os investigadores (para além do investigador principal) terão apenas acesso à informação codificada não sendo possível identificar a que indivíduo pertence.

Os dados e as amostras serão preservados durante 5 anos, período após o qual serão destruídas.

**Responsável pela Investigação:**

Maria José Serol de Brito Correia

Tlm: 919871348

Email: mcorreia@ucp.pt

Agradecemos o seu contributo para o desenvolvimento científico da Medicina Dentária da Universidade Católica Portuguesa e na qualidade de investigador responsável estou ao dispor para qualquer informação/dúvida que possa surgir durante este estudo.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do Investigador Principal: \_\_\_\_\_

Por favor, leia com atenção toda a informação. Se achar que algo não está claro, não hesite em solicitar mais informações. Se concorda com a proposta que lhe foi feita, queira assinar este documento.

Declaro ter lido e compreendido este documento, bem como as informações verbais e escritas que me foram fornecidas pelo Investigador Principal que acima assina.

Foi-me garantida a possibilidade de, em qualquer altura, recusar participar neste estudo sem qualquer tipo de consequências assim como de aceder aos meus dados.

Aceito participar neste estudo, de forma informada e esclarecida, e permito a utilização dos dados que de forma voluntária forneço, confiando em que apenas serão utilizados para esta investigação e nas garantias de confidencialidade e anonimato que me são dadas pelo investigador.

**Nome do participante no estudo:** \_\_\_\_\_

**Assinatura:** \_\_\_\_\_

**SE NÃO FOR O PRÓPRIO A ASSINAR POR IDADE OU INCAPACIDADE**

(se o menor tiver discernimento deve também assinar em cima, se consentir)

Nome: \_\_\_\_\_

BI/CC nº: \_\_\_\_\_

Data ou validade \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Grau de parentesco ou tipo de representação: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Contacto do Encarregado de Proteção de Dados (DPO - Data Protection Officer) da UCP:**

Data Protection Officer - UCP

Dra. Frederica Campos de Carvalho

Contacto telefónico: +351 217214179

E-mail: [compliance.rgpd@ucp.pt](mailto:compliance.rgpd@ucp.pt)

**Contacto do Encarregado da Proteção de Dados deste estudo na FMD-UCP**

**Viseu:**

Maria José Serol de Brito Correia

Tlm: 919871348

Email: [mcorreia@ucp.pt](mailto:mcorreia@ucp.pt)

## Anexo III– Ficha de recolha de dados dos dadores

### 1. CÓDIGO

1.1. Identificador (número do processo) : \_\_\_\_\_

### 2. DADOS DA AMOSTRA

2.1. Código da amostra: \_\_\_\_\_

2.2. Código do paciente: \_\_\_\_\_

2.3. Data de preenchimento (dd/mm/aaaa) : \_\_\_\_\_

2.4. Material biológico:

- Saliva
- Bochecho
- Biofilme
- Não recolheu amostra biológica

2.5. Amostragem:

- 1ª amostragem
- Amostragem de follow-up

2.6. Hora de Recolha: \_\_\_\_\_

2.7. Data de colheita (dd/mm/aaaa): \_\_\_\_\_

2.8. Local de amostragem:

- Centro Hospitalar Tondela Viseu
- Clínica Dentária UCP
- Actividade Sénior Viseu

- Outros

### **3. DADOS PESSOAIS DO DADOR**

#### 3.1. Origem do paciente

- Clínica dentária UCP
- Centro Hospitalar Tondela Viseu
- Outros

3.2 Data de Nascimento (dd/mm/aaaa): \_\_\_\_\_

#### 3.3. Género

- Feminino
- Masculino

#### 3.4. Raça

- Caucasiana
- Africana
- Oriental
- Cigana
- Outra
- Não respondeu

#### 3.5. Nível de Escolaridade

- Básico (até ao 9º ano)
- Médio (até ao 12º ano)
- Licenciatura, Mestrado e/ou Doutoramento
- Outra
- Não respondeu

3.6. Investigador: \_\_\_\_\_

3.7. Data do preenchimento (dd/mm/aaaa): \_\_\_\_\_

#### 4. INFORMAÇÕES DE SAÚDE GERAL DO DADOR

O grupo de questões que se segue destina-se a recolher informação geral acerca da sua saúde:

4.1. Tem hipertensão?

- Sim
- Não
- Não sabe

4.2. Tem Diabetes?

- Tipo 1
- Tipo 2
- Não sabe (qual o tipo)
- Não tem

4.3. Tem ou já teve alguma destas patologias?

	Sim	Não	Não sabe
Problemas cardíacos			
Doenças de sangue			
Doenças de fígado			
Doenças de estômago			
Doenças renais			
Doenças intestinais			
Cancro			
Alergias			
Outras doenças			

4.4. Especifique o tipo (diagnóstico) da patologia:

---

---

4.5. Foi sujeito a algum tratamento de radioterapia ou quimioterapia?

Sim

Não

4.6. Se sim, há quanto tempo? (anos) \_\_\_\_\_

4.7. História Familiar - Existem doenças na família como?

Doenças Cardíacas

Diabetes

Cancro

Outra

Não tem

4.8. Qual ? \_\_\_\_\_

## **5. COVID-19**

5.1. Foi diagnosticado com COVID-19 há menos de 90 dias?

Sim

Não

5.2. Já foi submetido a vacinação?

- Sim
- Não

5.3. Qual a vacina administrada?

- Pfizer-BioNTech
- Moderna
- Johnson & Johnson/Janssen
- AstraZeneca
- Novavax
- Outra. Por favor especificar qual: \_\_\_\_\_

5.4. Quantas doses já recebeu? \_\_\_\_\_

## 6. MEDICAÇÃO

O grupo de questões que se segue pretende recolher informações relevantes relativas à sua medicação:

6.1. Faz algum tipo de tratamento médico ou medicação com regularidade?

- Sim
- Não
- Não sabe

6.2. Se sim, refira-o:

---

---

6.3. Fez algum tipo de tratamento médico ou medicação nos últimos 30 dias?

- Sim
- Não

6.4. Se sim, refira-o :

---

---

6.5. Responda às seguintes questões:

	Sim	Não	Não sabe
Tomou algum antibiótico nos últimos 3 meses?			
Recebeu recentemente a vacina da gripe? (últimos 6 meses)			
Nos últimos 12 meses foi consultado por um médico?			

6.6. Refira o(s) nome(s) do(s) antibiótico(s):

---

---

## 7. HÁBITOS TABÁGICOS

O grupo de questões que se segue pretende avaliar os seus hábitos tabágicos:

7.1. Fuma ou já fumou?

- Sim
- Não
- Ex-fumador

7.2. Se fuma/fumou:

- Com que idade começou a fumar? \_\_\_\_\_
- Não sabe

7.3. Quantos cigarros fuma/fumava (por **dia**): Nota: um maço equivale a 20 cigarros.

- Até 10
- Mais do que 10
- Não sabe

7.4. Se é ex-fumador há quantos **anos** deixou de fumar?

- Sabe \_\_\_\_\_
- Não sabe

## 8. CONSUMO DE ALCOOL

O grupo de questões que se segue pretende avaliar o seu consumo de álcool.

8.1. Bebe ou já bebeu, regularmente, bebidas alcoólicas?

- Sim
- Não

8.2. Se bebe/bebeu; com que idade começou?

- Idade \_\_\_\_\_
- Não sabe

8.3. Se bebe ou já bebeu, preencha o seguinte quadro:

Nº copos vinho (por <b>semana</b> )	<input type="checkbox"/> Até 14	<input type="checkbox"/> Mais de 14	<input type="checkbox"/> Não sabe	<input type="checkbox"/> Não bebe
Nº cervejas (por <b>semana</b> )	<input type="checkbox"/> Até 14	<input type="checkbox"/> Mais de 14	<input type="checkbox"/> Não sabe	<input type="checkbox"/> Não bebe
Nº digestivos/bebidas brancas (por <b>semana</b> )	<input type="checkbox"/> Até 7	<input type="checkbox"/> Mais de 7	<input type="checkbox"/> Não sabe	<input type="checkbox"/> Não bebe

8.4. Deixou de beber? Se sim com qual idade?

- Sim \_\_\_\_\_
- Não

## 9. ALTERAÇÕES HORMONAIIS

O grupo de questões que se segue pretende avaliar possíveis alterações hormonais.

9.1. Está grávida?

- Sim
- Não

9.2. Se sim, de quantas semanas? \_\_\_\_\_

9.3. Encontra-se na menopausa?

- Sim
- Não

9.4. Se sim, há quanto tempo (anos)? \_\_\_\_\_

9.5. Há quanto tempo teve a última menstruação (dias)? \_\_\_\_\_

9.6. Toma anticoncepcionais?

Sim

Não

## **10. HÁBITOS E COMPORTAMENTO DE HIGIENE ORAL**

O grupo de questões que se segue pretende avaliar os seus hábitos e comportamentos de higiene oral.

10.1. Costuma escovar os dentes diariamente?

Sim

Não

10.2. Se sim, quantas vezes por dia?

1

2

3

> 3

10.3. Costuma utilizar fio dentário?

Não

Sim, às vezes

Sim, diariamente

Não sei o que é o fio dentário.

10.4. Quando foi a última vez que visitou um dentista?

- Há 1 ano
- Há 2 anos
- Entre 2 e 5 anos
- Há mais de 5 anos
- Nunca

10.5. Sente alguma dor na região da face ou no interior da boca?

- Sim
- Não

10.6. Sente que a sua boca esta "seca"?

- Sim
- Não

10.7. Se sim, tenta compensar este facto com maior consumo de água?

- Sim
- Não

10.8. Sente alguma alteração no paladar?

- Sim
- Não

## **11. REABILITAÇÃO PROTÉTICA**

As questões que se seguem relacionam-se com o uso de prótese.

11.1 Utiliza prótese?

- Sim
- Não

11.2 Em qual das arcadas ?

- Superior
- Inferior
- Ambas

11.3 Qual o tipo da prótese ?

	Total	Parcial acrílica	Parcial esquelética
Superior	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Inferior	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

11.4. A que tipo de classificação de Kennedy corresponde a prótese que utiliza?

	Classe I	Classe II	Classe III	Classe IV	Sem classificação
Superior	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Inferior	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

11.5. Quando utiliza a(s) prótese(s) ?

- Sempre
- Às vezes
- Só durante as refeições
- Nunca

11.6. Como faz a higienização da sua prótese?

- Só com água
- Com água e escova
- Pastilhas de limpeza
- Fio dentário
- Escovilhão
- Produto dentário (qual?) \_\_\_\_\_

11.7. Quantas vezes por dia é feita essa higienização?

- 0
- 1
- 2
- 3

11.8. Costuma retirar a prótese para dormir?

- Sempre
- Às vezes
- Raramente
- Nunca

11.9. Há quanto tempo utiliza uma prótese dentária? (anos) \_\_\_\_\_

11.10. Há quanto tempo tem a atual prótese dentária? (anos) \_\_\_\_\_

11.11. Qual a frequência de consultas de manutenção protética?

- em 3 meses
- 6 em 6 meses
- 1 vez por ano
- Nenhuma das hipóteses

## 12. SAÚDE ORAL

O grupo de itens' que se segue pretende avaliar a sua saúde oral.

12.1. Condição atual de cada elemento dentário:

	Ausente	Cariado	Desvitalizado	Restaurado	Implante	Raiz
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
31						
32						
33						
34						
35						
36						
37						
38						
41						
42						



12.4. As questões a seguir referem-se ao diagnóstico periodontal (nova classificação).

Preencher Perio Chart e copiar informações para o questionário.

<https://www.periodontalchart-online.com/uk/>

Diagnóstico Periodontal (marcar uma resposta ou mais)

- Saúde Periodontal
- Periodonto reduzido
- Gengivite
- Periodontite localizada (menor que 30%)
- Periodontite generalizada (maior que 30%)
- Padrão Molar Incisivo
- Estadio I
- Estadio II
- Estadio III
- Estadio IV
- Grau A
- Grau B
- Grau C
- Mucosite Peri-implantar
- Peri-implantite

#### 12.5. Diagnóstico Oral

- Estomatite protética Tipo I
- Estomatite protética Tipo II
- Estomatite protética Tipo III

12.6. Necessidade de tratamento médico-dentário?

- Sim
- Não

12.7. Necessidade de reabilitação protética?

- Sim
- Não

## **Anexo IV– Extração de ADN das amostras**

### **DNA extraction from saliva samples using the QuickExtract™ DNA Extraction Solution (QE0905T, Lucigen)**

- 1-** Vortex saliva and in a centrifuge tube mix 50 µl of saliva with 50 µl of QE DNA extraction solution;
- 2-** Vortex for 10 sec;
- 3-** Transfer tubes to a heat block at 65 °C and incubate for 6 min;
- 4-** Mix by vortexing;
- 5-** Transfer tubes to a heat block at 98 °C and incubate for 2 min;
- 6-** Place tubes on ice;
- 7-** Use 5 µl or less of the extracted DNA for each PCR amplification;
- 8-** Store the DNA at -20 °C or at -80 °C for longer periods;

## Anexo V - Quantificação microbiana

### QPCR protocol for absolute quantification

#### Quantification of total bacterial load:

##### Standard Curve:

Plasmid DNA containing cloned target sequences is widely used as standards in quantitative PCR.

For the **16S rRNA gene** a standard curve was obtained from *Staphylococcus Capitis*;

##### Plasmid DNA concentration:

16S rRNA gene construct: 516,1 ng/uL

##### **NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2x) (MB22402)**

NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2x) is ready-to-use and only requires primers and template addition. It is optimized for intercalating green dye detection on different instruments.

16S rRNA gene: annealing temperature 61.5 °C

##### 10 µL final reaction mix:

NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2x): 5 µL

10 µM forward primer: 0.4 µL, final concentration: 0,4 µM

10 µM reverse primer: 0.4 µL, final concentration: 0,4 µM

DNA: 1 ng per PCR reaction

Nuclease-free water up to 10 µL

		<b>16S rRNA gene</b>	
95 °C	Forward Primer	926F AAACTCAAAGAATTGACGG	<b>Cycle PCR:</b> for 2 min <u>cycles:</u>
	Reverse Primer	1062R CTCACRRRCACGAGCTGAC	

40 95 °C for 5 sec

61.5 °C for 20 sec

PCR was performed using the CFX Connect Real-time PCR system, BioRad. For data analysis the formula below was used.

##### DNA Copy Number determination:

Number of copies = (DNA concentration (ng/µl) x [6.022 x 10<sup>23</sup>]) / (length of template (bp) x [1x10<sup>9</sup>] x 650)