



CATÓLICA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

VISEU

MICROBIOMA ASSOCIADO À CÁRIE RADICULAR NUMA POPULAÇÃO DE IDOSOS

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

Por:

Joana Catarina Patrão Cunha

Viseu, 2024



CATÓLICA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

UISEU

MICROBIOMA ASSOCIADO À CÁRIE RADICULAR NUMA POPULAÇÃO DE IDOSOS

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

Por:

Joana Catarina Patrão Cunha

Orientador: Professora Doutora Maria José Correia

Coorientadores: Doutora Ana Peixoto Gomes e Doutor Pedro Campos Lopes

Viseu, 2024

Membros do Júri das Provas Públicas

Presidente: Doutora Anna Moura, Professora Associada
(Categoria profissional e Filiação académica)

Arguente: Doutora Cristina Figueiredo, Professora Auxiliar
(Categoria profissional e Filiação académica)

Orientador: Doutora Maria José Correia, Professora Associada
(Categoria profissional e Filiação académica)

Data das provas públicas: 19 / 07 / 2024

Classificação: _____

Validação e confirmação pelos serviços escolares:

___ / ___ / ___

“A vitória sempre foi de quem nunca duvidou dela”

Raul Follerman

Agradecimentos

À minha orientadora **Professora Doutora Maria José Correia**, por todo o conhecimento científico transmitido e pela disponibilidade, compreensão e paciência. Agradeço, ainda, pelo apoio incansável!

À minha coorientadora **Doutora Ana Peixoto Gomes**, pela forma como acompanhou este projeto, pela disponibilidade bem como pelo apoio prestado ao longo deste jornada.

Ao meu coorientador, **Doutor Pedro Campos Lopes**, obrigada por desde o primeiro dia acreditar no meu potencial, pela confiança depositada em mim para a realização deste trabalho, por todos os conselhos e pela disponibilidade!

Ao **SalivaTec**, e em particular, à **Mónica** e à **Marla**, agradeço todo o esforço e dedicação e ajuda na realização deste trabalho.

À **Universidade Católica Portuguesa**, aos **professores** e **funcionários** com quem tive a oportunidade de partilhar estes anos e por quem obtive afeição e respeito.

Aos meus pais, por me permitirem realizar todos os meus sonhos e nunca me deixarem desistir, ajudando sempre a superar os obstáculos enfrentados.

Ao meu irmão e aos meus avós, por todo o carinho e por estarem presentes em todas as minhas conquistas ao longo da vida!

Ao Fernando, por todo o apoio, paciência e amor, e principalmente, por ser o meu porto de abrigo ao longo deste percurso.

À **Petra**, pela amizade, companheirismo e por todo tempo que passámos juntas.

A todos os colegas e amigos que conheci nesta instituição por me acompanharam e apoiaram ao longo destes 5 anos. Em especial, **ao Ricardo** e **à Ivana**, por todos os momentos e experiências que vivemos juntos.

À Mélanie por ter colaborado comigo na recolha de dados.

Aos Diretores dos Lares visitados e da Atividade Sénior e a todo o pessoal auxiliar, pela coloração e disponibilidade nas visitas. Em particular, **aos participantes**, que de forma voluntária demonstraram receptividade para que esta investigação fosse concretizada.

Por fim, a todos os que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho, um enorme obrigado do fundo do coração!

Resumo

Introdução: A cárie radicular é uma doença crónica que está diretamente associada ao envelhecimento. É importante o conhecimento do microbioma associado às lesões de cárie radicular para possibilitar o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas para esta lesão em específico nos idosos.

Objetivos: Caracterizar o microbioma associado à cárie radicular na população idosa, através da quantificação bacteriana do biofilme oral da lesão. Verificar se o índice microbiológico CarioCheck, o qual inclui a quantificação de bactérias cariogénicas e carioprotetoras, tem valor preditivo na cárie radicular nesta população.

Materiais e métodos: Este estudo, que é observacional transversal estando incluído num estudo longitudinal, incluiu 53 pacientes da Clínica Dentária Universitária da Universidade Católica Portuguesa e instituições de acolhimento de idosos com mais de 65 anos. Cada paciente que cumpriu os requisitos necessários para participar nesta investigação foi observado pelos investigadores que recolheram os dados do paciente através da realização de um questionário registado na plataforma *Qualtrics*, de uma avaliação intraoral e da recolha de amostras de saliva, biofilme oral e da lesão radicular.

Resultados: Dos 53 pacientes observados, apenas 16 eram portadores de cárie radicular. A presença de espécies cariogénicas e carioprotetoras na lesão cariosa nas amostras biológicas recolhidas dos pacientes com cárie radicular foi avaliada. Os resultados mostraram que as espécies *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Actinomyces naeslundii* podem ser considerados preditores da cárie radicular dada a elevada carga bacteriana das mesmas nesta lesão. Verificou-se ainda que o índice CarioCheck em desenvolvimento no SalivaTec necessita de modificações para ser aplicado em idosos.

Conclusão: Neste trabalho concretizou-se o objetivo de caracterizar o microbioma da cárie radicular em idosos. Contudo, não se fez o cálculo do índice microbiológico CarioCheck, dado que este questionário não está adaptado para idosos e seria

necessária uma amostra significativamente maior para se poder fazer uma análise comparativa entre indivíduos com cárie radicular e sem cárie radicular com idades e condições de saúde comparáveis.

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

Abstract

Introduction: Root caries is a chronic disease directly associated with aging. Knowledge on the microbiome of root caries lesions is important to enable the development of preventive and therapeutic strategies for this injury specifically in the elderly.

Goal: Characterize the microbiome associated with root caries in the elderly through bacterial quantification of the oral biofilm of the lesion. Verify whether the CarioCheck microbiological index, which includes the quantification of cariogenic and carioprotective bacteria, has predictive value for root caries in this population.

Materials and methods: This study, which is cross-sectional observational and is included in a longitudinal study, included 53 patients from Clínica Dentária Universitária da Universidade Católica Portuguesa and nursing homes. Each patient who met the requirements to participate in this research was observed by researchers who collected the patient's data by completing a questionnaire registered on the Qualtrics platform, an intraoral assessment and the collection of samples of saliva, oral biofilm and biofilm from the root lesion.

Results: Of the 53 patients observed, only 16 had root caries. In these 16 individuals, the presence of cariogenic and carioprotective species in the carious lesion in the biological samples collected was evaluated. The results showed that *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mitis* and *Actinomyces naeslundii* can be considered predictors of root caries given their high bacterial load in this lesion. It was also found that the CarioCheck index being developed at SalivaTec requires modifications to be applied to the elderly.

Conclusion: This work achieved the objective of characterizing the microbiome of root caries in the elderly. However, the CarioCheck microbiological index was not calculated, given that this questionnaire is not adapted for the elderly and a significantly larger sample would be needed to be able to carry out a comparative analysis between

individuals with root caries and those without root caries with comparable ages and health conditions.

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

Índice Geral

Agradecimentos	VII
Resumo	IX
Abstract	XI
Índice de abreviaturas	XV
Índice de tabelas	XVI
Índice de figuras	XVII
1. Introdução	1
1.1. Caracterização da cárie radicular	3
1.2. Cárie radicular na população idosa	3
1.3. Microbioma da cárie radicular.....	4
1.4. Gestão da cárie e o papel do Médico Dentista	6
2. Materiais e métodos	8
2.1. Caracterização do estudo.....	10
2.2. Caracterização da amostra.....	10
2.3. Princípios éticos.....	11
2.4. Treino e calibração.....	11
2.5. Recolha de dados e amostras biológicas	12
2.5.1. Fase 1 – Questionário.....	12
2.5.2. Fase 2 – Exame clínico.....	12
2.5.3. Fase 3 – Recolha de saliva.....	13
2.5.4. Fase 4 – Recolha de biofilme	14
3. Resultados	16
3.1. Caracterização da amostra em estudo	18
3.1.1. Caracterização dos hábitos de higiene oral	19
3.1.2. Caracterização dos hábitos alimentares	20
3.1.3. Caracterização de fatores que predispõem a acumulação de placa bacteriana	21

3.1.4. Caracterização dos fatores associados ao fluxo salivar	22
3.1.5. Caracterização da análise salivar	24
3.1.6. Caracterização de resultados decorrentes da inspeção intraoral	26
3.1.7. Caracterização da análise do biofilme oral e do biofilme da lesão radicular	28
3.1.8. Risco de desenvolver lesões de cárie radicular	31
3.2. <i>Recalls</i>.....	31
4. <i>Discussão</i>.....	32
4.1. Hábitos de higiene oral	34
4.2. Hábitos alimentares	36
4.3. Fatores que contribuem para a acumulação de placa bacteriana	36
4.4. Fatores que afetam o fluxo salivar	37
4.5. Análise do pH da saliva	39
4.6. Quantificação da carga total bacteriana e de espécies cariogénicas e carioprotetoras nas amostras biológicas	39
4.7. Indicadores de doença.....	40
4.8. Classificação relativamente ao risco de desenvolver lesões de cárie radicular	42
4.9. Limitações e perspectivas futuras.....	42
5. <i>Conclusões</i>	45
6. <i>Bibliografia</i>.....	48
7. <i>Anexos</i>.....	55
Anexo 1 – Consentimento informado	57
Anexo 2 – Questionário	60
Anexo 3 – Protocolo Laboratorial	78
Anexo 4 – Cálculo final	82

Índice de abreviaturas

ASV- *Atividade Sénior de Viseu*

CAMBRA- *Caries Management by Risk Assessment*

CDU-UCP- *Clínica Dentária Universitária da Universidade Católica Portuguesa*

CPC- *Centro Social Paroquial do Campo*

CPOD- *Índice de dentes cariados, perdidos e obturados*

CRL- *Centro Social Paroquial Rio de Loba*

FMD-UCP- *Faculdade de Medicina Dentária da Universidade Católica de Viseu*

ICDAS- *International Caries Detection and Assessment System*

ICDAS II- *Sistema Internacional para a Detecção e Avaliação de Cáries*

LV- *Lar Viscondessa de São Caetano*

MIMD- *Mestrado Integrado em Medicina Dentária*

WHO- *World Health Organization*

Índice de tabelas

Tabela 1. Definição dos códigos do ICDAS II (Tabela adaptada de Banava et al., 2012).....	12
Tabela 2. Distribuição da população em estudo de acordo com o género.	18
Tabela 3. Distribuição da amostra de acordo com a origem dos indivíduos.....	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.....	20
Tabela 6. Distribuição da amostra de acordo com a utilização de açúcar nos lanches entre as refeições principais.	21
Tabela 7. Distribuição da amostra relativamente aos fatores que predispõem a acumulação da placa bacteriana em função da idade.....	22
Tabela 8. Distribuição da amostra relativamente à ingestão de medicação que influencia o fluxo salivar.....	23

Índice de figuras

Figura 1. Profundidade de sulco e fissuras (Imagem adaptada do artigo Fissure Depth and Caries Incidence in First Permanent Molars: A Five-Year Follow-Up Study).	13
Figura 2. Locais selecionados para a recolha de biofilme oral (Imagem modificada do GoogleSearchImages).	15
Figura 3. Distribuição da amostra de acordo com o número de lanches açucarados entre as refeições principais e a presença de cárie radicular.	21
Figura 4. Distribuição da amostra relacionando o fluxo salivar com a toma de medicação que afeta a saliva.	24
Figura 5. Distribuição da amostra em função do pH salivar nos indivíduos com cárie radicular.	25
Figura 6. Distribuição da amostra relativamente à quantificação molecular bacteriana na saliva.	26
Figura 7. Distribuição da amostra em função do número de dentes presentes em boca com o envelhecimento.	27
Figura 8. Distribuição da amostra relativamente à quantificação molecular bacteriana no biofilme oral.	28
Figura 9. Distribuição da amostra relativamente à quantificação molecular bacteriana no biofilme da lesão radicular.	29
Figura 10. Distribuição da amostra relativamente à quantificação molecular de 16sRNA bacteriano em função da gravidade da lesão de cárie radicular.	30
Figura 11. Distribuição da amostra relativamente à quantificação molecular das bactérias cariogénicas e carioprotetoras em função da gravidade da lesão de cárie radicular.	30
Figura 12. Distribuição da amostra relativamente à quantificação molecular bacteriana das espécies bacterianas analisadas em função da gravidade da lesão de cárie radicular.	31

1. Introdução

1.1. Caracterização da cárie radicular

A prevalência de cárie radicular aumenta com a idade e varia na sua distribuição intraoral, sendo os molares e os pré-molares inferiores os dentes mais afetados e, de seguida, os caninos e os incisivos superiores (1). As lesões radiculares desenvolvem-se no cimento radicular ou na dentina, os quais são mais suscetíveis à desmineralização em comparação com o esmalte (2,3). Além disso, a dentina da superfície radicular que fica exposta após a raspagem e alisamento radicular, não está protegida pela absorção de flúor, sendo mais suscetível à cárie (2).

Normalmente, a cárie radicular localiza-se na superfície exposta da raiz, na margem gengival, frequentemente na margem de uma restauração realizada anteriormente ou na junção amelo-cementária (4). No entanto, quando a lesão cariosa se encontra próxima da margem gengival ou prolifera para a zona subgengival, o fluído crevicular gengival pode alterar a composição microbiana de pH neutro a fracamente alcalino (4).

Embora a cárie radicular seja causada por um biofilme microbiano supragengival, o microbioma associado a este é diferente do microbioma da cárie coronal (3). Para além disso, as espécies presentes em lesões de cárie radicular diferem consoante a localização desta cárie (4).

1.2. Cárie radicular na população idosa

Com a evolução da sociedade, houve progressos nos hábitos de higiene oral e dieta o que se tem traduzido numa população idosa com dentição natural. Atualmente, é possível observar indivíduos desta população com, no mínimo, 20 dentes naturais, a chamada “dentição funcional” (5).

À medida que envelhecemos ocorre um aumento da inflamação periodontal, que leva à migração apical da margem gengival, induzindo o aparecimento de recessões gengivais e perda de inserção (1,5). Deste modo, verifica-se o aparecimento da exposição radicular e posterior ocorrência da cárie radicular, dado

que há um maior número de superfícies dentárias disponíveis. Igualmente, com o envelhecimento aumentam os fatores de risco para este tipo de cárie, como a diminuição do fluxo salivar, diminuição da destreza para a higiene oral e a utilização de próteses convencionais com ganchos sobre os dentes. Em geral, nos pacientes mais velhos, a hipossalivação ocorre devido à involução das glândulas salivares relacionada à idade, bem como da ingestão insuficiente de água e efeitos colaterais da polimedicação (2).

Estudos realizados anteriormente confirmaram que a saúde oral, em particular dos idosos, também depende do meio em que residem (6). Em 2018, Adriana Sofia Fernandes Ribeiro realizou um estudo comparativo da saúde oral em idosos institucionalizados e não-institucionalizados, onde concluiu a existência de saúde oral precária nos dois grupos (6). Contudo, a pior saúde oral manifestou-se na população institucionalizada, dado ao maior índice de dentes cariados, perdidos e obturados (CPOD), maior percentagem de indivíduos edêntulos e à maior incidência de doenças cardiovasculares, hábitos de higiene oral diminuídos e maior prevalência de *Candida* (6). Neste estudo não se incidirá apenas nos pacientes da Clínica Dentária da Universidade Católica Portuguesa de Viseu (CDU-UCP), que maioritariamente são autónomos e não institucionalizados, mas também em idosos residentes em instituições, de modo a aumentar a representatividades da amostra.

1.3. Microbioma da cárie radicular

A cavidade oral, uma vez que é constituída por um epitélio húmido de mucosa mole e tecidos duros que permitem a colonização microbiana, possui a população microbiana mais diversificada do corpo humano (7). Observa-se que, numa situação de saúde, o microbioma oral é bastante diversificado havendo uma colonização de todas as superfícies que constituem a cavidade oral. As bactérias presentes contribuem para o desenvolvimento do sistema imunitário estimulando uma resposta adequada aos microrganismos presentes. Existe uma grande diversidade de microrganismos adaptados aos vários nichos que “dialoga” de forma equilibrada com as células do sistema imunitário mantendo um estado de homeostasia. Este estado de equilíbrio, a que chamamos eubiose é dinâmico e por vezes o equilíbrio é perturbado temporariamente. No entanto quando a perturbação do equilíbrio é grande

ou prolongada no tempo pode surgir a inflamação oral, ou patologias orais como a cárie, a este estado chama-se disbiose (8). Para além dos efeitos locais, as disbioses orais estão ainda relacionadas com doenças sistémicas, tais como doenças cardiovasculares, cancro gastrointestinal e colorretal, infeções do trato respiratório, diabetes e resultados adversos na gravidez (9). Deste modo, é crucial compreender como é que o microbioma varia com a idade e perceber como é que a relação entre o microbioma oral e o sistema imunitário evolui com as alterações inerentes ao envelhecimento (8).

Microrganismos com potencial cariogénico, como *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus*, fornecem ao biofilme dentário “propriedades cariogénicas” através da produção de subprodutos ácidos oriundos da fermentação dos hidratos de carbono da dieta (10). O processo repetido de acidificação induz a seleção destes microrganismos produtores de ácido e resistentes ao mesmo, o qual induz a perda da homeostase do pH e promove o equilíbrio da desmineralização-rem mineralização no sentido da perda mineral dentária (11). Portanto, estes ácidos afetam a desmineralização dos tecidos dentários levando ao desenvolvimento das lesões de cárie (11). Em contrapartida, as bactérias comensais como *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus salivarius*, competem com as bactérias cariogénicas, contrariando o crescimento e virulência das mesmas através da produção de peróxido de hidrogénio e álcalis, equilibrando o pH, estando assim relacionados com um menor risco de cárie e superfícies dentárias saudáveis (10). Assim, a homeostase do pH salivar depende de um conjunto complexo de interações microbianas no biofilme oral e não apenas das bactérias cariogénicas (11).

Há indícios que o microbioma associado à superfície e à cárie radicular seja diferente daquele que coloniza o esmalte. A superfície disponível para colonização nesta situação não é o esmalte, mas sim o cimento. De facto, a composição bacteriana do microbioma associado à cárie radicular varia consoante a localização do desenvolvimento da mesma: acima da margem gengival ou abaixo da margem gengival (4). Por outro lado, esta composição também varia de acordo com a presença ou ausência de cárie e extensão e atividade da mesma. Sabe-se que a diversidade de espécies bacterianas é menor no biofilme das lesões radiculares moderadas/extensas e ativas, em comparação com os locais hígidos, havendo maior

abundância de espécies acidogénicas nas lesões cavitadas e ativas (12). Os primeiros colonizadores da superfície radicular são semelhantes aos do esmalte, predominando as espécies Gram-positivas, como o *Streptococcus sanguinis*, *S. oralis*, *S. mitis* e *Actinomyces* (13). Contudo, o filo Bacteroidetes, os géneros *Propionibacterium*, *Olsenella*, *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Atopobium*, *Pseudoramibacter*, *Rothia*, *Veillonella* e as espécies *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Dialister invisus*, e *Fusobacterium nucleatum* também têm sido indicadas como patógenos deste tipo de cárie (3,12,14,15). Mais recentemente, foram analisados cinco microrganismos responsáveis pelo surgimento da cárie radicular em idosos residentes em lares, onde se concluiu que *S. mutans*, *S. sobrinus* e *Bifidobacterium spp.*, quando presentes na saliva, aparentam estar relacionados com a lesão cáriosa radicular nesta população e, como tal, podem atuar como biomarcadores para a análise do risco de cárie radicular (16).

Através da análise bibliográfica, verifica-se que existe uma grande variabilidade bacteriana no microbioma da cárie radicular que ainda não foi totalmente caracterizado. Como expresso anteriormente, foram descritos vários microrganismos como colonizadores deste tipo de cárie, contudo os diferentes autores não conseguiram chegar ao mesmo resultado e, conseqüentemente, conclusões generalizadas são impossíveis. Posto isto, com este projeto espera-se contribuir para desvendar o microbioma associado à cárie radicular.

1.4. Gestão da cárie e o papel do Médico Dentista

Apesar de prevalente em idosos, a cárie radicular pode ser controlada através da escovagem diária com pastas dentífricas que contenham flúor, enquanto a cárie inicial pode ser tornada numa cárie inativa através da aplicação de vernizes de flúor ou soluções fluoretadas (1). No caso das lesões ativas, em que há dificuldades no acesso e por isso não podem ser escovadas adequadamente pelo paciente, devem ser restauradas por técnicas minimamente invasivas (1). É de grande importância para o médico dentista poder averiguar qual a probabilidade de um paciente desenvolver ou não cáries e, em especial, nos pacientes idosos de desenvolverem cáries radiculares. Através do protocolo *Caries Management by Risk Assessment*

(CAMBRA) é possível gerir as lesões de cárie intervindo de forma minimamente invasiva antes que estas atinjam um estágio de cavitação (17).

O presente estudo tem como objetivo por um lado:

- 1) caracterizar o microbioma associado a cáries radiculares numa população idosa, pela análise molecular do biofilme oral da lesão; e
- 2) verificar se o índice microbiológico CarioCheck (Ribeiro, 2023), onde se inclui a quantificação de bactérias cariogénicas e carioprotetoras, tem valor preditivo na cárie radicular na população em avaliação.

Este trabalho insere-se num projeto associado ao estudo do Microbioma Oral a decorrer na Faculdade de Medicina Dentária da Universidade Católica de Viseu (FMD-UCP) em que é analisada a microbiota associada à cárie e que foi iniciado em 2021 pelo colega André Fonseca (que terminou MIMD em 2022) e continuado pela colega Vanessa Ribeiro (que terminou MIMD em 2023). Neste momento existe uma outra colega, Mélanie Ferreira, que está a continuar o estudo em adultos excluindo adultos acima dos 65 anos de idade. Em todos estes estudos citados a cárie radicular não é analisada de forma separada.

2. Materiais e métodos

2.1. Caracterização do estudo

O estudo em evidência é denominado como observacional transversal, estando incluído num estudo longitudinal, e baseia-se na aplicação de um questionário ao paciente, numa avaliação intraoral e na recolha de amostras de saliva e de biofilme.

Com o projeto pretende-se caracterizar as amostras de cárie radicular através da quantificação da carga total bacteriana e da identificação e quantificação de bactérias cariogénicas e carioprotetoras para, posteriormente, ser testado o índice CarioCheck desenvolvido no SalivaTec para estudo de cáries em adultos quanto à sua capacidade de prever o risco de cárie nesta população. A amostra integrou pacientes que frequentaram a clínica da FMD-UCP e indivíduos que residiam no Lar Viscondessa de São Caetano (LV), no Centro Social Paroquial Rio de Loba (CRL), no Centro Social Paroquial do Campo (CPC) e indivíduos que tenham participado na Atividade Sénior de Viseu (ASV). Ao contrário das restantes instituições, a ASV é um programa comunitário, direcionado a idosos com mais de 55 anos, que visa promover a atividade física, literacia, formação e avaliação da saúde nesta população. Neste programa encontram-se vários parceiros, nos quais se destaca a FMD-UCP, que é a entidade responsável pela promoção de saúde oral. A recolha de dados foi realizada em novos pacientes e em pacientes que já tinham sido observados há pelo menos 6 meses, aos quais foi feita uma nova observação e avaliação. Nos pacientes que residissem em lares, esta *recall* não foi realizada dado que as primeiras recolhas tiveram início apenas em dezembro de 2023 e, portanto, os *recalls* não foram exequíveis.

2.2. Caracterização da amostra

O presente estudo foi realizado com base numa amostra constituída por pacientes que frequentaram a Clínica Dentária da Universidade Católica Portuguesa de Viseu e indivíduos que residiam no LV, no CRL, no CPC e que tenham participado na ASV. Para tal, foram estabelecidos os seguintes critérios de inclusão/exclusão:

Critérios de inclusão: pacientes que frequentem a clínica dentária universitária durante o período de recolha de dados ou que residam nos lares referidos anteriormente, com idade igual ou superior a 65 anos e que aceitem participar voluntariamente no estudo.

Critérios de exclusão: são considerados excluídos os pacientes que tenham realizado terapia antibiótica nos últimos 3 meses, que tenham realizado a higiene oral/ingerido alimentos num espaço de tempo inferior a 1 hora antes da recolha e pacientes edêntulos totais.

2.3. Princípios éticos

Os indivíduos que frequentaram a clínica da FMD-UCP ou que residiam no Lar Viscondessa de São Caetano, no Centro Social Paroquial Rio de Loba, no Centro Social Paroquial do Campo ou que participaram na Atividade Sénior de Viseu, e satisfaçam os critérios estabelecidos, foram convidados a participar no estudo e assinar o consentimento informado (anexo 1). Os dados recolhidos, bem como a sua utilização será de uso exclusivo para a investigação, garantindo o anonimato e a confidencialidade dos participantes. Os participantes serão ainda informados que será possível abandonarem o estudo assim que o desejarem.

2.4. Treino e calibração

Como a recolha de dados foi realizada por dois investigadores, pelo autor da monografia e pelo 2º investigador que está a realizar um estudo semelhante, mas para um grupo de indivíduos de idades entre os 18 e os 65 anos, foi efetuada uma calibração intra e inter-examinadores, para utilização do ICDAS II.

A calibração foi dividida em três fases:

- a) Revisão da literatura e do protocolo proposto pelo comité do ICDAS II.
- b) Foi preparada uma apresentação de slides de modo a exemplificar cada código dos critérios através fotografias de casos clínicos.
- c) Foram realizadas calibrações em alunos do Mestrado Integrado em Medicina Dentária interessados.

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 nas restantes instituições supracitadas. As recolhas realizadas na clínica foram executadas sempre no início de cada consulta. A recolha é dividida em quatro etapas. Em primeiro lugar foi realizado um questionário do tipo 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 empregue 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. Posteriormente, a informação foi inserida nas variáveis que integram o índice de risco de cárie a ser testado (Anexo 2) (18,19).

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 Deteção e Avaliação de Cáries (ICDAS II) (20).

Tabela 1. Definição dos códigos do ICDAS II (Tabela adaptada de Banava et al., 2012).

Código	Definição
0	Superfície dentária intacta e sem lesões
1	Cavidade incipiente em esmalte
2	Alteração visual em esmalte
3	Cavidade em esmalte, sem dentina envolvida
4	Sombra de lesão sem cavidade
5	Cavidade distinta à volta de uma restauração ou selante, >0.5mm
6	Cavidade muito extensa, com exposição de dentina

Ao nível da morfologia, os molares e pré-molares possuem uma superfície oclusal caracterizada pela presença de sulcos (21). Nos dentes com sulcos rasos verifica-se a formação de um “ângulo V” maior que 70°, no qual a ponta da sonda WHO consegue alcançar a base do sulco. Nos dentes com sulcos profundos verifica-se a formação de um “ângulo V” menor que 70°, e a ponta da sonda WHO não consegue atingir a base do sulco (18,19). Portanto, para esta observação foi necessária a utilização de um espelho intraoral, sonda WHO e material de proteção individual.

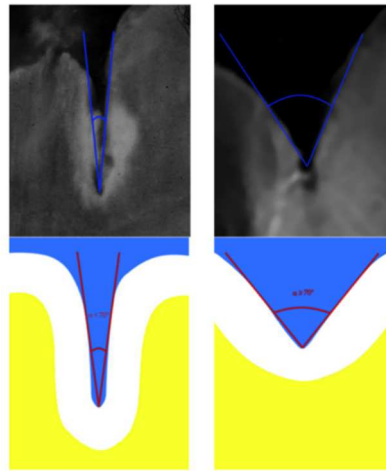


Figura 1. Profundidade de sulco e fissuras (Imagem adaptada do artigo *Fissure Depth and Caries Incidence in First Permanent Molars: A Five-Year Follow-Up Study*).

2.5.3. Fase 3 – Recolha de saliva

Com o intuito de garantir a padronização das recolhas, foram selecionados os pacientes que não realizaram a higiene oral nem ingeriram alimentos até 1 hora antes da recolha (critério de exclusão). A recolha foi iniciada pela colheita de saliva não estimulada pelo método de expelição, com o paciente sentado numa posição relaxada. Para tal, foi pedido que o paciente acumulasse saliva na cavidade oral e a expelisse de forma consecutiva para um tubo graduado, por um período de 1 minuto. O tempo foi medido com um temporizador digital.

No caso de o valor do fluxo salivar na ausência de estímulo ser moderado (0,3-0,7ml/min), foi também avaliado o fluxo salivar com estímulo, sendo este realizado

com recurso a uma pastilha de Parafilm CRT® Buffer, mastigada durante 30s. Posteriormente, a saliva foi expelida para um tubo graduado, durante 1 minuto. Utilizando a saliva recolhida, pH da saliva estimulada foi medido usando um eletrodo de medição de pH [Hannah Instruments HI1083] fornecido pelo laboratório da FMD-UCP SalivaTec, o qual permite analisar com precisão o pH da saliva. Antes e depois da medição, o eletrodo foi devidamente lavado com água Mili-Q (água destilada, filtrada e purificada). Os tubos foram devidamente fechados e transportados para o laboratório SalivaTec, local onde a composição microbiológica da saliva foi analisada. As amostras foram alíquotadas e conservadas a -80°C.

Para a quantificação da carga total bacteriana e das espécies cariogénicas e carioprotetoras foi realizado um qRT-PCR usando *primers* universais, de forma a quantificar a carga total bacteriana e a carga das espécies *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mitis* e *Actinomyces naeslundii* nas amostras de saliva dos pacientes (18,19) (anexo 3).

2.5.4. Fase 4 – Recolha de biofilme

De forma a ser uniformizada, a recolha foi realizada em locais distintos da cavidade oral, previamente determinados. Deste modo, os locais selecionados foram o espaço interincisivo dos dentes inferiores por vestibular e lingual, a face vestibular dos incisivos superiores, a face vestibular de um 1º molar superior e a face lingual de um 1º molar inferior (figura 2) (18,19). Em situações de ausência do 1º molar permanente, a recolha foi realizada no dente mais posterior.

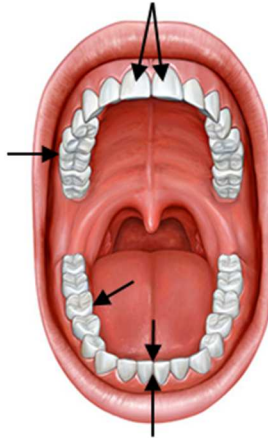


Figura 2. Locais selecionados para a recolha de biofilme oral (Imagem modificada do GoogleSearchImages).

No caso da recolha do biofilme da cárie radicular, esta foi realizada na superfície radicular com lesão usando a mesma metodologia que foi aplicada para o biofilme supragengival. Para a execução da raspagem do biofilme oral e do biofilme da lesão de cárie radicular foram utilizados dois palitos estéreis que foram colocados individualmente numa solução salina dentro de um tubo. Em seguida, todas as amostras foram pré processadas sendo alíquotadas, em dois tubos distintos com 500µl cada, e conservadas a -80°C. As amostras de biofilme foram processadas e analisadas da mesma forma que as amostras de saliva (anexo 3).

3. Resultados

3.1. Caracterização da amostra em estudo

A população alvo deste estudo foi obtida através de uma amostra de conveniência, na qual foram observados os pacientes que frequentaram a clínica da FMD-UCP e indivíduos que residiam no Lar Viscondessa de São Caetano, no Centro Social Paroquial Rio de Loba, no Centro Social Paroquial do Campo e que tenham participado na Atividade Sénior de Viseu. A amostra final tem um total de 53 pacientes, que cumpriram os critérios de inclusão/exclusão previamente definidos. Deste total, apenas 3 dos pacientes responderam ao *recall*, estando estes na faixa etária dos 65-74 anos.

A amostra é constituída por 31 pacientes do género feminino e 22 do género masculino (tabela 2), com um maior número de indivíduos na faixa etária 65-74, e uma média de idades de 77 anos. De forma geral, os indivíduos observados eram na sua maioria institucionalizados (tabela 3).

Tabela 2. Distribuição da população em estudo de acordo com o género.

		Idade				Total
		65-74	75-84	85-94	≥ 95	
Género	Masculino	13	5	4	0	22
	Feminino	11	11	8	1	31
Total		24	16	12	1	53

Tabela 3. Distribuição da amostra de acordo com a origem dos indivíduos.

		Indivíduos Não Institucionalizados (n=21)		Indivíduos Institucionalizados (n=32)		
		CDU-UCP	ASV	CRL	CPC	LV
Idade	65-74	14	4	1	3	2
	75-84	2	1	5	7	1
	85-94	0	0	1	5	6
	≥ 95	0	0	0	0	1
Total		16	5	7	15	10

3.1.1. Caracterização dos hábitos de higiene oral

No decorrer da recolha de informação foram realizadas questões relativas aos hábitos de higiene oral da população em estudo, na qual se verificou que a maioria dos participantes escova os dentes com uma pasta dentífrica fluoretada (n=42). No entanto, a realização da higiene oral com uma pasta fluoretada diminuiu em função do aumento da idade (tabela 4).

Outro fator importante nos hábitos de higiene oral é a utilização de fio dentário e, como é possível observar na tabela 3, a maioria dos idosos observados refere não utilizar fio dentário (n=45). Como seria de esperar, verificou-se que a não utilização de fio dentário também está diretamente relacionado com o avanço da idade (tabela 4).

Adicionalmente, foi analisada a realização de bochechos com um colutório fluoretado e a relação entre esta prática de higiene e a idade. Os resultados obtidos foram bastante semelhantes aos do uso de fio dentário, uma vez que apenas 8 dos pacientes relatou realizar esta etapa da higiene oral (tabela 4). E, mais uma vez, a resposta negativa à utilização de um colutório com flúor poderá estar diretamente relacionada com o envelhecimento (tabela 4).

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

		Higiene Oral com pasta Fluoretada		Uso de fio dentário		Colutório com flúor (0,05% NaF)	
		Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não
Idade	65-74 (n=26)	21	3	5	19	6	18
	75-84 (n=16)	12	4	3	13	2	14
	85-94 (n=12)	9	3	-	12	-	12
	≥95 (n=1)	-	1	-	1	-	1
	Total	42	11	8	45	8	45

Relativamente ao número de escovagens diárias, dos 42 indivíduos que utilizavam pasta dentífrica com flúor, 28 realizava a escovagem apenas uma vez ao

dia, ao passo que somente 14 escovavam duas ou mais vezes durante o 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=21)	9	12
	75-84 (n=12)	10	2
	85-94 (n=9)	9	-
	≥95 (n=1)	-	-
	Total	28	14

3.1.2. Caracterização dos hábitos alimentares

A respeito da alimentação, a realização de lanches açucarados entre as refeições principais é um fator importante para a avaliação do risco de cárie. Como tal, os resultados obtidos demonstram que 40 participantes ingeriam açúcar nos lanches entre as refeições (tabela 6), sendo que 20 destes afirmaram consumir açúcar 1 vez por dia e os restantes 20 consumir 2 ou mais vezes por dia (tabela 6). Verificou-se também que a presença de cárie radicular esteve maioritariamente associada a pacientes que ingeriam lanches açucarados mais do que uma vez por dia (figura 3).

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

	Idade	Consumo de açúcares		Açúcar nos lanches	
		Sim	Não	1x	≥ 2x
	65-74	15	9	12	3
		(n=26)		(n=15)	
	75-84	14	2	4	10
		(n=16)		(n=14)	
	85-94	10	2	4	6
		(n=12)		(n=10)	
	≥95	1	-	-	1
		(n=1)		(n=1)	
	Total	40	13	20	20

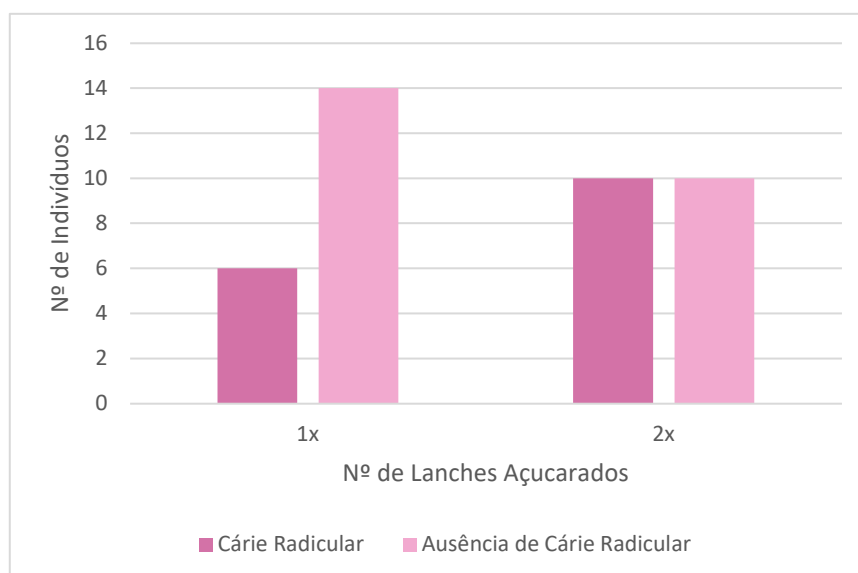


Figura 3. Distribuição da amostra de acordo com o número de lanches açucarados entre as refeições principais e a presença de cárie radicular.

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

Fatores como a utilização de aparelho ortodôntico, a profundidade dos sulcos e fissuras de pré-molares e molares, a utilização de próteses removíveis parciais e a exposição radicular aumentam a predisposição para a acumulação de placa bacteriana. Uma vez que a população em estudo é uma população envelhecida e o presente estudo visa avaliar em específico a cárie radicular, os fatores com maior importância são a presença de exposição radicular e a utilização de próteses.

Na amostra em estudo encontram-se 40 participantes com exposição radicular, contrastando com 13 que não apresentavam. Quanto à distribuição da presença de exposição radicular com a idade, verificou-se que esta está presente em todas as faixas etárias de forma praticamente uniforme (tabela 7).

No que diz respeito à utilização de próteses removíveis parciais, verificou-se que a maioria dos idosos, embora apresentem uma dentição bastante incompleta, preferem não utilizar próteses dentárias de modo a evitar futuros transtornos e visitas ao dentista. A sua maioria recusa utilizar este aparelho dado a estar institucionalizado e à falta de interesse em deslocar-se ao dentista; outros pacientes relataram ter utilizado próteses às quais nunca se adaptaram (queixas de dor e falta de retenção na prótese) e, portanto, não tencionam voltar a usar; e os restantes indivíduos não se vêm a adaptar-se a este dispositivo dada a idade avançada. Desta forma, entre os pacientes observados, apenas 17 fazem uso de prótese dentária (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 (n=26)	9	15	15	9
	75-84 (n=16)	3	13	15	1
	85-94 (n=12)	5	7	9	3
	≥95 (n=1)	-	1	1	-
Total		17	36	40	13

3.1.4. Caracterização dos fatores associados ao fluxo salivar

O fluxo salivar não estimulado através do método de expelição foi outro aspeto avaliado durante a recolha de dados. Considerou-se que o fluxo salivar sem estímulo seria moderado quando o valor fosse de 0,3-0,7 ml/min, pelo que o não cumprimento deste requisito significava que o paciente não tinha produção de saliva satisfatória e seria sinónimo de hipossalivação. Então constatou-se que dos 53 pacientes, 45

apresentavam hipossalivação. Assim, dos 8 pacientes que tinham um fluxo salivar normal, foi avaliado se estes produziam saliva suficiente após estimulação. Se a produção de saliva após o estímulo com uma pastilha de parafina CRT® fosse moderada, significava que o indivíduo produzia saliva suficiente. Observou-se que a maioria (n=5) produzia saliva suficiente.

Considerando um dos fatores que afeta a produção de saliva (medicação dos grupos terapêuticos: anticolinérgicos, antidepressivos, antipsicóticos, diuréticos, ansiolíticos, anti-histamínicos, anti-hipertensivos e analgésicos) podemos observar que a grande maioria dos pacientes observados (n=45) toma medicação que pode provocar uma diminuição na produção de saliva (tabela 8). Contudo, dos 45 indivíduos com hipossalivação, apenas 39 tomavam algum deste tipo de medicação (figura 4).

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=26)	19	5
	75-84 (n=16)	13	3
	85-94 (n=12)	12	-
	≥95 (n=1)	1	-
Total		45	8

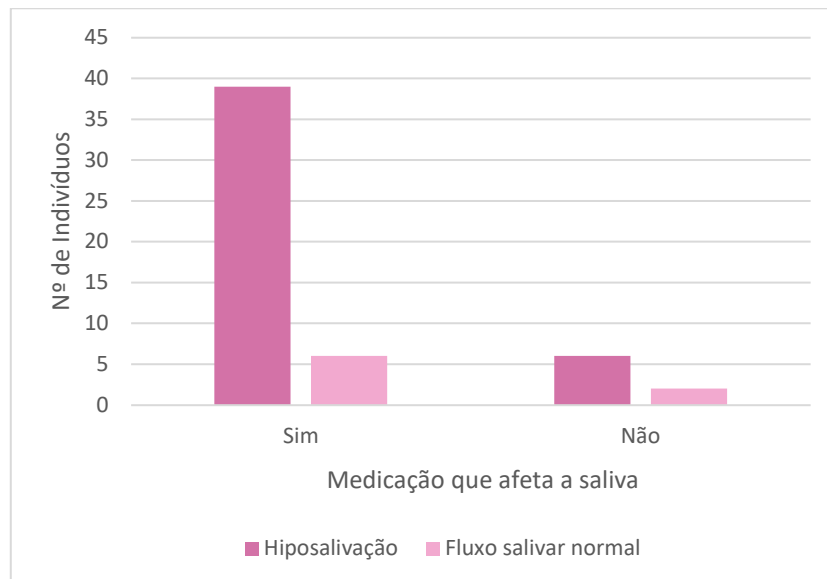


Figura 4. Distribuição da amostra relacionando o fluxo salivar com a toma de medicação que afeta a saliva.

3.1.5. Caracterização da análise salivar

Em relação ao pH salivar, das 53 amostras de saliva recolhidas, 15 apresentaram um pH inferior a 6,5 e as restantes 38 um pH igual ou superior a 6,5. No presente estudo, uma vez que o alvo do mesmo é analisar a cárie radicular, são apresentados os resultados relativos aos pacientes que apresentassem cárie radicular. Dos 19 pacientes com cárie radicular, apenas em 16 foi possível realizar as 3 colheitas em análise (saliva, biofilme oral e biofilme da lesão de cárie radicular). Assim sendo, dos 16 pacientes referidos 9 apresentaram um pH ácido (< 6,5) (figura 5).

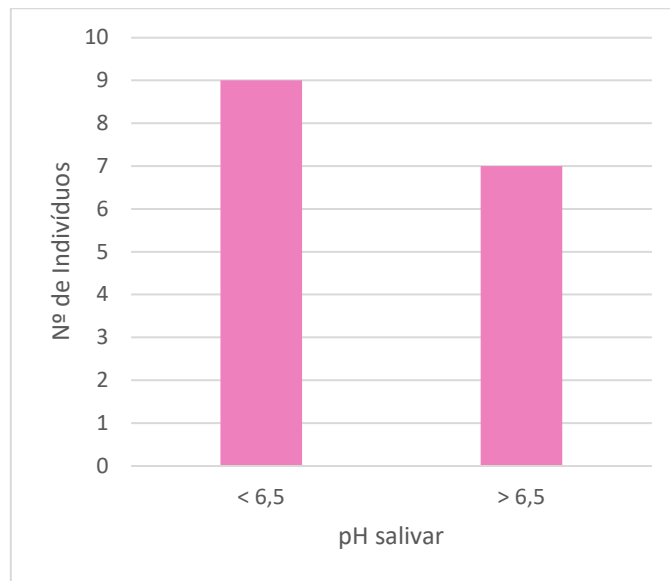


Figura 5. Distribuição da amostra em função do pH salivar nos indivíduos com cárie radicular.

Para cada quantificação da carga total bacteriana e das espécies cariogênicas e carioprotetoras foram considerados níveis baixos, médios e elevados de acordo com a distribuição específica da amostra. É essencial salientar que esta classificação foi realizada com base na distribuição observada nesta amostra de conveniência, uma vez que não há evidências literárias que definam pontos de corte específicos. Relativamente à quantificação molecular do 16sRNA bacteriano (carga total bacteriana) e do *S.mitis* na saliva, verificou-se que os resultados foram mais ou menos uniformes, não variando significativamente entre os três níveis (figura 6). Para *S.mutans*, *S.sobrinus* e *A.naeslundii*, a maior parte dos indivíduos apresenta níveis baixos de quantificações destas espécies, sendo que apenas na quantificação de *S.mutans* se observou, para alguns indivíduos, níveis elevados desta bactéria cariogênica (figura 6).

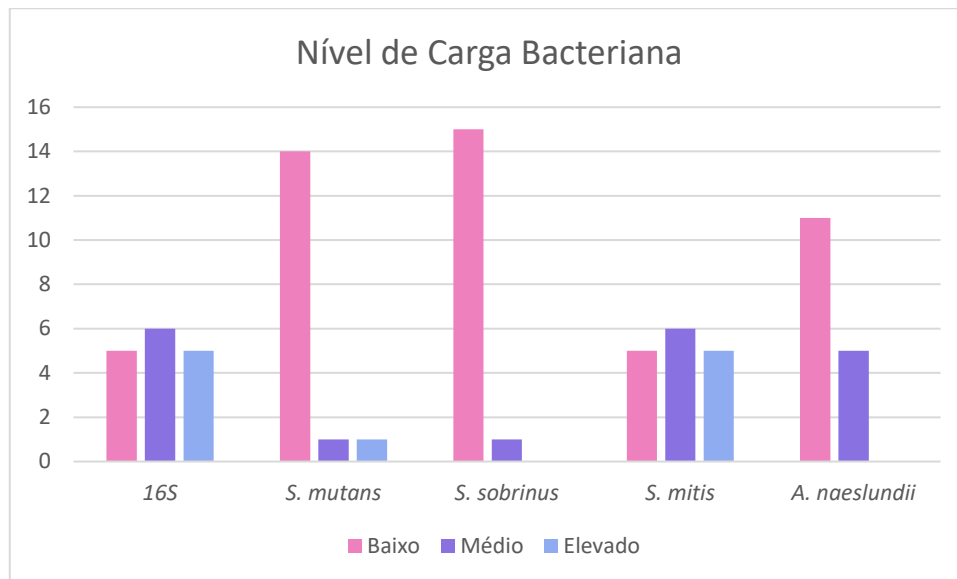


Figura 6. Distribuição da amostra relativamente à quantificação molecular bacteriana na saliva.

3.1.6. Caracterização de resultados decorrentes da inspeção intraoral

Uma vez que a recolha de dados não foi toda realizada em ambiente clínico, nos utentes dos lares/centro de dia não foi possível ter acesso ao seu histórico de tratamentos realizados nos últimos 3 anos decorrentes de lesões de cárie (restaurações, tratamento endodôntico radical, extrações). No entanto, a maioria relatou não ir ao dentista há mais de 3 anos.

Através da observação intraoral foi possível examinar a presença de lesões de cárie radicular e classificá-las segundo o ICDAS II. Constatou-se que dos 53 pacientes observados, 7 estavam livres de qualquer tipo de lesão cariiosa. No entanto, embora 40 indivíduos apresentassem exposição radicular (tabela 7), somente 19 experienciavam a lesão de cárie radicular, sendo esta mais prevalente na faixa etária dos 75-84 anos (tabela 9). De seguida, verificou-se a lesão cariiosa moderada é mais prevalente nesta população: 2 indivíduos apresentaram lesão cariiosa era inicial (ICDAS 1-2), 42 lesão cariiosa moderada (ICDAS 3-4) e 19 lesão cariiosa extensa (ICDAS 5-6) (tabela 9).

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

		ICDAS 1-2 (Inicial)	ICDAS 3-4 (Moderada)	ICDAS 5-6 (Severa)	Cárie Radicular	Ausência de Cárie
Idade	65-74 (n=26)	2	15	7	5	6
	75-84 (n=16)	-	15	5	11	1
	85-94 (n=12)	-	11	6	2	-
	≥95 (n=1)	-	1	1	1	-
Total		2	42	19	19	7

Contudo, sabe-se que à medida que a idade avança o número de peças dentárias presentes em boca também diminui (figura 7). O que não significa que haja menor possibilidade de experienciar a cárie radicular perante uma dentição reduzida, apenas que como há menos dentes há menos possibilidade de observar lesões de cárie radicular.

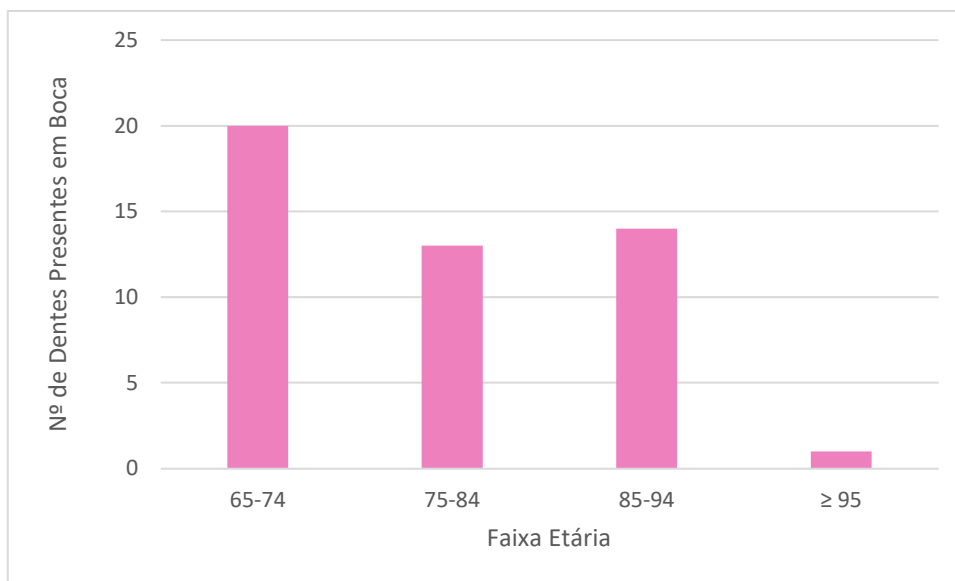


Figura 7. Distribuição da amostra em função do número de dentes presentes em boca com o envelhecimento.

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

Um componente amplamente considerado nos índices de avaliação do risco de cárie dentária é a carga microbiana, cuja análise é realizada através da análise do índice de placa. Esta avaliação é subjetiva e visualmente realizada pelo médico dentista, introduzindo potenciais variações entre observadores. Todavia, é possível obter uma quantificação mais precisa e objetiva da carga microbiana utilizando técnicas moleculares, como a quantificação do 16sRNA bacteriano. À semelhança da saliva, observou-se que a carga total bacteriana total não variou de forma significativa entre os níveis baixo, médio e elevado (figura 8). Os resultados mostraram ainda que apenas foram detetados níveis de quantificação baixos de *S.mutans*. No caso de *S.mitis* foram quantificados níveis baixos e médios desta bactéria associadas a saúde, enquanto no caso das bactérias cariogénicas *A.naeslundii* e *S. sobrinus* foram detetados os 3 níveis de quantificação (figura 8).

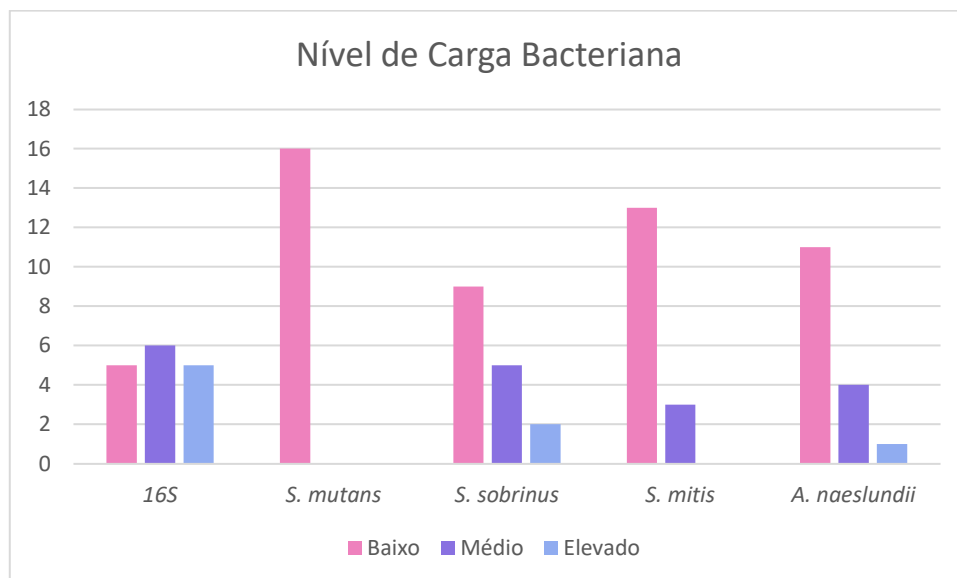


Figura 8. Distribuição da amostra relativamente à quantificação molecular bacteriana no biofilme oral.

Relativamente ao biofilme da lesão radicular, verificou-se que a carga total bacteriana foi maioritariamente elevada (figura 9). Quanto à presença das espécies bacterianas analisadas, observou-se novamente que a carga do *S.mutans*, *S. mitis* e *A.naeslundii* foi baixa na maioria dos indivíduos, enquanto que *S. sobrinus* apresentou

valores semelhantes nos três níveis de quantificação (baixo, médio e elevado) (figura 9).

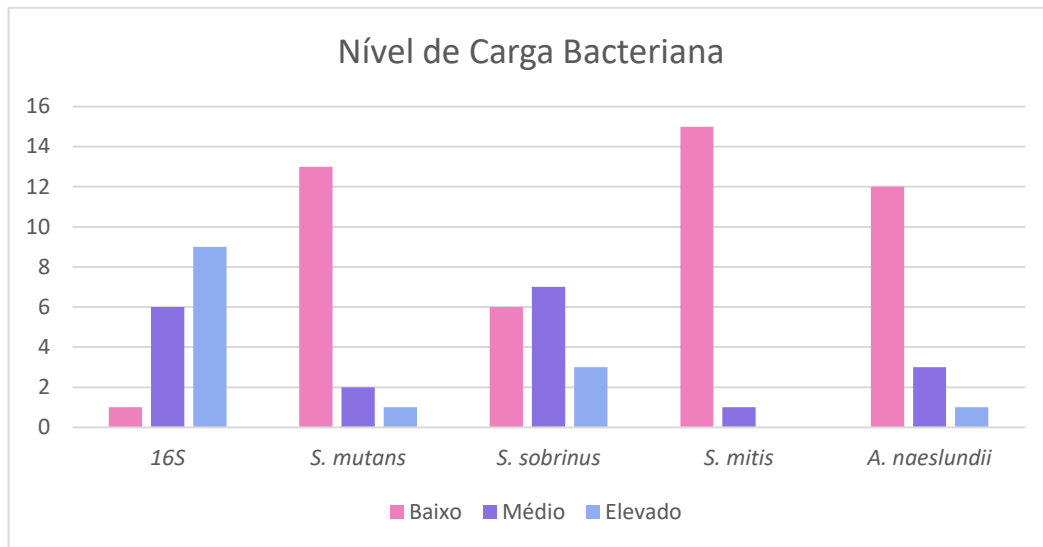


Figura 9. Distribuição da amostra relativamente à quantificação molecular bacteriana no biofilme da lesão radicular.

Relacionando a carga total bacteriana com a extensão da lesão de cárie radicular, observou-se que não há relação entre estas, dado que cargas médias e severas estiveram mais associadas a lesões de cárie moderadas (figura 10). Contudo, verificou-se que, tanto na cárie moderada como na severa, a carga bacteriana das bactérias carioprotetoras foi baixa, sendo média em apenas um indivíduo com lesão severa (figura 11). Portanto, de forma geral, as bactérias cariogénicas predominaram nas lesões moderadas e severas de cárie (figura 11). Destas, destaca-se que *S.mutans*, *S.sobrinus* e *A.naeslundii* apresentaram cargas elevadas nas lesões moderadas, ao passo que nas lesões severas apenas *S.sobrinus* apresentou carga elevada (figura 12).

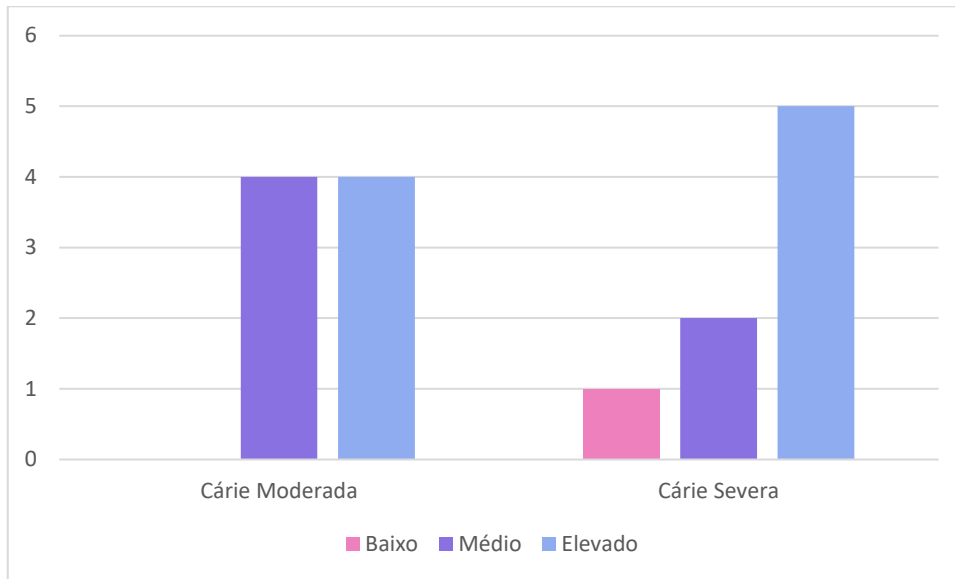


Figura 10. Distribuição da amostra relativamente à quantificação molecular de 16sRNA bacteriano em função da gravidade da lesão de cárie radicular.

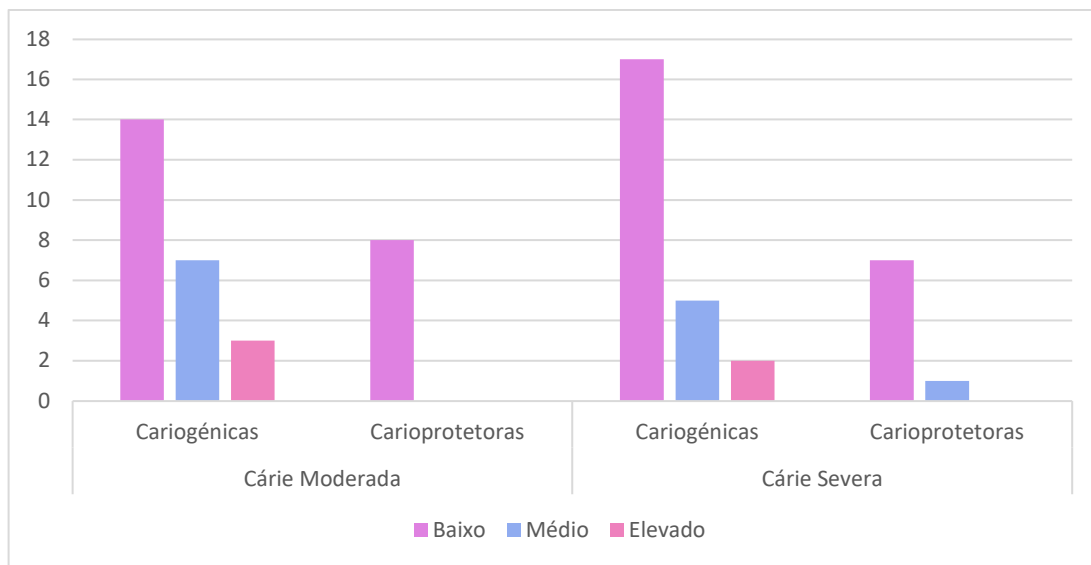


Figura 11. Distribuição da amostra relativamente à quantificação molecular das bactérias cariogénicas e carioprotetoras em função da gravidade da lesão de cárie radicular.

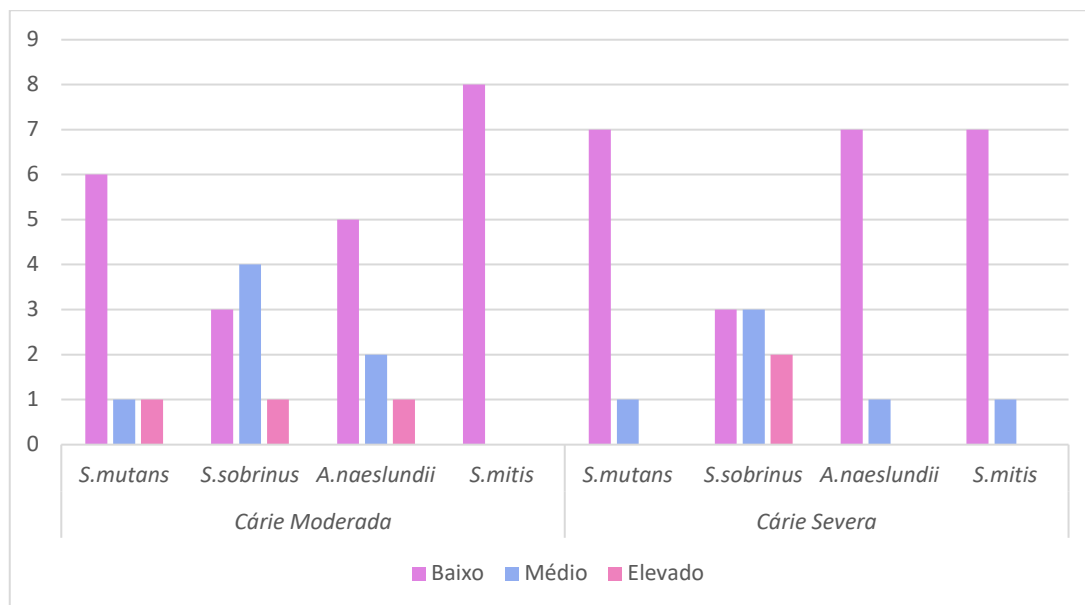


Figura 12. Distribuição da amostra relativamente à quantificação molecular bacteriana das espécies bacterianas analisadas em função da gravidade da lesão de cárie radicular.

3.1.8. Risco de desenvolver lesões de cárie radicular

Para avaliar o risco de desenvolver lesões de cárie radicular recorreu-se ao índice microbiológico CarioCheck em desenvolvimento na SalivaTec (19). O potencial de cárie foi determinado através da quantificação das informações adquiridas e considerando o peso atribuído a cada variável específica (anexo 4). No cálculo final verificou-se que todos os pacientes apresentavam risco elevado de cárie (n=16).

3.2. Recalls

Relativamente às *recalls*, apenas 3 pacientes aceitaram realizá-las. No entanto, em nenhum dos momentos de colheita estes indivíduos apresentaram cárie radicular, pelo que para este a sua análise não era relevante.

4. Discussão

Nos últimos anos, a investigação da cárie radicular tem aumentado e tem sido cada vez mais precisa na comparação com parâmetros como a idade e os hábitos alimentares e de higiene. Neste estudo, serão abordados os tópicos de interesse presentes nos questionários, relacionando-os com a presença/ausência de cárie radicular, bem como com a carga total bacteriana das lesões e com a carga das quatro espécies analisadas. Deste modo, espera-se conseguir detalhar de forma mais rigorosa as espécies mais associadas a este tipo de lesão cariosa e em que situações estas surgem.

4.1. Hábitos de higiene oral

Nos idosos a manutenção de uma dentição saudável e funcional está dependente da sua capacidade de realizar ou receber cuidados diários de higiene oral e de se dirigirem periodicamente ao médico dentista (22). Sabe-se que uma rotina de higiene oral bem estabelecida consiste na escovagem diária com uma pasta dentífrica fluoretada e o uso de fio dentário, de forma independente ou com auxílio de um cuidador (22). Assim sendo, durante as recolhas os idosos e/ou os cuidadores foram questionados relativamente aos hábitos de higiene oral dos mesmos. Primeiramente foram questionados quanto à realização da escovagem diária com uma pasta fluoretada, ao qual 42 indivíduos responderam positivamente. Este resultado contraria dados de outros estudos realizados na FMD-UCP. Em 2018, verificou-se que a maioria dos indivíduos institucionalizados não realizam a escovagem dentária (6). Sabendo que a amostra deste estudo consistiu principalmente em idosos institucionalizados, pode concluir-se que desde 2018 até 2024 houve um aumento nos cuidados de higiene oral nestas instituições.

A realização da escovagem dentária uma vez ao dia poderá ser suficiente para manter a saúde oral e prevenir a ocorrência de lesões cariosas e doenças periodontais, mas para a remoção mais eficiente da placa bacteriana, o ideal é realizar a escovagem duas vezes ao dia e fazer uso do fio dentário (23). No entanto, outros estudos afirmam que a escovagem bidiária não é satisfatória, relatando que um menor risco para a incidência de cáries está diretamente relacionado com uma maior

frequência das escovagens (24). Deste modo, dos 42 indivíduos que realizavam a escovagem dentária, 28 afirmaram realizar esta ação uma vez por dia e 14 afirmaram realizá-la duas vezes ou mais por dia. No entanto, estes testemunhos podem não ser credíveis, uma vez que muitos utentes tendem a responder o que consideram ser a resposta mais adequada (23). Para além dos hábitos referidos, uma boa higiene oral também está dependente de uma técnica de escovagem correta durante cerca de 2 a 3 minutos por sessão (25), fator que não foi possível avaliar.

Como referido anteriormente, uma boa higiene oral não é alcançada apenas com a escovagem diária, a utilização do fio dentário é indispensável para a remoção do biofilme nas zonas interproximais, mas apenas um número reduzido da população faz uso do mesmo (26). Este facto é coincidente com o resultado deste estudo, dado que apenas 8 pacientes responderam positivamente à utilização do fio dentário. Ribeiro 2018, também conclui que a maioria dos idosos, institucionalizados ou não, não fazem uso do fio dentário (6). Tal deve-se ao alto nível de habilidades táteis e motoras finas exigidas ao paciente para a correta remoção dos alimentos entre os dentes e da placa interdental (27). É natural que perante uma população envelhecida, tal não possa ser conseguido.

Outro componente fundamental na prevenção de cáries é o flúor. Este atua nos estágios iniciais da cárie e inibe a desmineralização do esmalte, impedindo a formação da lesão cariosa (28). Como referido anteriormente, este pode ser utilizado na rotina através de pastas dentífricas fluoretadas, mas também por meio de colutórios. Assim, no presente estudo notou-se que, à semelhança do uso do fio dentário, só 8 indivíduos realizavam bochechos diários com um colutório com flúor (0,05% NaF).

Estes dados confirmaram que a diminuição da execução duma higiene oral correta está diretamente relacionada com o envelhecimento. A maioria da população idosa não se sente capaz nem demonstra interesse na realização dos hábitos de higiene oral. De facto, nem os cuidadores conseguem assegurar a prática deste hábito dado o número reduzido de funcionários nas instituições portuguesas em comparação com o número de utentes.

4.2. Hábitos alimentares

A dieta afeta localmente a saúde oral, principalmente ao nível da integridade dos dentes, pH e composição da saliva e do desenvolvimento da placa bacteriana (29). Desde o começo do estudo da etiologia da cárie radicular, percebeu-se que os indivíduos com esta patologia consumiam quantidades significativamente maiores de açúcares, ingeriam mais frequentemente hidratos de carbono fermentáveis e apresentavam menor capacidade de tamponamento salivar comparando com os indivíduos livres da lesão cariosa (30). Portanto, consta-se que indivíduos que ingeriram significativamente maiores quantidades de carboidratos sólidos fermentáveis como bolos, biscoitos e cereais matinais, apresentem um risco mais elevado de desenvolver esta lesão (30). No presente estudo verificou-se que dos 53 pacientes observados, 40 consumiam açúcares nos lanches entre refeições.

Sabe-se que alguns idosos, em vez de fazerem as três refeições principais, preferem consumir vários lanches ao longo do dia (30). Assim, os 40 pacientes que consumiam lanches açucarados foram questionados quanto à frequência dessa ingestão, à qual 20 afirmaram consumir uma vez ao dia e os restantes 20 duas vezes ou mais.

Resumidamente, a maioria dos intervenientes não consumia açúcares entre refeições. No entanto, verificou-se que na amostra analisada a presença de cárie radicular esteve relacionada com um consumo mais frequente de lanches açucarados.

4.3. Fatores que contribuem para a acumulação de placa bacteriana

Um dos fatores de risco que contribui para o início e progressão das lesões de cárie é a formação de placa bacteriana nas superfícies dentárias (31). De entre os fatores que contribuem para a acumulação de placa bacteriana na população envelhecida, o mais relevante, a seguir à hipossalivação, é a utilização de próteses. As próteses, para além de reterem mais biofilme na cavidade oral, acarretam maiores cuidados na realização da higiene (32). No entanto, este acúmulo de biofilme varia consoante o tipo de prótese com que nos deparamos. Em Portugal, da população envelhecida que faz uso de uma prótese dentária, a sua maioria utiliza próteses. Em

2014 foi realizado um estudo que comparou este tipo de prótese com as implanto-suportadas, no qual se verificou que as próteses induziam maiores índices de placa bacteriana (32). De facto, a utilização de uma prótese removível demonstra impactar de forma negativa a condição periodontal dos dentes pilares, resultando em recessões gengivais, perda clínica de inserção, surgimento de cáries e ocorrência de fraturas (22). Nesta investigação analisou-se este fator verificando-se que, apesar de os idosos observadores terem uma dentição bastante incompleta, apenas 17 destes faziam uso de prótese. Contudo, destes 17 pacientes, apenas 5 apresentavam cárie radicular. Portanto, a utilização de prótese removível não foi o principal fator para o surgimento da lesão cariosa. Salienta-se que nesta amostra a média de dentes presentes em boca foi de 17, o que comprova a prevalente ausência de peças dentárias nesta faixa etária.

A reduzida aderência ao uso de próteses dentárias, que restabelecem as funções mastigatórias perdidas, deve-se principalmente a três razões bastante relatadas pelos pacientes: evitar idas recorrentes ao dentista para a realização de controlos, nunca foram incitados à utilização deste dispositivo de reabilitação e nesta idade não se vêm capazes de iniciarem a sua utilização e, por fim, casos de próteses que por fatores biológicos deixaram de assentar corretamente na cavidade oral e os pacientes preferiram cessar o uso das mesmas.

4.4. Fatores que afetam o fluxo salivar

A saliva apresenta um papel crucial na proteção contra lesões cariosas, dado que é responsável pela diluição e eliminação de açúcares e outros componentes, atua como tampão, promove a desmineralização/remineralização e atua como antimicrobiano (33). O baixo fluxo salivar, também denominado de hipossalivação, promove a ocorrência de xerostomia, ou seja, secura da cavidade oral (34,35). Estas patologias podem estar na origem da desmineralização e cavitação dentária, promovendo o aparecimento de lesões cariosas de rápido desenvolvimento que resultam na perda dentária (34). Nos idosos, uma das principais causas de boca seca é a polimedicação, a qual inclui classes de medicamentos como anticolinérgicos, antidepressivos, antipsicóticos, diuréticos, ansiolíticos, anti-histamínicos, anti-

hipertensivos e analgésicos (22). Deste modo, dos 53 pacientes observados, 45 faziam uso deste tipo de medicação, mas apenas 39 apresentavam hipossalivação.

No entanto, fatores biológicos como histórico de radiação na cabeça e pescoço, doenças das glândulas salivares, diabetes, cirrose alcoólica e doenças autoimunes como o lúpus e a síndrome de Sjogren, também atuam como condicionantes da produção de saliva (22,36). O histórico de radiação referido é um dos fatores importantes, dado que a radioterapia nestas regiões induz efeitos colaterais como anomalias nas glândulas salivares (34). Não esquecendo, que nesta população envelhecida, a hipossalivação também ocorre devido à involução das glândulas salivares relacionada com a idade e da ingestão insuficiente de água (2). Estes fatores não foram possíveis observar dadas as condições de realização das recolhas e dada a idade avançada dos pacientes, os quais não conseguiam na maioria das vezes responder com clareza e assertividade ao que lhes era pedido e, noutros casos, devido às instituições só terem conhecimento das patologias mais recentes dos mesmos.

Com a diminuição do fluxo salivar, os microrganismos conseguem agregar-se e aderir melhor aos tecidos orais, o que faz com que o biofilme fique estagnado por mais tempo, levando à perda de estrutura dentária, gengivite, doença periodontal, cárie dentária e halitose (22). Assim sendo, foi avaliado o fluxo salivar não estimulado pelo método de expelção, no qual se verificou que dos 53 pacientes, 45 apresentavam hipossalivação. Dos 8 pacientes com fluxo salivar normal, a maioria (n=5) produzia saliva suficiente.

Portanto, constatou-se que o número de 45 indivíduos, que tomam medicação que afeta a produção salivar (grupos terapêuticos anticolinérgicos, antidepressivos, antipsicóticos, diuréticos, ansiolíticos, anti-histamínicos, anti-hipertensivos e analgésicos), é coincidente com o número de indivíduos que apresentaram hipossalivação. Contudo, destes 45 indivíduos com hipossalivação, 6 não tomam a referida medicação, pelo que nem toda a hipossalivação foi originária da medicação.

4.5. Análise do pH da saliva

Independentemente da quantidade de açúcar ingerido, 2 a 5 minutos após esta ingestão ocorre um declínio do pH, que só é restabelecido ao fim de 15 a 40 minutos. Posto isto, as recolhas de saliva foram realizadas aos pacientes que não tinham ingerido alimentos ou escovado os dentes até 1 hora antes desta recolha. Denomina-se pH crítico quando há saturação de um mineral específico, como o esmalte dentário, numa solução (37). A saliva, normalmente apresenta saturação do mineral dentário, ou seja, apresenta um pH superior ao pH crítico, o que impede que os dentes se dissolvam nela (37). No entanto, a cavidade oral é frequentemente exposta a alimentos com pH inferior ao da saliva, o que promove a erosão química do esmalte (33). Este pH crítico não tem um valor exato, mas no esmalte pode encontra-se entre 5,3 e 5,7, e na dentina pode variar de 6,5 a 6,7 (38). Por este motivo, neste estudo, um pH inferior a 6,5 foi definido como fator de risco para a erosão dentária. Na presente amostra, só 9 pacientes de um total de 16 apresentaram um pH dentro deste valor. Isto coincide com o facto da maioria dos mesmos (n=13 de um total de 16) afirmar consumir açúcares nos lanches.

4.6. Quantificação da carga total bacteriana e de espécies cariogénicas e carioprotetoras nas amostras biológicas

Neste estudo quantificou-se carga total bacteriana de cada amostra e das espécies *S. mutans*, *S. sobrinus*, *A.naeslundii* (espécies cariogénicas) e *Streptococcus mitis* (espécie carioprotetora). Deste modo, podemos observar que tipo de bactérias estão mais prevalentes na cárie radicular.

Com a análise da carga total bacteriana presente no biofilme da lesão radicular, verificou-se que não havia relação entre esta e a extensão das lesões cariosas (figura 10). Contudo, foi possível averiguar que mesmo não havendo um número elevado de bactérias, a grande maioria eram cariogénicas (figura 11).

As espécies cariogénicas *S.mutans*, *S.sobrinus* e *A.naeslundii* são considerados patógenos da cárie radicular (3,39,40). *S.mutans* e *S.sobrinus*, em estudos recentes, foram referenciadas como potenciais biomarcadores para o risco

de cárie radicular (16). Nas amostras de biofilme da lesão verificou-se que *S.mutans*, *S.sobrinus* e *A.naeslundii* apresentaram os três níveis de carga bacteriana, sendo que na maioria dos indivíduos a carga destas foi baixa. Também tem sido relatado que a abundância de *S.mutans* e *S.sobrinus* aumenta com a gravidade da cárie radicular (16). Neste estudo, verificou-se que ambas as espécies e a espécie *A.naeslundii* apresentavam carga elevada em lesões moderadas (ICDAS 3-4), mas *S.sobrinus* foi a única que também apresentou carga elevada na lesão severa (ICDAS 5-6). Como nenhum paciente apresentou lesão radicular inicial (ICDAS 1-2), não foi possível verificar a relação destas espécies com lesões iniciais.

Sabe-se que o *S. mitis* é um dos primeiros colonizadores da superfície radicular (13), atuando como uma espécie carioprotetora. Neste estudo, verificou-se que *S.mitis* foi a espécie que apresentou sempre cargas baixas, concluindo-se que havia pouca prevalência de espécies carioprotetoras. Resultado que era expectável, dado que todas as amostras eram de pacientes com lesões de cárie.

Resumindo, embora as quatro espécies estivessem presentes tanto em lesões moderados como em severas, só as espécies cariogénicas (*A.naeslundii*, *S.sobrinus* e *S.mutans*) apresentaram carga bacteriana elevada em pelo menos um indivíduo. *S.mitis*, embora presente em todas as amostras, só apresentou níveis baixos e, esporadicamente, médios. Pelo que, nestas amostras, houve maior prevalência de espécies cariogénicas do que carioprotetoras.

4.7. Indicadores de doença

Os indicadores de doença são os resultados observados clinicamente de destruição prévia e/ou contínua do mineral dentário por cárie dentária, os quais são simplesmente manifestações e sinais clínicos dos efeitos da lesão cariosa em diferentes estágios (31). Portanto, como indicadores de doença temos a cárie dentária evidente ou manchas brancas, placa dentária dura e restaurações realizadas recentemente (últimos 2 anos) (17).

O ICDAS II é um sistema que classifica os estágios da lesão de cárie com base na sua extensão e atividade/progressão (43). Esta classificação pode ser utilizada em

superfícies coronais ou radiculares, lesões de esmalte ou dentina e lesões cavitadas ou não cavitadas (44). Nesta investigação distribuiu-se a presença de cárie em função do estágio em que esta se encontrava, pelo que a lesão cariosa moderada (ICDAS 3-4) foi a mais prevalente (n=40) seguida da lesão severa (ICDAS 5-6) (n=19). Portanto, em geral, os idosos apresentaram lesões cavitadas. Do total de 53 indivíduos, 46 apresentavam cáries, sendo que a maioria dispunha de diferentes estágios da lesão em simultâneo. Contudo, apenas 19 demonstraram ter lesões radiculares, sendo estas classificadas como moderadas ou severas, não se verificaram lesões radiculares de estágio inicial (ICDAS 1-2).

Dos 19 indivíduos com cárie radicular, apenas em 16 foi possível fazer a recolha do biofilme da lesão e conseqüentemente o processamento do mesmo. Como referido anteriormente, nestes indivíduos só se observaram lesões moderadas e severas. Através da quantificação bacteriana verificou-se que as bactérias cariogénicas (*S.mutans*, *S.sobrinus* e *A.naeslundii*) apresentaram cargas elevadas nas lesões moderadas (ICDAS 3-4) e apenas *S.sobrinus* apresentou esta carga em lesões severas (ICDAS 5-6). Quer isto dizer que estas três espécies podem ser consideradas como preditoras da cárie radicular, dado que o seu elevado teor bacteriano em nos dois estágios de cárie referidos.

À semelhança da cárie coronal, a cárie radicular é um processo dinâmico com estágios ativos e inativos da doença, sendo que nas lesões ativas à perda mineral progressiva e nas lesões inativas, para além de não haver perda de minerais, pode até ocorrer a formação de novos (2). A determinação da atividade da lesão é um ponto chave para o tratamento da mesma (45). Deste modo, as lesões cariosas inativas são consideradas cicatrizes, não necessitando de tratamento, ao passo que as lesões ativas requerem intervenção terapêutica (2). Provavelmente, muitos destes pacientes apresentavam cáries ativas que não foram devidamente tratadas e evoluíram para estágios mais avançados de cárie. Outros ainda apresentam lesões ativas em constante evolução, mas a inexistência de patologia dolorosa proporciona a falta de motivação na procura de tratamento. Infelizmente, a atividade das lesões foi um aspeto que não foi possível observar dada a falta de meios de aspiração e iluminação, mas espera-se que em estudos futuros o mesmo seja concretizado. Relativamente à evolução das lesões cariosas, só seria possível verificar se as instituições tivessem

um histórico de consultas dentárias de cada paciente. Contudo, não se observou um único paciente que continuasse a visitar clínicas dentárias após a sua entrada no lar.

4.8. Classificação relativamente ao risco de desenvolver lesões de cárie radicular

Todos os indivíduos observados com cárie radicular (n=16) apresentaram um risco elevado de cárie. Como referido anteriormente, este era o resultado esperado dado que apenas foi realizado o processamento e análise das amostras nos pacientes com lesões cariosas radiculares. Isto significa que todos estes indivíduos apresentavam exposição radicular com pelo menos uma lesão, o que os tornava uma população de risco para o surgimento de cáries. O índice microbiológico CarioCheck (anexo 4) foi criado para avaliar o risco de cárie numa população adulta. O referido índice analisa questões como a utilização de aparelho ortodôntico e drogas recreativas, as quais não se aplicam a uma população envelhecida sendo a resposta às mesmas negativa. Para a análise do risco de cárie radicular numa população idosa seria necessário a criação de um índice mais específico. Neste deviam ser incluídos parâmetros como a utilização de prótese, o número de dentes presentes em boca e a presença de cárie radicular. A atividade das lesões cariosas é um aspeto que deveria ser mantido, contudo para que seja possível ser avaliado é preciso garantir as condições necessárias para a realização do mesmo. Portanto, é essencial dispor de instrumentos que permitam a aspiração e secagem da cavidade oral e em específico das superfícies dentárias, e meios de iluminação intra-oral. A população idosa portuguesa, na sua maioria, ainda se encontra em instituições/lares e realizar este tipo de estudos nesses locais não permite avaliar com precisão a extensão da cárie bem como a sua atividade. Para que o mesmo seja possível, é fundamental conceber as condições referidas anteriormente.

4.9. Limitações e perspetivas futuras

Após a conclusão deste estudo, é essencial ressaltar as principais **limitações** identificadas:

- A integração das recolhas na Clínica Universitária não se mostrou proveitosa, dada a baixa afluência destas idades e ao facto de os poucos pacientes desta faixa etária que se dirigiam à clínica serem edêntulos ou já apresentarem as lesões radiculares devidamente tratadas;
- O reduzido número de examinadores não possibilitou obter uma amostra maior;
- Em relação aos *recalls*, é relevante observar que nem todos os pacientes aceitaram participar novamente no estudo, resultando numa amostra reduzida;
- Dificuldade em uniformizar as idades observadas, dada a pouca colaboração das faixas etárias mais avançadas;
- Relativamente aos questionários, não foi possível confirmar a veracidade das respostas uma vez que eram os idosos a responder. Apenas a medicação e patologias foram fornecidas pelo enfermeiro responsável.

Com base nas limitações identificadas, na análise dos procedimentos, dados e resultados, são propostas as seguintes **sugestões** para dar continuidade ao estudo:

- Expandir o corpo de examinadores qualificados com o intuito de aumentar a disponibilidade para a coleta de dados;
- Incluir todos os novos pacientes que frequentam a Clínica Universitária no estudo, visando uma amostragem mais representativa;
- Incluir pacientes de novos lares e instituições de idosos;
- Proporcionar melhores condições para a realização das recolhas quando realizadas fora da Clínica Universitária, por exemplo levando a mala portátil dentária da FMD-UCP (contém aspiração, jato de ar e água, contra-ângulo e turbina), uma vez que permitirá secar a cavidade oral e as superfícies dentárias possibilitando observar com maior precisão o estadio das lesões cariosas bem como a sua atividade/inatividade. Também é essencial levar uma lanterna/luz que permita a observação intra-oral com maior clareza;
- Confirmar se o índice microbiológico CarioCheck (Ribeiro, 2023) tem valor preditivo na cárie radicular na população em avaliação através da realização de *recalls* nos 16 pacientes observados com cárie radicular. No entanto, para que o mesmo seja possível, é necessário acrescentar neste índice questões relativas à utilização de próteses parciais, número de dentes presentes em boca e presença de cárie radicular, bem como o estadio e

atividade da mesma. Por outro lado, questões relativas ao uso de aparelho ortodôntico e drogas recreativas devem ser retiradas. Outra questão propícia a ser removida, é a profundidade de sulcos e fissuras, uma vez que para avaliar o risco de cárie radicular este aspecto não demonstra relevância.

5. Conclusões

Através deste projeto foi possível concretizar o primeiro objetivo definido para o mesmo. Verificou-se que as espécies bacterianas *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. mitis* e *A. naeslundii* estavam presentes no microbioma das lesões de cárie radicular na população idosa. Também foi possível averiguar, que nas amostras em estudo, houve maior prevalência de espécies cariogénicas (*S. mutans*, *S. sobrinus* e *A. naeslundii*) do que carioprotetoras (*S. mitis*). Por sua vez, este resultado coincide com o facto de as lesões radiculares observadas serem todas moderadas e/ou severas.

Relativamente ao segundo objetivo, sendo este um estudo preliminar e havendo ainda poucos *recalls*, não se consegue fazer de forma sustentada uma determinação de risco e uma comparação de valor preditivo. É de frisar que, infelizmente, nenhuma das *recalls* efetuadas correspondia a um paciente portador de cárie radicular, o que também impediu a análise das mesmas. Espera-se que no próximo ano, os pacientes observados aceitem realizar novamente as recolhas. Deste modo, será possível verificar se houve variações na carga bacteriana das quatro espécies quantificadas tendo em conta se o número de lesões no indivíduo aumentou, manteve-se ou diminuiu. Além disso, as *recalls* também serão necessárias para que seja exequível confirmar se o índice microbiológico CarioCheck tem valor preditivo nesta população e na lesão radicular. Realça-se novamente que se trata de um estudo em pacientes idosos, pelo que a realização das *recalls* é complicada e por vezes impossível (óbito).

Contudo, verificou-se que nesta população o índice de risco de cárie era elevado, o que coincide com o facto de os idosos observados apresentarem todas lesões moderadas/severas. Ainda assim, para um estudo mais preciso e direcionado para a cárie radicular e a população envelhecida, seria necessário adaptar este índice. Portanto, deixo as recomendações necessárias para que quem continue este projeto no ano seguinte possa melhorar o índice, acrescentar mais amostras e realizar as *recalls* a estes pacientes.

6. Bibliografia

1. Heasman PA, Ritchie M, Asuni A, Gavillet E, Simonsen JL, Nyvad B. Gingival recession and root caries in the ageing population: a critical evaluation of treatments. *J Clin Periodontol*. 2017 Mar 1;44(18):S178–93.
2. 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.
3. Chen L, Qin B, Du M, Zhong H, Xu Q, Li Y, et al. Extensive description and comparison of human supra-gingival microbiome in root caries and Health. *PLoS One*. 2015 Feb 6;10(2).
4. 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 13;9.
5. Alian AY, McNally ME, Fure S, Birkhed D. Assessment of Caries Risk in Elderly Patients Using the Cariogram Model. *Journal of Canadian Dental Association [Internet]*. 2006 Jun;72(5):459–63. Available from: www.cda-adc.ca/jcda
6. Ribeiro ASF. Saúde oral em idosos institucionalizados e não-institucionalizados: um estudo comparativo. [Viseu]: Universidade Católica Portuguesa; 2018.
7. Singh M, Teles F, Uzel NG, Papas A. Characterizing Microbiota from Sjögren's Syndrome Patients. *JDR Clin Trans Res [Internet]*. 2021 Jul 20;6(3):324–32. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2380084420940623>
8. Schwartz JL, Peña N, Kwar N, Zhang A, Callahan N, Robles SJ, et al. Old age and other factors associated with salivary microbiome variation. *BMC Oral Health*. 2021 Dec 1;21(1).
9. Kazemtabrizi A, Haddadi A, Shavandi M, Harzandi N. Metagenomic investigation of bacteria associated with dental lesions: a cross-sectional study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal [Internet]*. 2020 Mar 1;25(2):0–0. Available from: <http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/aop/23326.pdf>

10. Jiang W, Xie Z, Huang S, Huang Q, Chen L, Gao X, et al. Targeting cariogenic pathogens and promoting competitiveness of commensal bacteria with a novel pH-responsive antimicrobial peptide. *J Oral Microbiol.* 2023;15(1).
11. Lopes P, Gomes A, Mendes K, Blanco L, Correia M. What do molecular microbial results on biofilm reveal regarding caries? - A systematic review. *JDR Clin Trans Res* [Internet]. 2023 Nov 8; Available from: <http://mc.manuscriptcentral.com/>
12. Usuga-Vacca M, Marquez-Ortiz RA, Castellanos JE, Martignon S. Association of Root Biofilm Bacteriome with Root Caries Lesion Severity and Activity. *Caries Res* [Internet]. 2024 Feb 22;58(1):39–48. Available from: <https://karger.com/doi/10.1159/000535923>
13. Do T, Damé-Teixeira N, Naginyte M, Marsh PD. Root Surface Biofilms and Caries. *Monogr Oral Sci* [Internet]. 2017;26:26–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29050018>
14. Preza D, Olsen I, Aas JA, Willumsen T, Grinde B, Paster BJ. Bacterial profiles of root caries in elderly patients. *J Clin Microbiol.* 2008 Jun;46(6):2015–21.
15. Reddy N, Golob Deeb J, Kitten T, Carrico CK, Grzech-Leśniak K. The In Vitro Effect of Laser Irradiation (Er:YAG and CO₂) and Chemical Reagents (Hydrogen Peroxide, Sodium Hypochlorite, Chlorhexidine, or Sodium Fluoride) Alone or in Combination on Reducing Root Caries Bacteria. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Dec 12;23. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/24/15732>
16. Chen L, Qin Y, Lin Y, Du M, Li Y, Fan M. Salivary levels of five microorganisms of root caries in nursing home elderly: a preliminary investigation. *BMC Oral Health* [Internet]. 2023 Jun 3;23(1):355. Available from: <https://bmcoralhealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12903-023-02953-9>
17. Featherstone J, Ramos Gomez F, Crystal YO. CAMBRA® Caries Management by Risk Assessment A Comprehensive Caries Management Guide for Dental Professionals. *J Calif Dent Assoc* [Internet]. 2019 Jul 11;47. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/334401386>
18. Fonseca AF dos S. Avaliação de um índice de risco de cárie numa população adulta. [Viseu]: Universidade Católica Portuguesa; 2022.

19. Ribeiro VMM. Inclusão de indicadores microbianos num índice de risco de cárie numa população adulta. [Viseu]: Universidade Católica Portuguesa; 2023.
20. Banava S, Fattah M, Kharrazifard MJ, Safaie T, Askarzadeh SH, Yazdi MS, et al. Clinical comparison of dental caries by DMFT and ICDA systems. 2012;24(2).
21. 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 Sep 23;
22. Desai JP, Nair RU. Oral Health Factors Related to Rapid Oral Health Deterioration among Older Adults: A Narrative Review. *J Clin Med* [Internet]. 2023 Apr 29;12(9):3202. Available from: <https://www.mdpi.com/2077-0383/12/9/3202>
23. Attin T, Hornecker E. Tooth brushing and oral health: how frequently and when should tooth brushing be performed? *Oral Health Prev Dent*. 2005;3(3):135–40.
24. Kumar S, Tadakamadla J, Johnson NW. Effect of Toothbrushing Frequency on Incidence and Increment of Dental Caries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Dent Res* [Internet]. 2016; Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0022034516655315>
25. Iba B, Adamu VE. Tooth brushing: An effective oral hygiene measure. *Orapuh Journal* [Internet]. 2021 Jul 31;2(2). Available from: <https://orapuh.org/journal/>
26. Kubo MMF, Mialhe FL. Fio dental: da dificuldade ao êxito na remoção do biofilme interproximal / Dental floss: from difficulty to success in the removal of interproximal biofilms. *Arquivos em Odontologia, Belo Horizonte* [Internet]. 2011 Jan [cited 2024 May 13];47(1):51–5. Available from: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-725232>
27. Sälzer S, Graetz C, Dörfer CE, Slot DE, Van der Weijden FA. Contemporary practices for mechanical oral hygiene to prevent periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2020 Oct 1;84(1):35–44.
28. Cate JM ten. Contemporary perspective on the use of fluoride products in caries prevention. *Br Dent J*. 2013 Feb 23;214(4):161–7.

29. Touger-Decker R, van Loveren C. Sugars and dental caries. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2003 Oct;78(4):881S-892S. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002916522034086>
30. Faine MP, Allender D, Baab D, Persson R, Lamont RJ. Dietary and salivary factors associated with root caries. *Special Care in Dentistry*. 1992;12(4):177–82.
31. Featherstone JDB, Crystal YO, Alston P, Chaffee BW, Doméjean S, Rechmann P, et al. Evidence-Based Caries Management for All Ages-Practical Guidelines. *Frontiers in Oral Health* [Internet]. 2021 Apr 27;2. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/froh.2021.657518/full>
32. Cortelli SC, Costa FO, Rode S de M, Haas AN, Andrade AKP de, Pannuti CM, et al. Mouthrinse recommendation for prosthodontic patients. *Braz Oral Res*. 2014;28(1):1–9.
33. Llana-Puy C. The rôle of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* [Internet]. 2006 Aug;11(5):E449–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16878065>
34. Deng J, Jackson L, Epstein JB, Migliorati CA, Murphy BA. Dental demineralization and caries in patients with head and neck cancer. *Oral Oncol* [Internet]. 2015 Jul 18;51(9):824–31. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1368837515002560>
35. Wolff A, C. Fox P, Porter S, T. Konttinen Y. Established and Novel Approaches for the Management of Hyposalivation and Xerostomia. *Curr Pharm Des*. 2012 Oct 2;18(34):5515–21.
36. Su N, Marek CL, Ching V, Grushka M. Caries Prevention for Patients with Dry Mouth. *Journal of canadian dental association*. 2011;77.
37. Dawes C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? *J Can Dent Assoc* [Internet]. 2003 Dec;69(11):722–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14653937>
38. Zumarán JFC, Aguilar AAA. Prognosis method for risk assessment of dental caries induced by chocolate consumption. *Revista Odontológica Mexicana* [Internet]. 2015 Jan;19(1):27–32. Available from: <http://www.medigraphic.com/facultadodontologiaunam>

39. Chen T, Shi Y, Wang X, Wang X, Meng F, Yang S, et al. High-throughput sequencing analyses of oral microbial diversity in healthy people and patients with dental caries and periodontal disease. *Mol Med Rep.* 2017;16:127–32.
40. Brailsford SR, Lynch EJR, Beighton D. The Isolation of *Actinomyces naeslundii* from Sound Root Surfaces and Root Carious Lesions. *Caries Res.* 1998;32(2):100–6.
41. Takahashi N, Yamada T. Catabolic pathway for aerobic degradation of lactate by *Actinomyces naeslundii*. *Oral Microbiol Immunol.* 1996 Jun;11(3):193–8.
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 Jan 31;8(2):194.
43. Usuga-Vacca M, Marin-Zuluaga DJ, Castellanos JE, Martignon S. Association between root/coronal caries and individual factors in institutionalised elderly using ICDAS severity and activity. *BMC Oral Health.* 2021 Mar 23;21(1):146.
44. Dikmen B. ICDAS II CRITERIA (INTERNATIONAL CARIES DETECTION AND ASSESSMENT SYSTEM). *J Istanbul Univ Fac Dent [Internet].* 2015 Oct 21;49(3):63–72. Available from:
<http://iupress.istanbul.edu.tr/journal/eor/article/icdas-ii-criteria-international-caries-detection-and-assessment-system>
45. Oliveira RS, Zenkner JEA, Maltz M, Rodrigues JA. Association between two visual criteria in assessing non-cavitated caries lesion activity on occlusal surfaces of permanent molars. *Clin Oral Investig.* 2015 Mar 3;19(2):565–8.

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



Questionário de dadores

A- Dados da amostra

Questão 1.

Código do dador

Questão 2.

Data da colheita

Questão 3.

Material Biológico

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

Questão 4.

Amostragem

- 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 _____



Questão 6.

Investigador / Médico dentista responsável

B- Dados pessoais do dador

Questão 7.

Género

- Feminino
- Masculino
- Não binário
- Prefere não mencionar

Questão 8.

Data de nascimento

Questão 9.

Etnia

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

Questão 10.

Nível de escolaridade

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



C- Informações de saúde geral do dador

Questão 11.

Tem ou teve alguma patologia?

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

Questão 12.

Especifique o tipo de patologia (s)

Questão 13.

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

- Sim
- Não

Questão 14.

Se sim, há quanto tempo (anos)?

Questão 15.

Tem hipertensão?

- Sim
- Não



Questão 16.

Tem diabetes?

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

Questão 17.

Histórico familiar – Existem doenças na família como?

- Doenças cardíacas

- Diabetes

- Cancro

- Outras

D- Informações sobre a medicação

Questão 18.

Faz algum tipo de tratamento médico ou medicação com regularidade?

- Sim

- Não

- Não sabe



Questão 19.

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

- Sim
- _____
- Não
- Não sabe

Questão 20.

Fez antibiótico nos últimos 3 meses?

- Sim
- _____
- Não
- Não sabe

Questão 21.

Recebeu a vacina da gripe nos últimos 6 meses?

- Sim
- Não
- Não sabe

E- Hábitos – Consumo de tabaco

Questão 22.

Fuma ou já fumou?

- Sim
- Não
- Ex-fumador

Questão 23.

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

- Sabe
- _____
- Não sabe



Questão 24.

Quantos cigarros fuma ou fumava por dia?

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

Questão 25.

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

- Sabe
- Não sabe

Questão 26.

Usa drogas recreativas?

- Sim
- Não

F- Hábitos - Consumo de álcool

Questão 27.

Bebe ou já bebeu, regularmente bebidas alcoólicas?

- Sim
- Não

Questão 28.

Se bebe ou já bebeu, com que idade começou?

- Sabe

- Não sabe

Questão 29.

Se bebe ou já bebeu, preencha o seguinte quadro:

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



Questão 30.

Se deixou de beber foi com que idade?

- Sabe
- _____
- Não sabe

G- Hábitos - Alimentares

Questão 31.

Utiliza açúcar nos lanches entre refeições?

- Sim
- Não
- Não sabe

Questão 32.

Número de lanches com açúcar entra as refeições:

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

H- Nível hormonal

Questão 33.

Toma anticoncecionais?

- Sim
- Não

Questão 34.

Há quantos dias teve a última menstruação?



Questão 35.

Está grávida?

- Sim
- Não

Questão 36.

Se sim, de quantas semanas?

Questão 37.

Encontra-se na menopausa?

- Sim
- Não

Questão 38.

Se sim, há quantos anos?

I- Hábitos e comportamentos de higiene oral

Questão 39.

Costuma escovar os dentes diariamente?

- Sim
- Não

Questão 40.

Se sim, quantas vezes por dia?

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



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 46.

Utiliza aparelho ortodóntico?

- Sim
- Não



Questão 47.

Quando foi a última vez que visitou um dentista?

- Há 1 ano
- Há 2 anos
- Entre 2 a 5 anos
- Há mais de 5 anos
- Nunca fui ao dentista

Questão 48.

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

- Sim
- Não

Questão 49.

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

- Sim
- Não

Questão 50.

Sente que a sua boca esta "seca"?

- Sim
- Não

Questão 51.

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

- Sim
- Não



Questão 52.

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

- Sim
- Não

Questão 53.

Sente alguma alteração no paladar?

- Sim
- Não

J- Saúde oral – Lesões de cárie e diagnóstico periodontal

Questão 54. Condição atual de cada elemento dentário

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



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

Questão 59. Diagnóstico periodontal (marcar uma resposta ou mais)

Nota: Como questões a seguir referem-se ao diagnóstico periodontal (nova classificação). Preencher Perio Chart e copiar informações para o questionário. <https://www.periodontalchart-online.com/uk/>

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

Questão 60.

BOP – Sangramento à sondagem



Questão 61.

Índice de placa

Questão 62.

Média da profundidade de sondagem

Questão 63.

Necessidade de tratamento médico-dentário?

- Sim
- Não

K- Saúde oral – Próteses dentárias

Questão 64.

Utiliza prótese dentária?

- Sim
- Não

Questão 65.

Em qual das arcadas?

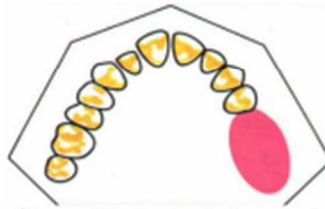
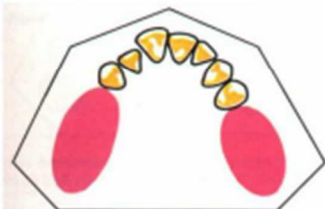
- Superior
- Inferior
- Ambas

Questão 66. Qual o tipo de prótese?

	Total	Parcial acrílica	Parcial esquelética
Superior			
Inferior			

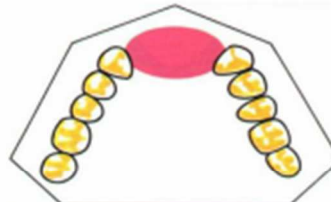
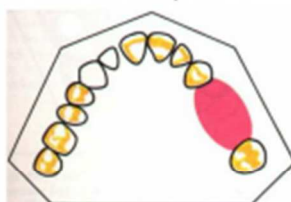
Questão 67. A que tipo de classificação de Kennedy corresponde a prótese que utiliza?

- 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:

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

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 – Cálculo final

	Indicadores de doenças	Fatores de risco	Fatores de proteção	Peso no cálculo final
Lesões de cárie iniciais (ativas)				+3
Lesões de cárie moderadas (ativas)				+3
Lesões de cárie extensas (ativas)				+3
Histórico de tratamentos associado a cárie nos últimos 3 anos				+2
Profundidade de sulcos e fissuras				+2
Exposição radicular				+2
Utilização de aparelho ortodôntico				+2
Frequência de lanches com açúcar				+2
Uso de drogas recreativas				+2
Fluxo salivar não estimulado <0,3ml p/min				+2
Ph salivar				+2
Carga bacteriana total				+1
Quantidade de bactérias cariogênicas				+2
Uso de fio dentário				-1
Uso de pasta fluoretada 1x p/ dia				-1
Uso de pasta fluoretada 2x p/dia				-1
Uso de colutório com fluor				-1
Pasta fluoretada 5000 ppm				-1
Verniz de fluor nos últimos 6 meses				-1
Fluor em gel nos últimos 6 meses				-1
Prescrição de clorhexidina				-1
Quantidade de bactérias carioprotetoras				-1
Fluxo salivar estimulado >1ml p/min				-1
Total				

Risco baixo	-10 a -2
Risco moderado	-1 a +2
Risco elevado	+3 a +17
Risco severo	+18 a +28 ou Risco elevado mais hipossalivação