



CATÓLICA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

VISEU

O Microbioma associado à lesão de cárie radicular difere do Microbioma Oral recolhido no esmalte saudável do mesmo indivíduo?

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

Por:
João Sousa Garcia

Viseu, 2025



CATÓLICA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

VISEU

O Microbioma associado à lesão de cárie radicular difere do Microbioma Oral recolhido no esmalte saudável do mesmo indivíduo?

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

Por:

João Sousa Garcia

Orientador: Professora Doutora Maria José Correia

Coorientadores: Professor Doutor Pedro Campos Lopes

Viseu, 2025

Membros do Júri das Provas Públicas

Presidente: Professora Doutora Anna Moura

Professor Associado, FDM-UCP

Arguente: Professora Doutora Patrícia Couto

Professor Auxiliar, FDM-UCP

Orientador: Professora Doutora Maria José Correia

Professor Associado, FDM-UCP

Data das provas públicas: 28/07/2025

“A persistência é o caminho do êxito”

Charles Chaplin

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Maria José Correia, pelo apoio, pela partilha de conhecimento e pela disponibilidade ao longo deste trabalho. Agradeço ainda pela confiança e orientação em todas as etapas deste percurso.

Ao meu coorientador, Doutor Pedro Campos Lopes, pelos conselhos, incentivo e pela forma como acompanhou este projeto.

Ao SalivaTec, e em especial à Mónica e à Marla, um agradecimento sincero por toda a ajuda, dedicação e colaboração na realização deste estudo.

À Universidade Católica Portuguesa, aos professores e funcionários com quem me cruzei ao longo destes anos, obrigada pelo apoio, pela formação transmitida e pelo ambiente que tornou esta etapa tão especial.

Aos meus pais, por estarem sempre presentes, por me apoiarem em todas as decisões e por nunca me deixarem desistir, mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus avós, pelo carinho, pelas palavras de conforto.

Aos colegas e amigos que me acompanharam ao longo destes anos, obrigada por todos os momentos partilhados, pelo companheirismo e pelo apoio.

Por fim, a todos aqueles que, de forma direta ou indireta, estiveram presentes e contribuíram para a concretização deste trabalho, deixo o meu mais sincero agradecimento.

Resumo

Introdução: A cárie radicular é uma condição cada vez mais frequente em populações idosas, associada a fatores como idade, higiene oral, medicação e alterações na composição do microbioma oral. A compreensão da dinâmica bacteriana associada a estas lesões pode contribuir para estratégias preventivas mais eficazes.

Objetivos: Comparar o perfil microbiológico de lesões de cárie radicular com o biofilme oral saudável do mesmo indivíduo, focando-se nas espécies *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* e *Streptococcus mitis*.

Materiais e métodos: Foram recolhidas amostras de saliva, biofilme oral saudável e biofilme da lesão de cárie radicular em indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos. A quantificação bacteriana foi realizada através de qRT-PCR, permitindo avaliar a carga relativa de cada espécie nos diferentes nichos.

Resultados: Verificou-se uma variabilidade interindividual significativa. Algumas amostras apresentaram menor carga bacteriana nas lesões, enquanto noutras se observou maior concentração de espécies cariogénicas na zona afetada. *S. mitis* demonstrou uma presença mais estável entre os dois ambientes, sugerindo maior resiliência ecológica.

Conclusão: Os resultados sugerem que o microbioma presente em lesões de cárie radicular pode diferir substancialmente do microbioma oral saudável, refletindo alterações locais ou sistémicas. Este estudo reforça a importância de considerar a dinâmica microbiana na avaliação do risco de cárie em populações envelhecidas.

Palavras-chave: Cárie radicular, idosos, microbioma, espécies cariogénicas, espécies carioprotetoras.

Abstract

Introduction: Root caries is an increasingly prevalent condition in older adults, associated with age-related factors such as oral hygiene, medication use, and changes in the oral microbiome. Understanding bacterial dynamics in these lesions may support more effective preventive strategies.

Goal: To compare the microbial profile of root caries lesions with the healthy oral biofilm from the same individual, focusing on *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii*, and *Streptococcus mitis*.

Materials and methods: Samples of saliva, healthy oral biofilm, and root caries lesion biofilm were collected from individuals aged 65 years or older. Bacterial quantification was performed using qRT-PCR to assess the relative load of each species in the different ecological niches.

Results: Substantial interindividual variability was observed. In some cases, lower bacterial loads were found in the lesions, while in others, higher concentrations of cariogenic species were detected. *S. mitis* showed a more consistent presence across both environments, suggesting greater ecological resilience.

Conclusion: The microbiome associated with root caries may differ considerably from the healthy oral microbiome, reflecting potential local or systemic imbalances. This study highlights the importance of microbial dynamics in assessing caries risk, particularly in elderly populations.

Key words: Root caries, elderly, microbiome, cariogenic species, carioprotective species.

Índice

1. Introdução.....	1
1.2. Os diferentes tecidos que formam o dente	3
1.3. Microbiologia oral	4
1.4. A ecologia microbiana da cárie	5
1.5. Importância clínica e em saúde pública	6
1.6. Lacunas no conhecimento atual sobre a microbiologia da cárie radicular	7
2. Materiais e métodos	9
2.1. Caracterização do estudo	10
2.2. Caracterização da amostra	10
2.3. Princípios éticos.....	10
2.4. Treino e calibração.....	11
2.5. Recolha de dados e amostras biológicas	11
2.5.1. Fase 1 – Questionário	11
2.5.2. Fase 2 – Exame clínico	11
2.5.3. Fase 3 – Recolha de saliva	13
2.5.4. Fase 4 – Recolha de biofilme	14
2.5.5. Fase 5 – Processamento das amostras de biofilme	16
3. Resultados	17
3.1. Caracterização da amostra em estudo	18
3.1.1. Caracterização dos hábitos de higiene oral	18
3.1.2. Caracterização dos hábitos alimentares	20
3.1.3. Caracterização de fatores que predispõem a acumulação de placa bacteriana	20
3.1.4. Caracterização dos fatores associados ao fluxo salivar	21
3.1.5. Caracterização da análise salivar	22
3.1.6. Caracterização de resultados decorrentes da inspeção intraoral	23
3.1.7. Caracterização da análise do biofilme oral e do biofilme e radicular.....	25
3.2. Recalls.....	35
4. Discussão.....	36
4.1. Hábitos de higiene oral e a sua influência na cárie radicular	37
4.2. Hábitos alimentares e a ingestão de açúcares	38
4.3. Fatores que contribuem para a acumulação de placa bacteriana	39
4.4. Fluxo salivar e xerostomia	40
4.5. Análise do pH da saliva	41
4.6. Perfil microbiológico da cárie radicular vs biofilme saudável	41
4.7. Interpretação das variações interindividuais.....	42
4.8. Limitações metodológicas e sugestões para estudos futuros	43
5. Conclusões	45

6. Bibliografia.....	47
7. Anexos	51
Anexo 1 – Consentimento informado.....	52
Anexo 2 – Questionário	55
Anexo 3 – Protocolo Laboratorial.....	67
Anexo 4 – Protocolo RT-qPCR	71

Índice de abreviaturas

BIOF – Biofilme oral saudável

BR – Biofilme da lesão de cárie radicular

DNA – Ácido desoxirribonucleico

FMD – Faculdade de Medicina Dentária

ICDAS II – International Caries Detection and Assessment System II

qRT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real com Transcriptase Reversa

UCP – Universidade Católica Portuguesa

Índice de tabelas

Tabela 1 Códigos e critérios do sistema ICDAS II para detecção e avaliação de lesões de cárie. Adaptado de Gupta et al., (19).....	12
Tabela 2 Códigos e critérios do sistema ICDAS II para lesões de cárie radicular. Adaptado de Gupta et al. (19).....	12
Tabela 3 Distribuição da população em estudo de acordo com o género.....	18
Tabela 4 Dados obtidos relacionando os hábitos de higiene oral e a idade.	19
Tabela 5 Distribuição da amostra de acordo com o número de escovagens com pasta fluoretada.....	19
Tabela 6 Distribuição da amostra de acordo com a utilização de açúcar nos lanches entre as refeições principais.	20
Tabela 7 Distribuição da amostra relativamente aos fatores que predispõem a acumulação da placa bacteriana em função da idade.....	21
Tabela 8 Distribuição da amostra relativamente à ingestão de medicação que influencia o fluxo salivar.	22
Tabela 9 Distribuição da amostra relativamente à classificação da lesão cariosa segundo o ICDAS II e a presença da mesma.....	25

Índice de figuras

Figura 1 Exemplo ilustrativo dos códigos do sistema ICDAS II. Adaptado de Dikmen et al. (20).	13
Figura 2 Profundidade de sulcos e fissuras (imagem adaptada do artigo Fissure Depth and Caries in First Permanent Molars: A Five-Year Follow-up Study) (22).	13
Figura 3 Locais selecionados para a recolha de biofilme oral (Imagem modificada do GoogleSearchImages).....	15
Figura 4 Distribuição da amostra em função do pH salivar.	23
Figura 5 Distribuição da amostra em função do pH cárie radicular	23
Figura 6 Distribuição da amostra relativamente à quantificação molecular bacteriana no biofilme oral.	26
Figura 7 Distribuição da amostra relativamente à quantificação molecular bacteriana no biofilme radicular.	27
Figura 8 Comparação da classificação bacteriana entre biofilme oral e cárie radicular – Amostra 1	28
Figura 9 Comparação da classificação bacteriana entre biofilme oral e cárie radicular – Amostra 2	29
Figura 10 Comparação da classificação bacteriana entre biofilme oral e cárie radicular – Amostra 3	30
Figura 11 Comparação da classificação bacteriana entre biofilme oral e cárie radicular – Amostra 4	30
Figura 12 Comparação da classificação bacteriana entre biofilme oral e cárie radicular – Amostra 5	31
Figura 13 Comparação da classificação bacteriana entre biofilme oral e cárie radicular – Amostra 6	32
Figura 14 Comparação da classificação bacteriana entre biofilme oral e cárie radicular – Amostra 7	33
Figure 15 Visão comparativa dos resultados obtidos para todas as amostras (1 a 7) apresentadas nesta secção, com o objetivo de facilitar a análise conjunta.....	34

1. Introdução

1.1. A Cárie

A cárie dentária é uma doença não transmissível, com origem no biofilme oral, que resulta de um desequilíbrio dinâmico entre os processos de desmineralização e remineralização dos tecidos dentários. Este desequilíbrio ocorre em resposta à atividade metabólica de microrganismos acidogénicos que, ao fermentarem hidratos de carbono, produzem ácidos orgânicos capazes de dissolver os minerais do esmalte e da dentina (1).

Em condições saudáveis, a saliva e outros fatores protetores neutralizam os ácidos e promovem a remineralização. Contudo, quando há um consumo frequente de açúcares fermentáveis, fluxo salivar diminuído ou deficiências na higiene oral, a desmineralização tende a prevalecer, levando ao aparecimento de lesões cariosas. Esta doença apresenta um padrão crónico e evolutivo, com manifestações e impactos distintos ao longo da vida (1).

A cárie dentária é considerada a doença crónica mais prevalente a nível mundial. Segundo Peres *et al.* mais de 2 mil milhões de pessoas apresentam cárie dentária em dentes permanentes. Esta prevalência é particularmente preocupante em grupos vulneráveis, como os idosos, entre os quais se verifica uma maior incidência de cárie radicular (2).

Com o envelhecimento populacional e a maior retenção de dentes naturais, a cárie radicular tornou-se uma preocupação crescente em termos de saúde pública. Esta localiza-se na raiz do dente, afetando o cemento e a dentina, frequentemente em zonas com recessão gengival. A sua prevenção e diagnóstico precoce exigem uma compreensão aprofundada da ecologia do biofilme oral (3).

Em Portugal, os dados mais recentes com detalhe por faixa etária provêm do III Estudo Nacional de Prevalência das Doenças Orais (2013–2014), promovido pela Ordem dos Médicos Dentistas e publicado pela Direção-Geral da Saúde. Este estudo revelou que, entre os adultos com idades compreendidas entre os 65 e os 74 anos, mais de 60% apresentavam lesões de cárie ativa. Estes números reforçam a necessidade de estratégias preventivas específicas dirigidas à população geriátrica,

especialmente tendo em conta o envelhecimento demográfico e a crescente retenção de dentes naturais (4,5).

Contudo, desde essa publicação, não foram divulgados novos inquéritos nacionais com estratificação por idade em relação à cárie radicular, sendo evidente uma lacuna de dados atualizados sobre esta condição em Portugal, especialmente entre os idosos institucionalizados. Esta ausência de informação sistemática dificulta a construção de políticas públicas eficazes e direcionadas à prevenção da cárie radicular numa população em envelhecimento e, portanto, toda a informação que possa ser recolhida contribuirá para a caracterização das necessidades de tratamento.

1.2. Os diferentes tecidos que formam o dente

O dente é composto por tecidos mineralizados com propriedades distintas: o esmalte, a dentina e o cimento. O esmalte, que reveste a coroa dentária, é o tecido mais mineralizado do corpo humano (96% de hidroxiapatite), oferecendo elevada resistência à desmineralização. Apesar de poder sofrer remineralização em fases iniciais da desmineralização, o esmalte é incapaz de se regenerar de forma completa após perda estrutural, uma vez que não possui células que permitam a sua reposição. (6).

Por baixo do esmalte encontra-se a dentina, um tecido tubular e menos mineralizado (cerca de 70%), cuja estrutura facilita a difusão de ácidos e a invasão bacteriana. Esta vulnerabilidade é agravada pela sua proximidade com a polpa dentária, facilitando a progressão da infeção através dos túbulos dentinários. Segundo Warreth *et al.*, a dentina possui menor grau de mineralização e maior conteúdo orgânico do que o esmalte, tornando-se mais permeável e suscetível à desmineralização. Além disso, como demonstrado por Huang *et al.*, determinadas bactérias, como *Streptococcus mutans*, possuem proteases capazes de degradar o colagénio dentinário, contribuindo para a invasão em profundidade do tecido (6,7).

O cimento recobre a raiz dentária e assegura a inserção das fibras periodontais. Por ser menos mineralizado que a dentina, é particularmente vulnerável quando exposto ao meio oral, como ocorre em casos de recessão gengival. Esta exposição aumenta o risco de desenvolvimento de cárie radicular (8).

A morfologia radicular e a sua composição facilitam a adesão bacteriana e aceleram a progressão da cárie. Estas características justificam uma abordagem preventiva específica, sobretudo em populações com maior risco, como os idosos (9).

1.3. Microbiologia oral

O microbioma oral refere-se ao conjunto de microrganismos que habitam a cavidade oral, formando comunidades complexas e dinâmicas. Desde o nascimento, a cavidade oral é colonizada por diversas espécies bacterianas, cuja composição evolui ao longo da vida em resposta a fatores como dieta, higiene oral, idade, uso de medicamentos e estado imunológico. Em condições de saúde, estas comunidades mantêm-se em equilíbrio, com predomínio de espécies comensais que contribuem para a homeostasia oral, regulando o pH, inibindo a colonização por patógenos e estimulando respostas imunitárias tolerogénicas (10).

O biofilme dentário, estrutura organizada de microrganismos aderidos à superfície dos dentes, representa uma manifestação física deste microbioma. O conhecimento das espécies presentes no biofilme oral tem evoluído muito nas últimas décadas pois as comunidades retratadas pelos métodos baseados em cultura não são as mesmas que os métodos independentes de cultura apresentam (11).

Sendo os primeiros colonizadores do biofilme espécies benéficas como *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis* ou *Veillonella*, este biofilme pode sofrer alterações ecológicas em resposta a mudanças ambientais, como a ingestão frequente de açúcares ou redução do fluxo salivar. Esse processo, designado por disbiose, favorece o crescimento de espécies acidogénicas e acidotolerantes, como *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus*, que contribuem para o desenvolvimento da cárie (12).

Com o início da atividade cariogénica, verifica-se uma alteração progressiva da composição do microbioma oral, com redução da diversidade e aumento da dominância de microrganismos adaptados ao ambiente ácido. Este fenómeno é especialmente evidente em superfícies radiculares, onde a menor proteção mineral e a dificuldade de higienização favorecem a instalação de um biofilme disbiótico. Alguns estudos como o do Gondo *et al.*, demonstram que o microbioma da cárie radicular

apresenta um perfil distinto do da cárie coronária, com maior presença de géneros como *Actinomyces*, *Leptotrichia* e *Scardovia* (12).

Apesar da relevância tradicional atribuída a *Streptococcus mutans*, a literatura atual evidencia que esta espécie não atua isoladamente na patogénese da cárie. Pelo contrário, interage com outras bactérias no seio do biofilme, criando ambientes favoráveis à sua própria persistência. Além disso, *S. mutans* possui mecanismos ativos para inibir espécies comensais como *S. sanguinis* e *S. mitis* através da produção de compostos antimicrobianos naturais. Esta capacidade confere-lhe vantagem competitiva em ambientes ácidos, potenciando o desequilíbrio ecológico (13).

1.4. A ecologia microbiana da cárie

A transição de um microbioma oral em equilíbrio para um estado disbiótico está na base do desenvolvimento da cárie. Essa transformação não se traduz apenas numa maior presença de microrganismos, mas sobretudo numa alteração do perfil ecológico da comunidade bacteriana. A cárie instala-se quando há um predomínio de espécies acidogénicas e acidotolerantes capazes de sobreviver e prosperar num ambiente com pH constantemente baixo. Este fenómeno caracteriza-se não apenas pela proliferação de bactérias cariogénicas, mas também pela perda de diversidade e pela supressão de espécies comensais com função protetora (10).

Entre as bactérias mais frequentemente associadas à cárie coronária, destacam-se *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus spp.* e *Scardovia wiggsiae*. Estas espécies têm capacidade elevada para fermentar açúcares, produzir ácido láctico e tolerar ambientes ácidos, sendo eficazes na desmineralização do esmalte. No entanto, não atuam isoladamente: interagem com outras espécies, alterando a matriz do biofilme e promovendo a sua adesão às superfícies dentárias. Por outro lado, espécies como *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis* e *Veillonella parvula* são consideradas carioprotetoras, por competirem com patogénios, consumirem ácidos e contribuírem para a regulação do pH (14,15).

No caso específico da cárie radicular, o ambiente ecológico é distinto. A menor mineralização da dentina e do cimento, a proximidade da polpa, e a maior complexidade anatómica favorecem a instalação de comunidades bacterianas

diferentes daquelas observadas na cárie coronária. Gondo e colaboradores (2024) encontraram para além dos géneros que dominam nas cáries oclusais dos mesmos indivíduos (*Olsenella*, *Lactobacillus* e *Prevotella*) outras espécies como *Pseudoramibacter*, *Fusobacterium* e *Actinomyces*. As espécies associadas às caries radiculares são capazes de colonizar superfícies mais rugosas e resistir ao fluxo salivar, criando biofilmes espessos e metabolicamente ativos que contribuem para a rápida progressão da lesão (12).

Além da composição bacteriana, a estrutura e maturação do biofilme desempenham um papel central na patogénese. Biofilmes mais maduros e densos são associados a um microambiente mais ácido, baixa penetração salivar e maior resistência à remoção mecânica. Estes fatores dificultam o restabelecimento do equilíbrio ecológico, perpetuando o ciclo de acidificação e desmineralização. O conhecimento das espécies envolvidas e das suas interações ecológicas é, por isso, fundamental para estratégias de prevenção e diagnóstico precoce da cárie (13).

1.5. Importância clínica e em saúde pública

A cárie radicular é uma condição frequentemente subdiagnosticada, mas com elevado impacto na saúde oral, particularmente entre a população idosa. A sua localização em áreas de difícil acesso, associada à menor mineralização da dentina e do cimento, contribui para uma progressão silenciosa e muitas vezes irreversível da lesão. A ausência de sintomatologia inicial e o facto de ocorrer frequentemente em indivíduos com perdas cognitivas ou funcionais dificultam ainda mais o diagnóstico atempado. Por este motivo, a sua identificação precoce e compreensão microbiológica representam um desafio clínico prioritário (16).

Além do risco de perda dentária, a cárie radicular está associada a alterações da qualidade de vida, nomeadamente ao comprometimento da função mastigatória, dor crónica, alterações nutricionais e impacto psicológico. Em instituições de cuidados continuados, esta patologia representa uma das principais causas de infeção oral persistente. Compreender os microrganismos envolvidos na sua patogénese permite orientar estratégias de prevenção, diagnóstico e intervenção mais eficazes, adaptadas ao perfil de risco de cada paciente (9).

A nível de saúde pública, o envelhecimento populacional implica um aumento previsível da prevalência da cárie radicular. Com a retenção crescente de dentes naturais em idades mais avançadas, a exposição das superfícies radiculares será cada vez mais comum. A integração da avaliação do risco de cárie radicular em programas de saúde oral é, por isso, uma prioridade emergente, especialmente em contextos como lares, cuidados paliativos ou unidades de internamento prolongado (17).

Importa ainda salientar que o microbioma oral, em particular quando desregulado, tem sido associado a repercussões para além da cavidade oral. A literatura científica tem vindo a demonstrar correlações entre a disbiose oral e doenças sistémicas como diabetes, pneumonia aspirativa, doenças cardiovasculares e infeções em próteses articulares. Neste sentido, estudar a ecologia do biofilme radicular e os seus desfechos clínicos não contribui apenas para a saúde oral, mas também para a vigilância e promoção da saúde geral em populações vulneráveis (18).

1.6. Lacunas no conhecimento atual sobre a microbiologia da cárie radicular

Apesar dos avanços na compreensão da cárie dentária, o conhecimento sobre a microbiologia específica da cárie radicular continua limitado. A maioria dos estudos existentes foca-se na cárie coronária, deixando as lesões radiculares relativamente pouco caracterizadas em termos de composição microbiana, progressão ecológica e resposta do hospedeiro, além disso, os dados disponíveis são frequentemente obtidos por métodos clássicos de cultura, com baixa sensibilidade para detetar espécies anaeróbias ou de difícil cultivo (12,19).

A utilização de técnicas moleculares, como o sequenciamento do gene 16S rRNA ou a qPCR, tem vindo a revelar um ecossistema microbiano mais diverso e complexo do que o anteriormente descrito. Contudo, grande parte destes estudos compara indivíduos com e sem cárie, ignorando a heterogeneidade interindividual. Esta abordagem limita a capacidade de isolar as variáveis relacionadas com o nicho ecológico local como o tipo de superfície (esmalte vs. raiz), o pH, a exposição salivar e o grau de maturação do biofilme (12).

Persistem lacunas significativas quanto ao papel de espécies cariogénicas “não tradicionais”, como *Leptotrichia*, *Scardovia* ou *Propionibacterium*, na progressão das lesões radiculares. Para além disso, as interações competitivas entre espécies cariogénicas e carioprotetoras são pouco exploradas. A ecologia do biofilme radicular, distinta da observada na coroa dentária, exige uma abordagem própria que contemple a abundância relativa, a função metabólica e a adaptabilidade das espécies envolvidas (20).

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar o microbioma associado à cárie radicular numa população idosa, através da análise molecular do biofilme recolhido diretamente da lesão ativa e da sua comparação com o biofilme oral saudável do mesmo indivíduo, presente em superfícies de esmalte intacto. Esta abordagem intraindividual permite minimizar a variabilidade entre sujeitos e identificar de forma mais robusta as alterações ecológicas associadas à presença da lesão. O estudo dá continuidade à linha de investigação iniciada por Joana Cunha (MIMD 2022) na Faculdade de Medicina Dentária da Universidade Católica Portuguesa – Centro Regional de Viseu (FMD-UCP), agora aprofundando especificamente a caracterização microbiológica da cárie radicular e compará-lo com o esmalte saudável do mesmo indivíduo, um aspeto ainda pouco explorado nos trabalhos anteriores.

2. Materiais e métodos

2.1. Caracterização do estudo

Este trabalho insere-se num estudo observacional transversal, integrado num projeto longitudinal mais alargado em curso na Faculdade de Medicina Dentária da Universidade Católica Portuguesa (FMD-UCP). A investigação baseou-se na aplicação de um questionário, na realização de um exame clínico intraoral e na recolha de amostras biológicas, nomeadamente saliva e biofilme. O principal objetivo foi comparar o perfil microbiológico de lesões de cárie radicular com superfícies saudáveis do mesmo indivíduo, permitindo caracterizar possíveis diferenças entre ambos os nichos ecológicos.

2.2. Caracterização da amostra

A amostra incluiu utentes da clínica dentária da FMD-UCP e idosos residentes em lares da região. Foram admitidos participantes com idade igual ou superior a 65 anos, que tivessem pelo menos um dente em boca e aceitassem participar mediante consentimento informado. No caso de indivíduos com dificuldades cognitivas, o consentimento foi obtido através da assinatura do responsável legal. Foram excluídos indivíduos edêntulos totais, com história recente de uso de antibióticos (últimos 3 meses), que tivessem realizado higiene oral ou consumido alimentos até uma hora antes da recolha, ou que utilizassem colutórios antissépticos nas 24 horas anteriores.

Relativamente ao questionário, sempre que necessário, as informações foram confirmadas com os cuidadores responsáveis ou, quando aplicável, com os profissionais da própria instituição, nomeadamente no que se refere à medicação em uso, ao histórico clínico e aos hábitos de higiene.

2.3. Princípios éticos

Todos os participantes foram informados dos objetivos do estudo e aceitaram participar através da assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1). Os dados recolhidos foram tratados com confidencialidade e utilizados exclusivamente para fins científicos, respeitando as normas éticas em vigor. A participação foi voluntária, e a qualquer momento os indivíduos puderam abandonar o estudo, sem prejuízo para o seu acompanhamento clínico.

2.4. Treino e calibração

A fim de garantir uniformidade na avaliação clínica, foi realizada uma calibração inter examinador com outro investigador envolvido num estudo paralelo. Esta preparação incluiu uma revisão detalhada dos critérios do sistema ICDAS II, apresentação de imagens clínicas exemplificativas e simulações práticas em contexto clínico. Adicionalmente, outros alunos do curso de Mestrado Integrado em Medicina Dentária foram treinados tendo a mesma formação e preparação para colaborar nas recolhas (tabela 1) (figura1).

2.5. Recolha de dados e amostras biológicas

A recolha de dados iniciou-se em outubro e terminou em abril, tanto na clínica universitária como nos respetivos lares. As recolhas realizadas na clínica foram executadas sempre no início de cada consulta. A recolha foi dividida em quatro etapas. Em primeiro lugar foi realizado um questionário semelhante a uma entrevista e registado na plataforma *Qualtrics*, seguido da realização de um exame clínico intraoral. Posteriormente, foi realizada uma colheita de saliva, na qual foi determinado o fluxo salivar e o pH. Por fim, foi realizada a recolha do biofilme oral e do biofilme da lesão de cárie radicular.

2.5.1. Fase 1 – Questionário

Foi feito um questionário sobre hábitos de higiene oral, hábitos tabágicos/alcoólicos, alimentação e saúde geral da população em estudo, permitindo compreender o comportamento e hábitos dos pacientes (anexo 2).

2.5.2. Fase 2 – Exame clínico

O exame clínico consistiu numa inspeção oral com o intuito de avaliar a presença de cáries dentárias e a profundidade dos sulcos. As cáries dentárias foram examinadas segundo o Sistema Internacional para a Detecção e Avaliação de Cáries (ICDAS II), incluindo também os códigos específicos para a deteção e classificação das lesões de cárie nas superfícies radiculares (21).

Tabela 1 Códigos e critérios do sistema ICDAS II para detecção e avaliação de lesões de cárie. Adaptado de Gupta *et al.*, (21)

Código	Descrição
0	Superfície dentária saudável: Sem evidência de cárie após 5 segundos de secagem com ar.
1	Primeira alteração visual no esmalte: Opacidade ou descoloração (branca ou acastanhada) visível na entrada da fissura após secagem prolongada com ar.
2	Alteração visual distinta no esmalte visível com o dente húmido; a lesão deve ser claramente visível quando seco.
3	Quebra localizada do esmalte (sem sinais clínicos de envolvimento dentinário), visível com o dente húmido e após secagem prolongada.
4	Sombra escura visível sob o esmalte, proveniente da dentina subjacente.
5	Cavidade distinta com dentina visível.
6	Cavidade extensa (mais de metade da superfície) com dentina visível.

Tabela 2 Códigos e critérios do sistema ICDAS II para lesões de cárie radicular. Adaptado de Gupta *et al.* (21).

Código	Descrição
E	A superfície radicular não pode ser visualizada diretamente devido à ausência de recessão gengival ou após secagem suave com ar, sendo assim excluída. Superfícies totalmente cobertas por cálculo podem ser excluídas ou o cálculo pode ser removido antes de determinar a classificação.
0	A superfície radicular não apresenta descoloração anormal nem defeitos superficiais, quer ao nível da junção cimento-esmalte (JCE) quer totalmente na raiz. Pode apresentar contorno anatômico natural ou uma perda de continuidade que não indique cárie.
1	Existe uma área claramente demarcada na superfície radicular ou na JCE com descoloração, mas sem cavitação (perda de contorno anatômico inferior a 0,5 mm).
2	Existe uma área claramente demarcada na superfície radicular ou na JCE com descoloração (castanho-claro/escuro, preto) e presença de cavitação (perda de contorno anatômico igual ou superior a 0,5 mm).

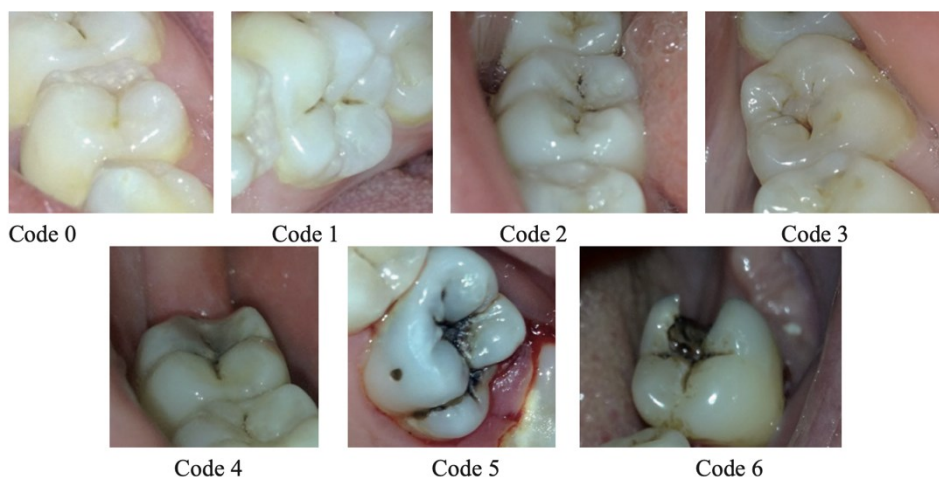


Figura 1 Exemplo ilustrativo dos códigos do sistema ICDAS II. Adaptado de Dikmen *et al.* (22).

Ao nível da morfologia dentária, os molares e pré-molares possuem uma superfície oclusal caracterizada pela presença de sulcos e fissuras. Esses elementos anatômicos variam quanto à profundidade, influenciando diretamente o risco de cárie. Nos dentes com sulcos rasos, forma-se um “ângulo em V” superior a 70°, permitindo que a ponta da sonda periodontal da OMS alcance a base do sulco, visível sob boa iluminação. Por outro lado, nos dentes com sulcos profundos, o “ângulo em V” é inferior a 70°, e a ponta da sonda não atinge a base, que não é visível mesmo sob boa iluminação (figura 2)(23).

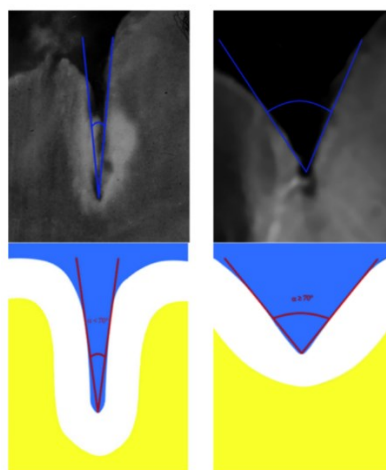


Figura 2 Profundidade de sulcos e fissuras (imagem adaptada do artigo Fissure Depth and Caries in First Permanent Molars: A Five-Year Follow-up Study) (24).

2.5.3. Fase 3 – Recolha de saliva

Para garantir a padronização das recolhas, foram incluídos apenas os pacientes que não realizaram higiene oral nem consumiram alimentos até uma hora antes do procedimento (critério de exclusão). A recolha teve início com a obtenção de

saliva não estimulada, utilizando o método de expelição, com o paciente confortavelmente sentado numa posição relaxada. Solicitou-se ao paciente que acumulasse saliva na cavidade oral e a expelisse consecutivamente para um tubo graduado, ao longo de um período de um minuto. O tempo foi rigorosamente controlado com a ajuda de um temporizador digital.

Se o fluxo salivar sem estímulo apresentasse valores moderados (entre 0,3 e 0,7 ml/min), avaliava-se também o fluxo salivar estimulado. O estímulo foi realizado por meio da mastigação de uma pastilha de Parafilm CRT® Buffer durante 30 segundos. Em seguida, o paciente expeliu a saliva para um tubo graduado durante um minuto.

A saliva recolhida foi utilizada para a medição do pH com um eletrodo específico [Hannah Instruments HI1083], fornecido pelo laboratório SalivaTec. Este equipamento permitiu determinar com precisão o nível de acidez da saliva. Antes da análise, o eletrodo foi cuidadosamente higienizado com água Milli-Q (destilada, filtrada e purificada).

Após a medição do pH, os tubos foram devidamente fechados e transportados para o laboratório SalivaTec, onde as amostras passaram por um pré-processamento, sendo alíquotas separadas e armazenadas a -80°C.

2.5.4. Fase 4 – Recolha de biofilme

Para garantir uniformidade, a recolha foi efetuada em áreas específicas da cavidade oral, previamente definidas. Os locais selecionados incluíram: o espaço interincisivo dos dentes inferiores, tanto pela face vestibular como pela lingual, a face vestibular dos incisivos superiores, a face vestibular de um primeiro molar superior, e a face lingual de um primeiro molar inferior. Nos casos de ausência do primeiro molar permanente, a recolha foi realizada no dente mais posterior presente na arcada (figura 3).

No caso da recolha do biofilme associado à cárie radicular, esta foi realizada diretamente na superfície radicular com lesão, seguindo a mesma metodologia utilizada para o biofilme supragengival. Para a raspagem do biofilme oral e do biofilme da lesão de cárie radicular, foram utilizados dois palitos estéreis, que foram

posteriormente colocados individualmente em solução salina dentro de tubos separados. Após a recolha, as amostras foram pré-processadas, alíquotadas em dois tubos distintos com 500 μ l cada e conservadas a -80 °C. O processamento e a análise das amostras de biofilme seguiram os mesmos procedimentos aplicados às amostras de saliva (anexo 3).

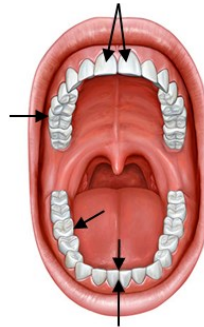


Figura 3 Locais selecionados para a recolha de biofilme oral (Imagem modificada do GoogleSearchImages).

2.5.5. Fase 5 – Processamento das amostras de biofilme

Para determinar a carga bacteriana total no biofilme dos pacientes, realizamos um teste de qRT-PCR utilizando primers universais para bactérias (anexo 3). Para quantificar o número de cópias de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis* e *Actinomyces naeslundii*, seguimos um procedimento idêntico detalhado no protocolo (anexo 4).

3. Resultados

3.1. Caracterização da amostra em estudo

A população envolvida neste estudo foi selecionada por conveniência, englobando tanto utentes da clínica universitária da FMD-UCP como residentes do Centro Social Paroquial do Campo e do Lar Residência Professor José Ceia Moreira Campos. Após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, a amostra final foi composta por 40 participantes. Destes, 11 foram reavaliados numa consulta de recall.

No que respeita à distribuição por género, participaram 24 mulheres e 16 homens (Tabela 3). A maioria dos indivíduos situava-se na faixa etária entre os 75-84 anos, registando-se uma média de idades de aproximadamente 77 anos. Importa ainda referir que, de um modo geral, a maior parte dos participantes encontrava-se institucionalizada.

Tabela 3 Distribuição da população em estudo de acordo com o género.

		65-74	75-84	85-94	>95
Género	Masculino (n=16)	4	7	4	1
	Feminino (n=24)	5	9	7	3
	Total (n=40)	10	16	12	4

3.1.1. Caracterização dos hábitos de higiene oral

Durante a recolha de dados, foram incluídas perguntas específicas sobre os hábitos de higiene oral da amostra estudada. A maioria dos participantes referiu utilizar pasta dentífrica fluoretada na escovagem dentária (n=39) (Tabela 4).

No que diz respeito ao uso de fio dentário, apenas uma minoria (n=3) indicou realizar esta prática como parte da sua rotina diária. A maioria absoluta dos idosos afirmou não usar fio dentário (n=37). Este padrão parece sugerir que, com o envelhecimento, a preocupação ou capacidade para manter práticas de higiene interdental tende a diminuir (Tabela 4).

Também se avaliou a utilização de colutórios fluoretados (0,05% NaF), tendo apenas (n=10) indivíduos referido adotar este tipo de bochechos na sua higiene oral, enquanto os restantes 30 não o utilizam. Tal como observado com o fio dentário, esta prática parece ser menos frequente entre os grupos etários mais velhos (Tabela 4).

Tabela 4 Dados obtidos relacionando os hábitos de higiene oral e a idade.

		Higiene oral com pasta fluoretada		Colutório com fluor (0,05% NaF)		Uso de fio dentário	
		Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não
Idade	65-74 (n=9)	8	1	6	3	1	8
	75-84 (n=16)	16	0	3	13	2	14
	85-94 (n=11)	11	0	0	11	0	11
	>95 (n=4)	4	0	1	3	0	4
	Total (n=40)	39	1	10	30	3	37

No que se refere à frequência diária da escovagem dentária com pasta fluoretada, verificou-se que a minoria dos participantes (n=16) referiu realizar esta prática duas ou mais vezes por dia. Em contraste, 18 indivíduos afirmaram escovar os dentes apenas uma vez por dia (Tabela 5).

Tabela 5 Distribuição da amostra de acordo com o número de escovagens com pasta fluoretada.

		Higiene oral com pasta fluoretada	
		1x	≥ 2x
Idade	65-74 (n=7)	3	4
	75-84 (n=12)	9	3
	85-94 (n=11)	5	6
	>95 (n=4)	1	3
	Total (n=34)	18	16

3.1.2. Caracterização dos hábitos alimentares

No âmbito dos hábitos alimentares, foi avaliado o consumo de açúcares em geral, bem como a sua presença nos lanches ao longo do dia. Dos 40 participantes avaliados, 26 relataram consumir alimentos açucarados com regularidade, enquanto apenas 14 afirmaram não o fazer (Tabela 6).

No que respeita especificamente à ingestão de açúcares entre as refeições principais nomeadamente durante os lanches apenas 7 indivíduos indicaram manter esse hábito. Este número representa uma minoria face aos 20 participantes que afirmaram não consumir açúcares nesses momentos do dia (Tabela 6).

Tabela 6 Distribuição da amostra de acordo com a utilização de açúcar nos lanches entre as refeições principais.

		Consumo de açúcares		Açúcares nos lanches		
		Sim	Não	Sim	Não	
Idade	65-74	5	4	3	2	
		(n=9)		(n=5)		
	75-84	10	6	3	7	
		(n=16)		(n=10)		
	85-94	8	3	1	7	
		(n=11)		(n=8)		
	>95	3	1	0	4	
		(n=4)		(n=4)		
	Total		26	14	7	20

3.1.3. Caracterização de fatores que predispõem a acumulação de placa bacteriana

Entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento de cárie radicular em populações envelhecidas, destacam-se a exposição radicular e o uso de próteses removíveis. Na presente amostra, verificou-se que 21 dos 40 participantes apresentavam superfícies radiculares expostas, um aspeto relevante considerando que estas áreas são mais suscetíveis à acumulação de biofilme e, conseqüentemente, à cárie. A distribuição da exposição radicular revelou-se relativamente homogênea entre as diferentes faixas etárias (Tabela 7).

Quanto à utilização de próteses removíveis, 19 indivíduos relataram fazer uso, enquanto os restantes 21 indicaram não o utilizar. Esta opção poderá estar relacionada com questões de conforto, adaptação e motivação pessoal. De facto, em contextos institucionalizados, muitos idosos optam por não recorrer a próteses, seja pela dificuldade em deslocar-se a consultas, pelo histórico de desconforto com próteses anteriores ou, simplesmente, pela resignação perante a ausência de dentes naturais (Tabela 7).

É interessante notar que a faixa etária dos 85-94 anos apresenta o maior número de utilizadores de prótese (n=8), o que poderá indicar uma maior valorização da reabilitação oral ou um historial de intervenções mais ativas em fases anteriores da vida. Por outro lado, nos grupos mais jovens (65-74 e 75-84 anos), a maioria opta por não utilizar prótese, o que poderá sugerir uma abordagem mais conservadora ou resistência inicial à sua colocação (Tabela 7).

Tabela 7 Distribuição da amostra relativamente aos fatores que predispõem a acumulação da placa bacteriana em função da idade.

		Utilização de prótese		Exposição radicular	
		Sim	Não	Sim	Não
Idade	65-74	3	6	3	6
	75-84	5	11	7	8
	85-94	8	3	8	4
	>95	3	1	1	3
Total		19	21	19	21

3.1.4. Caracterização dos fatores associados ao fluxo salivar

Durante a análise dos dados obtidos, referente à medicação com impacto na produção salivar (n=40), avaliou-se a influência de determinados grupos terapêuticos reconhecidos por poderem causar xerostomia. Entre estes incluem-se os anticolinérgicos, antidepressivos, antipsicóticos, diuréticos, ansiolíticos, anti-histamínicos, anti hipertensores e analgésicos (Tabela 8).

Verificou-se que 25 dos 40 participantes (62,5%) estavam a tomar pelo menos um medicamento pertencente a um destes grupos, o que poderá justificar a presença de alterações na produção salivar. Em contraste, 15 dos indivíduos (37,5%) não

tomavam qualquer medicação com potencial efeito xerogénico, o que poderá indicar uma menor probabilidade de apresentarem hipossalivação (Tabela 8).

Quando se analisam os dados por faixa etária, observa-se uma tendência clara: o recurso a este tipo de fármacos aumenta com a idade. No grupo dos 85-94 anos (n=12), a esmagadora maioria (n=11) encontrava-se medicada com substâncias que podem interferir com a produção de saliva. Já nos 75-84 anos (n=15), 10 indivíduos tomavam este tipo de medicação. Em contraste, no grupo mais jovem (65-74 anos, n=9), apenas 1 pessoa relatou o uso de medicamentos com este perfil (Tabela 8).

Tabela 8 Distribuição da amostra relativamente à ingestão de medicação que influencia o fluxo salivar.

		Medicação que afeta a saliva	
		Sim	Não
Idade	65-74 (n=9)	1	8
	75-84 (n=15)	10	5
	85-94 (n=12)	11	1
	>95 (n=4)	3	1
Total		25	15

3.1.5. Caracterização da análise salivar

Relativamente ao pH salivar, foram consideradas 23 amostras, do total de 40 participantes incluídos no estudo. Entre estes 23 indivíduos, 6 apresentaram valores de pH salivar inferiores a 6,5, enquanto os restantes 17 apresentaram valores iguais ou superiores a esse valor. Estes dados encontram-se representados na (Figura 4).

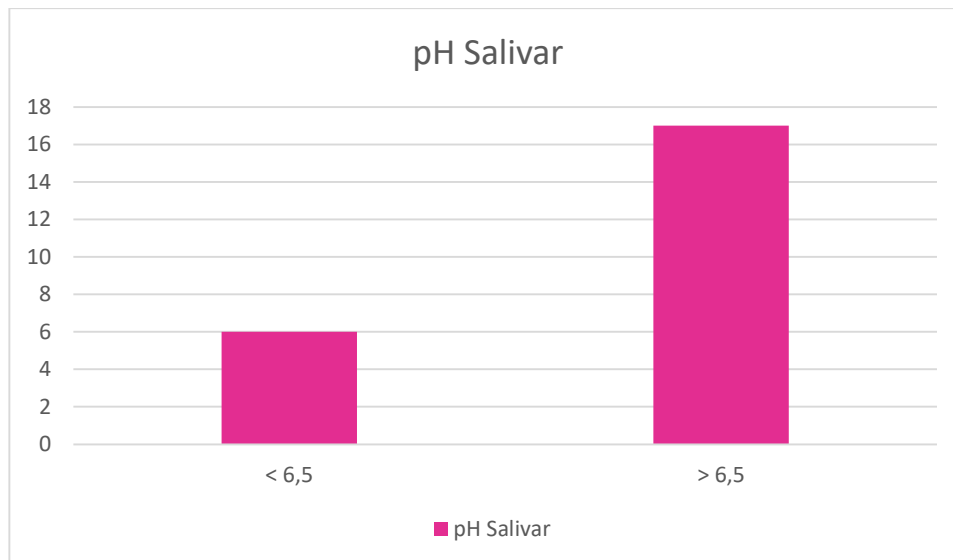


Figura 4 Distribuição da amostra em função do pH salivar.

Relativamente aos participantes com diagnóstico de cárie radicular, apenas foi possível determinar o valor de pH salivar em 7 das amostras recolhidas.

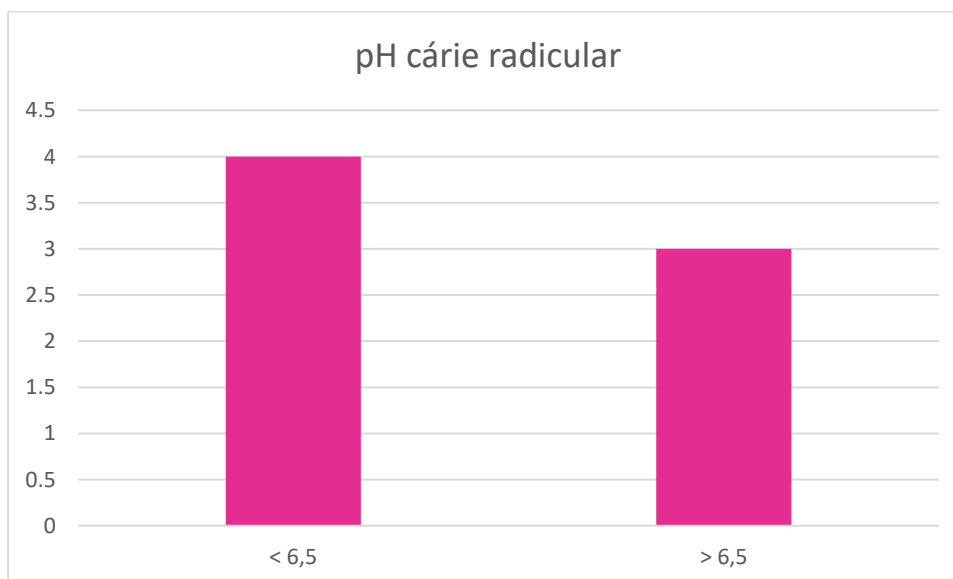


Figura 5 Distribuição da amostra em função do pH cárie radicular

3.1.6. Caracterização de resultados decorrentes da inspeção intraoral

Como parte da recolha de dados foi feita fora do ambiente clínico, não foi possível obter o histórico de tratamentos dentários realizados nos últimos anos, como restaurações ou extrações. No entanto, a maioria dos participantes referiu não ir ao dentista há mais de três anos.

Para uniformizar a análise das lesões cariosas observadas, foi estabelecida uma correspondência entre os códigos do sistema ICDAS II para superfícies coronárias e a adaptação para superfícies radiculares, permitindo agrupá-los em três categorias clínicas: lesões iniciais, moderadas e severas.

Assim, consideraram-se como lesões iniciais os casos classificados com os códigos 1 e 2 do ICDAS coronário, que representam alterações visuais no esmalte sem cavitação, e os códigos E e 0 do ICDAS radicular, que, embora não evidenciem cavitação ou lesão clara, podem já refletir alterações iniciais da superfície radicular ou impossibilidade de observação direta, sendo potencialmente indicativos de risco ou início de processo carioso.

As lesões moderadas corresponderam ao código 3 do ICDAS coronário, que descreve perda localizada de esmalte sem exposição de dentina, e ao código 1 do ICDAS radicular, que representa descoloração delimitada na superfície radicular ou na junção cimento-esmalte, ainda sem cavitação visível.

Por fim, as lesões severas incluíram os códigos 4, 5 e 6 do ICDAS coronário, que já evidenciam cavidade com envolvimento dentinário, e o código 2 do ICDAS radicular, que descreve a presença clara de cavitação com perda de contorno anatômico.

Esta correspondência entre os dois sistemas permitiu uma avaliação integrada da gravidade das lesões cariosas na amostra estudada, agrupando os diferentes tipos de envolvimento estrutural dentário numa mesma lógica clínica de severidade.

Entre os 40 pacientes observados, 21 não apresentavam qualquer tipo de lesão cariosa. Já os outros 19 mostraram sinais de cárie, sendo 6 classificados com lesões iniciais, 8 com lesões moderadas e 5 com lesões severas. As lesões moderadas e severas foram mais comuns nas faixas etárias mais elevadas, especialmente entre os 75 e os 94 anos.

Estes resultados mostram que a maioria dos casos de cárie detetados se encontrava já em fases avançadas, o que destaca a importância do acompanhamento regular, sobretudo em populações idosas.

Tabela 9 Distribuição da amostra relativamente à classificação da lesão cariosa segundo o ICDAS II e a presença da mesma.

		ICDAS-1 (inicial)	ICDAS-2 (moderada)	ICDAS-3 (severa)
Idade	65-74 (n=9)	3	3	0
	75-84 (n=16)	3	2	1
	85-94 (n=11)	0	3	3
	>95 (n=4)	0	0	1
	Total	6	8	5

3.1.7. Caracterização da análise do biofilme oral e do biofilme e radicular

Para além da análise da presença ou ausência de microrganismos específicos, foi também realizada uma avaliação da carga bacteriana total das amostras através da quantificação de cópias do gene 16S rRNA por microlitro. Os resultados foram agrupados em três categorias baixa, média e elevada carga bacteriana de acordo com intervalos definidos previamente na literatura. Esta classificação permitiu aferir a distribuição das amostras relativamente à sua densidade microbiana, fornecendo uma visão mais abrangente da colonização bacteriana nos diferentes nichos ecológicos avaliados.

A análise revelou uma variabilidade considerável entre amostras, tanto de biofilme saudável como de biofilme associado à lesão de cárie radicular. De um modo geral, as amostras provenientes de lesões apresentaram uma tendência para concentrações bacterianas mais elevadas, o que poderá refletir um ambiente mais propício à proliferação de espécies cariogénicas (Figura 6).

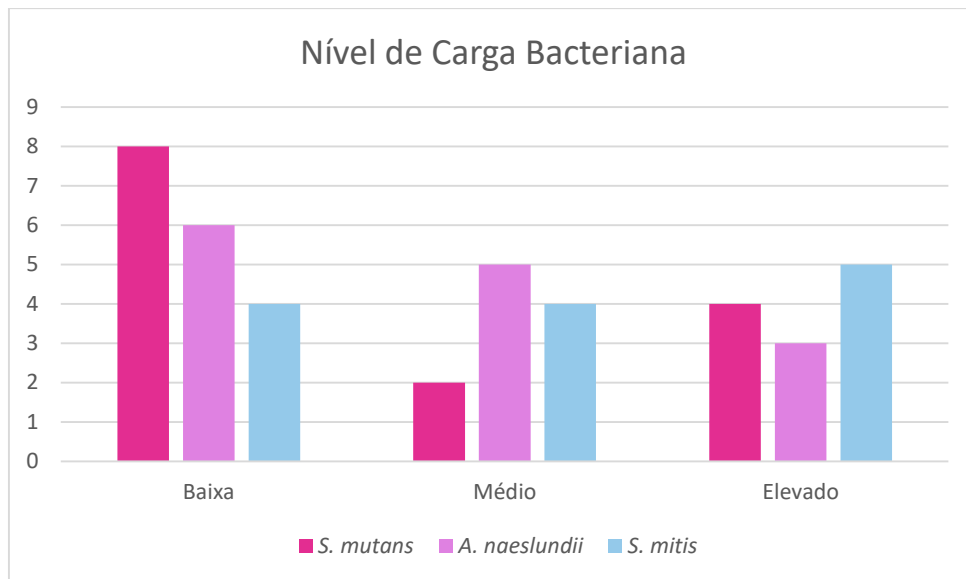


Figura 6 Distribuição da amostra relativamente à quantificação molecular bacteriana no biofilme oral.

Foi também analisado a distribuição da carga bacteriana de três espécies *S. mutans*, *A. naeslundii* e *S. mitis* em amostras recolhidas diretamente de lesões de cárie radicular, agrupadas em três níveis de carga baixa, média e elevada (Figura 7).

A espécie *S. mutans* apresentou-se maioritariamente associada a cargas bacterianas baixas (n=5), diminuindo significativamente nos níveis médio e elevado (n=1 em cada). Esta tendência poderá refletir uma presença inicial desta bactéria na lesão, com possível competição ou substituição por outras espécies ao longo da progressão da cárie.

A. naeslundii revelou uma distribuição distinta, com maior frequência nas amostras de carga bacteriana média (n=3), e menor expressão nos níveis baixo e elevado (n=2 em cada). Este padrão poderá indicar uma maior adaptabilidade desta espécie a ambientes de atividade cariogénica moderada, nomeadamente em lesões radiculares em progressão.

Por sua vez, *S. mitis*, geralmente considerada uma espécie associada a um microbioma mais estável, mostrou uma presença mais equilibrada entre os três níveis de carga bacteriana. Foram identificadas 3 amostras tanto com carga elevada, e 2 com carga média e baixa, sugerindo que esta espécie consegue manter-se presente mesmo em ambientes de disbiose, embora com variações na sua abundância relativa.

Estes resultados apontam para um papel mais dinâmico de *A. naeslundii* nas lesões radiculares, uma forte presença inicial de *S. mutans*, e uma resiliência de *S. mitis*, cuja presença pode persistir independentemente da carga total de bactérias.

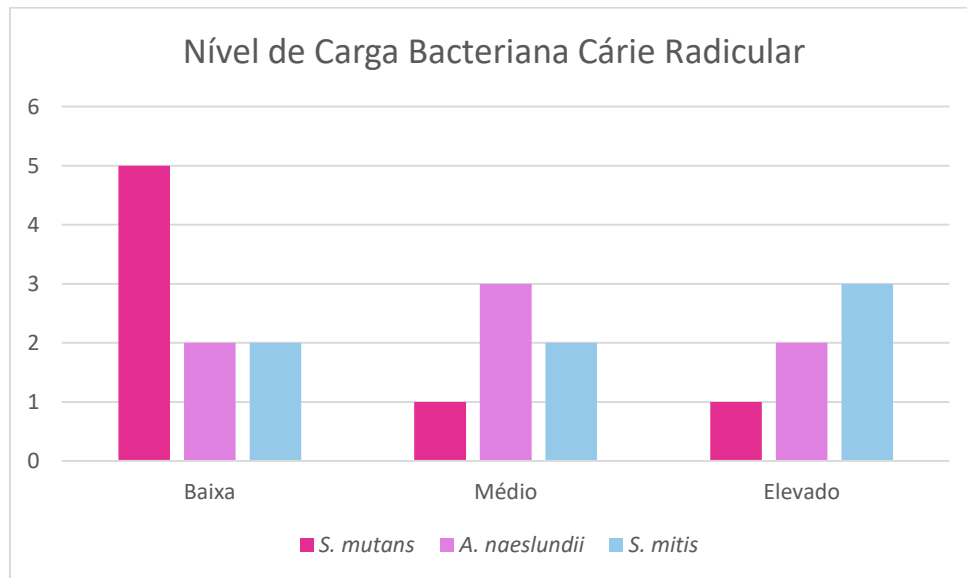


Figura 7 Distribuição da amostra relativamente à quantificação molecular bacteriana no biofilme radicular.

A Figura 8 apresenta a comparação da classificação da carga bacteriana entre o biofilme oral saudável (BIOF) e a lesão de cárie radicular (BR) de um mesmo indivíduo (Amostra 1). Observa-se que, para as três espécies analisadas *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* e *Streptococcus mitis* a classificação foi consistentemente mais elevada no biofilme saudável, sendo classificada como "Alta" em todos os casos.

Já na lesão de cárie radicular, a classificação bacteriana desceu para valores mais baixos: "Moderada" para *S. mutans* e "Baixa" para *A. naeslundii* e *S. mitis*. Estes resultados sugerem uma diminuição geral da diversidade ou da dominância destas espécies na lesão ativa, podendo refletir um ambiente microbiológico mais seletivo ou dominado por outras bactérias não analisadas nesta comparação direta.

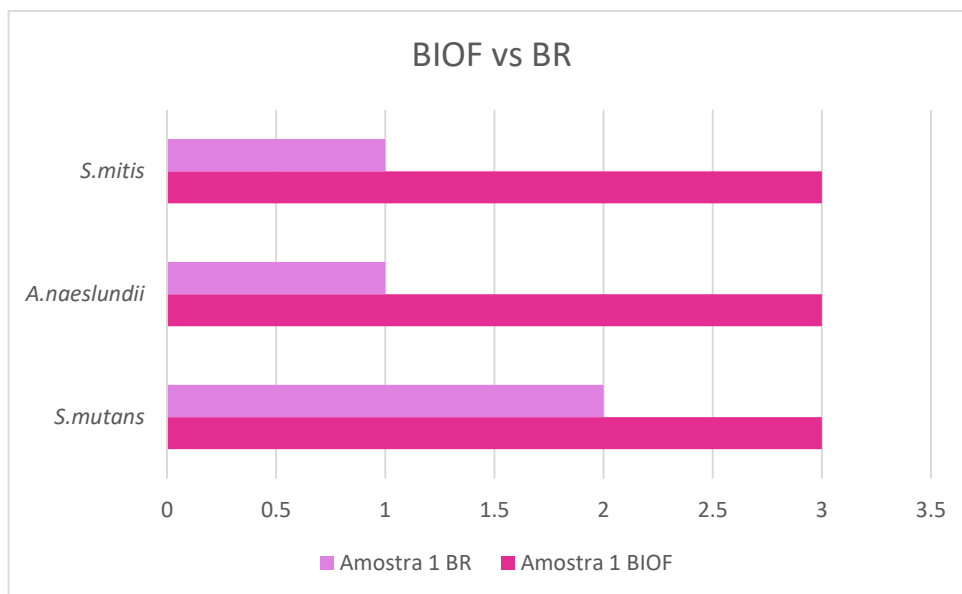


Figura 8 Comparação da classificação bacteriana entre biofilme oral e cárie radicular – Amostra 1

Na Amostra 2, observa-se um padrão distinto em relação à Amostra 1. As classificações da carga bacteriana de *S. mitis* e *A. naeslundii* mantiveram-se constantes entre o biofilme saudável (BIOF) e a lesão (BR), ambas com valores equivalentes. No entanto, a espécie *S. mutans* apresentou uma redução da classificação entre os dois locais, descendo de "Moderada" no biofilme saudável para "Baixa" na lesão de cárie radicular (Figura 9).

Estes resultados podem sugerir que, neste indivíduo, *S. mutans* teve menor participação na composição microbiana da lesão em comparação com o biofilme saudável, enquanto as outras duas espécies mantiveram estabilidade na sua presença.

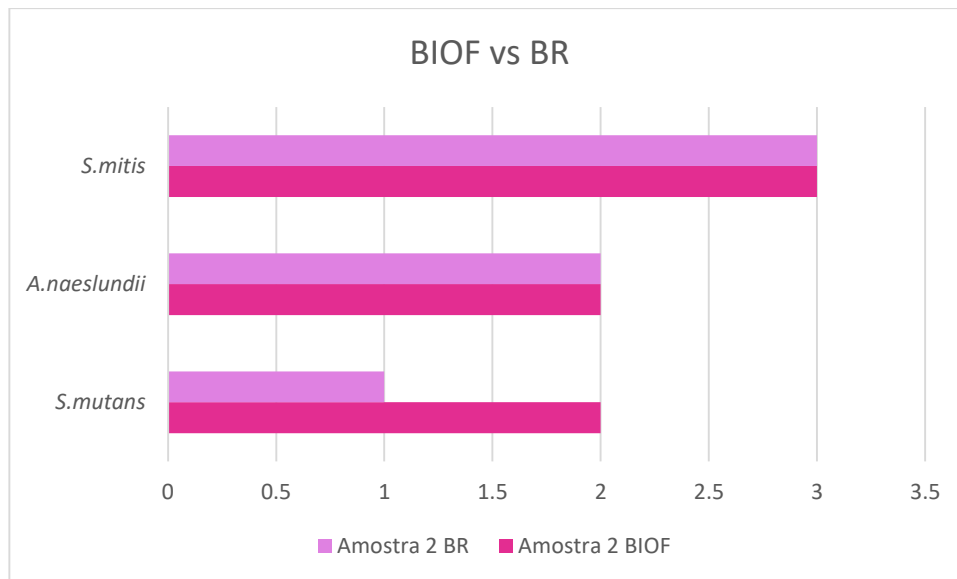


Figura 9 Comparação da classificação bacteriana entre biofilme oral e cárie radicular – Amostra 2

Na Figura 10, observa-se que, na Amostra 3, *S. mutans* apresentou uma classificação alta no biofilme saudável, diminuindo para baixa na lesão de cárie radicular, o que poderá indicar uma redução da sua representatividade na composição microbiana da lesão.

Em contrapartida, *A. naeslundii* apresentou uma classificação baixa no biofilme saudável e alta na amostra da lesão, sugerindo um aumento da sua prevalência em ambiente cariado. Por sua vez, *S. mitis* manteve uma classificação moderada em ambas as amostras, evidenciando uma presença relativamente constante nos dois nichos ecológicos.

Estes dados reforçam a ideia de que a composição bacteriana pode variar significativamente entre o biofilme oral saudável e a lesão de cárie radicular, sendo essa variação espécie-dependente.

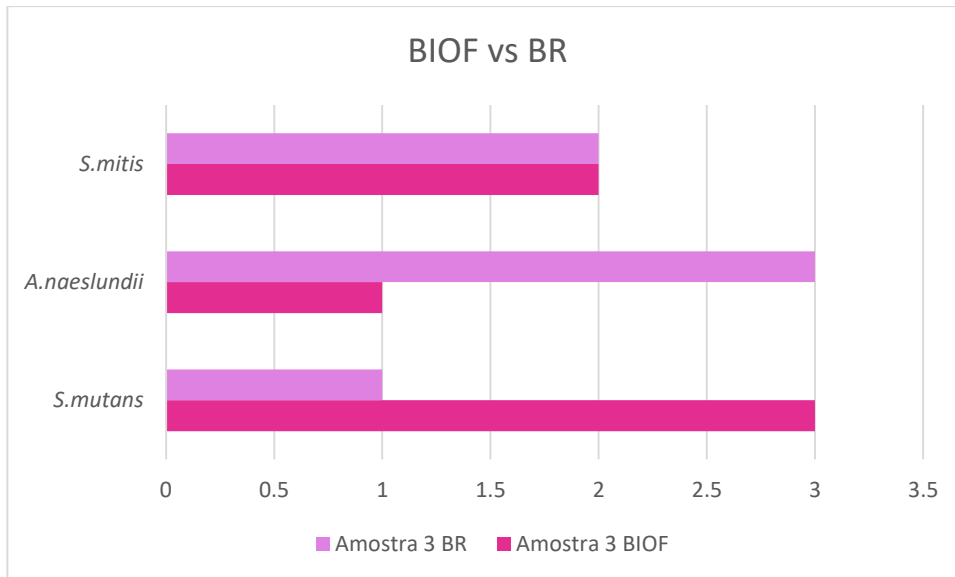


Figura 10 Comparação da classificação bacteriana entre biofilme oral e cárie radicular – Amostra 3

Na Figura 11, relativa à Amostra 4, observa-se que as classificações da carga bacteriana foram idênticas entre o biofilme saudável e a lesão de cárie radicular para todas as espécies analisadas. *S. mutans* e *A. naeslundii* apresentaram classificações baixas, enquanto *Streptococcus mitis* foi classificado como tendo carga bacteriana alta em ambas as amostras.

Este perfil sugere uma relativa estabilidade da composição bacteriana entre os dois nichos ecológicos neste indivíduo, sem variações significativas nas espécies avaliadas. A manutenção de uma carga elevada de *S. mitis* tanto no biofilme saudável como na lesão poderá refletir uma característica individual do microbioma oral.

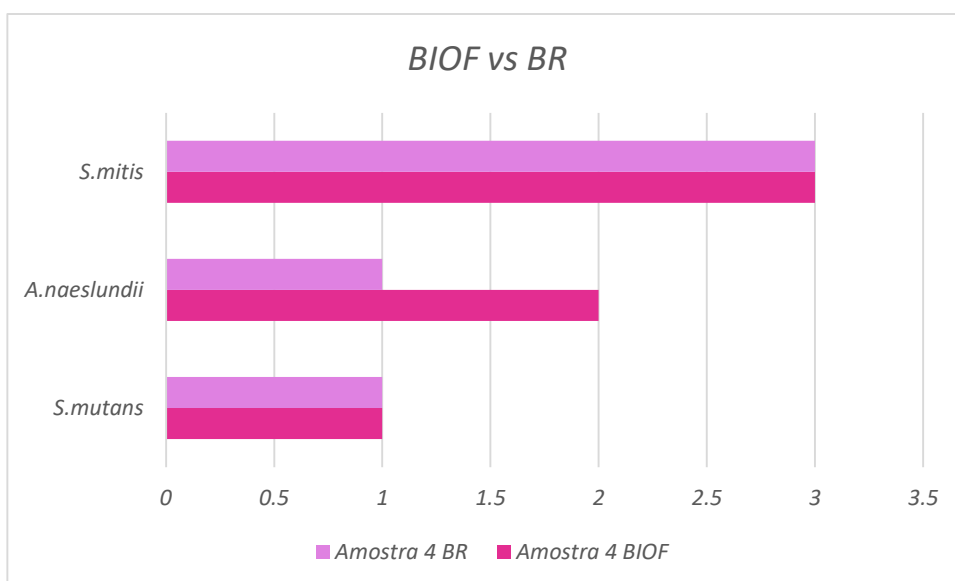


Figura 11 Comparação da classificação bacteriana entre biofilme oral e cárie radicular – Amostra 4

A Figura 12 revela que, na Amostra 5, não se verificaram diferenças nas classificações da carga bacteriana entre o biofilme oral saudável e a lesão de cárie radicular. As três espécies analisadas *S. mutans*, *A. naeslundii* e *S. mitis* apresentaram classificações altas em ambas as amostras.

Este padrão uniforme pode refletir uma colonização bacteriana semelhante nos dois nichos ecológicos analisados neste indivíduo, sugerindo que, neste caso específico, a presença de cárie radicular não foi acompanhada por alterações expressivas nas espécies avaliadas.

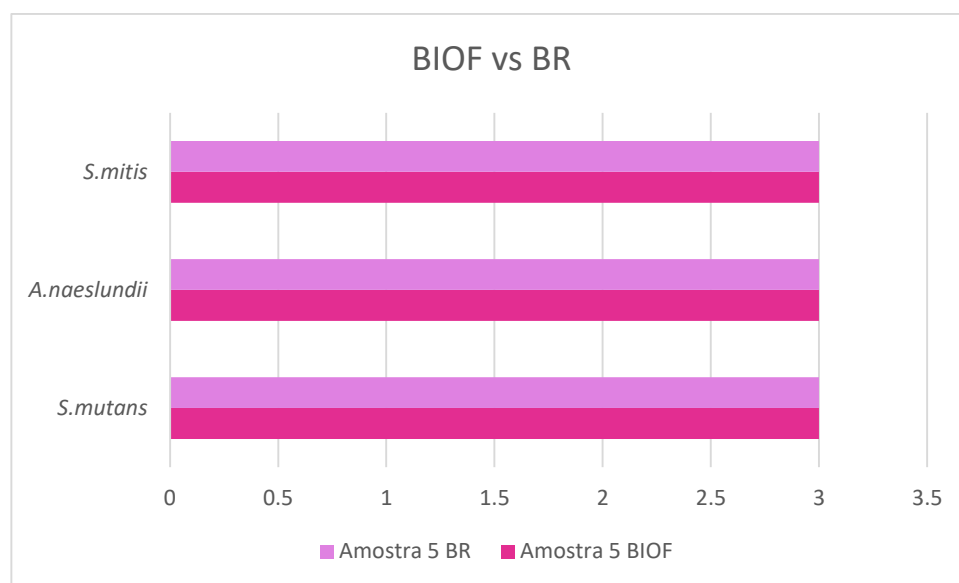


Figura 12 Comparação da classificação bacteriana entre biofilme oral e cárie radicular – Amostra 5

Na Figura 13, observam-se diferenças significativas entre o biofilme saudável e a lesão de cárie radicular na Amostra 6. *S. mutans* apresentou uma classificação alta na lesão e baixa no biofilme saudável, indicando um aumento acentuado da sua presença na área afetada. *A. naeslundii* também demonstrou um padrão semelhante, com classificação moderada no biofilme oral e alta na lesão.

Por outro lado, *S. mitis* manteve a classificação em ambas as amostras (moderada), o que poderá refletir uma estabilidade da sua presença, independentemente do estado patológico do tecido.

Estes resultados sugerem uma possível associação entre *S. mutans* e *A. naeslundii* e o desenvolvimento da cárie radicular nesta amostra, reforçando o seu potencial papel na progressão da doença.

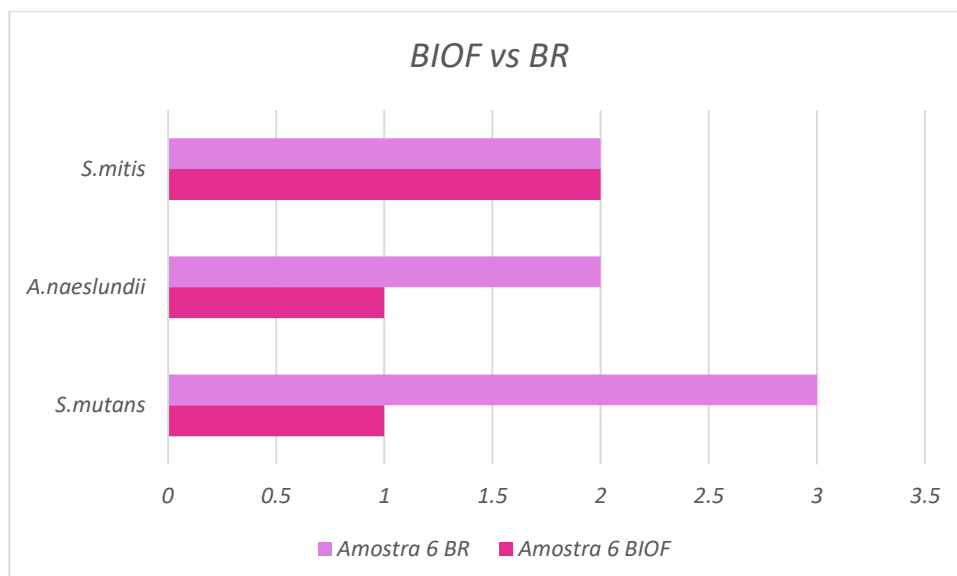


Figura 13 Comparação da classificação bacteriana entre biofilme oral e cárie radicular – Amostra 6

Na Amostra 7, as três espécies analisadas apresentaram classificações superiores no biofilme saudável em comparação com a lesão de cárie radicular. *S. mutans* e *A. naeslundii* foram classificadas como altas no biofilme oral e moderadas na lesão. *S. mitis*, por sua vez, apresentou uma diferença mais acentuada, passando de alta no biofilme saudável para baixa na lesão (Figura 14).

Este perfil aponta para uma diminuição global da carga bacteriana destas espécies na lesão ativa, o que poderá refletir uma ruptura do equilíbrio microbiano e eventual substituição por outras bactérias associadas à progressão da cárie radicular.

Contudo, é importante referir que esta amostra apresentou um valor anômalo na quantificação total de DNA, o que poderá indicar uma falha técnica ou uma recolha com material insuficiente. Por esse motivo, os resultados microbiológicos desta amostra devem ser interpretados com cautela, considerando a possibilidade de viés introduzido por limitações na colheita ou no processamento laboratorial.

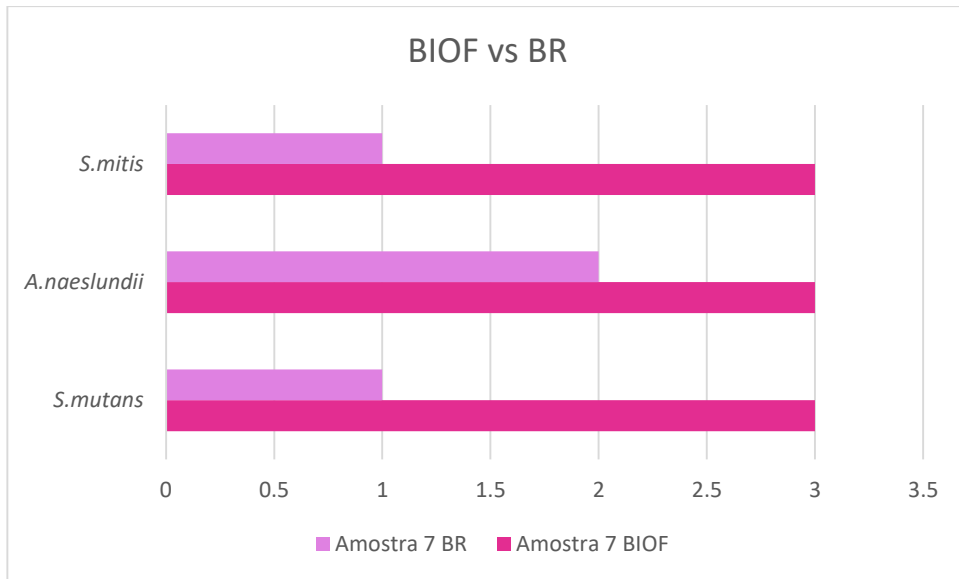


Figura 14 Comparação da classificação bacteriana entre biofilme oral e cárie radicular – Amostra 7

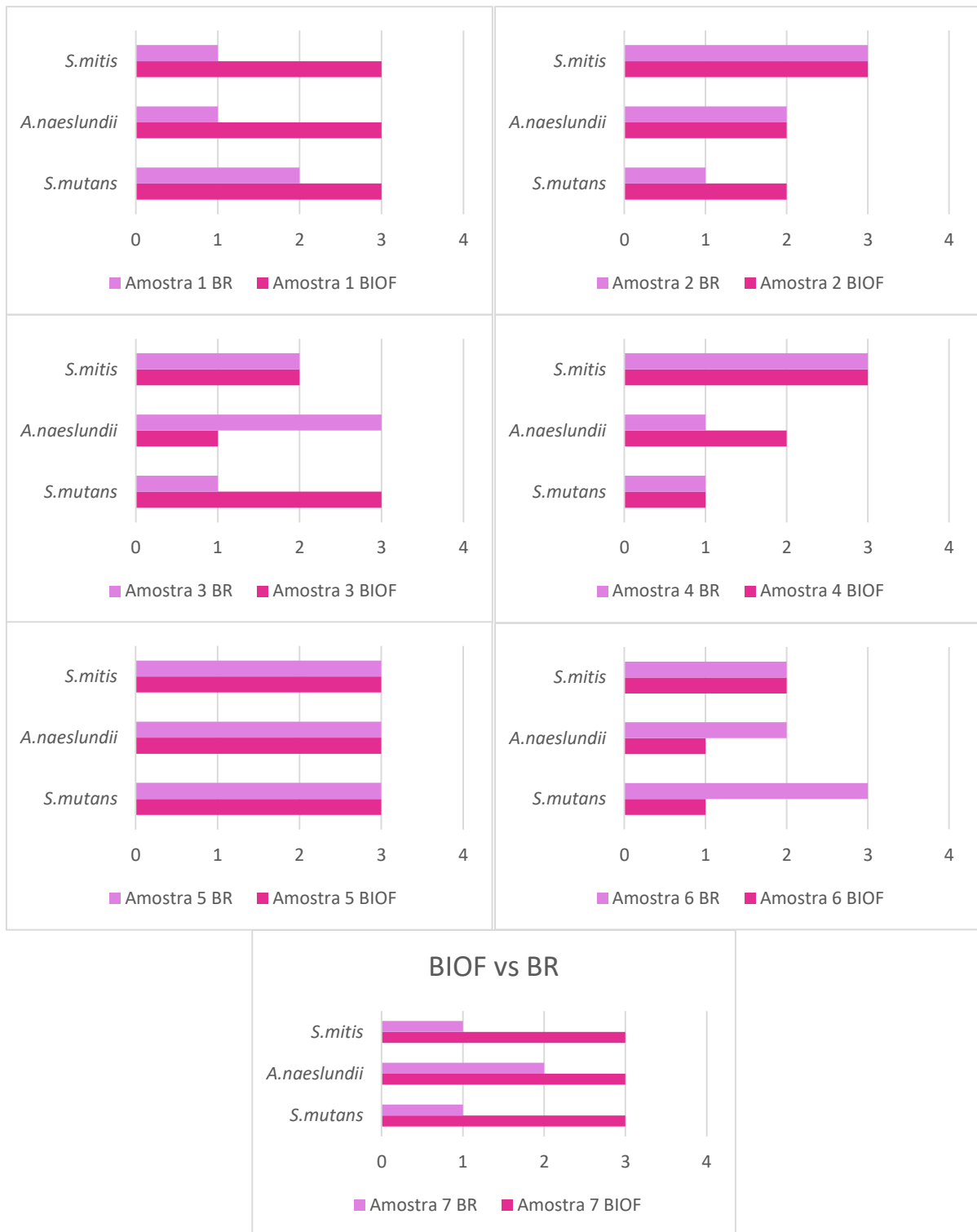


Figure 15 Visão comparativa dos resultados obtidos para todas as amostras (1 a 7) apresentadas nesta secção, com o objetivo de facilitar a análise conjunta.

3.2. Recalls

No presente estudo, não foi possível considerar as amostras de *recalls*, uma vez que não existiam dados suficientes para uma comparação significativa.

4. Discussão

Nos últimos anos, tem-se assistido a um crescimento significativo no interesse pela compreensão da cárie radicular, particularmente no que diz respeito à sua relação com os fatores comportamentais associados à higiene oral e alimentação. O presente estudo procurou explorar essa realidade numa população idosa, analisando os dados recolhidos através de questionários, exames clínicos e análises microbiológicas. Neste capítulo, discutem-se os principais achados obtidos, relacionando-os com a presença ou ausência de lesões de cárie radicular, com o perfil microbiológico identificado e com as condições clínicas e hábitos individuais de cada participante. O objetivo é compreender melhor em que contextos estas lesões surgem e quais os microrganismos mais frequentemente associados ao seu desenvolvimento.

4.1. Hábitos de higiene oral e a sua influência na cárie radicular

A higiene oral adequada constitui um dos pilares fundamentais na prevenção da cárie radicular, particularmente em adultos mais velhos. Neste estudo, a maioria dos participantes referiu escovar os dentes pelo menos uma vez por dia, embora a escovagem duas vezes por dia tenha sido mencionada por uma minoria. Esta frequência revela-se inferior ao recomendado por Chan *et al.*, que indicam que tanto a regularidade como a técnica de escovagem estão diretamente associadas à redução da acumulação de biofilme, com especial impacto nas superfícies radiculares expostas. Segundo os mesmos autores, mesmo uma escovagem diária com dentífrico fluoretado pode exercer um efeito protetor, mas a eficácia preventiva aumenta substancialmente quando realizada duas vezes ao dia com técnica adequada (25).

Por outro lado, a utilização de fio dentário e de colutórios fluoretados revelou-se muito reduzida entre os participantes deste estudo, sendo reportada apenas por uma pequena parte da amostra. A higiene interdental tem sido apontada como um fator essencial na prevenção da cárie radicular, uma vez que estas lesões tendem a ocorrer em zonas de difícil acesso à escovagem convencional. De acordo com o estudo conduzido por Shi *et al.*, baseado nos dados do NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*), indivíduos que realizavam higiene interproximal quatro ou mais vezes por semana apresentavam uma redução de aproximadamente 40 % no risco de cárie radicular não tratada. Estes resultados reforçam a importância de incentivar hábitos de higiene oral que complementem a escovagem, sobretudo em adultos mais velhos (26).

Em comparação com estudos recentes realizados em adultos mais velhos, observa-se uma tendência clara para a diminuição da frequência e da qualidade da higiene oral com o avanço da idade. De acordo com Schwendicke *et al.*, diversos fatores, como a redução da destreza manual, a dependência de terceiros para a higiene diária, a menor motivação e o desconhecimento de práticas corretas, contribuem significativamente para a acumulação de biofilme e, conseqüentemente, para o aumento da prevalência de cárie radicular. Os autores sublinham ainda que esta condição tende a agravar-se quando está associada à presença de xerostomia e a doenças sistêmicas crônicas, fatores comuns na população geriátrica (27).

Adicionalmente, Gluzman *et al.*, destacam a relevância de estratégias preventivas não farmacológicas na gestão da cárie radicular, salientando a eficácia da escovagem supervisionada, do uso de escovas elétricas e da aplicação tópica de fluoretos. Quando aplicadas de forma consistente, estas medidas têm demonstrado um impacto positivo na contenção da progressão das lesões radiculares. No entanto, os autores sublinham que a eficácia destas abordagens depende fortemente do grau de adesão do paciente e da continuidade do acompanhamento educativo, fatores que se tornam particularmente desafiantes em idosos institucionalizados ou com limitações funcionais (28).

4.2. Hábitos alimentares e a ingestão de açúcares

Na presente amostra, 26 dos 40 participantes relataram consumir alimentos açucarados com regularidade, enquanto 14 indicaram não o fazer. Esta elevada prevalência de ingestão de açúcares sugere uma exposição frequente a substratos fermentáveis na cavidade oral, condição que pode favorecer a atividade de microrganismos acidogênicos e acelerar a desmineralização das superfícies dentárias radiculares. Segundo Moynihan *et al.*, a ingestão frequente de açúcares livres é um dos fatores de risco mais bem estabelecidos para o desenvolvimento de lesões de cárie, particularmente em indivíduos com exposição radicular. Os autores reforçam ainda que a limitação da ingestão de açúcares a menos de 10 % da energia total diária está associada a uma redução significativa do risco de cárie, sendo recomendada como meta nutricional preventiva em saúde oral (29).

No que diz respeito à ingestão de açúcares entre as refeições principais, apenas 7 dos 40 participantes confirmaram esse hábito, enquanto a maioria (n=20) referiu não consumir alimentos açucarados nos lanches. Apesar de a frequência ser relativamente baixa, a ingestão de açúcares fora das refeições principais tem sido descrita como especialmente prejudicial, uma vez que muitas dessas ingestões ocorrem sem a estimulação salivar associada à mastigação completa, o que favorece a queda do pH na cavidade oral. De acordo com Moynihan *et al.*, mesmo pequenas exposições repetidas a açúcares ao longo do dia, independentemente da quantidade, estão fortemente associadas a um aumento do risco de cárie, sobretudo quando o intervalo entre as ingestões é curto e o tempo de recuperação do pH para valores neutros é insuficiente para permitir a remineralização (30).

Ao analisar os dados por faixas etárias (Tabela 6), verificou-se que os grupos entre os 75 e os 94 anos foram os que mais frequentemente relataram o consumo de alimentos açucarados. Esta tendência poderá refletir um maior grau de autonomia alimentar nestas idades, em contraste com os participantes com mais de 95 anos, entre os quais se registou menor frequência de ingestão deste tipo de alimentos. Este padrão está em consonância com as observações de Chan *et al.*, que referem que a autonomia funcional, as preferências alimentares individuais e o nível de dependência no apoio às refeições estão fortemente associados às escolhas alimentares dos idosos, incluindo a frequência de consumo de produtos ricos em açúcares (31).

4.3. Fatores que contribuem para a acumulação de placa bacteriana

A análise dos dados revelou que 19 dos participantes apresentava exposição radicular decorrente de recessão gengival (Tabela 7). A exposição das superfícies radiculares cria um ambiente particularmente vulnerável à cárie, uma vez que estas estruturas têm menor conteúdo mineral e degradam-se mais rapidamente quando expostas ao biofilme cariogénico. Estudos internacionais indicam que a recessão gengival é um fator fortemente associado à prevalência de cárie radicular, com risco aumentado em adultos mais velhos, especialmente quando combinado com fatores como higiene oral deficiente Chen *et al.*, (32).

Relativamente às próteses removíveis, cerca de (n=19) dos participantes referiu utilizar prótese parcial removível (Tabela 7). A presença destas próteses pode

dificultar a higiene adequada, criando zonas de retenção de placa junto aos dentes remanescentes, e promovendo acúmulo de biofilme nas junções entre dente e prótese. Esta potencialização do risco está bem documentada: o uso de próteses removíveis tem sido associado a maior incidência de carie radicular e doença periodontal, especialmente em adultos mais idosos que mantêm dentes naturais Zhang *et al.*, (33).

Adicionalmente, o número reduzido de dentes, foi outro fator importante. Embora a evidência seja mista alguns estudos mostram que ter mais dentes pode significar mais superfícies expostas ao risco, outros sugerem que poucos dentes indicam falta de mastigação eficiente e higiene prejudicada um valor constante é que tanto a redução drástica como a manutenção de muitos dentes sem cuidados adequados estão associados a risco aumentado de cárie radicular Ritter *et al.*, (17).

4.4. Fluxo salivar e xerostomia

Na presente amostra, 62,5 % dos participantes encontravam-se medicados com fármacos reconhecidos como potencialmente xerogênicos, tais como antidepressivos, ansiolíticos, opioides e broncodilatadores (Tabela 8). Estes medicamentos são frequentemente prescritos em contexto geriátrico e associados a uma diminuição significativa do fluxo salivar. A literatura reforça esta associação, demonstrando que a prevalência de xerostomia aumenta progressivamente com o número e o tipo de medicamentos tomados, afetando negativamente a saúde oral e sistêmica Thomson *et al.*, (34).

A relação entre medicação e idade é particularmente evidente nos dados recolhidos: no grupo etário dos 85–94 anos, 91,6 % tomavam pelo menos um medicamento com efeito potencial sobre o fluxo salivar. Em contraste, apenas 11 % dos participantes entre os 65–74 anos apresentavam esse perfil. Esta tendência é corroborada por estudos que demonstram que o envelhecimento por si só não determina a hipossalivação é a polimedicação associada à idade que exerce o principal efeito sobre o fluxo salivar Minagi *et al.*, (35).

A hipossalivação, induzida ou agravada pela medicação, tem consequências diretas na progressão da cárie radicular. A redução do fluxo salivar compromete a limpeza mecânica, diminui o efeito tampão do pH e reduz a disponibilidade de iões

protetores, criando um ambiente ideal para adesão bacteriana em superfícies radiculares expostas. Revisões sistemáticas confirmam que a xerostomia, quando não controlada, está fortemente associada a um risco aumentado de cárie em adultos idosos Vieira *et al.*, (3).

4.5. Análise do pH da saliva

Relativamente ao pH salivar, foram analisados apenas os 23 participantes. Verificou-se que 6 desses indivíduos apresentavam valores de pH inferiores a 6,5, enquanto os restantes 17 tinham pH igual ou superior a esse valor (Figura 4). Esta predominância de pH mais ácido entre os participantes com cárie ativa poderá refletir um ambiente oral desfavorável à remineralização, propício à progressão das lesões. De acordo com Afonso *et al.*, valores de pH salivar abaixo de 6,5 estão associados a um aumento do risco de desmineralização da dentina, sendo considerados um marcador precoce de desequilíbrio na homeostasia oral (36).

A dentina possui um pH crítico mais alto do que o esmalte, aproximadamente 6,2–6,4 em comparação com 5,5 para o esmalte, o que implica que ambientes salivares com pH próximo de 6,5 são especialmente prejudiciais às superfícies radiculares expostas. De acordo com Pattem *et al.*, esta sensibilidade da dentina reforça a importância da monitorização do pH salivar como componente essencial na avaliação de risco para cárie radicular (37).

Por último, existe uma relação clara entre pH salivar, ingestão de açúcares e fluxo salivar. Moynihan *et al.* demonstram que exposições repetidas a açúcares sem aumentos no fluxo salivar atrasam a recuperação do pH, prolongando os períodos de acidez salivar e favorecendo a desmineralização da dentina radicular. Este fenómeno revela-se mais comum em contextos de hipossalivação, situação observada em grande parte da amostra (29).

4.6. Perfil microbiológico da cárie radicular vs biofilme saudável

Observámos que nas amostras (Amostras 1, 2 e 7), a carga bacteriana total era elevada no biofilme saudável em comparação com as lesões. Esta redução na abundância bacteriana nas lesões de cárie radicular pode refletir um processo de disbiose, em que espécies comensais são substituídas por grupos acidotolerantes.

Estudos demonstram que ambientes ácidos promovem esta seleção microbiana, associada à progressão da carie radicular (38–40).

Em contraste, a Amostra 6 apresentaram carga elevada de *S. mutans* e *A. naeslundii*, reforçando o papel destas espécies na fase ativa da doença. *S. mutans* destaca-se pela sua acidogenicidade e tolerância ao baixo pH, sendo considerada chave nos estádios iniciais e avançados de cárie. Por sua vez, de Oliveira *et al.* mostraram que *A. naeslundii* colabora na formação de biofilmes dual-espécie com *S. mutans*, sugerindo ação sinérgica na patogénese (41,42).

Relativamente a *S. mitis*, observou-se uma prevalência mais estável entre os nichos saudável e lesionado, sem variações expressivas na carga bacteriana. Esta constância sugere um comportamento ecológico resiliente e típico de uma espécie comensal persistente no microbioma oral. O estudo de Engel *et al.*, disponível em PDF, descreve *S. mitis* como uma das espécies pioneiras e dominantes no biofilme oral saudável, mantendo a sua presença mesmo em condições de disbiose inicial, como no início da carie radicular (43).

Estes resultados reforçam a ideia de que o perfil microbiológico da cárie radicular é altamente heterogéneo e influenciado por fatores individuais, locais e sistémicos. Assim, a simples presença de determinadas espécies não é, por si só, indicativa de atividade patológica, sendo necessário considerar a sua abundância relativa e o contexto ecológico em que se inserem. Como demonstrado por Zaura *et al.*, abordagens quantitativas como a qRT-PCR permitem uma caracterização mais precisa da composição bacteriana, fornecendo dados relevantes para compreender a transição de um biofilme saudável para um biofilme patogénico (44–46).

4.7. Interpretação das variações interindividuais

Os resultados deste estudo revelaram grande variabilidade entre indivíduos quanto à composição e carga bacteriana do biofilme saudável e das lesões de cárie radicular. Enquanto algumas amostras evidenciaram uma diminuição acentuada da carga bacteriana nas lesões (Amostras 1, 2 e 7), noutras observou-se um aumento significativo de espécies cariogénicas na lesão (Amostra 6). Estas discrepâncias podem resultar de diversos fatores individuais, evolução da lesão, estado imunitário, uso de fármacos e maturação do biofilme. Estudos como Nearing *et al.*, mostram que,

mesmo em condições clínicas semelhantes, o microbioma oral pode variar bastante entre indivíduos saudáveis, dificultando a generalização dos perfis microbianos e reforçando a necessidade de abordagens individualizadas (47).

O uso de medicação que reduzem o fluxo salivar, a presença de próteses removíveis, a idade e os hábitos de higiene oral também influenciam a composição microbiana. A hipossalivação reduz a remoção mecânica de bactérias e altera o pH salivar, favorecendo espécies acidogénicas. No estudo de Pei *et al.*, idosos com xerostomia associada a múltiplos fármacos confirma que estes fatores estão ligados a alterações significativas no microbioma oral, incluindo redução da diversidade e maior dominância de espécies específicas, independentemente da presença de lesões patológicas (45).

Estas variações reforçam a importância de uma abordagem personalizada no diagnóstico e no tratamento da cárie radicular. A deteção isolada de espécies potencialmente patogénicas não permite, por si só, inferir a existência de atividade de doença. Torna-se essencial avaliar o perfil microbiano em conjunto com a atividade metabólica das bactérias e os fatores do hospedeiro. Segundo Chen *et al.*, uma análise integrada com recurso a técnicas de sequenciação de alto débito permite distinguir entre colonização comensal e disbiose patológica, contribuindo para uma interpretação mais precisa da composição microbiana oral (18).

4.8. Limitações metodológicas e sugestões para estudos futuros

Este estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas na interpretação dos resultados. A amostra foi limitada em número e heterogénea em termos de origem, integrando indivíduos institucionalizados e utentes de clínica universitária, o que pode ter introduzido variabilidade ambiental e comportamental. De acordo com Schwartz *et al.*, o ambiente, a idade e o estado de saúde sistémico são fatores que influenciam significativamente a composição do microbioma oral em adultos mais velhos, afetando a comparação entre indivíduos mesmo dentro de uma mesma faixa etária (44).

Apesar da amostra inicial do estudo ter incluído 40 participantes, apenas em 7 casos foi possível proceder à análise comparativa entre o biofilme recolhido de superfícies de esmalte saudável e o biofilme da lesão ativa de cárie radicular. Esta

limitação deveu-se, em grande parte, à dificuldade em obter quantidade suficiente de biofilme nas lesões para posterior análise molecular.

Outra limitação refere-se à dificuldade em obter material suficiente de algumas lesões radiculares, levando a amostras com biomassa bacteriana reduzida. Zaura *et al.*, destacam que estudos microbiológicos clínicos devem aplicar boas práticas desde a recolha até à análise, pois a baixa biomassa pode reduzir a fiabilidade dos dados e aumentar o impacto de contaminações reagentes, comprometendo a robustez da análise microbiológica (46).

Para futuros estudos, é essencial aumentar o número de amostras e realizar comparações entre amostras recolhidas anteriormente e novas recolhas algo que pode revelar mudanças ao longo do tempo ou entre diferentes contextos clínicos. O estudo de Zhou *et al.*, demonstra que o microbioma oral, embora geralmente estável, pode apresentar alterações individuais significativas ao longo do tempo, reforçando a relevância de análises longitudinais com amostras sequenciais (48).

Adicionalmente, à luz de bibliografia recente talvez seja importante alterar os alvos microbianos na análise. Os microrganismos utilizados foram os que são descritos na literatura (sobretudo de análises dependentes de cultura) mas estudos de metagenómica mostram que há outros microrganismos que podem ser relevantes no contexto da cárie radicular. Importa portanto conseguir a competência técnica para identificar esses microrganismos e/ou fazer análises de metagenómica na população em estudo para que seja possível compreender as particularidades e especificidades destes indivíduos.

5. Conclusões

O presente estudo procurou responder à pergunta central: O microbioma associado à lesão de cárie radicular difere do microbioma oral recolhido no esmalte saudável do mesmo indivíduo? Os resultados obtidos, apesar de limitados pelo número de amostras e pela heterogeneidade dos participantes, revelaram diferenças relevantes entre os dois nichos ecológicos analisados.

Verificou-se, em várias amostras, uma diminuição da carga bacteriana das espécies *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* e *Streptococcus mitis* nas lesões de cárie radicular, em comparação com o biofilme saudável. No entanto, noutros casos observou-se o padrão inverso, com maior presença de espécies cariogénicas na lesão. Esta variabilidade interindividual sugere que a composição bacteriana do biofilme não é estática e pode refletir tanto o estágio evolutivo da lesão como as características sistémicas e comportamentais do hospedeiro.

A presença mais estável de *S. mitis* em ambos os nichos pode indicar o seu papel como espécie comensal resiliente, ao passo que a flutuação de *S. mutans* e *A. naeslundii* parece estar mais ligada ao estado de disbiose associado à atividade da cárie radicular. Estes dados reforçam a importância de uma abordagem ecológica ao estudo da cárie, que considere a dinâmica microbiana em vez da simples presença de espécies isoladas.

Do ponto de vista clínico, a possibilidade de recolher biofilme e saliva de forma não invasiva abre portas para uma monitorização mais personalizada do risco de cárie radicular em populações idosas. A integração de dados microbiológicos com fatores clínicos e comportamentais poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias preventivas mais eficazes e ajustadas às necessidades individuais.

Embora os resultados devam ser interpretados com cautela, este trabalho representa um contributo inicial importante para a compreensão da ecologia microbiana da cárie radicular. Estudos futuros com amostras mais alargadas e recolhas longitudinais permitirão validar e aprofundar estas observações, aproximando a medicina dentária de uma abordagem mais preventiva, personalizada e baseada na ciência do microbioma.

6. Bibliografia

1. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 May 25;3.
2. Peres MA, Macpherson LMD, Weyant RJ, Daly B, Venturelli R, Mathur MR, et al. Oral diseases: a global public health challenge. Vol. 394, *The Lancet*. Lancet Publishing Group; 2019. p. 246–60.
3. Vieira AR, Gati D. Elderly at greater risk for root caries: A look at the multifactorial risks with emphasis on genetics susceptibility. *International Journal of Dentistry*. 2011. p. 1–6.
4. Tonetti MS, Bottenberg P, Conrads G, Eickholz P, Heasman P, Huysmans MC, et al. Dental caries and periodontal diseases in the ageing population: call to action to protect and enhance oral health and well-being as an essential component of healthy ageing – Consensus report of group 4 of the joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 2017 Mar 1;44:S135–44.
5. Calado R, Ferreira CS, Nogueira P, Ribeiro De Melo P. III Estudo Nacional de Prevalência das Doenças Orais. Lisboa; (DGS) 2015.
6. Warreth A. *Dental Caries and Its Management*. Vol. 2023, *International Journal of Dentistry*. Hindawi Limited; 2023. p. 1–15.
7. Huang B, Stewart CA, McCulloch CA, Santerre JP, Cvitkovitch DG, Finer Y. *Streptococcus mutans* Proteases Degrade Dentinal Collagen. *Dent J (Basel)*. 2022 Dec 1;10(12):1–13.
8. Kaidonis JA. Tooth wear: The view of the anthropologist. *Clin Oral Investig*. 2008;12(SUPPL.1):21–6.
9. Takenaka S, Edanami N, Komatsu Y, Nagata R, Naksagoon T, Sotozono M, et al. Periodontal pathogens inhabit root caries lesions extending beyond the gingival margin: a next-generation sequencing analysis. *Microorganisms*. 2021 Nov 1;9(11):1–12.
10. Baty JJ, Stoner SN, Scofield JA. Oral Commensal Streptococci: Gatekeepers of the Oral Cavity. Vol. 204, *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology; 2022. p. 1–18.
11. Bostanghadiri N, Kouhzad M, Taki E, Elahi Z, Khoshbayan A, Navidifar T, et al. Oral microbiota and metabolites: key players in oral health and disorder, and microbiota-based therapies. Vol. 15, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media SA; 2024. p. 1–16.
12. Gondo T, Hiraishi N, Takeuchi A, Moyes D, Shimada Y. Comparative analysis of microbiome in coronal and root caries. *BMC Oral Health*. 2024 Dec 1;24(1):1–9.
13. Tang X, Kudo Y, Baker JL, Labonte S, Jordan PA, McKinnie SMK, et al. Cariogenic *Streptococcus mutans* Produces Tetramic Acid Strain-Specific Antibiotics That Impair Commensal Colonization. *ACS Infect Dis*. 2020 Apr 10;6(4):563–71.
14. Abram AM, Szewczyk MM, Park SG, Sam SS, Eldana HB, Koria FJ, et al. A Co-Association of *Streptococcus mutans* and *Veillonella parvula/dispar* in Root Caries Patients and In Vitro Biofilms. *Infect Immun*. 2022 Oct 1;90(10):1–17.
15. Kressirer CA, Smith DJ, King WF, Dobeck JM, Starr JR, Tanner ACR. *Scardovia wiggisiae* and its potential role as a caries pathogen. Vol. 59, *Journal of Oral Biosciences*. Japanese Association for Oral Biology; 2017. p. 135–41.
16. Xu GY, Zhao IS, Lung CYK, Yin IX, Lo ECM, Chu CH. *Frontiers of Global Research Trend on Root Caries: A Bibliometric Analysis*. *International Dental Journal*. Elsevier Inc.; 2024. p. 1197–204.

17. Ritter A V, Shugars DA, Bader JD. Root Caries Risk Indicators: A Systematic Review of Risk Models NIH Public Access. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2010;38(5):383–97.
18. Chen H, Jiang W. Application of high-throughput sequencing in understanding human oral microbiome related with health and disease. *Front Microbiol.* 2014 Oct 13;5(SEP):1–6.
19. Preza D, Olsen I, Willumsen T, Boches SK, Cotton SL, Grinde B, et al. Microarray analysis of the microflora of root caries in elderly. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 2009 May;28(5):509–17.
20. Usuga-Vacca M, Marquez-Ortiz RA, Castellanos JE, Martignon S. Association of Root Biofilm Bacteriome with Root Caries Lesion Severity and Activity. *Caries Res.* 2024 Feb 1;58(1):39–48.
21. Gupta M, Gugnani N, Pandit I. International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): A New Concept. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2011 Aug;4(2):93–100.
22. Dikmen B. ICDAS II CRITERIA (INTERNATIONAL CARIES DETECTION AND ASSESSMENT SYSTEM). *J Istanbul Univ Fac Dent.* 2015 Oct 21;49(3):63.
23. Sánchez-Pérez L, Irigoyen-Camacho ME, Molina-Frechero N, Zepeda-Zepeda M. Fissure depth and caries incidence in first permanent molars: A five-year follow-up study in schoolchildren. *Int J Environ Res Public Health.* 2019 Oct 1;16(19):1–10.
24. Bakker MH, de Smit MJ, Valentijn A, Visser A. Oral health assessment in institutionalized elderly: a scoping review. *BMC Oral Health.* 2024 Dec 1;24(1):1–17.
25. Chan AKY, Tamrakar M, Jiang CM, Lo ECM, Leung KCM, Chu CH. A systematic review on caries status of older adults. Vol. 18, *International Journal of Environmental Research and Public Health.* MDPI; 2021. p. 1–15.
26. Shi L, Zhu Z, Tian Q, He L. Association of Interdental Cleaning and Untreated Root Caries in Adults in the United States of America. *Int Dent J.* 2023 Dec 1;73(6):819–27.
27. Paris S, Banerjee A, Bottenberg P, Breschi L, Campus G, Doméjean S, et al. How to Intervene in the Caries Process in Older Adults: A Joint ORCA and EFCD Expert Delphi Consensus Statement. Vol. 54, *Caries Research.* S. Karger AG; 2020. p. 459–65.
28. Gluzman R, Katz R V., Frey BJ, McGowan R. Prevention of root caries: A literature review of primary and secondary preventive agents. Vol. 33, *Special Care in Dentistry.* 2013. p. 133–40.
29. Moynihan PJ, Kelly SAM. Effect on caries of restricting sugars intake: Systematic review to inform WHO guidelines. Vol. 93, *Journal of Dental Research.* 2014. p. 8–18.
30. Moynihan P. Sugars and dental caries: Evidence for setting a recommended threshold for intake. Vol. 7, *Advances in Nutrition.* American Society for Nutrition; 2016. p. 149–56.
31. Chan AKY, Tsang YC, Jiang CM, Leung KCM, Lo ECM, Chu CH. Diet, Nutrition, and Oral Health in Older Adults: A Review of the Literature. Vol. 11, *Dentistry Journal.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023. p. 1–14.
32. Chen W, Zhu T, Zhang D. The prevalence and common risk indicators of root caries and oral health service utilization pattern among adults, a cross-sectional study. *PeerJ.* 2023 Nov 22;11:1–16.

33. Zhang J, Sardana D, Wong MCM, Leung KCM, Lo ECM. Factors Associated with Dental Root Caries: A Systematic Review. Vol. 5, JDR Clinical and Translational Research. SAGE Publications Ltd; 2020. p. 13–29.
34. Thomson WM, Smith MB, Ferguson CA, Moses G. The Challenge of Medication-Induced Dry Mouth in Residential Aged Care. *Pharmacy*. 2021 Oct 1;9(4):162.
35. Ostrowska M, Settaf-Cherif L, Kiersztyn J, Ostrowski A, Drewa TA, Adamowicz J, et al. Drug-induced xerostomia and hyposalivation in patients with overactive bladder: a prospective open-label observational study comparing antimuscarinics and β 3-adrenoceptor agonists. *Sci Rep [Internet]*. 2025 Jul 9;15(1):24758. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-025-09720-6>
36. Afonso M, Buzalaf R, Reis Hannas A, Kato MT. Saliva and dental erosion [Internet]. Vol. 493, *J Appl Oral Sci*. 2012. Available from: www.scielo.br/jaos
37. Pattem J, Field J, Waterhouse PJ, German MJ. The dynamic interplay of dietary acid pH and concentration during early-stage human enamel and dentine erosion. *Frontiers in Dental Medicine*. 2022;3:1–13.
38. Mantzourani M, Fenlon M, Beighton D. Association between *Bifidobacteriaceae* and the clinical severity of root caries lesions. *Oral Microbiol Immunol*. 2009 Feb 12;24(1):32–7.
39. Tanner ACR, Kressirer CA, Faller LL. Understanding Caries From the Oral Microbiome Perspective. *J Calif Dent Assoc*. 2016 Jul;44(7):437–46.
40. Mantzourani M, Gilbert SC, Sulong HNH, Sheehy EC, Tank S, Fenlon M, et al. The Isolation of Bifidobacteria from Occlusal Carious Lesions in Children and Adults. *Caries Res*. 2009;43(4):308–13.
41. Spatafora G, Li Y, He X, Cowan A, Tanner ACR. The Evolving Microbiome of Dental Caries. Vol. 12, *Microorganisms*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
42. de Oliveira RVD, Bonafé FSS, Spolidorio DMP, Koga-ito CY, de Farias AL, Kirker KR, et al. Streptococcus mutans and actinomyces naeslundii interaction in dual-species biofilm. *Microorganisms*. 2020 Feb 1;8(2):1–15.
43. Engen SA, Rørvik GH, Schreurs O, Blix IJS, Schenck K. The oral commensal Streptococcus mitis activates the aryl hydrocarbon receptor in human oral epithelial cells. *Int J Oral Sci*. 2017 Sep 1;9(3):145–50.
44. Schwartz JL, Peña N, Kawar N, Zhang A, Callahan N, Robles SJ, et al. Old age and other factors associated with salivary microbiome variation. *BMC Oral Health*. 2021 Oct 4;21(1):1–9.
45. Pei XM, Zhou LX, Tsang MW, Tai WCS, Wong SCC. The Oral Microbial Ecosystem in Age-Related Xerostomia: A Critical Review. Vol. 25, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024. p. 1–25.
46. Zaura E, Pappalardo VY, Buijs MJ, Volgenant CMC, Brandt BW. Optimizing the quality of clinical studies on oral microbiome: A practical guide for planning, performing, and reporting. *Periodontol 2000*. 2021 Feb 1;85(1):210–36.
47. Nearing JT, DeClercq V, Van Limbergen J, Langille MGI. Assessing the Variation within the Oral Microbiome of Healthy Adults. *mSphere*. 2020 Oct 28;5(5):1–20.
48. Zhou X, Shen X, Johnson JS, Spakowicz DJ, Agnello M, Zhou W, et al. Longitudinal profiling of the microbiome at four body sites reveals core stability and individualized dynamics during health and disease. *Cell Host Microbe*. 2024 Apr 10;32(4):506-526.e9.

7. Anexos

Anexo 1 – Consentimento informado



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

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

Título do estudo: Microbioma Oral Humano

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

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

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

Vantagens e riscos na participação solicitada: Este estudo não envolve procedimentos que não se enquadrem na prática clínica normal nem pretende testar novos produtos ou medicamentos. A participação neste estudo é totalmente voluntária e anónima, não acarretando quaisquer custos. É fundamental que perceba que pode retirar o seu consentimento em qualquer etapa do estudo. Não precisa para tal de apresentar explicações aos responsáveis pela investigação, nem terá qualquer prejuízo, assistenciais ou outros, caso não queira participar. Ao decidir participar pode colocar todas as questões que considerar necessárias para o seu esclarecimento. Mesmo depois de assinado o documento de consentimento esclarecido e informado, pode em qualquer altura solicitar a sua exclusão do estudo. Para tal basta contactar o investigador principal cuja identificação está no fim deste formulário. A sua contribuição com dados e amostras para este estudo permitirá conhecer melhor a relação entre os microrganismos da cavidade oral e a saúde dos indivíduos. Este estudo não é financiado e a participação não implica qualquer remuneração ou encargo económico para o participante. Os participantes colaboram de forma voluntária, livre e esclarecida.

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

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

Medidas de Partilha de Benefícios:

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

Recolha de Dados:

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

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

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

Responsável pela Investigação:

Maria José Serol de Brito Correia

Tlm: 919871348

Email: mcorreia@ucp.pt

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

Data: ____/____/____

Assinatura do Investigador Principal: _____

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

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

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

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

Nome do participante no estudo: _____

Assinatura: _____

SE NÃO FOR O PRÓPRIO A ASSINAR POR IDADE OU INCAPACIDADE

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

Nome: _____

BI/CC nº: _____

Data ou validade ____ / ____ / ____

Grau de parentesco ou tipo de representação: _____

Assinatura: _____

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

Data Protection Officer - UCP

Dra. Frederica Campos de Carvalho

Contacto telefónico: +351 217214179

E-mail: compliance.rgpd@ucp.pt

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

Maria José Serol de Brito Correia

Tlm: 919871348

Email: mcorreia@ucp.pt

Anexo 2 – Questionário



UNIVERSIDADE CATÓLICA
PORTUGUESA
VISEU



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

Questão 4.

Amostragem

- 1º amostragem
- Amostras follow-up

Questão 5.

Local de amostragem

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

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



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

D- Informações sobre a medicação

Questão 18.

Faz algum tipo de tratamento médico ou medicação com regularidade?

- Sim
- Não
- Não sabe



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

G- Hábitos - Alimentares

Questão 31.

Utiliza açúcar nos lanches entre refeições?

- Sim
- Não
- Não sabe

Questão 32.

Número de lanches com açúcar entra as refeições:

- 1x
- 2x
- 3x
- 4x
- Mais que 4x

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

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



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 clorhexidina 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 50.

Sente que a sua boca esta "seca"?

- Sim
- Não

Questão 51.

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

- Sim
- Não

Questão 54. Condição atual de cada elemento dentário

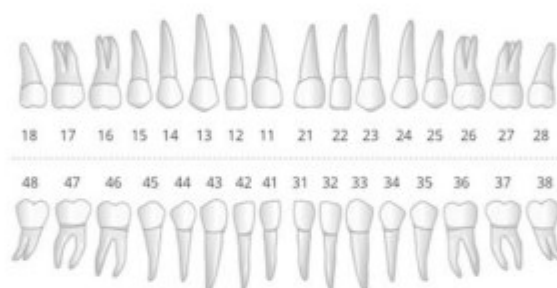
	Presente	Ausente	Hígido	Cariado	Restaurado	Implante	Raiz residual	Desvitalizado
11								
12								
13								
14								
15								
16								
17								
18								
21								
22								
23								
24								
25								
26								
27								
28								
31								
32								
33								
34								
35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

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



37									
38									
41									
42									
43									
44									
45									
46									
47									
48									

Questão 55. ICDAS



Odontograma

- 1º - 18º
- 1º - 17º
- 1º - 16º
- 1º - 15º
- 1º - 14º
- 1º - 13º
- 1º - 12º



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



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

Questão 56. Lesões de cárie

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



Questão 57.

Profundidade de sulcos e fissuras?

- Rasos
- Profundos

Questão 58.

Exposição radicular

- Sim
- Não

K- Saúde oral – Próteses dentárias

Questão 64.

Utiliza prótese dentária?

- Sim
- Não

Questão 65.

Em qual das arcadas?

- Superior
- Inferior
- Ambas

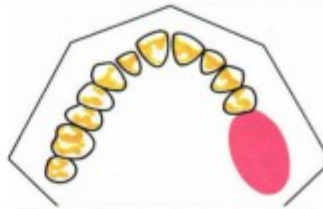
Questão 66. Qual o tipo de prótese?

	Total	Parcial acrílica	Parcial esquelética
Superior			
Inferior			



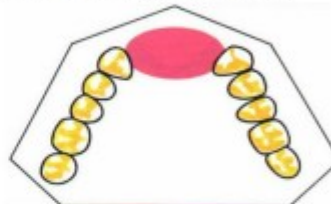
Questão 67. A que tipo de classificação de Kennedy corresponde a prótese que utiliza?

- 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 68.

Quando utiliza a(s) prótese(s)?

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

Questão 69.

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



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

Anexo 3 – Protocolo Laboratorial

QPCR protocol for absolute quantification

Quantification of total bacterial load:

Standard Curve:

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

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

Plasmid DNA concentration:

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

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

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

16S rRNA gene: annealing temperature 61.5 °C

10 µL final reaction mix:

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

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

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

DNA: 1 ng per PCR reaction

Nuclease-free water up to 10 µL

		16S rRNA gene	
95 °C 40	Forward Primer	926F AAACTCAAAGAATTGACGG	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)

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

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:

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

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

Vector size: 2,88 kb

Vector concentration: 50 ng/µL

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 - 10x5ML, 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.

Anexo 4 – Protocolo RT-qPCR

- **Protocolo da Extração do DNA microbioano**

1. Adicionar 50 μL de saliva com 50 μL da solução de extração de DNA Quick Extract (QE) Buffer (Lucigen QE0905T48);
2. Fazer vortex por 10 segundos;
3. Transferir os tubos para a palca de aquecimento a 65 °C e incubar por 6 minutos;
4. Fazer vortex;
5. Transferir os tubos para a palca de aquecimento a 98 °C e incubar por 2 minutos;
6. Colocar os tubos no gelo;
7. Quantificar o DNA;
8. Armazenar o DNA a -20 °C ou a -80 °C para períodos mais longos.

- **Quantificação do DNA extraído**

- Equipamento: Placa μDrop (Thermo Scientific™).
- Volume analisado: 2–10 μL .
- Parâmetros avaliados:
 - Concentração de DNA (ng/ μL)
 - Pureza: A260/A280 e A260/A230
- Método: espectrofotometria.

Preparação dos poços na placa μDrop :

- Poço 1: 2 μL de QuickExtract Buffer (sem DNA)
- Demais poços: 2 μL de cada amostra extraída

- **Diluição das Amostras de DNA**

- Objetivo: obter uma concentração final de 40 ng/ μL (para que cada poço da microplaca contenha 2 ng de DNA em 2 μL).

Fórmulas utilizadas:

- $VDNA = (10 \times 40) / \text{Concentração medida na } \mu\text{Drop}$
- $VH_2O = 40 - VDNA$
- Caso $VDNA < 1$:
 - Realizar diluição 1:10: 1 μL de DNA + 9 μL de H_2O
 - Repetir a medição e novo cálculo com a concentração ajustada

- **Preparação da Curva Padrão**

- Finalidade: quantificação absoluta das espécies bacterianas:
 - *Streptococcus mutans*
 - *Streptococcus mitis*
 - *Actinomyces naeslundii*

- DNA padrão: obtido a partir de DNA plasmídico contendo o gene 16S rRNA de cada bactéria.
- Produzido via protocolo de clonagem e miniprep (NZYtech).
- Diluições decimais feitas em duplicado (7 concentrações padrão não zero).
- Diluições realizadas em série com homogeneização prévia.

- **Reação de qPCR**

Preparação da mistura de PCR (por reação, 10 μL):

- 5 μL de NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2x)
- 0,4 μL de primer forward (0,4 μM final)
- 0,4 μL de primer reverse (0,4 μM final)
- 2 μL da amostra de DNA
- Reações realizadas em duplicado

Montagem da placa de 96 poços:

- 8 μL da master mix em cada poço

- Adicionar:
 - 2 μ L de água para PCR (controle negativo)
 - 2 μ L das 7 diluições padrão
 - 2 μ L das amostras de DNA

Execução da qPCR no Termociclador: BIO-RAD CFX Connect Digital Thermal Cycler (SalivaTec)

Programa de amplificação (real-time):

Etapa	Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
Desnaturação inicial	95 °C	2 min	1
Desnaturação	95 °C	5 seg	40
Anelamento + Extensão	65 °C	20 seg	40

<i>Streptococcus mitis</i>				
	Sequence 5' to 3'	Tm	GC%	Product length
Primer Forward	CCCGAAGTCGGTGAGGT AAC	60.11	60.00	91 bp
Primer Reverse	TCCCAAACGGCTGACTTG TT	60.11	50.00	
<i>Streptococcus mutans</i>				
	Sequence 5' to 3'	Tm	GC%	Product length
Primer Forward	GCCTACAGCTCAGAGAT GCTATTCT	59.70	55.00	178 bp
Primer Reverse	GCCATACACCACTCATGA ATTGA	59.46	57.20	
<i>Actinomyces naeslundii</i>				
	Sequence 5' to 3'	Tm	GC%	Product length
Primer Forward	CGCTGCCGGCGTACATAA	60.58	61.11	110 bp
Primer Reverse	GAAGGGGGCAGGTTACT CAC	60.04	60.00	
16S				
	Sequence 5' to 3'	Tm	GC%	Product length
Primer Forward	AAACTCAAAGAATTGAC GG	60.50	61.10	178 bp
Primer Reverse	CTCACRRCACGAGCTGA C	59.20	58.20	