



CATÓLICA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

VISEU

INTEGRAÇÃO DE DADOS CLÍNICOS E MOLECULARES NA ESTRATIFICAÇÃO DE PACIENTES COM DOENÇA PERIODONTAL

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

Eduardo Manuel Craveiro Gamboa de Nunes Batista

Viseu, 2024



CATÓLICA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

VISEU

INTEGRAÇÃO DE DADOS CLÍNICOS E MOLECULARES NA ESTRATIFICAÇÃO DE PACIENTES COM DOENÇA PERIODONTAL

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

Por:

Eduardo Manuel Craveiro Gamboa de Nunes Batista

Orientador

Professor Doutor Nuno Rosa

Coorientador

Professor Doutor Tiago Marques

Doutora Karina Mendes

Viseu, 2024

“Aut viam inveniam aut faciam”

(Hannibal)

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Nuno Rosa,

Por toda a disponibilidade, apoio à realização deste trabalho e todo o conhecimento transmitido, ao longo do meu percurso académico.

À Doutora Karina Mendes,

Por toda a ajuda, paciência, conhecimento e conselhos transmitidos. Sem a sua disponibilidade, este trabalho não seria possível.

Ao Professor Doutor Tiago Marques,

Por ser a peça fundamental no ensino da prática clínica da Periodontologia e por permitir, muitas vezes, o impossível.

À equipa do Laboratório Salivatec,

Por toda a ajuda que se revelou fundamental ao longo deste processo. Um especial agradecimento à Mónica e à Marla, que foram incansáveis.

Aos meus pais,

Por todo o esforço, dedicação e amor incondicional. Por estarem sempre presentes.

Aos meus avós,

Por todo o carinho, ajuda e reforço positivo. Por nunca me abandonarem, mesmo nos momentos mais difíceis, e por acreditarem sempre nas minhas capacidades.

À minha binómia,

Pela amizade, apoio incondicional, companheirismo e espírito crítico.

Aos meus amigos e colegas,

Por todos os momentos vividos ao longo deste percurso.

Resumo

Introdução: A doença periodontal (DP) é uma doença inflamatória crônica de etiologia multifatorial, originada pela disbiose do biofilme bacteriano nas gengivas, afetando os tecidos moles, os ligamentos periodontais e o osso alveolar. A DP é um desafio significativo para a saúde pública, devido à sua prevalência e impacto negativo na saúde sistêmica, sendo uma das principais causas de perda dentária em adultos. Fatores de risco para o desenvolvimento da DP incluem a diabetes, a genética, o tabagismo, a resposta inflamatória gengival e periodontal descontrolada, o stress e uma dieta não saudável. Esta dissertação propõe a análise molecular e a validação de biomarcadores, em conjunto com a adoção de novos critérios de estratificação, como uma nova estratégia para a prática de medicina dentária de precisão.

Objetivos: Quantificação de biomarcadores moleculares em amostras de saliva e/ou biofilme de pacientes com saúde periodontal, gengivite ou DP, de forma a melhorar a estratificação dos pacientes através da integração dos resultados moleculares obtidos com os respectivos dados clínicos.

Materiais e Métodos: Estudo observacional transversal com 82 pacientes. Incluiu questionários, sondagem periodontal, diagnóstico e recolha de saliva e biofilme. As amostras foram analisadas pelo laboratório Salivatec. Foi efetuada a quantificação do número de cópias de DNA de espécies periodontopatogénicas por qPCR, de um grupo representativo de cada um dos diagnósticos da DP (incluindo saúde periodontal e gengivite), perfazendo um total de 34 amostras.

Resultados: A análise dos resultados de qPCR revelou que a *T. denticola* foi mais prevalente em estadios avançados da DP (III e IV) e em casos de gengivite, indicando a sua relevância tanto em processos inflamatórios iniciais quanto em estadios severos da doença. A *F. fastidiosum* apresentou uma variação muito significativa entre diagnósticos da DP, sugerindo uma forte associação com estadios graves da doença. A *M. timidum* demonstrou uma associação com estadios moderados e avançados na DP.

Conclusão: A integração de biomarcadores moleculares específicos no diagnóstico, como *F. fastidiosum* e *T. denticola*, no tratamento da DP, pode proporcionar uma abordagem de precisão, melhorando a gestão clínica e a monitorização do estado de saúde periodontal dos pacientes.

Palavras-chave: Doença Periodontal, Disbiose, Bactérias Periodontopatogénicas, Biomarcadores Moleculares, Medicina Dentária de Precisão

Abstract

Introduction: Periodontal disease (PD) is a chronic inflammatory disease of multifactorial etiology, caused by dysbiosis of the bacterial biofilm on the gums, affecting the soft tissues, periodontal ligaments and alveolar bone. PD is a significant public health challenge due to its prevalence and negative impact on systemic health, being one of the main causes of tooth loss in adults. Risk factors for the development of PD include diabetes, genetics, smoking, uncontrolled gingival and periodontal inflammatory response, stress and an unhealthy diet. This dissertation proposes the molecular analysis and validation of biomarkers, together with the adoption of new stratification criteria, as a new strategy for the practice of precision dentistry.

Objective: Quantification of molecular biomarkers in saliva and/or biofilm samples from patients with periodontal health, gingivitis or PD, to improve patient stratification by integrating the molecular results obtained with the respective clinical data.

Materials and methods: Cross-sectional observational study with 82 patients. It included questionnaires, periodontal probing, diagnosis and collection of saliva and biofilm. The samples were analyzed by the Salivatec laboratory. The number of DNA copies of periodontopathogenic species was quantified by qPCR, from a representative group of each of the PD diagnoses (including periodontal health and gingivitis), totaling 34 samples.

Results: Analysis of the samples revealed that *T. denticola* was more prevalent in advanced stages of PD (III and IV) and in cases of gingivitis, indicating its relevance in both initial inflammatory processes and severe stages of the disease. *F. fastidiosum* showed a very significant variation between PD diagnoses, suggesting a strong association with severe stages of the disease. *M. timidum* showed an association with moderate and advanced stages of PD.

Conclusion: The integration of specific molecular biomarkers in the diagnosis, such as *F. fastidiosum* and *T. denticola*, in the treatment of PD can provide a precision approach, improving clinical management and the monitoring of patients' periodontal health status.

Keywords: Periodontal Disease, Dysbiosis, Periodontopathogenic Bacteria, Molecular Biomarkers, Precision Dentistry

Índice Geral

Índice de Figuras	XIV
Índice de Tabelas	XVI
Índice de Abreviaturas	XVII
1. Introdução	1
1.1 A complexidade da periodontite, etiologia e fatores de risco	1
1.2 Principais bactérias periodontopatogénicas associadas ao desenvolvimento e progressão da doença periodontal	3
1.3 Resposta imune na Doença Periodontal	5
1.4 Limitações atuais no diagnóstico da doença periodontal.....	7
1.5 Integração de dados clínicos e moleculares no diagnóstico, prognóstico e monitorização do tratamento da DP	8
2. Objetivos	11
3. Materiais e métodos	13
3.1 Descrição do Estudo	13
3.1.1 Tipo de estudo	13
3.1.2 População do estudo	13
3.2 Considerações de Ética	13
3.3 Recolha de amostras biológicas	14
3.4 Recolha de dados clínicos e sociodemográficos	15
3.5 Quantificação da carga total bacteriana (16S rRNA) e de bactérias periodontopatogénicas por qPCR	17
3.6 Análise estatística	17
3.6.1 Análise das relações biológicas / clínicas	17
4. Resultados	20
4.1 Caracterização da amostra em estudo	20
4.1.1 Género e Idade	20
4.1.2 Nível de Escolaridade	21
4.1.3 Hábitos diários	22
4.1.4 Saúde dos pacientes da amostra (Patologias)	23
4.1.5 História Familiar	24
4.1.6 Prevalência de Estádios/Graus	25
4.1.7 Índices de Sondagem	26
4.2 Resultados da Quantificação por qPCR: Carga Total Bacteriana (16S rRNA) e Bactérias Periodontopatogénicas	28
4.2.1 Relação das bactérias periodontopatogénicas com o Diagnóstico da DP	29
5. Discussão dos Resultados	34
6. Conclusões	45

7. Perspetivas Futuras	46
8. Bibliografia	48
9. Anexos	54
Anexo 1. Parecer favorável sobre o projeto	54
Anexo 2. Consentimento Informado	55
Anexo 3. Questionário de dadores	59
Anexo 4. Protocolo laboratorial para quantificação de DNA por qPCR	77

Índice de Figuras

Figura 1: O Bom e o Mau, na doença periodontal.....	2
Figura 2: Tubo graduado de 50ml	14
Figura 3: Locais aproximados das recolhas de Biofilme	15
Figura 4: Exemplo de um Periograma (Periochart)	16
Figura 5: Sonda utilizada na avaliação clínica das amostras	16
Figura 6: Nível de escolaridade da amostra	21
Figura 7: Contraste nos hábitos diários dos pacientes da amostra	22
Figura 8: Patologias identificadas na amostra.....	23
Figura 9: História Familiar dos pacientes da amostra	24
Figura 10: Quantificação de espécies bacterianas obtidas por qPCR.....	29
Figura 11: Média do número de cópias de DNA de <i>Fretibacterium fastidiosum</i> por reação de qPCR para cada diagnóstico da DP	30
Figura 12: Média do número de cópias de DNA de <i>Mogibacterium timidum</i> por reação de qPCR para cada diagnóstico da DP	31
Figura 13: Média do número de cópias de DNA de <i>Treponema denticola</i> por reação de qPCR para cada diagnóstico da DP	32

Índice de Tabelas

Tabela I: Classificação Periodontal.....	8
Tabela II: Distribuição da idade dos pacientes da amostra	20
Tabela III: Diagnósticos Periodontais da amostra.....	25
Tabela IV: Valores da amostra, registados no Periochart: Bleeding on Probing (BOP), Profundidade Média de Sondagem (PM) e Placa	26
Tabela V: Prevalência dos diferentes diagnósticos periodontais, no grupo representativo de 34 amostras de cada estadio da DP	28

Índice de Abreviaturas

16S rRNA: *16S ribosomal ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico ribossómico 16S)

BOP: *Bleeding on probing* (Percentagem de sangramento à sondagem)

CDU-UCP: Clínica Dentária Universitária da Universidade Católica Portuguesa

CES-UCP: Comissão de Ética da Universidade Católica Portuguesa

CIIS: Centro de Investigação Interdisciplinar em Saúde

CT: Threshold cycle (Ciclo limiar)

DM: Diabetes mellitus

DNA: *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

DP: Doença periodontal

F.fastidiosum: *Fretibacterium fastidiosum*

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

GAgP: Generalized aggressive periodontitis (Periodontite agressiva generalizada)

GChP: Generalized chronic periodontitis (Periodontite crónica generalizada)

IFN- γ : Interferão Gama

IL-1 β : Interleucina-1-beta

IL-6: Interleucina-6

IL-10: Interleucina-10

MMPs: Metaloproteinases da matriz

M.timidum: *Mogibacterium timidum*

MIMD: Mestrado Integrado em Medicina Dentária

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia de polimerase)

P.gingivalis: *Porphyromonas gingivalis*

PM: Profundidade Média de Sondagem

qPCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase quantitativa)

rRNA: Ribosomal ribonucleic acid (Ácido ribonucleico ribossómico)

T.denticola: *Treponema denticola*

T.forsythia: *Tannerella forsythia*

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

UCP: Universidade Católica Portuguesa

1. Introdução

1.1 A complexidade da periodontite, etiologia e fatores de risco

A periodontite, ou doença periodontal (DP), é reconhecida como a principal doença inflamatória crônica em humanos. Esta condição é desencadeada por uma interação multifatorial(1), que tem origem na disbiose do biofilme bacteriano nas gengivas, afetando principalmente os tecidos moles que rodeiam os dentes, os ligamentos periodontais (fibras de colagénio do tecido conjuntivo que fixam os dentes ao osso alveolar) e o osso alveolar. Esta doença tornou-se um desafio significativo para a saúde pública(2), devido ao constante crescimento populacional e aumento da expectativa de vida. A ausência de estratégias eficazes para a preservação da dentição resultou numa maior incidência de doenças periodontais, representando não apenas um problema de saúde oral, mas tendo também impacto negativo na saúde sistémica. A doença periodontal prejudica a qualidade de vida, sendo uma das principais causas de perda dentária em adultos e contribuindo para os custos crescentes com cuidados médicos(2).

Clinicamente, a DP está associada a fatores(3) que levam à redução do nível clínico de inserção: profundidade de sondagem aumentada; aumento do índice de placa; sangramento à sondagem; reabsorção óssea.

Apesar do biofilme bacteriano estar associado ao desenvolvimento da DP e ao processo inflamatório gengival de resposta do hospedeiro, os fatores que causam a disbiose bacteriana e a inflamação periodontal deixaram de estar apenas relacionados com doenças orais, incluindo agora também outros fatores de risco individuais, como a suscetibilidade genética, o 'stress' psicológico, o tabagismo, a diabetes e a dieta, essenciais para a compreensão da etiologia da doença(4–7). A presença de outras doenças inflamatórias crônicas, como a doença inflamatória do intestino, doenças cardiovasculares e distúrbios autoimunes foram também reconhecidos como comorbilidades que podem promover a patogénese da DP(8).

De forma análoga, mas no sentido inverso, a doença periodontal pode também potenciar outras doenças sistêmicas como a doença de Alzheimer(9), a doença inflamatória do intestino e o cancro oral, sublinhando a interação bidirecional entre a saúde oral e a saúde sistêmica(10).

A figura 1 resume os principais fatores de risco associados ao desenvolvimento e progressão da DP em contraste com a saúde periodontal.

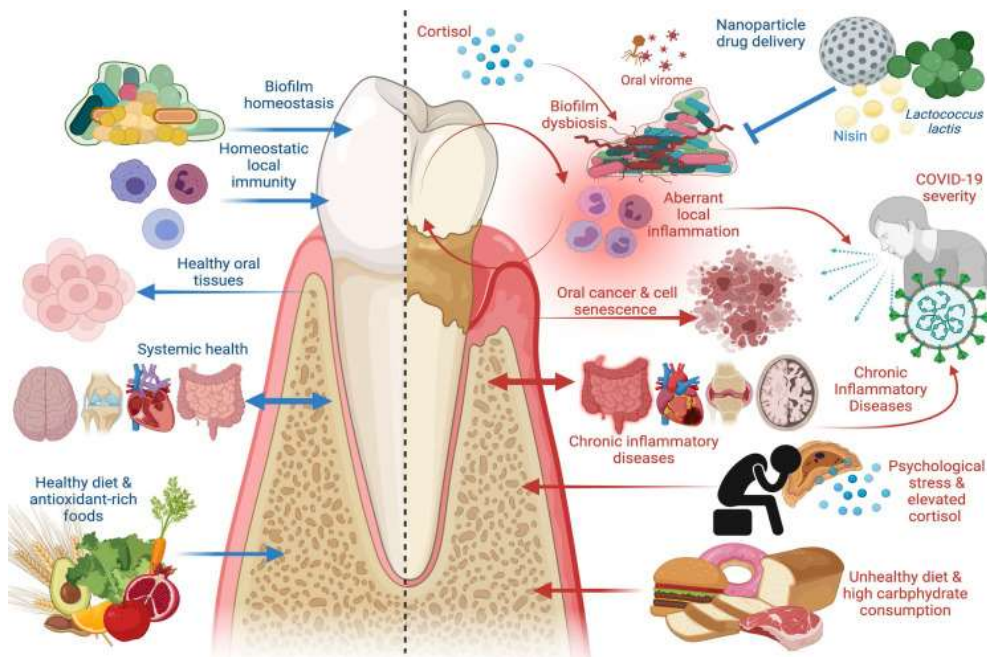


Figura 1: O Bom e o Mau, na doença periodontal. Adaptado de Sedghi et al, 2021(10).

Entre os fatores que promovem a saúde periodontal destacam-se a homeostase no biofilme subgengival e supra-gengival, a imunidade homeostática na gengiva e no periodonto, a presença de constituintes saudáveis na dieta e a ausência de doenças inflamatórias crônicas.

De forma oposta, os fatores que promovem a doença periodontal, incluem a disbiose do biofilme; a resposta inflamatória gengival e periodontal descontrolada; o stress associado à liberação de níveis elevados de cortisol e uma dieta não saudável, rica em hidratos de carbono.

Ou seja, a DP é influenciada pelos fatores de risco anteriormente mencionados e tem impacto negativo na saúde dos tecidos orais, sendo também um fator de risco para outras patologias, como o cancro oral.

Além disso, a DP promove a inflamação sistémica, contribuindo para o risco de desenvolver doenças inflamatórias crónicas, doenças cardiovasculares e a doença de Alzheimer.

1.2 Principais bactérias periodontopatogénicas associadas ao desenvolvimento e progressão da doença periodontal

Há uma certa complexidade na interação entre o microbioma oral, a resposta do hospedeiro e a cavidade oral. Isto deve-se principalmente à variação individual na composição bacteriana subgingival, com diferentes grupos de espécies e às respostas imunes e inflamatórias de cada indivíduo(11). No entanto, a disbiose bacteriana(8), como referido anteriormente, é, atualmente, o principal fator associado ao desenvolvimento da doença periodontal. Desta forma, estratégias para melhorar o diagnóstico precoce, o prognóstico e monitorização do tratamento incluem a caracterização do microbioma oral através da identificação e quantificação de bactérias específicas associadas à DP.

As principais bactérias associadas ao desenvolvimento e progressão desta patologia são a *Poryphomonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*, formando o antigo, mas ainda válido “complexo vermelho”(12,13).

A *Poryphomonas gingivalis* é normalmente considerada a principal bactéria periodontopatogénica, devido à sua capacidade de invadir tecidos periodontais e modular a resposta imunológica do hospedeiro(14). Ao contrário do que se verifica em pacientes com DP, esta espécie bacteriana não se encontra em elevadas quantidades em pacientes saudáveis ou com gengivite, demonstrando assim a sua associação com a doença periodontal(15).

Apesar da *P.gingivalis* estar descrita como uma das principais bactérias periodontopatogénicas associadas à patogénese da DP, neste trabalho foram

quantificadas as seguintes bactérias; *Treponema denticola*, *Mogibacterium timidum*, *Fretibacterium fastidiosum* e *Tannerella forsythia*, as quais fazem parte de um índice de disbiose microbiana subgengival, proposto por Chen e colaboradores em 2022(16).

A *Treponema denticola*(16) é uma bactéria periodontopatogénica, conhecida pela sua associação com a degradação de tecidos periodontais. Está associada a uma maior patogenicidade e severidade, tendo influência direta na inflamação e destruição do periodonto(11). De acordo com a literatura, as espécies de *Treponema* estão associadas a processos inflamatórios e destrutivos, com elevada gravidade e influência na profundidade das bolsas observadas na doença periodontal(13).

A *Mogibacterium timidum*(16,17)é uma bactéria estritamente anaeróbia, gram-positiva e também em forma de bastonete. A sua presença está relacionada com o aumento da severidade dos parâmetros clínicos da gengivite, sugerindo que a mesma aumenta a suscetibilidade dos pacientes em desenvolverem doença periodontal(17). É comum em casos de DP. No entanto, a prevalência da *M.timidum* aumenta significativamente em pacientes com DP que possuem, concomitantemente, duas condições: *diabetes mellitus* (DM) e controlo de glicémia desadequado(17). Estas condições, são consideradas fatores de risco da DP, pois influenciam de forma negativa a microbiota subgengival(18,19).

A *Fretibacterium fastidiosum*(16,20) é uma bactéria anaeróbica, gram-negativa. Isolada a partir da cavidade oral humana, especificamente de bolsas periodontais profundas(20), representa um ramo diferente, formalmente descrito em 2013(21), do filo *Synergistetes*(21).Devido à sua associação com bolsas periodontais profundas, a *F.fastidiosum* poderá ter potencial como biomarcador para auxiliar no diagnóstico e monitorização da DP.

A *Tannerella forsythia*(16) desempenha um papel significativo na patogénese da doença periodontal. É reconhecida pela sua capacidade de adesão e colonização nos tecidos periodontais, fixando-se nas superfícies dentárias e tecidos adjacentes, contribuindo para a formação de biofilmes e desencadeamento da resposta inflamatória local(13).

Desta forma, está frequentemente associada à reabsorção óssea e inflamação. Estudos recentes destacam o seu potencial como marcador no prognóstico da doença periodontal, correlacionando a sua presença e níveis com a gravidade da doença.

Em suma, identificar e compreender o papel das bactérias periodontopatogénicas na DP é crucial como ferramenta de suporte para o diagnóstico, prognóstico e monitorização do tratamento desta doença.

1.3 Resposta imune na Doença Periodontal

Na doença periodontal, o processo de inflamação crónica conduz à destruição dos tecidos de suporte dos dentes. As bactérias periodontopatogénicas desencadeiam uma resposta do sistema imunológico do hospedeiro, levando à libertação de mediadores inflamatórios e citocinas nos tecidos periodontais, contribuindo para a severidade da DP(22). Como tal, é importante caracterizar o perfil inflamatório dos pacientes com DP através da quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias, para que possamos monitorizar a progressão da doença.

As citocinas são definidas como proteínas sinalizadoras que são segregadas pelo sistema imunológico (células inflamatórias), como resposta a lesões e infeções, através do recrutamento de leucócitos(3).

Na literatura, foi demonstrado que uma elevada concentração de citocinas influencia a patogénese da periodontite, levando à destruição de tecidos moles e reabsorção óssea(3). Durante o processo inflamatório da periodontite há um aumento do número de citocinas, incluindo a interleucina-1-beta (IL-1 β), a interleucina-6 (IL-6), a interleucina-10 (IL-10), o interferão-gama (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).

O papel da interleucina-1-beta (IL-1 β) na inflamação periodontal está bem caracterizado, sendo uma citocina pró-inflamatória. É produzida como resposta a estímulos microbianos, por vários tipos de células, tais como macrófagos e células dendríticas.

Resultados obtidos a partir da literatura mostram que um nível aumentado de IL-1 β funciona como um estímulo ativo para que ocorra reabsorção óssea(23).

A interleucina-6 (IL-6) é também uma citocina pró-inflamatória, envolvida na patogênese da periodontite. É segregada por linfócitos T, macrófagos e células endoteliais. Esta desempenha um papel importante na ativação da inflamação e na formação de osteoclastos, estimulando, de igual forma, a reabsorção óssea.

A interleucina-10 (IL-10), é uma citocina anti-inflamatória que “regula” a inflamação periodontal. É também produzida por linfócitos T, bem como por macrófagos, de modo a limitar a resposta inflamatória e evitar danos exacerbados nos tecidos. Esta pode fornecer-nos informações acerca da capacidade do hospedeiro, em regular a resposta inflamatória (24).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória que está associada ao aumento de severidade da DP, produzida principalmente por macrófagos. Este desencadeia o mecanismo de reabsorção óssea e destruição de tecido conjuntivo, permitindo o aumento da síntese e secreção de metaloproteinases da matriz (MMPs)(23).

O Interferão Gama (IFN- γ) é segregado por linfócitos T e células “natural killer” (NK). Embora desempenhe um papel importante na defesa contra infeções, pode também contribuir para a inflamação crónica da periodontite. Este pode modular a atividade de outras citocinas e células inflamatórias, criando uma resposta inflamatória exacerbada e promovendo a destruição dos tecidos(25).

A caracterização do perfil inflamatório de pacientes com DP é importante para avaliar a progressão e severidade da doença, bem como para monitorizar o tratamento nestes pacientes.

1.4 Limitações atuais no diagnóstico da doença periodontal

Apesar dos avanços na prevenção e tratamento, a periodontite continua a ser um desafio, dada a sua elevada prevalência e limitação das abordagens de diagnóstico convencionais. A precisão do diagnóstico e a intervenção precoce são fundamentais para o sucesso do tratamento; evitando procedimentos tardios e menos eficazes.

Alguns métodos de diagnóstico tradicionais, como a radiografia convencional, podem não ser capazes de detetar extensões de destruição óssea, ou a presença de bolsas periodontais profundas, na cavidade oral.

Além disso, diferentes níveis de formação/experiência clínica dos médicos dentistas, podem traduzir-se em diagnósticos discrepantes, conducentes a tratamentos não adequados às necessidades dos pacientes. A título de exemplo, um médico dentista com menos experiência clínica pode estar menos hábil para detetar sintomas iniciais de desenvolvimento da doença periodontal, resultando num diagnóstico tardio e conseqüentemente num tratamento menos eficaz.

Neste contexto, a adoção de medidas padronizadas e objetivas na forma de efetuar o diagnóstico clínico, permite a realização de procedimentos uniformes. Tendo como exemplo, o uso de sondas periodontais de precisão, que impedem diferentes impressões de força na medição de bolsas periodontais, independentemente da técnica do médico dentista, resultando na eliminação de discrepâncias na medição de bolsas periodontais.

Em contrapartida, as ferramentas de diagnóstico que são usadas, na atualidade, podem não transparecer a complexidade da microbiota oral(26) e as respostas imunológicas dos pacientes. Deste modo, a integração de biomarcadores moleculares(1) à avaliação clínica convencional, tem potencial para auxiliar os métodos convencionais de diagnóstico, ao fornecer dados, por exemplo, sobre a disbiose do microbioma oral e a resposta inflamatória em pacientes com periodontite, culminando numa intervenção clínica mais assertiva.

1.5 Integração de dados clínicos e moleculares no diagnóstico, prognóstico e monitorização do tratamento da DP

Tendo em conta a natureza multifatorial da periodontite, a sua associação com doenças sistémicas e as limitações anteriormente mencionadas, torna-se imprescindível a realização de um diagnóstico precoce e preciso. O diagnóstico depende da capacidade dos profissionais de medicina dentária em categorizarem os pacientes nos diversos estadios e graus de severidade da DP, conforme preconizado pelo mais recente esquema de classificação(26,27). Este inclui os estadios I, II, III, IV e graus A, B, C (Tabela I).

Esta nova abordagem de classificação da DP visa não apenas prognósticos precisos, mas também uma gestão e monitorização clínica mais eficazes.

Tabela I: Classificação Periodontal (26)

Estadios baseados na gravidade/complexidade, pela nova Classificação (3,4)
Estadio I: Periodontite inicial
Estadio II: Periodontite moderada
Estadio III: Periodontite avançada, potencial de perda dentária adicional
Estadio IV: Periodontite avançada, potencial para perda da dentição
Graus de Severidade (Risco de Progressão da Doença)
Grau A: Taxa lenta de progressão
Grau B: Taxa moderada de progressão
Grau C: Taxa rápida de progressão

A integração de novos biomarcadores moleculares a este novo esquema de classificação da DP irá proporcionar uma melhor compreensão da patogénese e progressão da doença, bem como o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de monitorização do tratamento(26,27), contribuindo para a medicina dentária de precisão.

Através de testes genéticos e moleculares, é possível determinar a predisposição genética para desenvolver DP e caracterizar o microbioma oral associado à doença. Esta abordagem surge como resposta crucial aos desafios enfrentados no tratamento da DP, impulsionando a investigação, levando a avanços notáveis(26).

Entre muitos caminhos plausíveis, a análise molecular(28) a par de outras abordagens inovadoras, como o uso da inteligência artificial(29), podem apontar-se como exemplos atuais que exploram cada vez mais o uso da tecnologia.

O presente trabalho, através da combinação de análises moleculares com o novo esquema de classificação da DP em estádios e graus, visa delinear um caminho promissor, com intuito de desenvolver uma prática de medicina dentária mais avançada, adaptada à singularidade de cada paciente.

2. Objetivos

Foram definidos os seguintes objetivos para a realização deste trabalho:

Quantificação de bactérias periodontopatogénicas em amostras de saliva e/ou biofilme de pacientes com saúde periodontal, gengivite ou DP. Outro dos objetivos deste trabalho é a integração dos resultados moleculares obtidos com os respetivos dados clínicos de forma a melhorar a estratificação dos pacientes e propor um painel de biomarcadores que auxiliem no diagnóstico precoce, prognóstico e monitorização da doença e/ou tratamento da DP.

3. Materiais e métodos

3.1 Descrição do Estudo

3.1.1 Tipo de estudo

O estudo em questão é descrito como um estudo observacional transversal, incluído num estudo longitudinal. O método utilizado inclui a aplicação de um questionário aos pacientes, a sondagem periodontal, o diagnóstico periodontal e a recolha de amostras de saliva e biofilme.

3.1.2 População do estudo

Este estudo foi conduzido com uma amostra de 82 pacientes que frequentam a CDU-UCP. Foram estabelecidos os seguintes critérios de inclusão/exclusão:

- **Critérios de inclusão:** Pacientes que frequentaram a clínica dentária durante o período de colheita de dados, que aceitaram participar voluntariamente no estudo.
- **Critérios de exclusão:** Pacientes que não preencheram o consentimento informado.

3.2 Considerações de Ética

Foi pedido aos participantes que visitaram a CDU-UCP para tratamento dentário e cumprissem os requisitos para o tratamento, que assinassem um formulário de consentimento livre e informado (Anexo 2) de participação voluntária no estudo, antes da recolha das amostras biológicas.

Os dados recolhidos foram utilizados apenas para esta investigação, tendo sido garantida a confidencialidade dos dados. A confidencialidade dos participantes foi assegurada, pelo que as suas identidades nunca serão divulgadas.

Os participantes foram informados que poderiam abandonar o estudo a qualquer altura.

3.3 Recolha de amostras biológicas

A recolha de amostras biológicas foi efetuada antes da sondagem periodontal ou de qualquer outro procedimento clínico de avaliação de saúde oral, devido ao risco de sangramento e posterior contaminação da amostra a ser recolhida.

A recolha da amostra de saliva foi efetuada através do método de “*drooling*”, onde o paciente acumula saliva na cavidade oral e, de seguida, expele para um tubo apropriado de 50ml até atingir aproximadamente 2ml. Este tubo (Figura 2) foi desinfetado, identificado e transportado em gelo para o laboratório SalivaTec. No laboratório a amostra foi aliqüotada e preservada a -80°C para posterior determinação da sua composição microbiológica.

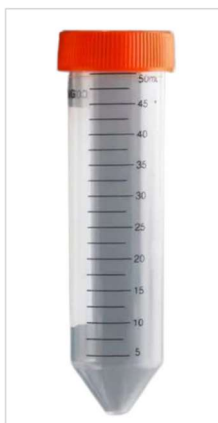


Figura 2: Tubo graduado de 50ml usado para recolha de amostras de saliva não estimulada. Adaptado de: <https://shorturl.at/eot16>

Quanto à colheita de biofilme, esta foi realizada por “raspagem”, com um palito estéril, colocado posteriormente numa solução salina, dentro de um tubo apropriado. A recolha foi efetuada em áreas previamente determinadas (Figura 3), na cavidade oral do paciente, nomeadamente: espaço entre os incisivos superiores e inferiores, por vestibular e lingual, no 2º pré-molar ou 1º molar superior, por vestibular e lingual, e de igual forma para os inferiores. As amostras de biofilme foram transportadas em gelo para o laboratório SalivaTec onde foram aliqüotadas e preservadas a -80°C.

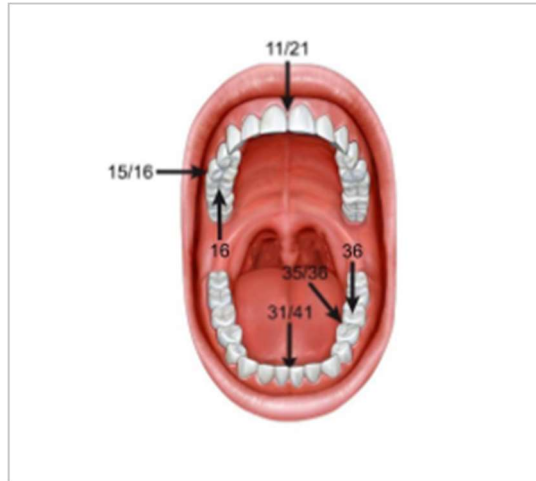


Figura 3: Locais aproximados das recolhas de Biofilme (através de “raspagem”)

3.4 Recolha de dados clínicos e sociodemográficos

O questionário aplicado (Anexo 3) aos pacientes aborda vários parâmetros, nomeadamente, a condição de saúde atual, hábitos de higiene oral, hábitos de nutrição, hábitos diários em geral e é efetuado com o intuito de nos dar informações acerca do comportamento e hábitos dos pacientes, posteriormente registadas na plataforma *Qualtrics* (<https://www.qualtrics.com>).

Para todos os pacientes foram também registados os diversos dados clínicos obtidos através de sondagem, na ferramenta (Figura 4) ***Periodontal Chart*** (<https://www.perio-tools.com>), para avaliação de dados clínicos em seis locais por dente ou implante para toda a dentição.

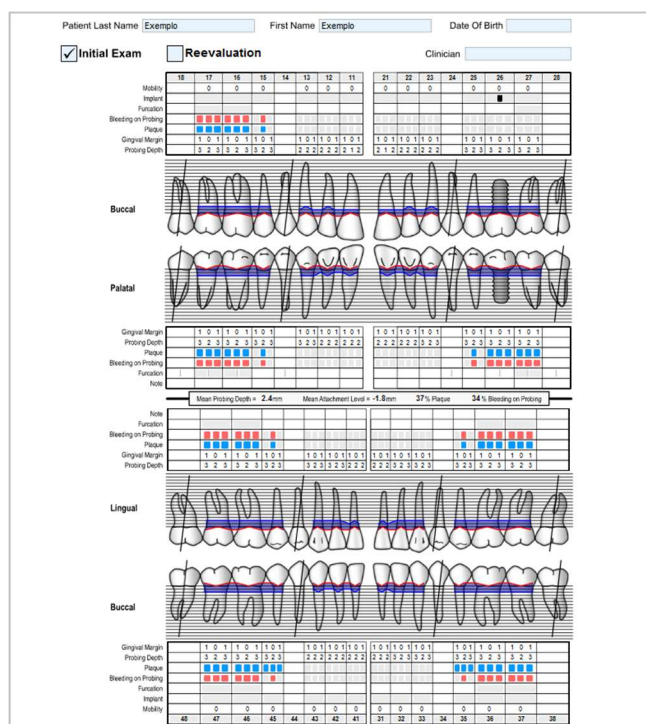


Figura 4: Exemplo de um Periograma (Periochart)

A sondagem foi efetuada através de sondas milimetradas periodontais **“WHO Probe - DB765R PCP 11,5C 165mm, 6 ½”** (Figura 5), particularmente importantes para este tipo de investigação, na medida em que a avaliação clínica poderá ser efetuada por mais do que um investigador (evitando assim a necessidade de calibração dos investigadores e possibilitando a comparação entre diversos estudos).



Figura 5: Sonda utilizada na avaliação clínica das amostras. WHO Probe - DB765R PCP 11,5C 165mm, 6 ½. (n.d.). Adaptado de: <https://austos.com>.

A classificação foi realizada através de estadios e graus de severidade da doença(26,27), com o registo da profundidade de sondagem, placa e sangramento à sondagem, feito através do periograma nos dispositivos da Clínica Dentária Universitária da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade Católica Portuguesa, de forma a efetuar o diagnóstico.

O diagnóstico, juntamente com os dados clínicos e sociodemográficos recolhidos dos pacientes em forma de questionário foram inseridos na plataforma *Qualtrics*.

3.5 Quantificação da carga total bacteriana (16S rRNA) e de bactérias periodontopatogénicas por qPCR

As amostras foram processadas e analisadas pela equipa do laboratório *Salivatec* do *CIIS* (Centro de Investigação Interdisciplinar em Saúde) da Universidade Católica Portuguesa em Viseu. Esta análise envolveu a quantificação da carga total bacteriana (16S) e de espécies periodontopatogénicas (*Fretibacterium fastidiosum*, *Mogibacterium timidum* e *Treponema denticola*) por qPCR nas amostras de saliva de pacientes com saúde periodontal, gengivite e DP (anexo 4). Em relação às amostras de biofilme, estas foram armazenadas a -80°C para futuras análises de determinação da composição microbiológica.

3.6 Análise estatística

A caracterização da amostra em estudo e análise dos resultados de quantificação bacteriana foi realizada com recurso às ferramentas Microsoft Office Excel® e GraphPad Prism (10.2.3).

3.6.1 Análise das relações biológicas / clínicas

Para avaliar se existiam diferenças significativas na quantificação de DNA bacteriano entre os diferentes diagnósticos periodontais, foi formulada a seguinte hipótese nula (H0): **“Não existem diferenças estatisticamente significativas nas quantificações de DNA bacteriano entre os diferentes diagnósticos, para cada uma das bactérias estudadas”**

Para responder a esta hipótese, realizámos as seguintes comparações, de forma a abranger os principais diagnósticos e diferentes estadios da DP:

- Saúde Periodontal vs. Doença Periodontal
- Saúde Periodontal vs. Gengivite
- Saúde Peridontal vs. Estadios III e IV da Doença Periodontal

Ou seja, para cada bactéria estudada, verificámos a exequibilidade da análise anterior. Para este fim, o teste de Mann-Whitney foi escolhido, por ser uma ferramenta não paramétrica, permitindo comparar dois grupos de dados sem assumir uma distribuição normal dos dados. É extremamente útil para analisar dados entre múltiplos diagnósticos periodontais, quando a suposição de normalidade não é válida ou quando analisamos amostras pequenas, como é o caso.

4. Resultados

Grupo de estudo: 82 Pacientes da Clínica Dentária Universitária da FMD-UCP, submetidos a sondagem Periodontal.

Nesta investigação foram analisados os dados recolhidos através das sondagens a 82 pacientes, nas consultas de Periodontologia da Clínica Universitária da FMD-UCP:

4.1 Caracterização da amostra em estudo

4.1.1 Género e Idade

Do total da amostra analisada, constituída por 82 pacientes, 42 (~51%) pertencem ao sexo masculino e 40 (~49%) ao sexo feminino.

Relativamente à distribuição da idade dos pacientes (Tabela II), a amostra foi dividida em 3 faixas etárias. A faixa etária dos 20 aos 40 anos foi a mais representada nestes resultados (~38%).

Tabela II: Distribuição da idade dos pacientes da amostra

		Frequência	Percentagem
Idade	[20 - 40]	31	~ 38%
]40 – 60]	24	~ 30%
]60 – 82]	27	~ 32%
	Total	82	100%

4.1.2 Nível de Escolaridade

Na análise do nível de escolaridade dos 82 pacientes da amostra (Figura 6), observamos uma distribuição variada. Os resultados indicam que:

- **Outro/Nenhum:** 7 pessoas, representando 8,54% da amostra.
- **Básico (Até 9º ano):** 23 pessoas, correspondendo a 28,05%.
- **Médio (Até 12º ano):** 17 pessoas, totalizando 20,73%.
- **Superior:** 35 pessoas, abrangendo a maioria com 42,68%.

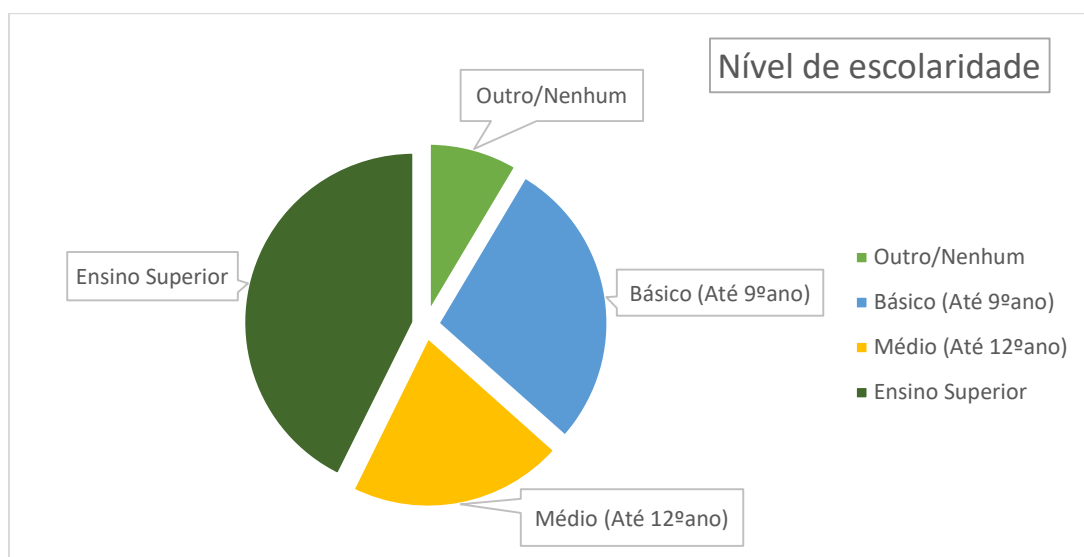


Figura 6: Nível de escolaridade da amostra (n=82)

4.1.3 Hábitos diários

Ao avaliar os hábitos diários dos 82 pacientes, representados na figura 7, destacam-se as seguintes informações:

- **Fumar (Inclui ex-fumadores):** 25 pessoas, representando 30,48% da amostra.
- **Ingerir ou ter ingerido álcool:** 27 pessoas, correspondendo a 32,92%.
- **Escovar \geq 3x/dia:** 26 pacientes, totalizando 31,70%.
- **Passar fio dentário:** 41 pessoas, abrangendo 50%.
- **Utilizar elixir oral:** 24 pessoas, compreendendo 29,26%.

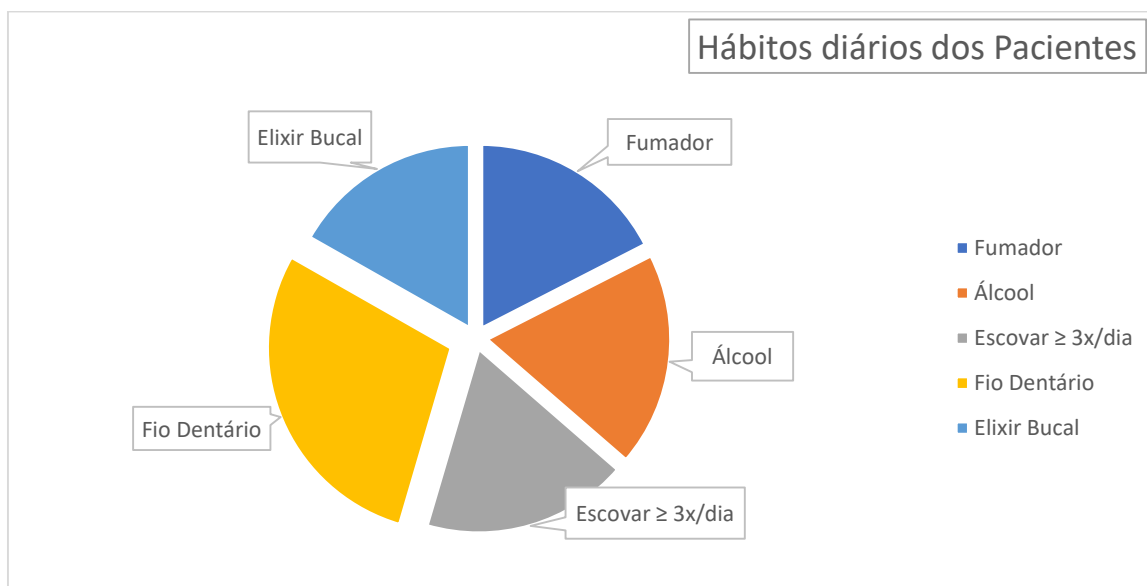


Figura 7: Contraste nos hábitos diários dos pacientes da amostra (n=82): Distribuição real dos hábitos de saúde oral

Verifica-se que cerca de metade dos pacientes utiliza fio dentário, enquanto outros hábitos como consumo de álcool, escovagem dos dentes três vezes ao dia ou mais, tabagismo e uso de elixir oral são comuns, cada um presente em aproximadamente um terço da amostra.

4.1.4 Saúde dos pacientes da amostra (Patologias)

A análise dos indicadores de saúde dos pacientes da amostra, analisada através das patologias (Figura 8) dos 82 pacientes, revela o seguinte:

- **Diabetes:** 6 casos, representando 7,31% da amostra.
- **Hipertensão:** 21 casos, correspondendo a 25,60%.
- **Doenças Cardíacas:** 14 casos, totalizando 17,07%.
- **Doenças Renais:** 2 casos, totalizando 2,43%.
- **Doenças Respiratórias:** 5 casos, totalizando 6,09%.
- **Doenças do Sistema Digestivo:** 12 casos, abrangendo 14,63%.
- **Cancro:** 2 casos, abrangendo 2,43%.
- **Outras:** 7 casos, abrangendo 8,53%.

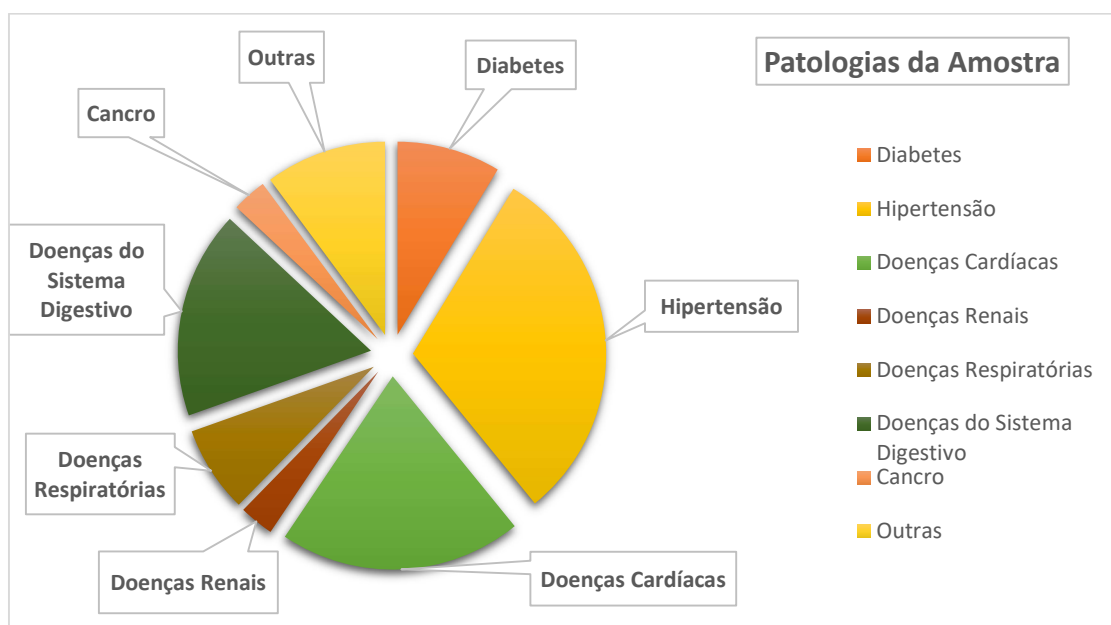


Figura 8: Patologias identificadas na amostra (n=82)

Estas informações fornecem uma perspetiva importante sobre as condições de saúde prevalentes na amostra, auxiliando na identificação de possíveis correlações com a prevalência da Periodontite.

4.1.5 História Familiar

Lembrando que cada paciente pode estar incluído em mais do que uma condição, são apresentadas as patologias presentes na família dos pacientes (Figura 9).

- Mais de metade dos pacientes da amostra, com história familiar de diabetes (n=32, 39,02%)
- 28 pacientes do total da amostra, com história familiar de cancro (34,14%)
- 30 pacientes da amostra, com história familiar de doenças cardíacas (36,58%)
- 29 pacientes da amostra, não tem histórico de doenças familiares (35,36%)
- 5 pacientes da amostra, têm outro tipo de doença não analisada na pesquisa (6,09%)

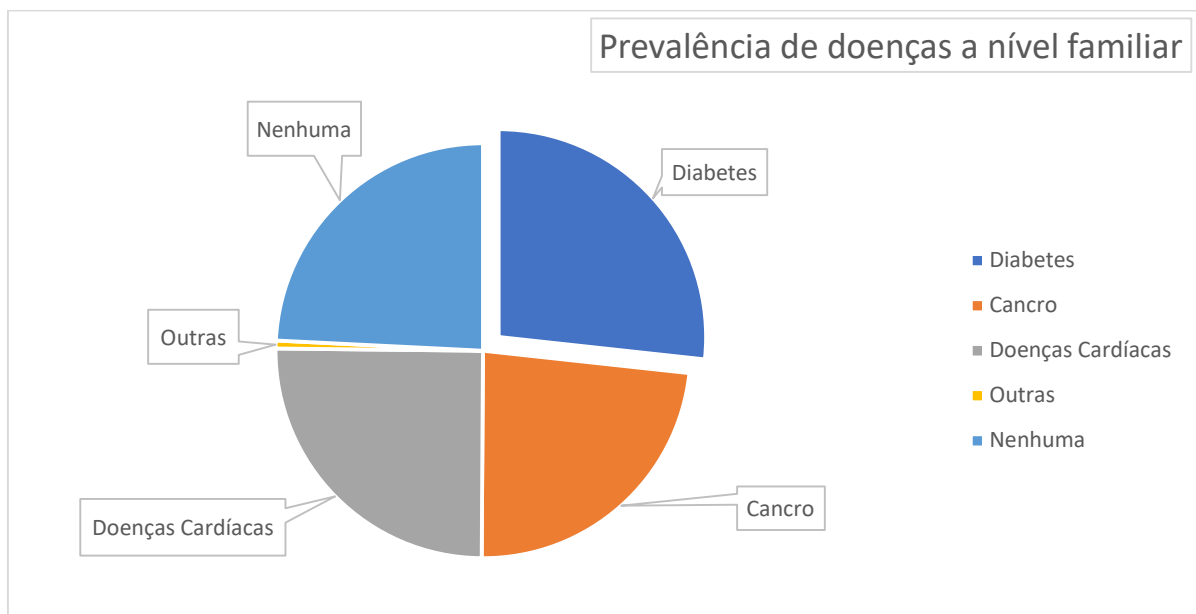


Figura 9: História Familiar dos pacientes da amostra (n=82)

4.1.6 Prevalência de Estádios/Graus

Relativamente à classificação periodontal, recorreu-se a uma tabela que divide a amostra pelos diferentes estádios diagnosticados (Tabela III), não sendo relevantes outras classificações, por não serem obtidas nesta amostra.

A classificação periodontal mais prevalente no mesmo grupo de amostras (n=82), foi a de Saúde Periodontal, com 23 amostras a obter este diagnóstico (~28%). A segunda classificação mais prevalente foi a de estadio III, grau B, com 16 amostras (~20%).

Tabela III: Diagnósticos Periodontais da amostra (n=82)

		Frequência	Percentagem
Diagnósticos Periodontais das amostras	Saúde Periodontal	23	~28%
	Gengivite	14	~17%
	Estadio I Grau A	1	~1%
	Estadio I Grau B	6	~7%
	Estadio II Grau B	13	~16%
	Estadio II Grau C	1	~1%
	Estadio III Grau B	16	~20%
	Estadio IV Grau B	7	~9%
	Estadio IV Grau C	1	~1%
	Total	82	100%

4.1.7 Índices de Sondagem

Ao analisar os índices de sondagem médios (Tabela IV) para a amostra em estudo (82 pacientes), os resultados indicam o seguinte:

Tabela IV: Valores da amostra, registados no Periochart: Bleeding on Probing (BOP), Profundidade Média de Sondagem (PM) e Placa

		MIN	Média	MAX
Sondagem	BOP	0%	25,53%	82%
	P.M.S	1,5 mm	2,44mm	5 mm
	PLACA	6%	37,46%	89%

- **BOP (Bleeding on Probing):** O índice de sangramento à sondagem apresentou os seguintes resultados:
 - **BOP mais alto:** 82% (o valor mais alto registado em toda a amostra, com 82% de sangramento à sondagem de todas as arcadas).
 - **BOP médio:** 25,53% (valor médio de BOP da amostra, calculado a partir dos valores obtidos na sondagem dos 82 pacientes)
 - **BOP mínimo:** 0% (o valor mais baixo registado em toda a amostra, sem sangramento à sondagem registado).

- **Profundidade Média de Sondagem (PM):** Os valores para a profundidade média de sondagem foram os seguintes:
 - **PM mais profundo:** 5mm (valor máximo registado à sondagem na amostra).
 - **PM médio:** 2,44mm (valor médio de PM calculado a partir da sondagem dos 82 pacientes da amostra).
 - **PM menos profunda:** 1,5mm (valor mínimo registado à sondagem na amostra).

- **Placa:** A análise do índice de placa mostra uma variação significativa:
 - **Placa mínima detetada:** 6% (valor mínimo detetado na amostra através de revelador de placa).
 - **Placa média:** 37,46% (média calculada a partir das percentagens das 82 amostras).
 - **Placa máxima detetada:** 89% (valor máximo detetado na amostra através de revelador de placa).

Os índices apresentados na tabela anterior, proporcionam uma visão abrangente da saúde periodontal da amostra, destacando aspetos como sangramento à sondagem, profundidade média de sondagem e a presença de placa bacteriana nos indivíduos da amostra, sendo estes dados importantes para atribuir a respetiva classificação.

4.2 Resultados da Quantificação por qPCR: Carga Total Bacteriana (16S rRNA) e Bactérias Periodontopatogénicas

Dos 82 pacientes da Clínica Dentária Universitária da FMD-UCP, submetidos a sondagem Periodontal, foi selecionado um grupo representativo que abrange todos os estadios da doença periodontal, gengivite e saúde periodontal, representados na tabela V, perfazendo um total de 34 amostras para análise preliminar de composição microbiológica.

Tabela V: Prevalência dos diferentes diagnósticos periodontais, no grupo representativo de 34 amostras de cada estadio da DP

		Frequência	Porcentagem
Diagnóstico Periodontal das amostras	Saúde Periodontal	5	~ 15%
	Gengivite	5	~ 15%
	Estadio I	4	~ 12%
	Estadio II	9	~ 26%
	Estadio III	7	~ 21%
	Estadio IV	4	~ 12%
	Total	34	100%

4.2.1 Relação das bactérias periodontopatogénicas com o Diagnóstico da DP

Para as 34 amostras seleccionadas, foi feita a quantificação da carga total bacteriana 16S e da carga de *Fretibacterium fastidiosum*, *Mogibacterium timidum* e *Treponema denticola*. Na figura 10 são apresentados os resultados das quantificações de DNA bacteriano obtidos por qPCR, agrupados por diagnóstico (saúde periodontal, gengivite, estadios I/II e III/IV). De salientar que, devido à dificuldade em distinguir os estadios I e II bem como os estadios III e IV a nível molecular, estes foram agrupados em estadios I/II e estadios III/IV para análise dos resultados de quantificação de carga bacteriana.

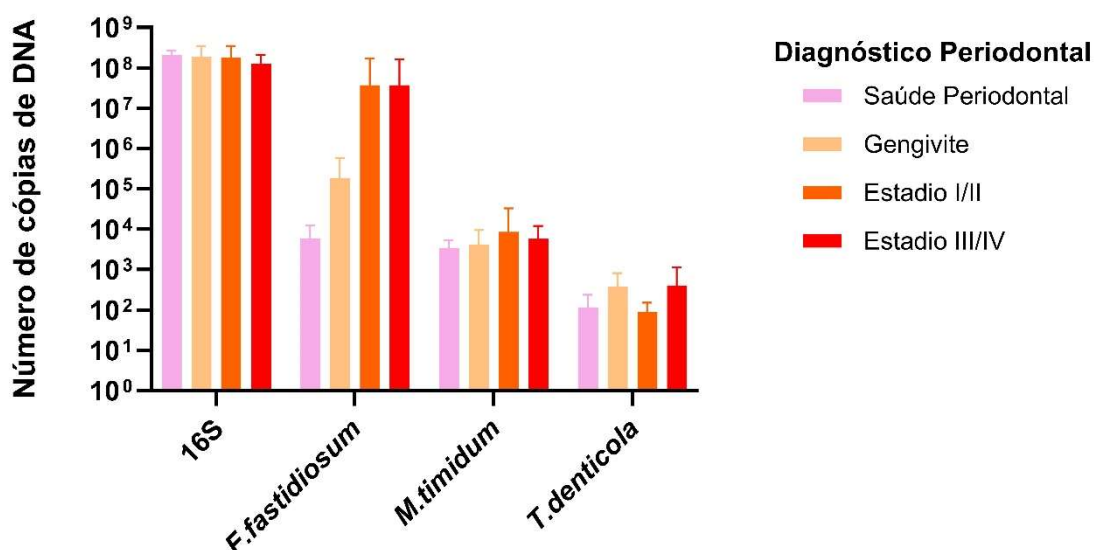


Figura 10: Número de cópias de DNA (média e desvio padrão) de 16S e das espécies *F. fastidiosum*, *M. timidum* e *T. denticola* de acordo com os grupos de diagnóstico: saúde periodontal, gengivite, estadios I/II e III/IV.

Tal como indicado na figura 10, a carga total bacteriana 16S não variou de forma significativa entre os diferentes grupo de diagnóstico.

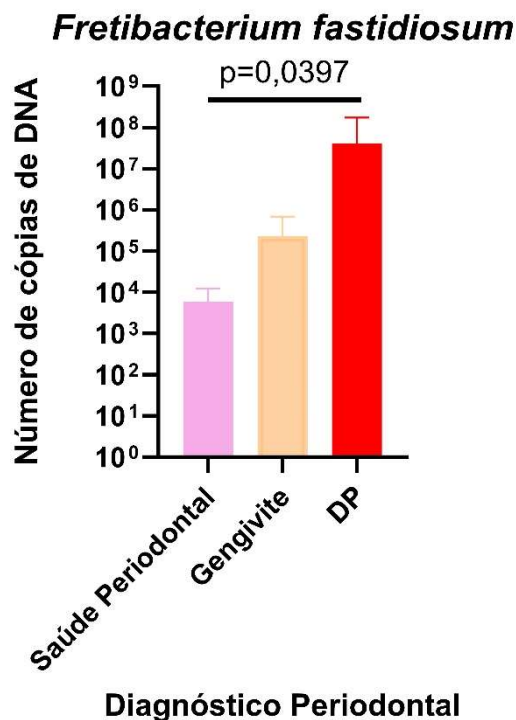


Figura 11: Número de cópias de DNA (média e desvio padrão) referente à espécie *F. fastidiosum*, de acordo com os grupos de diagnóstico: saúde periodontal, gengivite e DP (estádios I, II, III e IV).

Relativamente à quantificação da bactéria *F. fastidiosum* observou-se um aumento significativo na carga desta bactéria (figura 11) nos grupos gengivite e DP comparativamente ao grupo saúde periodontal. De salientar que, este aumento na carga de *F. fastidiosum* foi proporcional ao aumento da severidade da doença o que resultou numa diferença estatisticamente significativa entre os grupos saúde periodontal e DP (inclui estádios I/II/III e IV) ($P=0,0397$). Para os grupos saúde periodontal e estádios III/IV da DP ($P = 0,0897$), assim como saúde periodontal e gengivite ($P > 0,9999$) não se observaram diferenças estatisticamente significativas.

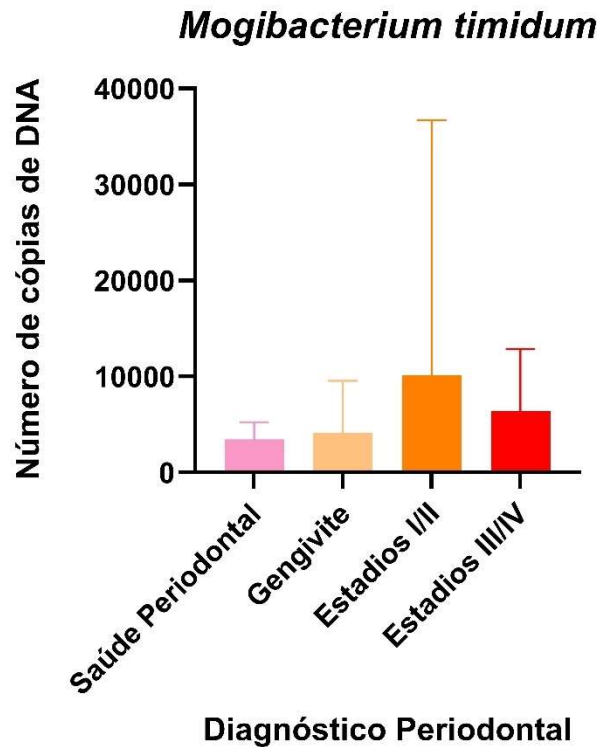


Figura 12: Número de cópias de DNA (média e desvio padrão) referente à espécie *M. timidum*, de acordo com os grupos de diagnóstico: saúde periodontal, gengivite, estádios I/II e III/IV da DP.

Em contraste com as quantificações de *F. fastidiosum* a carga *Mogibacterium timidum* (figura 12) não variou significativamente entre os grupos de gengivite e PD (estádios I/II e III/IV) comparativamente ao grupo de saúde periodontal e desta forma não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos saúde periodontal e DP ($P = 0,5341$), nem entre saúde periodontal e estádios III e IV ($P = 0,5185$).

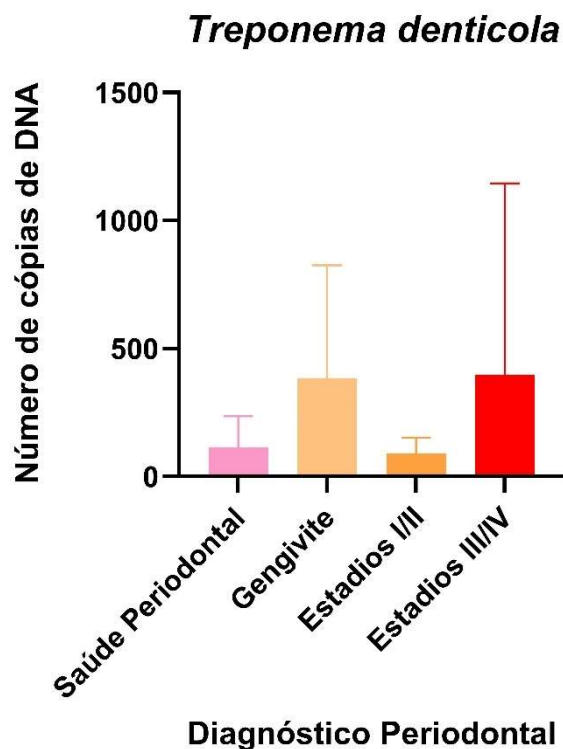


Figura 13: Número de cópias de DNA (média e desvio padrão) referente à espécie *T. denticola*, de acordo com os grupos de diagnóstico: saúde periodontal, gengivite, estádios I/II e III/IV da DP.

Em relação à *Treponema denticola* (figura 13) esta apresentou em média uma carga bacteriana mais baixa em todos os grupos de diagnóstico comparativamente às outras espécies quantificadas. No entanto, observa-se uma tendência para uma carga mais elevada de *T.denticola* no grupo gengivite e nos estádios III/IV comparativamente aos grupos de diagnóstico periodontal e estádios I/II, que se traduz em diferenças estatisticamente não significativas entre saúde periodontal e DP ($P = 0,9075$), entre saúde periodontal e gengivite ($P = 0,2222$), ou entre estádios I/II e estádios III e IV ($P = 0,6490$).

5. Discussão dos Resultados

Sendo a doença periodontal uma das principais doenças inflamatórias crônicas e prevalentes na cavidade oral, torna-se essencial o desenvolvimento de estratégias que permitam um diagnóstico precoce, bem como uma monitorização da doença e/ou tratamento eficazes. Desta forma, a identificação de biomarcadores moleculares na área da DP torna-se fundamental como ferramenta de suporte ao diagnóstico, prognóstico e monitorização do tratamento permitindo decisões clínicas mais precisas e eficazes.

O presente trabalho teve como principal finalidade contribuir para a identificação e quantificação, embora preliminar, de potenciais biomarcadores associados ao desenvolvimento e progressão da DP que associados aos dados clínicos poderão auxiliar e melhorar a estratificação dos pacientes com esta doença. A primeira etapa deste trabalho, envolveu a recolha de amostras biológicas (saliva não estimulada e biofilme) e respetivos dados clínicos e sociodemográficos. Numa primeira fase serão discutidos os resultados obtidos no âmbito da caracterização do grupo de amostras constituído por 82 indivíduos e numa segunda fase serão discutidos os resultados da quantificação de carga bacteriana e a sua integração com os dados clínicos.

Em relação à caracterização da amostra em estudo, composta por 82 pacientes, verifica-se que estes encontram-se divididos quase equitativamente entre os géneros masculino e feminino, sendo a faixa etária dos 20 aos 40 anos a mais representada (~38%). O nível de escolaridade variou, sendo que a maioria dos participantes possuía ensino superior (42,68%). Populações com maior nível de escolaridade ou estatuto socioeconómico superior apresentam geralmente maior cuidado com a saúde oral. Estudos como o de Julkunen e colaboradores em 2020(30), indicam que estes indivíduos refletem um maior conhecimento acerca da prevenção e cuidados necessários para ter saúde oral e, consecutivamente, saúde periodontal. É importante considerar estas variáveis ao interpretar os dados clínicos da amostra, pois a alta escolaridade pode estar associada a uma menor prevalência e severidade de doenças periodontais.

Este elevado nível de literacia pode estar associado a hábitos de higiene oral mais positivos entre os pacientes. Na amostra em estudo, 31,70% dos pacientes escovavam os dentes três ou mais vezes ao dia. A escovagem diária é essencial, benéfica e considerada como um hábito de higiene crítico na prevenção do aparecimento e progressão da DP. A literatura destaca que a escovagem frequente, combinada com o uso de pasta dentífrica fluoretada, é eficaz na remoção de placa bacteriana e na prevenção de doenças periodontais(31). Além disso, 50% dos pacientes utilizavam fio dentário. Esta alta taxa de utilização de fio dentário pode estar relacionada com o elevado nível de literacia da amostra, visto que, como referido anteriormente, indivíduos com maior nível de escolaridade tendem a adotar melhores práticas de higiene oral. No entanto, o uso regular de fio dentário, embora recomendado para remover a placa bacteriana interproximal em pacientes saudáveis, sendo essencial não só para prevenir o aparecimento da doença periodontal, mas também para a prevenção de outras patologias orais, como cáries e gengivite(32), é discutível em pacientes com DP. Dispositivos de higiene interdentária, como escovas interdentárias, são mais eficazes na remoção de placa bacteriana em pacientes com DP, devido à sua capacidade superior de limpeza nas áreas interproximais e maior facilidade de uso em casos de perda óssea e bolsas periodontais como descrito na literatura(33). Portanto, num estudo futuro, seria interessante investigar a eficácia do uso de dispositivos interdentários em comparação com o fio dentário em pacientes com DP.

Em relação aos hábitos diários menos positivos, 30,48% dos pacientes eram fumadores. O tabagismo é um conhecido fator de risco para doenças periodontais, pois afeta negativamente a resposta imunológica e favorece a colonização de agentes patogénicos periodontais(34). Estudos mostram que fumar é um dos fatores de risco mais bem estabelecido na DP, porque afeta a composição bacteriana e, conseqüentemente, a resposta do hospedeiro aos agentes microbianos nos tecidos periodontais podendo levar à destruição dos tecidos periodontais saudáveis circundantes(35).

Como já referido anteriormente, existe uma associação entre a DP e doenças sistêmicas. Na amostra em estudo, observou-se que uma parte significativa dos pacientes apresentava condições como hipertensão (25,60%), doenças cardíacas (17,07%) e doenças do sistema digestivo (14,63%). Aproximadamente 7,31% dos pacientes eram diabéticos, o que é particularmente relevante dado que a diabetes é amplamente reconhecida como um fator de risco importante para a DP, devido à sua capacidade de exacerbar a resposta inflamatória e diminuir a capacidade de cicatrização(36). A literatura reforça esta correlação com estudos que demonstram que a prevalência da DP é significativamente maior em indivíduos com diabetes, o que pode ser atribuído à resposta inflamatória exacerbada e à menor capacidade de cicatrização encontrada nesses pacientes(37). Além disso, indivíduos com outras patologias como hipertensão também apresentam maior prevalência de DP, possivelmente devido a fatores como inflamação crônica e alterações na microcirculação periodontal(38).

A presença de DP, por sua vez, pode induzir inflamação sistêmica significativa, elevando os níveis de biomarcadores inflamatórios. Níveis elevados destes biomarcadores são conhecidos por contribuir para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como ataques cardíacos e acidentes vasculares cerebrais (AVC). Portanto, pacientes que tenham outra condição clínica associada à DP, como doenças cardíacas, poderão apresentar um risco aumentado de eventos cardiovasculares adversos(39).

Relativamente ao diagnóstico periodontal dos 82 pacientes em estudo, 28% dos pacientes possuíam saúde periodontal e uma idade inferior a 30 anos, enquanto 20% dos pacientes que estavam no estadio III, grau B tinham uma idade superior a 60 anos e possuíam pelo menos uma patologia concomitante com a DP. Apesar de não haver literatura que o corrobore, estas observações podem sugerir que, a prevalência de doenças periodontais pode aumentar com a idade, devido ao efeito cumulativo de anos de práticas inadequadas de higiene oral e à presença de comorbidades.

Além disso, pacientes com mais idade podem não ter tido acesso à mesma consciencialização acerca de práticas de higiene oral adequadas, contribuindo para um maior risco de DP, em linha com o que foi referido anteriormente acerca da influência da literacia nos resultados da amostra. Ebersole e colaboradores em 2016(40), discutiram o facto de a exposição prolongada a fatores de risco contribuir para o aumento da prevalência da DP, mas nunca foi efetuada uma relação direta entre o nível de literacia e a exposição aos fatores de risco, sendo interessante explorar essa relação em futuros estudos. Assim, podemos sugerir que a prevalência da doença pode estar associada ao acúmulo prolongado de fatores de risco e maus hábitos de higiene oral ao longo do tempo e não apenas ao envelhecimento.

No diagnóstico da DP são usados parâmetros clínico como o índice de sangramento à sondagem (BOP) e a profundidade média de sondagem (PM), que variaram significativamente na amostra em estudo. Os valores mínimos de BOP quase nulos contrastam com os valores máximos de BOP atingindo 82% e a PM a atingir 5mm em estadios severos da DP. Estes índices são indicadores importantes da saúde periodontal, que refletem aspetos como a presença de inflamação gengival e a perda de suporte periodontal, ao longo dos diferentes tipos de diagnósticos da DP(41). De acordo com a literatura, índices elevados de BOP e PM estão fortemente associados com a progressão da DP e a presença de inflamação crónica(42). Esta inflamação crónica, pode agravar as condições sistémicas existentes como doenças cardiovasculares e diabetes, dando origem a um ciclo contínuo de deterioração da saúde sistémica e periodontal. (43)Para além dos índices clínicos anteriormente referidos, a quantificação de bactérias periodontopatogénicas surge como uma ferramenta adicional para avaliar a severidade e a progressão da DP bem como para monitorizar o tratamento.

Como tal, a quantificação de bactérias periodontopatogénicas como potenciais biomarcadores da DP é justificada pela literatura científica, que demonstra a associação destas bactérias com a patogénese da doença periodontal(44).

Desta forma, dos 82 pacientes, foi selecionado um grupo representativo de 34 amostras, para a realização das quantificações de DNA bacteriano para as bactérias *Fretibacterium fastidiosum*, *Mogibacterium timidum* e *Treponema denticola* e para o gene 16S rRNA. A escolha destas bactérias para quantificação de carga bacteriana foi feita com base no índice de disbiose subgengival da DP proposto por Chen e colaboradores em 2022(16).

A *F. fastidiosum* mostrou um aumento significativo e gradual na carga bacteriana nos grupos com diagnóstico de gengivite e DP (Figura 11), em comparação com aqueles com diagnóstico de saúde periodontal, existindo diferenças estatisticamente significativas ($P=0,0397$) entre os grupos saúde periodontal e PD. Estes resultados sugerem uma possível associação entre a presença desta bactéria e a progressão e severidade da doença bem como o seu potencial na monitorização do tratamento da DP. Contudo, é relevante destacar que os resultados deste estudo não validam esta aplicação na monitorização do tratamento, uma vez que não foram realizadas medições antes e depois do tratamento. Estudos futuros são necessários para investigar as mudanças na carga bacteriana após intervenções terapêuticas. No entanto, estas observações podem ser consistentes com estudos anteriores que destacam certas bactérias como indicadores potenciais de progressão e monitorização de doenças periodontais. Por exemplo, um estudo publicado por Chen e colaboradores em 2018(45), abordou a dinâmica da microbiota oral antes e depois de terapia periodontal não cirúrgica, e concluiu que a terapia periodontal pode alterar a composição da microbiota, favorecendo espécies associadas à saúde periodontal e reduzindo aquelas associadas a condições patológicas.

Em relação à *Mogibacterium timidum*, estudos anteriores *detetaram* a presença desta bactéria em depósitos de placa subgengival, avaliação essa que recorreu, tal como o presente trabalho, a quantificação por qPCR, mas em biofilme subgengival(46). Estes resultados sugerem que a *M. timidum* pode representar um possível biomarcador em determinados estadios da DP (17). No presente trabalho, embora se observe uma tendência para um aumento na carga desta bactéria em DP comparativamente a saúde periodontal ou gengivite, as diferenças entre os diferentes grupos de diagnóstico não foram estatisticamente

significativas. Estes resultados poderão indicar que esta bactéria não representa um biomarcador ideal quer para deteção precoce da doença quer como ferramenta de monitorização da doença e/ou tratamento. De qualquer forma, estes resultados devem ser cuidadosamente interpretados pois os desvios padrão, sobretudo para o grupo estadios I/II, são elevados o que se deve provavelmente ao reduzido número de pacientes incluídos em cada um dos diferentes grupos de diagnóstico. Além disso, devemos considerar a *M. timidum* como um possível constituinte fundamental de um complexo amplo de microorganismos que influenciam a saúde periodontal. De facto, a *M. timidum* já foi descrita na literatura como um agente patogénico oral que pode estar presente em associação com outros microorganismos patogénicos, mas que por si só não diferencia claramente as diferenças entre diagnósticos saudáveis ou patológicos(46). Desta forma, em futuros trabalhos poderão ser realizados estudos adicionais para explorar a interação entre esta bactéria e outros fatores patogénicos e entre as diferentes condições do hospedeiro na DP.

Em relação à *Treponema denticola*, os resultados destacaram a prevalência desta bactéria em pacientes com gengivite e em estadios avançados da DP (estadio III e estadio IV), sugerindo uma possível associação da mesma com processos inflamatórios iniciais e diagnósticos de DP avançados, respetivamente (41). O aumento da carga bacteriana da *T. denticola* em pacientes com gengivite poderá ser explicado pela alteração do ambiente subgengival durante a inflamação, que pode proporcionar condições mais favoráveis para o crescimento dessa bactéria, como por exemplo, a hipótese de ocorrer menor oxidação e maior disponibilidade de nutrientes. Isto porque, como verificado por Cai et al., as condições inflamatórias criadas pela gengivite favorecem o crescimento de bactérias anaeróbias, incluindo a *T. denticola*.

Nos estadios III e IV da DP, a maior carga bacteriana da *T. denticola* pode, possivelmente, ser explicada pelo possível agravamento do estado inflamatório e destruição tecidual. Como foi observado por Tan e colaboradores em 2014 (48), a presença contínua de inflamação e a progressão da DP, cria um ecossistema favorável para o crescimento da *T. denticola*.

No entanto, como referido anteriormente na quantificação da *M.timidum*, os resultados devem ser cuidadosamente interpretados pois os desvios padrão, sobretudo para os grupos gengivite e estadios III/IV, são elevados. Assim, em futuros estudos deve-se aumentar o número de amostras a analisar em cada um dos grupos de diagnóstico para tentar reduzir esses desvios e investigar se a *T. denticola* poderá vir a ser um biomarcador de progressão da doença(10).

A associação entre o índice de placa e a quantificação da carga bacteriana pode fornecer “insights” valiosos sobre a saúde periodontal e a progressão da doença, embora as quantificações tenham sido realizadas em saliva e não em biofilme. Na análise dos índices de sondagem médios para os 82 pacientes da amostra, observou-se uma variação significativa no índice de placa, com valores mínimos de 6%, uma média de 37,46% e máximos de 89%. A análise dos dados demonstrou que há uma possível correlação positiva entre o índice de placa e a quantificação de *F. fastidiosum* e *T. denticola*, indicando que um aumento no índice de placa pode corresponder a um aumento na carga dessas bactérias periodontopatogénicas. No entanto, a correlação com as quantificações de 16S rRNA e *M. timidum* não foi tão clara, sugerindo que outros fatores a serem descobertos podem influenciar essas quantificações. A análise sugere que a presença de placa bacteriana, como indicado pelos índices de placa, poderá estar correlacionada com uma maior carga de bactérias periodontopatogénicas na saliva, especialmente em casos de gengivite e DP.

Estudos como o de Socransky e colaboradores em 1998(12) e Haffajee e colaboradores em 2006(49), corroboram esta informação, ao mostrar que altos índices de placa estão ligados ao aumento da prevalência de bactérias periodontogénicas e, conseqüentemente, à severidade da doença. Esta análise é particularmente relevante, pois permite correlacionar parâmetros clínicos, como o índice de placa, com a quantificação de espécies bacterianas específicas, ajudando assim a aprofundar a compreensão acerca da composição bacteriana em condições periodontais.

Embora as quantificações tenham sido realizadas em saliva, os resultados apontam para a importância da placa bacteriana como um reservatório de agentes patogénicos periodontais que contribuem para a progressão da DP.

Os resultados preliminares indicam que a quantificação de biomarcadores moleculares na saliva pode fornecer informações valiosas sobre a saúde periodontal dos pacientes. Apesar da escolha das bactérias para quantificação de carga bacteriana ter sido baseada no índice de disbiose subgengival, as quantificações foram realizadas em saliva em vez de biofilme subgengival.

A utilização de saliva para a quantificação de bactérias periodontopatogênicas apresenta várias vantagens. Primeiramente, a saliva é um método não invasivo de recolha, que não causa desconforto ao paciente, corroborado na literatura por Wu e colaboradores em 2018(50), que utilizaram a técnica de qPCR para estudar perfis de carga bacteriana na saliva, validando a sua eficácia e aplicabilidade. Além disso, Hyvärinen e colaboradores em 2009(51), relataram que as amostras de saliva podem ser recolhidas sem a presença de um médico dentista, permitindo que, se necessário, o próprio paciente possa realizar a recolha em qualquer lugar, facilitando assim a monitorização o contínua da condição periodontal e em caso de necessidade, uma intervenção clínica precoce e precisa por parte do dentista.

Vários estudos validaram a utilidade clínica das bactérias específicas do biofilme subgengival presentes na microbiota salivar para a deteção da DP e demonstraram uma forte correlação entre os perfis microbianos de amostras de placa subgengival e saliva, destacando a relevância do uso de saliva na monitorização da saúde periodontal. Num estudo publicado por Belstrøm e colaboradores em 2017(52), foi demonstrado que a proporção de bactérias subgengivais na microbiota salivar aumenta com a progressão da periodontite, refletindo a eficácia da quantificação bacteriana na saliva como ferramenta de monitorização da DP.

Embora, a quantificação na saliva de certas espécies bacterianas possa ser representativa da comunidade bacteriana presente no biofilme subgengival, a recolha de biofilme subgengival representa o sítio mais próximo onde a doença está ativa e onde a maior parte das bactérias periodontopatogênicas, que são anaeróbias, se encontram(53). O biofilme pode também facilitar a sobrevivência de microrganismos patogênicos, contribuindo para a inflamação periodontal.

Além disso, estudos como o de Wang e colaboradores em 2024(54), concluíram que a presença de biofilme dentário e a sua correlação com a DP estão bem estabelecidas e conforme discutido em estudos recentes por Dubey e colaboradores em 2019(55), a recolha de biofilme subgengival pode fornecer dados precisos sobre a presença de bactérias periodontopatogénicas e a sua relação com a severidade da DP, ajudando a correlacionar a carga bacteriana com a severidade da doença periodontal e possibilitando intervenções mais eficazes.

Portanto, em futuros estudos torna-se essencial fazer um estudo comparativo entre quantificação de bactérias periodontopatogénicas em amostras de saliva e de biofilme subgengival do mesmo paciente.

Para além da quantificação de carga bacteriana, a quantificação de moléculas inflamatórias é útil na compreensão da resposta imunológica do organismo à presença de agentes patogénicos periodontais. A quantificação dessas moléculas pode fornecer detalhes importantes sobre a severidade e progressão da inflamação periodontal. Embora a quantificação das moléculas inflamatórias não tenha sido possível realizar neste estudo, as amostras recolhidas serão utilizadas em futuras análises, permitindo a identificação de potenciais biomarcadores de inflamação para deteção precoce, prognóstico e monitorização do tratamento da DP. Por exemplo, um estudo recente de Chelărescu e colaboradores em 2021(56), mostrou que a quantificação de citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α no fluido gengival crevicular pode fornecer informações valiosas sobre o estado inflamatório dos pacientes com DP. Este estudo comparou os níveis dessas citocinas em pacientes com DP e pacientes saudáveis, e conseguiu demonstrar que os níveis de IL-1 β e IL-6 eram significativamente mais elevados em pacientes com DP, sugerindo que essas moléculas podem servir como indicadores da severidade da doença.

Resumidamente, em futuros trabalhos, deve ser incluído um maior número de amostras em cada um dos grupos de diagnóstico (saúde periodontal, gengivite, estadios I/II/III e IV da DP), bem como a recolha de biofilme subgengival para comparação da carga bacteriana das espécies periodontopatogénicas entre saliva e biofilme subgengival.

A integração futura de dados moleculares com dados clínicos irá melhorar tanto a estratificação dos pacientes em diferentes estádios e graus da DP como a eficácia na monitorização do tratamento, contribuindo para o desenvolvimento de uma medicina dentária de precisão

6. Conclusões

A doença periodontal é uma condição inflamatória crónica que afeta significativamente a saúde oral e sistémica dos pacientes. Este estudo teve como objetivo principal a identificação e quantificação preliminar de potenciais biomarcadores associados ao desenvolvimento e progressão da DP.

Recorrendo à técnica de quantificação por qPCR, foram identificadas e quantificadas bactérias periodontopatogénicas específicas, como a *Treponema denticola*, a *Mogibacterium timidum* e a *Fretibacterium fastidiosum*. Os resultados mostraram diferenças significativas na presença destas bactérias entre os diferentes diagnósticos periodontais, permitindo avaliar o seu potencial como biomarcadores para a doença periodontal. *F. fastidiosum* foi identificada como um possível biomarcador para estadios avançados da DP, enquanto a *T. Denticola* demonstrou a sua relevância tanto em gengivite, como em estadios avançados da DP.

As 34 amostras de saliva submetidas a quantificação de DNA por qPCR foram eficazmente diagnosticadas, permitindo observar uma correlação positiva entre o índice de placa e a carga bacteriana de *F. fastidiosum* e *T. denticola*, reforçando a relevância destes biomarcadores na monitorização da DP.

A recolha de amostras de saliva demonstrou ser um possível método não invasivo viável para a quantificação de biomarcadores, apresentando-se como uma alternativa à recolha em biofilme subgengival, permitindo a monitorização contínua e intervenções precoces nos pacientes.

7. Perspetivas Futuras

Sendo este um estudo preliminar, ainda não foi possível propor um painel de biomarcadores. Uma perspetiva futura deste trabalho será aumentar o número de amostras de pacientes, de forma que consigamos a inclusão de um maior número de biomarcadores moleculares (bacterianos e inflamatórios). Com a obtenção de mais dados moleculares, será possível aprimorar a integração dos mesmos com informações clínicas, permitindo uma estratificação mais eficaz dos pacientes com DP.

Para isso, poderão ser utilizadas técnicas avançadas de análise, como a inteligência artificial, que possui uma elevada capacidade de processamento de diversos tipos de dados. Tal poderá facilitar o processo de integração de novos biomarcadores e abrir portas para a realização de estudos longitudinais que validem a eficácia desses biomarcadores na prática clínica.

Futuros estudos deverão focar-se na quantificação de bactérias periodontopatogénicas e moléculas inflamatórias antes e após diferentes intervenções terapêuticas, de forma a demonstrar a eficácia destes potenciais biomarcadores na monitorização do tratamento da DP.

8. Bibliografia

1. Gomes PRC, da Rocha MDR, de Lira JASP, Coelho FA da R, Alves EHP, Nascimento HMS, et al. Salivary biomarkers present in patients with periodontitis without clinical distinction: findings from a meta-analysis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2023;28(5).
2. Rakic M, Pejcic N, Perunovic N, Vojvodic D. A roadmap towards precision periodontics. *Medicina (Kaunas)*. 2021;57.
3. Ramadan DE, Hariyani N, Indrawati R, Ridwan RD, Diyatri I. Cytokines and Chemokines in Periodontitis. *Eur J Dent*. 2020;14.
4. Rai B, Kaur J, Anand SC, Jacobs R. Salivary Stress Markers, Stress, and Periodontitis: A Pilot Study. *J Periodontol*. 2011;82(2).
5. Duran-Pinedo AE, Solbiati J, Frias-Lopez J. The effect of the stress hormone cortisol on the metatranscriptome of the oral microbiome. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2018;4(1).
6. Woelber JP, Gärtner M, Breuninger L, Anderson A, König D, Hellwig E, et al. The influence of an anti-inflammatory diet on gingivitis. A randomized controlled trial. *J Clin Periodontol*. 2019;46(4).
7. Aral CA, Ölçer SN, Aral K, Kapila Y. Oxidative stress, neutrophil elastase and IGFBP7 levels in patients with oropharyngeal cancer and chronic periodontitis. *Oral Dis*. 2020;26(7).
8. Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: The polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol*. 2012;27(6).
9. Pisani F, Pisani V, Arcangeli F, Harding A, Singhrao SK. The Mechanistic Pathways of Periodontal Pathogens Entering the Brain: The Potential Role of *Treponema denticola* in Tracing Alzheimer's Disease Pathology. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19.
10. Sedghi LM, Bacino M, Kapila YL. Periodontal Disease: The Good, The Bad, and The Unknown. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11.
11. Curtis MA, Diaz PI, Van Dyke TE. The role of the microbiota in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2020;83.
12. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25(2).

13. Holt SC, Ebersole JL. Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: The “red complex”, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000*. 2005;38.
14. Hajishengallis G. The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. *Mol Oral Microbiol*. 2014;29(6).
15. Park OJ, Yi H, Jeon JH, Kang SS, Koo KT, Kum KY, et al. Pyrosequencing analysis of subgingival microbiota in distinct periodontal conditions. *J Dent Res*. 2015;94(7).
16. Chen T, Marsh PD, Al-Hebshi NN. SMDI: An Index for Measuring Subgingival Microbial Dysbiosis. *J Dent Res*. 2022;101(3).
17. Casarin RCV, Saito D, Santos VR, Pimentel SP, Duarte PM, Casati MZ, et al. Detection of Mogibacterium timidum in subgingival biofilm of aggressive and nondiabetic and diabetic chronic periodontitis patients. *Braz J Microbiol*. 2012;43(3).
18. Casarin RCV, Barbagallo A, Meulman T, Santos VR, Sallum EA, Nociti FH, et al. Subgingival biodiversity in subjects with uncontrolled type-2 diabetes and chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2013;48(1).
19. Makiura N, Ojima M, Kou Y, Furuta N, Okahashi N, Shizukuishi S, et al. Relationship of Porphyromonas gingivalis with glycemic level in patients with type 2 diabetes following periodontal treatment. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23(4).
20. Vartoukian SR, Downes J, Palmer RM, Wade WG. Fretibacterium fastidiosum gen. nov., sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013;63(Pt 2).
21. McCracken BA, Nathalia Garcia M. Phylum Synergistetes in the oral cavity: A possible contributor to periodontal disease. *Anaerobe*. 2021;68.
22. Kumaresan D, Balasundaram A, Naik VK, Appukuttan DP. Gingival crevicular fluid periostin levels in chronic periodontitis patients following nonsurgical periodontal treatment with low-level laser therapy. *Eur J Dent*. 2016;10(4).
23. Graves DT, Li J, Cochran DL. Inflammation and Uncoupling as Mechanisms of Periodontal Bone Loss. *J Dent Res*. 2011;90(2).
24. Pan W, Wang Q, Chen Q. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *Int J Oral Sci*. 2019;11.

25. Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13.
26. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol.* 2018;89.
27. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol.* 2018;45.
28. Kikuchi T, Hayashi JI, Mitani A. Next-Generation Examination, Diagnosis, and Personalized Medicine in Periodontal Disease. *J Pers Med.* 2022;12.
29. Vijayalakshmi R, Mahendra J, NalinaKumari CB, Ravi N, Ramani S. Artificial intelligence in periodontics - An overview. *IP Int J Periodontol Implantol.* 2023;8(2).
30. Julkunen-livari A, Heikkinen AM, Räisänen IT, Ruokonen H, Meurman JH, Toppila-Salmi S, et al. Tobacco products, periodontal health and education level: Cohort study from Sweden. *Dent J (Basel).* 2020;8(3).
31. Van Der Weijden F, Slot DE. Oral hygiene in the prevention of periodontal diseases: The evidence. *Periodontol 2000.* 2011;55(1).
32. Worthington HV, Macdonald L, Pericic TP, Sambunjak D, Johnson TM, Imai P, et al. Home use of interdental cleaning devices, in addition to toothbrushing, for preventing and controlling periodontal diseases and dental caries. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;2019.
33. Chapple ILC, Van Der Weijden F, Doerfer C, Herrera D, Shapira L, Polak D, et al. Primary prevention of periodontitis: Managing gingivitis. *J Clin Periodontol.* 2015;42.
34. Silva H. Tobacco use and periodontal disease—the role of microvascular dysfunction. *Biology (Basel).* 2021;10(5).
35. Zee KY. Smoking and periodontal disease. *Aust Dent J.* 2009;54.
36. Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, et al. Periodontitis and diabetes: A two-way relationship. *Diabetologia.* 2012;55.

37. Lalla E, Papapanou PN. Diabetes mellitus and periodontitis: A tale of two common interrelated diseases. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7.
38. Li Y, Yuan X, Zheng Q, Mo F, Zhu S, Shen T, et al. The association of periodontal disease and oral health with hypertension, NHANES 2009–2018. *BMC Public Health*. 2023;23(1).
39. Guo X, Li X, Liao C, Feng X, He T. Periodontal disease and subsequent risk of cardiovascular outcome and all-cause mortality: A meta-analysis of prospective studies. *PLoS One*. 2023;18(9).
40. Ebersole JL, Graves CL, Gonzalez OA, Dawson D, Morford LA, Huja PE, et al. Aging, inflammation, immunity and periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2016;72.
41. Lang NP, Bartold PM. Periodontal health. *J Periodontol*. 2018;89.
42. Zimmermann H, Hagenfeld D, Diercke K, El-Sayed N, Fricke J, Greiser KH, et al. Pocket depth and bleeding on probing and their associations with dental, lifestyle, socioeconomic and blood variables: A cross-sectional, multicenter feasibility study of the German National Cohort. *BMC Oral Health*. 2015;15(1).
43. Liccardo D, Cannavo A, Spagnuolo G, Ferrara N, Cittadini A, Rengo C, et al. Periodontal disease: A risk factor for diabetes and cardiovascular disease. *Int J Mol Sci*. 2019;20.
44. Griffen AL, Beall CJ, Campbell JH, Firestone ND, Kumar PS, Yang ZK, et al. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME J*. 2012;6(6).
45. Chen C, Hemme C, Beleno J, Shi ZJ, Ning D, Qin Y, et al. Oral microbiota of periodontal health and disease and their changes after nonsurgical periodontal therapy. *ISME J*. 2018;12(5).
46. Shikarkhane V, Dodwad V, Patankar SA, Pharne P, Bhosale N, Patankar A. Comparative Evaluation of *Mogibacterium timidum* in the Subgingival Plaque of Periodontally Healthy and Chronic Periodontitis Patients: A Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Study. *Cureus*. 2024;16(5):e61211.
47. Ishihara K. Virulence factors of *treponema denticola*. *Periodontol 2000*. 2010;54(1).
48. Tan KH, Seers CA, Dashper SG, Mitchell HL, Pyke JS, Meuric V, et al.

- Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* Exhibit Metabolic Symbioses. *PLoS Pathog.* 2014;10(3).
49. Haffajee AD, Teles RP, Socransky SS. Association of *Eubacterium nodatum* and *Treponema denticola* with human periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 2006;21(5).
 50. Wu DT, Tao O, Trinh N, Javaid MA, Ahmed AS, Durand R, et al. Saliva – A Promising Tool for Diagnosing Oral Diseases. *Curr Oral Health Rep.* 2018;5.
 51. Hyvärinen K, Laitinen S, Paju S, Hakala A, Suominen-Taipale L, Skurnik M, et al. Detection and quantification of five major periodontal pathogens by single copy gene-based real-time PCR. *Innate Immun.* 2009;15(4).
 52. Belstrøm D, Sembler-Møller ML, Grande MA, Kirkby N, Cotton SL, Paster BJ, et al. Microbial profile comparisons of saliva, pooled and site-specific subgingival samples in periodontitis patients. *PLoS One.* 2017;12(8).
 53. Kumar PS. Diversity of oral biofilms in periodontal health and disease. In: *Pathogenesis of Periodontal Diseases: Biological Concepts for Clinicians.* 2017.
 54. Wang Y, Yang F, Wang Y, Deng S, Zhu R. Alterations and correlations in dental plaque microbial communities and metabolome characteristics in patients with caries, periodontitis, and comorbid diseases. *BMC Oral Health.* 2024;24(1).
 55. Dubey S, Dubey S, Gupta A, Sharma V. Biofilm-mediated dental diseases. In: *Biofilms in Human Diseases: Treatment and Control.* 2019.
 56. Chelărescu S, Şurlin P, Decusară M, Oprică M, Bud E, Teodorescu E, et al. Evaluation of IL1 β and IL6 gingival crevicular fluid levels during the early phase of orthodontic tooth movement in adolescents and young adults. *Appl Sci.* 2021;11(2).

9. Anexos

Anexo 1. Parecer favorável sobre o projeto (1/1):



UNIVERSIDADE
CATÓLICA
PORTUGUESA

Parecer sobre o projeto nº 157 (pedido de alteração)
Comissão de Ética para a Saúde da Universidade Católica Portuguesa
Mandato 2019/2023

Projeto de Investigação Na reunião do dia 17 de fevereiro de 2022 a CES-UCP esteve reunida e apreciou do ponto de vista ético os elementos submetidos pela investigadora, em resposta a parecer prévio da CES. Sobre a apreciação redige o seguinte parecer.
Título: Estratégias moleculares e imunológicas em doenças inflamatórias: a ponte para a Medicina de Precisão (OralPreciseMed)
Investigadora principal: Ana Karina Silva Mendes. Centro de Investigação Interdisciplinar em Saúde (CIIS) Equipa de investigação: Ana Peixoto Gomes (investigadora), Maria José Correia (investigadora), Raquel Silva (investigadora), Ana Sofia Duarte (investigadora), Nuno Rosa (investigador), Gustavo Fernandes (médico dentista), Patrícia Couto (médico dentista), Patrícia Correia (médico dentista), Anna Carolina Moura (médico dentista), Tiago Marques (médico dentista), Nélio Veiga (médico dentista)
Assunto: Integração na equipa de investigação de Dimitris N. Tatakis (Ohio State University College of Dentistry)
Documentos - Apresentação de breve sinopse curricular; Justificação da necessidade de adaptação ao protocolo inicialmente previsto. "Um dos grandes objetivos deste projeto é a identificação de moléculas na saliva que sirvam de biomarcadores no prognóstico e gestão dos casos clínicos de doença periodontal. De forma a ser possível a validação dos métodos propostos inicialmente, é premente o enriquecimento do tipo de amostra a analisar. Desta forma, a inclusão de amostras de tecido gengival e de sangue periférico dos pacientes com doença periodontal, é fundamental. A presença do Investigador (Professor) Dimitris Tatakis, na Faculdade de Medicina Dentária da Universidade Católica Portuguesa, no âmbito do Programa Fulbright, possibilita a sua integração na equipa do projeto OralPreciseMed. Dado o seu vasto conhecimento na área da periodontologia, a sua participação será uma mais-valia para a execução do projeto". - Atualização do modelo de consentimento informado, esclarecido e livre para participação em estudos de investigação (de acordo com a declaração de Helsínquia e a convenção de Oviedo) - Descrição do processo de recolha do tipo de amostra.
Estiveram presentes na reunião nº 37 da CES-UCP Presidente: Doutora Mara de Sousa Freitas Vice-Presidente: Doutora M ^ª Teresa Marques Doutor Jerónimo Santos Trigo Doutor Pedro Garcia Marques Dr. Eugénio Fonseca Doutora Ana Mineiro Zaky Doutora Marta Brites
Conclusão Ouvido o Relator, e o plenário da reunião do dia 17 de fevereiro de 2022, realizada por videoconferência, esta CES delibera, por unanimidade, a emissão de Parecer Favorável . 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 17/02/2022

Anexo 2. Consentimento Informado (1/4):



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: OralPreciseMed

A doença periodontal é considerada a doença crónica inflamatória mais comum em humanos e representa um enorme desafio nos cuidados de saúde. Desta forma, é importante adquirir um maior conhecimento acerca de mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento e progressão desta doença.

Os dados obtidos neste estudo vão auxiliar o médico dentista num tratamento mais eficaz da doença periodontal fazendo com que haja um melhor prognóstico (melhor probabilidade de sucesso no tratamento).

A recolha das amostras (saliva e/ou fluido crevicular) é indolor e não requer nenhum procedimento clínico adicional. O único incómodo será o tempo adicional da consulta devido à entrevista que os investigadores tudo farão para minimizar.

Este estudo não envolve procedimentos que não se enquadrem na prática clínica normal nem pretende testar novos produtos ou medicamentos. As amostras recolhidas destinam-se apenas a ser analisadas neste estudo. 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, assistencial 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 a investigadora principal deste estudo: kmendes@ucp.pt ou através do número de telefone 232419500. A participação não implica qualquer remuneração ou encargo económico para o participante. Os participantes colaboram de forma voluntária, livre e esclarecida.

Consentimento Informado (2/4):



CATOLICA
CIS - CENTRO DE INVESTIGAÇÃO
INTERDISCIPLINAR EM SAÚDE
1989 - 1992 - 1993



CATOLICA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA
1989

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 ao Encarregado 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).

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.

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.

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 fluido crevicular. 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.

Este documento pretende informá-lo(a) e propor-lhe a sua participação neste estudo.

Consentimento Informado (3/4):



CATOLICA

INSTITUTO DE INVESTIGAÇÃO
INTERDISCIPLINAR EM SAÚDE

1000-000-000



CATOLICA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

1000

O(a) participante é livre de aceitar, ou não, participar no estudo proposto, podendo mudar de opinião e revogar o seu consentimento, abandonando o estudo se assim considerar oportuno, sem qualquer tipo de penalização ou represália.

Confirmando que expliquei à pessoa abaixo indicada, de forma adequada e inteligível, os procedimentos necessários ao ato referido neste documento. Respondi a todas as questões que me foram colocadas e assegurei-me de que houve um período de reflexão suficiente para a tomada da decisão. Também garanti que, em caso de recusa, serão assegurados os melhores cuidados possíveis nesse contexto, no respeito pelos seus direitos.

ASSINATURA

Nome do profissional responsável pela recolha: _____

Contacto Institucional: _____

Data: __/__/____

Eu, _____

Fui informado(a) pelo profissional responsável pela recolha _____

acerca do estudo clínico no qual me é proposto participar.

Fui ainda informado(a) dos riscos possíveis deste estudo.

Pude colocar todas as perguntas ou dúvidas que achei necessárias e entendi todas as explicações que me foram proporcionadas.

Dou o meu consentimento por escrito para participar neste estudo.

ASSINATURA

(nome completo do participante)

Universidade Católica Portuguesa | Campus Viseu | Estrada da Circunvalação, 3504-505

Viseu | Tel. +351 232 419 500 | Fax. +351 232 428 344 | email: salivatec@viseu.ucp.pt

Página 3 de 4

Consentimento Informado (4/4):



Consentimento informado do representante legal

Declaro ter lido e compreendido este documento bem como as informações verbais que me foram fornecidas pela pessoa que acima assina. Foi-me garantida a possibilidade de, em qualquer altura, recusar participar neste estudo sem qualquer tipo de consequências. Desta forma, como representante legal do (a) _____ aceito a sua participação neste estudo e permito que os dados e amostras biológicas recolhidas sejam usados para fins de investigação/publicação científica, desde que a minha identidade e da pessoa a meu encargo como seu representante legal seja mantida confidencial.

SE NÃO FOR O PRÓPRIO A ASSINAR POR IDADE OU INCAPACIDADE

Nome:

BVCC 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

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

Data Protection Officer FMD- UCP

Dr. Paulo Alexandre de Oliveira Castro Ribeiro

Contacto telefónico: +351 232 419 500

E-mail: pribeiro@ucp.pt

Anexo 3. Questionário de dadores (1/18):



UNIVERSIDADE CATÓLICA
PORTUGUESA
1982



Questionário de dadores

A- Dados da amostra

Questão 1.

Código do dador

Questão 2.

Data da colheita

Questão 3.

Material Biológico

- Saliva
- Biofilme
- Biofilme radicular
- Bochecho
- Biópsia
- Não recolheu amostra biológica

Questão 4.

Amostragem

- 1ª amostragem
- Amostras follow-up

Questão 5.

Local de amostragem

- Clínica dentária - Universidade Católica Portuguesa de Viseu
- Lar Viscondessa de São Caetano
- Centro Social Peroquim de Rio de Loba
- Atividade Sénior Viseu
- Outras _____

Universidade Católica Portuguesa – Faculdade de Medicina Dentária
SalivaTec (Laboratório de Investigação Interdisciplinar em Saliva) - CIIB

Questionário de dadores (2/18):



UNIVERSIDADE CATÓLICA
PORTUGUESA
VNCJ



Questão 6.

Investigador / Médico dentista responsável

B- Dados pessoais do dador

Questão 7.

Género

- Feminino
- Masculino
- Não binário
- Prefere não mencionar

Questão 8.

Data de nascimento

Questão 9.

Etnia

- Caucasiana
- Africana
- Oriental
- Cigana
- Oriental
- Outra _____

Questão 10.

Nível de escolaridade

- Básico (até ao 9ºano)
- Médio (até ao 12ºano)
- Licenciatura, Mestrado ou Doutoramento
- Outros
- Não respondeu

Universidade Católica Portuguesa – Faculdade de Medicina Dentária
SalivaTec (Laboratório de Investigação Interdisciplinar em Saliva) - CIIS

Questionário de dadores (3/18):



UNIVERSIDADE CATÓLICA
PORTUGUESA
VISEU



C- Informações de saúde geral do dador

Questão 11.

Tem ou teve alguma patologia?

	Sim	Não	Não sabe
Cardíaca			
Sanguínea			
Fígado			
Renal			
Intestinal			
Estômago			
Cancro			
Alergias			
Outros			

Questão 12.

Especifique o tipo de patologia (s)

Questão 13.

Se teve cancro foi sujeito a algum tratamento de radioterapia ou quimioterapia?

- Sim
- Não

Questão 14.

Se sim, há quanto tempo (anos)?

Questão 15.

Tem hipertensão?

- Sim
- Não

Questionário de dadores (4/18):

	UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA VINCÍ	
--	--	--

Questão 16.

Tem diabetes?

- Sim, Tipo 1
- Sim, Tipo 2
- Sim, mas não sabe o tipo
- Não tem

Questão 17.

Histórico familiar – Existem doenças na família como?

- Doenças cardíacas

- Diabetes

- Cancro

- Outras

D- Informações sobre a medicação

Questão 18.



Faz algum tipo de tratamento médico ou medicação com regularidade?

- Sim

- Não
- Não sabe

Universidade Católica Portuguesa – Faculdade de Medicina Dentária
SalivaTec (Laboratório de Investigação Interdisciplinar em Saliva) - CRB

Questionário de dadores (5/18):

 <p>UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA VINCI</p>	 <p>SALIVATEC Laboratório de Investigação Interdisciplinar em Saliva</p>
---	---

Questão 19.

Para além da medicação regular, fez mais algum tipo de tratamento médico ou medicação nos últimos 30 dias?

- Sim
- _____
- Não
- Não sabe

Questão 20.

Fez antibiótico nos últimos 3 meses?

- Sim
- _____
- Não
- Não sabe

Questão 21.

Recebeu a vacina da gripe nos últimos 6 meses?

- Sim
- Não
- Não sabe

E- Hábitos – Consumo de tabaco

Questão 22.

Fuma ou já fumou?

- Sim
- Não
- Ex-fumador



Questão 23.

Se fuma ou já fumou, com que idade deixou de fumar?

- Sabe
- _____
- Não sabe

Universidade Católica Portuguesa – Faculdade de Medicina Dentária
SalivaTec (Laboratório de Investigação Interdisciplinar em Saliva) - CIIB

Questionário de dadores (6/18):

	UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA VISEU	
---	--	---

Questão 24.

Quantos cigarros fuma ou fumava por dia?

- Até 10 cigarros
- Mais de 10 cigarros
- Não sabe

Questão 25.

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

- Sabe
- Não sabe

Questão 26.

Use drogas recreativas?

- Sim
- Não

F- Hábitos - Consumo de álcool

Questão 27.

Bebe ou já bebeu, regularmente bebidas alcoólicas?

- Sim
- Não

Questão 28.

Se bebe ou já bebeu, com que idade começou?

- Sabe

- Não sabe

Questão 29.

Se bebe ou já bebeu, preencha o seguinte quadro:

	Até 14	Mais de 14	Não sabe	Não bebe
Nº de copos de vinho (por semana)				
Nº de cervejas (por semana)				
Nº de bebidas digestivas (por semana)				

Universidade Católica Portuguesa – Faculdade de Medicina Dentária
SalivaTec (Laboratório de Investigação Interdisciplinar em Saliva) - CIB

Questionário de dadores (7/18):



UNIVERSIDADE CATÓLICA
PORTUGUESA

1918



Questão 30.

Se deixou de beber foi com que idade?

Sabe

Não sabe

G- Hábitos - Alimentares

Questão 31.

Utiliza açúcar nos lanches entre refeições?

Sim

Não

Não sabe

Questão 32.

Número de lanches com açúcar entre as refeições:

1x

2x

3x

4x

Mais que 4x

H- Nível hormonal

Questão 33.

Toma anticoncecionais?

Sim

Não

Questão 34.

Há quantos dias teve a última menstruação?

Universidade Católica Portuguesa – Faculdade de Medicina Dentária
SalivaTec (Laboratório de Investigação Interdisciplinar em Saliva) - CIB

Questionário de dadores (8/18):



UNIVERSIDADE CATÓLICA
PORTUGUESA

1918



Questão 35.

Está grávida?

- Sim
- Não

Questão 36.

Se sim, de quantas semanas?

Questão 37.

Encontra-se na menopausa?

- Sim
- Não

Questão 38.

Se sim, há quantos anos?

I- Hábitos e comportamentos de higiene oral

Questão 39.

Costuma escovar os dentes diariamente?

- Sim
- Não

Questão 40.

Se sim, quantas vezes por dia?

- 1x
- 2x
- 3x
- Mais de 3x

Questionário de dados (9/18):



UNIVERSIDADE CATÓLICA
PORTUGUESA

VENEZ



Questão 41.

Escova os dentes com uma pasta fluoretada?

- Sim
- Não

Questão 42.

Utiliza uma pasta fluoretada 5000ppm diariamente?

- Sim
- Não

Questão 43.

Utiliza um colutório com fluor (0,05% NaF) diariamente?

- Sim
- Não

Questão 44.

Durante os últimos 6 meses utilizou clorexidina uma vez por semana?

- Sim
- Não

Questão 45.

Costuma utilizar fio dentário?

- Sim, diariamente
- Sim, às vezes
- Não
- Não sei o que é o fio dentário

Questão 46.

Utiliza aparelho ortodóntico?

- Sim
- Não

Universidade Católica Portuguesa – Faculdade de Medicina Dentária
SalivaTec (Laboratório de Investigação Interdisciplinar em Saliva) - C.I.B.

Questionário de dados (10/18):



UNIVERSIDADE CATÓLICA
PORTUGUESA
1918



Questão 47.

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 fui ao dentista

Questão 48.

Fez algum destes tratamentos (restaurações, TER, extrações) nos últimos 3 anos?

- Sim
- Não

Questão 49.

Alguma vez lhe foi aplicado por um profissional de saúde verniz ou gel de fluor em consultório nos últimos 6 meses?

- Sim
- Não

Questão 50.

Sente que a sua boca está "seca"?

- Sim
- Não

Questão 51.

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

- Sim
- Não

Universidade Católica Portuguesa – Faculdade de Medicina Dentária
SalivaTec (Laboratório de Investigação Interdisciplinar em Saliva) - CIIB

Questionário de dados (11/18):



UNIVERSIDADE CATÓLICA
PORTUGUESA



Questão 52:

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

- Sim
- Não

Questão 53:

Sente alguma alteração no paladar?

- Sim
- Não

J- Saúde oral – Lesões de cárie e diagnóstico periodontal

Questão 54. Condição atual de cada elemento dentário

	Presente	Ausente	Hígido	Cariado	Restaurado	Implante	Raiz residual	Desvitalizado
11								
12								
13								
14								
16								
18								
17								
18								
21								
22								
23								
24								
26								
28								
27								
28								
31								
32								
33								
34								
36								
38								

Universidade Católica Portuguesa – Faculdade de Medicina Dentária
SalivaTec (Laboratório de Investigação Interdisciplinar em Saliva) - CIIB

Questionário de dados (13/18):



UNIVERSIDADE CATÓLICA
PORTUGUESA
1983



- 1º - 11º
- 2º - 21º
- 2º - 22º
- 2º - 23º
- 2º - 24º
- 2º - 25º
- 2º - 26º
- 2º - 27º
- 2º - 28º
- 3º - 38º
- 3º - 37º
- 3º - 36º
- 3º - 35º
- 3º - 34º
- 3º - 33º

Universidade Católica Portuguesa – Faculdade de Medicina Dentária
SalivaTec (Laboratório de Investigação Interdisciplinar em Saliva) - CIIB

Questionário de dados (14/18):



UNIVERSIDADE CATÓLICA
PORTUGUESA
1961





- o 3º - 32º
- o 3º - 31º
- o 4º - 41º
- o 4º - 42º
- o 4º - 43º
- o 4º - 44º
- o 4º - 45º
- o 4º - 46º
- o 4º - 47º
- o 4º - 48º

Questão 56. Lesões de cárie:

- Inicial (ICDAS 1 - 2)
- Moderada (ICDAS 3 - 4)
- Extensa (ICDAS 5 - 6)

Questionário de dados (15/18):

 <p>UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA 1919</p>	
<p>Questão 57.</p> <p>Profundidade de sulcos e fissuras?</p> <ul style="list-style-type: none"><input type="radio"/> Rasos<input type="radio"/> Profundos	
<p>Questão 58.</p> <p>Exposição radicular</p> <ul style="list-style-type: none"><input type="radio"/> Sim<input type="radio"/> Não	
<p>Questão 59. Diagnóstico periodontal (marcar uma resposta ou mais)</p> <p>Nota: Como questões a seguir referem-se ao diagnóstico periodontal (nova classificação). Preencher Perlo Chart e copiar informações para o questionário. https://www.periodontalchart-online.com/uk/</p> <ul style="list-style-type: none"><input type="radio"/> Saúde periodontal<input type="radio"/> Periodonto reduzido<input type="radio"/> Gingivite<input type="radio"/> Periodontite localizada (menos que 30%)<input type="radio"/> Periodontite generalizada (maior que 30%)<input type="radio"/> Padrão Molar Incisivo<input type="radio"/> Estadio I<input type="radio"/> Estadio II<input type="radio"/> Estadio III<input type="radio"/> Estadio IV<input type="radio"/> Grau A<input type="radio"/> Grau B<input type="radio"/> Grau C<input type="radio"/> Mucosite Peri-implantar<input type="radio"/> Peri-implantite<input type="radio"/> Estomatite protética Classe I<input type="radio"/> Estomatite protética Classe II<input type="radio"/> Estomatite protética Classe III	
<p>Questão 60.</p> <p>BOP – Sangramento à sondagem</p> <p>_____</p>	
<p>Universidade Católica Portuguesa – Faculdade de Medicina Dentária SalivaTec (Laboratório de Investigação Interdisciplinar em Saliva) - CIIB</p>	

Questionário de dados (16/18):



UNIVERSIDADE CATÓLICA
PORTUGUESA

VIII



Questão 61.

Índice de placa

Questão 62.

Média da profundidade de sondagem

Questão 63.

Necessidade de tratamento médico-dentário?

- Sim
- Não

K- Saúde oral – Próteses dentárias

Questão 64.

Utiliza prótese dentária?

- Sim
- Não

Questão 65.

Em qual das arcadas?

- Superior
- Inferior
- Ambas

Questão 66. Qual o tipo de prótese?

	Total	Parcial sorilios	Parcial esqueléticos
Superior			
Inferior			

Questionário de dados (17/18):



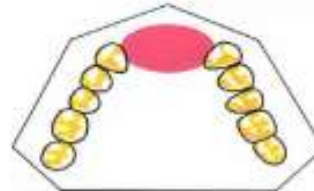
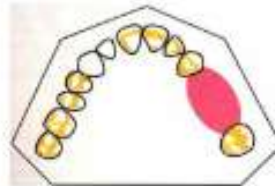
Questão 57. A que tipo de classificação de Kennedy corresponde a prótese que utiliza?

- Classe I: desdentado bilateral posterior
 Classe II: desdentado unilateral posterior



- Classe III: desdentado unilateral posterior incompleto

- Classe IV: desdentado anterior



	Classe I	Classe II	Classe III	Classe IV	Classe V	Sem classificação
Superior						
Inferior						

Questão 58.

Quando utiliza a(s) prótese(s)?

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

Questão 59.

Como faz a higienização da sua prótese?

- Só com água
- Com água e escova
- Pastilhas de limpeza
- Fio dentário
- Escovilhão
- Produto dentário (qual?) _____
- Não faz higienização da prótese.

Questionário de dadores (18/18):



UNIVERSIDADE CATÓLICA
PORTUGUESA



Questão 70.

Quantas vezes por dia é feita essa higienização?

- 1x
- 2x
- 3x
- 4x
- 5x
- 6x

Questão 71.

Costuma tirar a prótese para dormir?

- Sempre
- Às vezes
- Raramente
- Nunca

Questão 72.

Há quanto tempo utiliza uma prótese dentária (anos)?

Questão 73.

Há quanto tempo tem a atual prótese dentária? (anos)

Questão 74.

Qual a frequência de consultas de manutenção protética?

- 3 em 3 meses
- 6 em 6 meses
- 1x por ano
- Nunca

Questão 75.

Necessidade de reabilitação protética?

- Sim
- Não

Universidade Católica Portuguesa – Faculdade de Medicina Dentária
SalvaTec (Laboratório de Investigação Interdisciplinar em Saliva) - CIIB

Anexo 4. Protocolo laboratorial para quantificação de DNA por qPCR (1 / 4)

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/μL

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

		16S rRNA gene	
95 °C 40	Forward Primer	926F AAACTCAAAGGAATTGACGG	Cycle PCR: for 2 min cycles:
	Reverse Primer	1062R CTCACRRCACGAGCTGAC	

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 10²³]) / (length of template (bp) x [1x10⁹] x 650)

Protocolo laboratorial para quantificação de DNA por qPCR (2 / 4)

Quantification of total bacterial load by real-time PCR

June 2021

Preparation of standard curve

✓ gDNA extraction

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

- 1- Isolate genomic DNA from the cultures of *S. capitis* using the NZY Microbial gDNA Isolation kit (MB21702) according to the manufacturer's instructions.
- 2- DNA amplification by PCR according with the following protocol:

Primers (5' to 3')

	16S rRNA gene
Forward	926F AAACTCAAAGGAATTGACGG
Reverse	1062R CTCACRRCACGAGCTGAC

Optimized annealing temperature

16S rRNA gene: Ta 50 °C

NZYTaq II 2x Green Master Mix 0.2 U/μL (MB358)

Resulting PCR products have an A-overhang and are suitable for cloning with NZYTech's NZY-A PCR cloning kit (MB053);

Prepare a master mix (MM) to a final volume = 10 μL

5 μL MM

0,25 μL Primer F (10 μM), final concentration: 0,25 μM

0,25 μL Primer R (10 μM), final concentration: 0,25 μM

x μL DNA

x μL H₂O

Negative control: x μL MM + x μL H₂O

Cycle PCR:

95 °C for 15 min

35 cycles:

94 °C for 30 sec

50 °C/45 °C for 30 sec

72 °C for 20 sec

Protocolo laboratorial para quantificação de DNA por qPCR (3 / 4)

Quantification of total bacterial load by real-time PCR

June 2021

72 °C for 10 min

4 °C infinite

Confirm PCR product size on Agarose Gel (1 %):

0,6 g agarose + 60 mL TAE 1x + 2 µL GreenSafe (NZYtech)

Load in the gel: 10 µL from each sample and 3 µL ladder I (NZYtech)

Expected product size:

16S rRNA gene: 178 bp

NZY Gelpure (MB011) to purify DNA from agarose gel:

NZYGelpure kit is designed for the purification of DNA from TAE/TBE agarose gels and for direct purification of PCR products.

After purification DNA was eluted in 30 µL of EB;

Purified DNA concentration (NanoDrop):

	Conc. (ng/µL)	A260/230	A260/280
DNA 16S	22.688	0.34	1.71

PCR product cloning into the NZY-A PCR cloning kit (MB05301, including competent cells)

NZY-A PCR cloning kit was designed to allow the direct cloning of PCR products with 3'-A overhangs, which result from amplifications using non-proofreading DNA polymerases. The cloning vector was prepared by cutting NZYTech's pNZY28 with EcoRV and adding a 3' terminal thymidine at both ends.

Cloning and transformation are performed according to the manufacturer's instructions.

Insert preparation:

We recommend using a 1:3 molar ratio of vector:insert and starting with 50 ng of pNZY28-A vector. To calculate the optimal amount of PCR product required, use the following equation:

$$\frac{ng\ of\ vector \times kb\ size\ of\ insert \times molar\ ratio\ of\ insert}{kb\ size\ of\ vector} = ng\ of\ insert\ vector$$

16S rRNA gene: 7,3 ng DNA (insert size 0,14 kb)

Vector size: 2,88 kb

Vector concentration: 50 ng/µL

Protocolo laboratorial para quantificação de DNA por qPCR (4 / 4)

Quantification of total bacterial load by real-time PCR

June 2021

Components	16S rRNA gene	Control reaction (NZY-A positive control insert)
NZY-A buffer	5 μ L	5 μ L
pNZY28-A vector	1 μ L	1 μ L
PCR fragment	0,32 μ L	3 μ L
T4 DNA Ligase	1 μ L	1 μ L
Nuclease-free water	2,68 μ L	-

Note: Final volume: 10 μ L

Transformation:

Prepare LB agar plates containing 100 μ g/mL ampicillin, 15 μ g/mL tetracycline, 100 μ g/mL X-gal and 0.5 mM IPTG;

SOC medium (S1797 - 10xSML, Sigma) is necessary for the transformation protocol;

Plasmid DNA isolation (NZYMiniprep, MB01001)

Pick a single colony from a freshly streaked selective plate and inoculate a culture of 1–5 mL LB medium containing the appropriate selective antibiotic. Incubate for 12–16 h at 37 °C with vigorous shaking.

Isolate plasmid DNA according to the manufacturer's instructions.

Screening for recombinants:

Cut pNZY28 vector with EcoR I or BamH I to excise the cloned insert or send samples to sanger sequencing.

Plasmid DNA isolation (NZYMidiprep, MB05004)

After screening for recombinants and check the correct insert insertion, prepare highly pure plasmid DNA (typically 100 μ g) to use in quantitative real-time PCR experiments.