



CATÓLICA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

UISEU

Inclusão de indicadores microbianos num índice de risco de cárie numa população adulta

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

Por:

Vanessa Maria Monteiro Ribeiro

Viseu, 2023



CATÓLICA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

VISEU

Inclusão de indicadores microbianos num índice de risco de cárie numa população adulta

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

Por:

Vanessa Maria Monteiro Ribeiro

Orientador: Professora Doutora Maria José Correia

Coorientador: Professora Doutora Rute Rio e Mestre Pedro Lopes

Viseu, 2023

Agradecimentos

À minha orientadora **Professora Doutora Maria José Correia** por me ter orientado com todo o rigor científico e profissionalismo.

À minha co-orientadora, **Professora Doutora Rute Rio**, pelas suas intervenções pertinentes, pelo seu contributo nesta investigação e pela constante demonstração de disponibilidade.

Ao meu co-orientador, **Mestre Pedro Lopes** pela disponibilidade que demonstrou comigo e com os seus alunos.

Ao **SalivaTec**, e em particular, à **Doutora Ana Peixoto Gomes**, à **Marla**, à **Mónica** e à **Ana Patrícia**, o meu agradecimento por toda a dedicação.

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

Aos meus pais, pelo vosso apoio incondicional, por me permitirem este percurso académico, sem vocês nada disto seria possível. Obrigada por me realizarem este e outros sonhos!

Aos meus avós, por serem exemplos de bondade e amor.

Ao André, pela ajuda, compreensão e paciência ao longo do meu percurso e essencialmente por acreditar em mim tão genuinamente!

A todos os colegas e amigos que conheci nesta casa por toda a ajuda, amizade e companheirismo durante estes 5 anos. Em especial, à **Matilde**, por todo tempo que passámos juntas e pelos momentos de boa disposição.

À **Maria** pela amizade genuína que criámos no 1º ano.

Aos amigos de Canas por me ensinarem que as amizades de longa data perduram.

À Melanie e à Joana, por terem colaborado comigo na recolha de dados. Foram incansáveis!

Aos participantes, que de forma voluntária demonstraram disponibilidade para que esta investigação fosse concretizada.

Resumo

Introdução: A cárie é a doença crónica mais comum que afeta os seres humanos. Por isso, é de extrema importância realizar a avaliação do risco de cárie, a fim de identificar indivíduos com maior propensão a desenvolver essas lesões e, assim, personalizar o plano de tratamento. Essa abordagem permite fornecer medidas preventivas para evitar o surgimento ou a progressão da doença.

Objetivos: Contribuir para a recolha de informação sobre o risco de cárie dos pacientes adultos que recorrem à Clínica Dentária Universitária. Aumentar a amostra total de pacientes continuando o projeto iniciado por Fonseca, 2022 (20). Realizar *recalls* em pacientes observados há mais de 8 meses e perceber as mudanças ocorridas. Utilizar as amostras de saliva recolhidas para caracterizar o microbioma oral dos pacientes em termos de carga total bacteriana e da bactéria cariogénica *Streptococcus sobrinus*. Propor os fatores a incluir numa aplicação *chairside*.

Materiais e métodos: Este é um estudo observacional longitudinal que incluiu 123 pacientes que frequentaram a Clínica Dentária da Universidade Católica Portuguesa de Viseu, entre março de 2022 e maio de 2023. A recolha de dados dos pacientes consistiu na aplicação de um questionário, de uma avaliação intraoral, e na colheita de amostras de saliva e de biofilme. Vinte pacientes foram sujeitos a uma segunda avaliação decorrida 8/10 meses após a primeira avaliação. Os dados foram recolhidos na plataforma *Qualtrics* e analisados recorrendo ao programa SPSS.

Resultados: Nos 123 pacientes avaliados, classificamos como risco baixo 58,54% (n=72), risco moderado 28,46% (n=35), risco elevado 11,38% (n=14) e risco severo 1,63% (n=2). Foi feito o *recall* de 20 pacientes, em que 3 pacientes alteraram o risco: o primeiro paciente transitou de um risco elevado para um risco moderado, o segundo transitou de risco elevado para um nível baixo e o terceiro transitou de um nível moderado para um nível de risco baixo. Foi feita a classificação do risco em 66 pacientes com a adição da quantificação de *Streptococcus sobrinus*, constatando-se que houve mudanças no risco de cárie com esta variável comparando ao risco sem

ela. Porém são necessárias melhorias, principalmente nas análises microbiológicas a serem executadas, como a quantificação de outras bactérias cariogênicas e carioprotetoras.

Conclusão: Neste trabalho, alcançaram-se os objetivos de classificar provisoriamente 123 pacientes em relação ao risco de cárie, servindo assim como ponto de partida para a identificação das necessidades de tratamento e estabelecimento de estratégias preventivas. Foi feita a reavaliação em 20 pacientes para verificar mudanças ocorridas. Além disso, ampliou-se a análise ao classificar 66 pacientes em relação ao risco de cárie adicionando a variável da quantificação de *Streptococcus sobrinus*. Propor os fatores a incluir numa aplicação *chairside*.

Palavras-chave: Cárie dentária, Prevenção de cárie, CAMBRA, Risco de cárie, indicadores de doença, fatores de risco, fatores de proteção.

Abstract

Introduction: Carie is the most common chronic disease that affects human beings. Therefore, it is extremely important to assess the risk of caries in order to identify individuals with a higher propensity to develop these lesions and thus personalize the treatment plan. This approach allows for the provision of preventive measures to avoid the onset or progression of the disease.

Goal: To contribute to gathering information of the risk of dental caries in adult patients attending the CDU-UCP. To utilize the collected saliva samples to characterize the oral microbiome of the patients in terms of total bacterial load and the cariogenic bacteria *Streptococcus sobrinus*. Increase the total patient sample by continuing the project initiated by Fonseca, 2022 (20). Perform recalls on patients observed for more than 8 months and assess the changes that have occurred. Propose the factors to include in a *chairside* application.

Materials and methods: This study consisted of a longitudinal observational study that included 123 patients who attended the CDU-UCP, between March 2022 and May 2023. Each patient who met the necessary requirements to participate in this study was observed by the researchers, who collected the patient's data through the administration of a questionnaire, an intraoral assessment, and the collection of saliva and biofilm samples. Among the patients, some (20) underwent a second assessment 8/10 months after the first evaluation. The data were collected using the Qualtrics platform and analyzed using the SPSS software.

Results: In the 123 evaluated patients, we classified 58.54% (n=72) as low risk, 28.46% (n=35) as moderate risk, 11.38% (n=14) as high risk, and 1.63% (n=2) as severe risk. A recall was performed on 20 patients, where 3 patients had a change in their risk classification: the first patient transitioned from high risk to moderate risk, the second one transitioned from high risk to low risk, and the third transitioned from moderate risk to low risk. Risk classification was conducted on 66 patients with the addition of *Streptococcus sobrinus* quantification, revealing changes in caries risk compared to the risk without this variable. However, improvements are needed,

especially in the microbiological analyses to be performed, such as quantification of other cariogenic and carioprotective species.

Conclusion: In this study, the objectives of provisionally classifying 123 patients in relation to caries risk were achieved, serving as starting point for identifying treatment needs and establishing preventive strategies. A reevaluation was conducted on 20 patients to assess the changes that occurred. Additionally, the analysis was expanded by provisionally classifying 66 patients in relation to caries risk incorporating the variable of *Streptococcus sobrinus* quantification.

Key words: Dental caries, Caries prevention, CAMBRA, Caries risk, disease indicators, risk factors, protective factors.

Índice Geral

Agradecimentos	V
Resumo	VII
Abstract	IX
Índice Geral	XI
Índice de abreviaturas	XIII
Índice de tabelas e figuras	XIV
1. Introdução	1
1.1. Epidemiologia da cárie em adultos	3
1.2. Estrutura Dentária e a cárie	4
1.3. O Biofilme oral e a cárie.....	5
1.4. Cárie como patologia multifatorial	5
1.5. Gestão da cárie e o papel do Médico Dentista	7
2. Materiais e Métodos	9
2.1. Caracterização do estudo	11
2.2. Caracterização da amostra	11
2.3. Princípios éticos.....	12
2.4. Treino e calibração	12
2.5. Recolha da amostra	13
2.5.1. Fase 1 – Questionário.....	13
2.5.2. Fase 2 – Exame clínico.....	13
2.5.3. Fase 3 – Recolha de saliva	14
2.5.4. Fase 4 – Recolha de biofilme.....	15
2.6. Análise estatística	16
3. Resultados	17
3.1. Caracterização demográfica da amostra em estudo	19
3.2. Caracterização dos hábitos de higiene oral	20
3.3. Caracterização dos hábitos alimentares	24

3.4. Caracterização de fatores que predisõem a acumulação de placa bacteriana	26
3.5. Caracterização de fatores associados ao fluxo salivar	29
3.6. Caracterização da análise salivar.....	30
3.7. Risco de desenvolver lesões de cárie	36
3.8. <i>Recalls</i>	43
3.9. Risco de desenvolver lesões de cárie com a adição da quantificação de <i>Streptococcus sobrinus</i>	44
4. Discussão de resultados	47
4.1. Hábitos de higiene oral	49
4.2. Hábitos alimentares	51
4.3. Fatores que contribuem para a acumulação de placa bacteriana.....	52
4.4. Fatores que afetam o fluxo salivar	53
4.5. Análise da saliva	54
4.6. Análise do Biofilme	54
4.7. Indicadores de doença.....	55
4.8. Classificação relativamente ao risco de desenvolver lesões de cárie.....	56
4.9. <i>Recalls</i>	56
4.10. Risco de desenvolver lesões de cárie com a adição da quantificação de <i>Streptococcus sobrinus</i>	57
4.11. Considerações finais.....	57
Limitações e perspectivas futuras.....	59
5. Conclusões.....	60
6. Bibliografia	61
7. Anexos	65
Anexo 1- Consentimento informado.....	67
Anexo 2- Questionário	70
Anexo 3- Cálculo final.....	76
Anexo 4- Protocolos laboratoriais	77

Índice de abreviaturas

ADA- *American Dental Association*

CAMBRA- *Caries management by risk assessment*

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

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

ICDAS- *International Caries Detection and Assessment System*

WHO- *World Health Organization*

Índice de tabelas e figuras

Figura 1. Diagrama esquemático do equilíbrio entre fatores protetores e patológicos na cárie. (Imagem adaptada de Community Dent Oral Epidemiol Featherstone JBD, 1999).....	5
Figura 2. O equilíbrio/desequilíbrio da cárie. (Adaptado de Featherstone JD et al, 2012).....	6
Figura 3. Profundidade de sulco e fissuras. (Imagem adaptada do artigo Fissure Depth and Caries Incidence in First Permanent Molars: A Five-Year Follow-Up Study).....	14
Figura 4. Distribuição da população de acordo com o género.	19
Figura 5. Histograma representativo da distribuição de idades dos indivíduos da amostra.....	20
Figura 6. Distribuição da amostra relativamente ao uso de pasta dentífrica com flúor.	21
Figura 7. Distribuição da amostra relativamente ao número de escovagens com uso de pasta dentífrica com flúor.....	21
Figura 8. Distribuição da amostra relativamente ao uso de fio dentário	22
Figura 9. Distribuição da amostra relativamente à utilização de colutório com flúor (0,05% NaF)	22
Figura 10. Relação entre o uso de fio dentário e a idade.....	23
Figura 11. Distribuição da amostra de acordo com a utilização de verniz de flúor nos últimos 6 meses.	24
Figura 12. Distribuição da amostra de acordo com a utilização de açúcar nos lanches entre as refeições principais.....	25
Figura 13. Distribuição da amostra relativamente ao número de lanches com açúcar.....	25
Figura 14. Distribuição da amostra relativamente à utilização de aparelho ortodôntico.....	26
Figura 15. Distribuição da amostra de acordo com a profundidade de sulcos e fissuras de pré-molares e molares.....	27
Figura 16. Distribuição da amostra relativamente à presença de exposição radicular.....	28
Figura 17. Relação entre a presença de exposição radicular e a idade.....	28

Figura 18. <i>Distribuição da amostra relativamente à análise do fluxo salivar não estimulado</i>	29
Figura 19. <i>Distribuição da amostra relativamente à análise do fluxo salivar estimulado</i>	29
Figura 20. <i>Distribuição da amostra relativamente à presença de algum fator que pode influenciar o fluxo salivar</i>	30
Figura 21. <i>Distribuição da amostra relativamente ao pH salivar</i>	31
Figura 22. <i>Distribuição da amostra relativamente à quantificação molecular de 16sRNA bacteriano</i>	32
Figura 23. <i>Distribuição da amostra relativamente ao histórico de tratamentos relacionados a lesões de cárie</i>	33
Figura 24. <i>Distribuição da amostra relativamente à presença de lesões de cárie iniciais (ICDAS 1-2)</i>	34
Figura 25. <i>Distribuição da amostra relativamente à presença de lesões de cárie moderadas (ICDAS 3-4)</i>	34
Figura 26. <i>Distribuição da amostra relativamente à presença de lesões de cárie extensas (ICDAS -6)</i>	35
Figura 27. <i>Relação entre a idade e a presença de lesões de cárie extensas (ICDAS 5-6)</i>	35
Figura 28. <i>Classificação relativa ao risco de desenvolver lesões de cárie</i>	36
Figura 29. <i>Relação entre a idade e o risco de desenvolver lesões de cárie</i> ...	37
Figura 30. <i>Relação entre o risco de desenvolver lesões de cárie e o número de escovagens com pasta fluoretada</i>	38
Figura 31. <i>Relação entre o risco de desenvolver lesões de cárie e a utilização de fio dentário</i>	39
Figura 32. <i>Relação entre o risco de cárie e o número de lanches com açúcar entre as refeições principais</i>	40
Figura 33. <i>Relação entre o risco de cárie e o histórico de tratamentos decorrentes de lesões de cárie nos últimos 3 anos</i>	41
Figura 34. <i>Relação entre o pH salivar e o risco de cárie</i>	42
Figura 35. <i>Relação entre o risco de desenvolver lesões de cárie e a carga bacteriana total</i>	42

Figura 36. <i>Comparação entre o risco apresentado na primeira avaliação e o risco apresentado na segunda avaliação</i>	43
Figura 37. <i>Distribuição da amostra relativamente à quantificação de Streptococcus sobrinus.</i>	44
Figura 38. <i>Classificação relativa ao risco de desenvolver lesões de cárie sem a adição da quantificação de S.sobrinus (A) e com a adição da quantificação de S.sobrinus (B).</i>	45

1. Introdução

A cárie dentária, embora possível de prevenir, é reconhecida como a doença crônica mais comum a nível mundial (1). O termo cárie refere-se quer à patologia quer à lesão cariiosa que é a manifestação da patologia (2). A cárie resulta de mecanismos que levam à alteração do pH no ambiente oral, que resulta principalmente de alterações na composição do biofilme oral, mas simultaneamente a condiciona numa interação dinâmica entre hospedeiro e microrganismos. A lesão cariiosa começa com a desmineralização provocada pela descida prolongada ou extrema do pH, seguida de uma pequena irregularidade na superfície, e progride eventualmente para a formação de uma cavidade. Se não tratada, a cárie pode afetar a polpa dentária, causar abscessos e apresentar sinais sistémicos (3).

A doença cárie pode ser caracterizada como um desequilíbrio entre fatores que protegem e fatores que causam doença, sendo que o predomínio dos fatores patológicos resulta no surgimento ou agravamento das lesões (4). Assim, é extremamente importante avaliar o risco de cárie e identificar os indivíduos mais propensos a desenvolver lesões (5).

1.1. Epidemiologia da cárie em adultos

Num período anterior à utilização do flúor, principalmente durante as décadas de 1960 e 1970, a cárie dentária era descrita como uma epidemia, sendo praticamente impossível escapar dela, afetando quase todos os dentes até aos 18 anos (6).

Atualmente tem-se observado uma diminuição na ocorrência da cárie dentária nos países desenvolvidos. Houve uma redução significativa, de 28% para 17% em dentes decíduos e de 29% para 16% em dentes permanentes (7). No entanto, nos países em desenvolvimento os níveis de cárie ainda são mais elevados, havendo uma exceção notável no continente africano, onde a prevalência é baixa, devido à alimentação praticada, que é escassa em alimentos cariogénicos (8).

1.2. Estrutura Dentária e a cárie

Os dentes são conhecidos por possuírem uma superfície dura, o esmalte, exposta a um ambiente rico em nutrientes, o que facilita a colonização dos microrganismos. No entanto o esmalte apresenta um desafio para a colonização bacteriana, pois está sujeito a constante mudança provocada por fluidos como saliva e fluido crevicular (9). As diferentes morfologias oclusais estão relacionadas a diferentes níveis de suscetibilidade à cárie, uma vez que a facilidade de colonização bacteriana e acumulação de resíduos alimentares depende em muito da morfologia da superfície dentária (10). Indivíduos com sulcos profundos nos dentes posteriores têm uma maior suscetibilidade a essa patologia (10).

Os alimentos e bebidas produzem mudanças no pH, assim como, certas medicações e condições sistêmicas (11). Após a ingestão de alimentos, o pH oral diminui nos 2 a 5 minutos seguintes e só volta ao normal após 15 a 40 minutos (12). A regulação do pH na superfície do dente é efetuada pela saliva, mais especificamente pela sua capacidade tampão, que evita a colonização da cavidade oral por microrganismos potencialmente patogênicos (11,13).

A saliva tem um papel importante na limpeza mecânica da cavidade oral, na redução da solubilidade do esmalte dentário, na neutralização dos ácidos produzidos pelos microrganismos cariogênicos através dos substratos provenientes da dieta, apresentando ainda capacidade antimicrobiana (14). Está demonstrada também a relação direta entre a prevalência de cáries e o pH salivar ácido, demonstrando desta forma a importância do pH na saúde oral (13,14).

1.3. O Biofilme oral e a cárie

Os microrganismos cariogênicos, como *Streptococcus mutans*, lactobacilos e *Streptococcus sobrinus* utilizam hidratos de carbono da dieta para produzir subprodutos ácidos e, desta maneira, conseguem fornecer ao biofilme dentário propriedades cariogênicas (15), sendo que *S.mutans* e *S.sobrinus* têm sido as espécies do grupo de streptococcus mais frequentemente implicadas na patogênese da cárie dentária (16). Por outro lado, as bactérias comensais como *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius* contrariam as cariogênicas, inibindo o crescimento e virulência das mesmas através da produção de peróxido de hidrogênio e substâncias alcalinas. Essas ações estão associadas a um menor risco de cárie e superfícies dentárias saudáveis (15). Muitos índices de risco de cárie não contabilizam este fator microbiológico uma vez que pode ser um processo dispendioso e complexo, que requer infraestrutura laboratorial e recursos humanos (11).

Existe uma relação de simbiose entre as bactérias carioprotetoras e as bactérias cariogênicas que formam, assim, o biofilme oral (17). Há então um equilíbrio entre a produção de ácidos e uma compensação alcalina, estabelecendo-se um pH neutro. Pode, no entanto, ocorrer modificações no microbioma oral que leva a uma disbiose e consequente cárie dentária (9).

1.4. Cárie como patologia multifatorial

Em 1999, *Feathersone* desenvolveu o seguinte diagrama esquemático onde demonstra o balanço referido anteriormente (18).

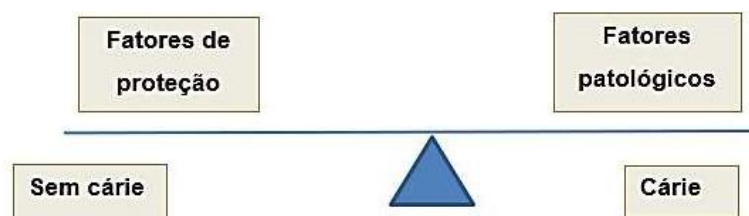


Figura 1. Diagrama esquemático do equilíbrio entre fatores protetores e patológicos na cárie. (Imagem adaptada de *Community Dent Oral Epidemiol Feathersone JBD*, 1999).

No ano de 2012, *Featherstone JD et al* realizaram uma avaliação do risco de cárie por meio da consideração de todos os indicadores de doença e fatores de risco, comparados aos fatores de proteção presentes (19).

Assim, foi necessário incluir os indicadores de doença, que são as observações clínicas que descrevem o histórico de cárie ou a sua presença atual, como cavidades, manchas brancas ou áreas radiolúcidas (9). A presença desses indicadores tem um impacto significativo na previsão do risco de cárie, pois indicam que a doença continuará a progredir a menos que ocorra uma intervenção terapêutica (9).

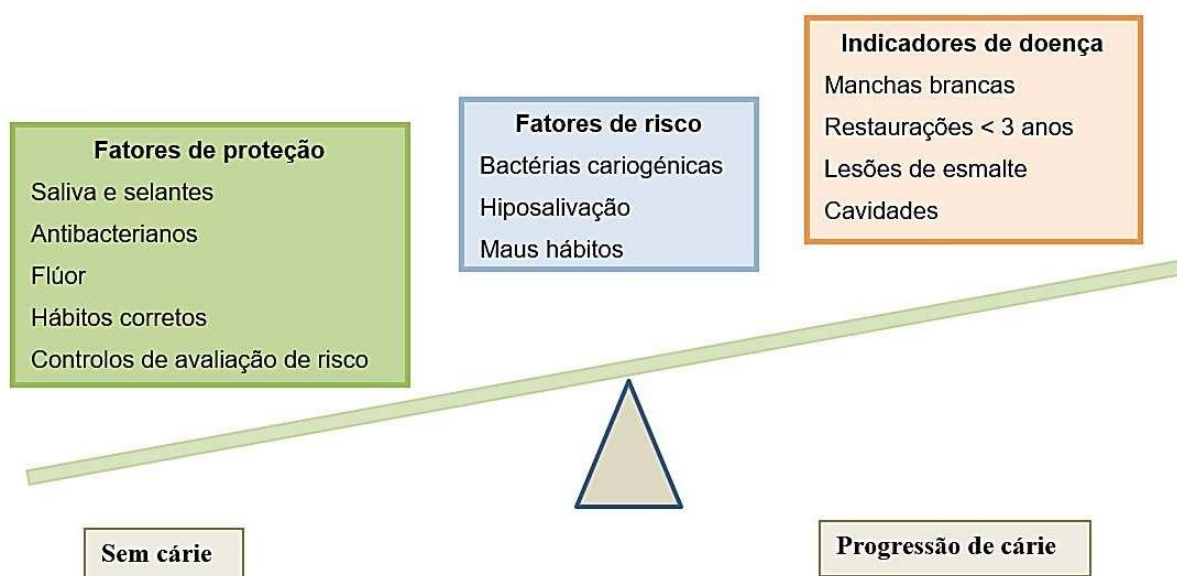


Figura 2. O equilíbrio/desequilíbrio da cárie. (Adaptado de Featherstone JD et al, 2012).

Os fatores de risco são elementos biológicos que contribuem para o surgimento das lesões. Entre eles, estão a presença de bactérias cariogénicas, a diminuição da produção de saliva, hábitos inadequados de higiene e dieta, consumo de hidratos de carbono fermentáveis e o uso de drogas recreativas (5).

À medida que os fatores de risco do paciente aumentam, torna-se necessário intensificar os fatores de proteção para equilibrar ou reverter o processo de cárie (4). São exemplos de fatores de proteção: a presença de selantes, uso de antibacterianos, utilização de fluor, bons hábitos de higiene oral, dieta adequada e controlos regulares de avaliação do risco (9).

1.5. Gestão da cárie e o papel do Médico Dentista

Avaliar o risco de cárie individual é uma medida essencial, pois possibilita a identificação dos principais fatores causadores e a personalização de um plano de tratamento preventivo (18). É do interesse do médico dentista conhecer a probabilidade de um paciente específico desenvolver ou não cáries no futuro. O risco do paciente influencia o tipo de tratamento necessário, a frequência das consultas e a necessidade de retornos periódicos (*recalls*) (20).

Para os indivíduos classificados como tendo um “baixo risco de cárie” é possível aumentar os intervalos entre as consultas. Por outro lado, para aqueles indivíduos com maior necessidade e classificados como tendo um “alto risco de cárie”, intervalos de retorno mais curtos devem ser adotados. Desta maneira, está associado aos *recalls* uma melhoria da saúde oral através de uma menor incidência de doenças não tratadas, menor taxa de perda dentária, maior quantidade de dentes funcionais e os indivíduos são menos propensos a desenvolver sintomas agudos que requerem cuidados de emergência (21).

A medicina de precisão está intimamente ligada à avaliação do risco de cárie individual, pois refere-se à personalização de diagnósticos e tratamentos para cada indivíduo (22).

O protocolo CAMBRA (*Caries Management by Risk Assessment*) tem como objetivos prevenir, reverter ou, se necessário, intervir de forma minimamente invasiva.

Permite identificar os fatores de risco específicos de cada paciente para a cárie dentária e, com base nisso, desenvolver um plano de tratamento personalizado que aborde esses fatores. (5). Esta abordagem permite gerir as lesões de cárie através de medidas preventivas antes que atinjam um estágio de cavitação, o que possibilita adiar ou até evitar tratamentos restauradores (19).

O presente estudo tem como objetivos:

-Testar um índice de avaliação do risco de cárie com base no CAMBRA modificado pela adição de fatores como: utilização de fio dentário, conteúdo da dieta, análise microbiológica com quantificação da carga bacteriana total, pH salivar, quantificação de *Streptococcus sobrinus*;

-Dar continuidade à recolha de dados iniciados no estudo anterior (“Avaliação de um índice de risco de cárie numa população adulta” Fonseca 2022) (20).

-Realizar a quantificação de *Streptococcus sobrinus* das amostras recolhidas até maio de 2022;

-Relacionar o *score* do índice com a evolução de cárie nos pacientes avaliados em *recall* após 8-10 meses;

-Propor os fatores a incluir numa aplicação *chairside* que facilite a avaliação do risco de cárie.

2. Materiais e Métodos

2.1. Caracterização do estudo

O estudo em questão é classificado como observacional transversal, estando incluído num estudo longitudinal. O método utilizado envolveu a aplicação de um questionário ao paciente, uma avaliação intraoral, recolha de amostras de saliva e de biofilme.

Com isto, objetiva-se testar um índice para avaliar o risco de cárie dentária, utilizando o método CAMBRA. A amostra foi composta por pacientes que visitaram a clínica da FMD-UCP durante o período de recolha. A amostra final contabilizou um total de 123 pacientes observados (43 durante o ano letivo 22/23 e 80 durante o ano letivo 21/22).

A recolha de dados foi realizada em novos pacientes bem como em pacientes já analisados aos quais foi feito um *recall* decorridos 8 a 10 meses (20 pacientes) perfazendo assim um total de 143 avaliações.

2.2. Caracterização da amostra

Este estudo foi conduzido tendo por base uma amostra composta por pacientes que frequentam a Clínica Dentária da Universidade Católica Portuguesa de Viseu. Foram estabelecidos os seguintes critérios de inclusão/exclusão:

Critérios de inclusão: pacientes que frequentaram a clínica dentária durante o período de recolha de dados, com idade igual ou superior a 18 anos e que aceitaram participar voluntariamente no estudo.

Critérios de exclusão: foram considerados excluídos os pacientes que não preencheram o consentimento informado, apresentaram idade inferior a 18 anos, tivessem realizado terapia antibiótica nos últimos 3 meses e que tivessem realizado a higiene oral/ingerido alimentos num espaço de tempo inferior a 1 hora antes da recolha.

2.3. Princípios éticos

Os indivíduos que recorreram à clínica da universidade para realizar tratamentos dentários e que atendiam aos critérios estabelecidos, foram convidados a participar e a assinar o consentimento informado (anexo 1). A confidencialidade dos dados foi assegurada e o uso dos dados recolhidos foi exclusivamente para fins desta pesquisa.

O anonimato dos participantes foi garantido, pelo que a identificação dos participantes nunca será divulgada publicamente.

Os participantes foram informados que podiam desistir a qualquer momento deste estudo.

2.4. Treino e calibração

Como a recolha de dados foi realizada por três investigadores (pelo autor da monografia (VR) e pelos dois investigadores (MF, JC) foi efetuada uma calibração intra e inter-examinadores, para utilização do ICDAS II.

A calibração foi dividida em três etapas:

- 1) Revisão da literatura e do protocolo proposto pelo comité do ICDAS II.
- 2) Uma apresentação de slides foi preparada para exemplificar cada código dos critérios, utilizando fotografias de casos clínicos.
- 3) Foram realizadas calibrações em alunos do Mestrado Integrado em Medicina Dentária que se voluntariaram.

Além disso, durante o mês de novembro de 2022, os examinadores participaram num Workshop de Recolha e Processamento de Saliva, organizado pelo laboratório SalivaTec. Foram abordados protocolos e boas práticas relacionadas ao manuseio deste tipo de amostra. Embora, posteriormente, tenham sido tratadas e armazenadas pelo SalivaTec.

2.5. Recolha da amostra

A recolha de dados iniciou em novembro e foi realizada até ao mês de maio na clínica universitária, no início de cada consulta.

Numa primeira fase foi aplicado um questionário do tipo entrevista e registado na plataforma *Qualtrics*, após o qual foi realizado um exame clínico intraoral.

Seguidamente, foi efetuada uma colheita de saliva para determinar o fluxo salivar e o pH.

Finalmente, realizou-se a recolha de biofilme oral dos participantes.

2.5.1. Fase 1 – Questionário

Foi aplicado um questionário do tipo entrevista sobre saúde geral, hábitos de nutrição e de higiene oral hábitos nutricionais permitindo assim ter uma perceção sobre o comportamento e hábitos dos pacientes. Essas informações foram incluídas como variáveis no índice de risco de cárie a ser testado (Anexo 2) (17).

2.5.2. Fase 2 – Exame clínico

Consiste na avaliação da presença de cáries e da profundidade dos sulcos e fissuras. As cáries dentárias são avaliadas através do Sistema Internacional para a Detecção e Avaliação de Cáries (ICDAS II) (17).

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

Em termos de morfologia, os molares e pré-molares possuem uma superfície oclusal que apresenta sulcos (10). Os dentes com sulcos rasos formam um “ângulo V” maior que 70°, e quando a sonda WHO é inserida, a sua ponta atinge a base do sulco. Por outro lado, os dentes com sulcos profundos formam um “ângulo V” menor que 70°, e a ponta da sonda WHO não consegue penetrar até à base do sulco (17).

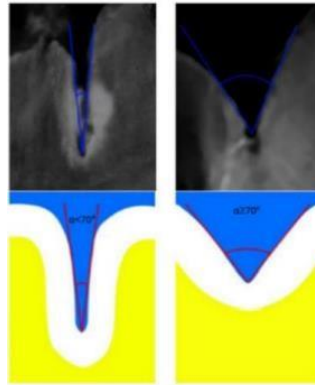


Figura 3. Profundidade de sulco e fissuras. (Imagem adaptada do artigo *Fissure Depth and Caries Incidence in First Permanent Molars: A Five-Year Follow-Up Study*)

2.5.3. Fase 3 – Recolha de saliva

Para garantir uma padronização das recolhas, foram seleccionados os pacientes que não realizaram a higiene oral nem ingeriram alimentos até 1 hora antes do momento da recolha.

Foi feita a recolha de saliva não estimulada pelo método de expelição, com o paciente sentado numa posição relaxada. Foi, então, pedido ao paciente que acumulasse saliva na cavidade oral e seguidamente para a expelir para um tubo graduado, durante 1 minuto. O tempo foi medido com um temporizador digital.

Se o valor do fluxo salivar na ausência de estímulo for moderado (0,3-0,7ml/min), é posteriormente avaliado o fluxo salivar com estímulo, com recurso a uma pastilha de Parafilm CRT® Buffer, mastigada durante 30s, e posterior expelição da saliva para um tubo graduado, durante 1 minuto.

Foi realizado um teste de pH utilizando a saliva recolhida, usando um elétron de medição de pH [Hannah Instruments HI1083] fornecido pelo laboratório da faculdade SalivaTec. Este indica com precisão o nível de acidez da saliva. Antes da medição, o elétron foi devidamente lavado com água Mili-Q (água destilada, filtrada e purificada). Em seguida, cada tubo foi fechado, e transportado para o laboratório SalivaTec, onde a composição microbiológica da saliva foi avaliada.

As amostras foram pré processadas sendo aliqotadas e conservadas a -80°C. Para este estudo, foi realizado um qRT-PCR utilizando *primers* universais para bactérias, de forma a determinar a carga total bacteriana nas amostras de saliva dos pacientes (anexo 4).

2.5.4. Fase 4 – Recolha de biofilme

A recolha para ser uniformizada foi realizada em locais distintos da cavidade oral, previamente determinados. Assim, os locais determinados foram: o espaço inter-incisivo dos dentes inferiores, em vestibular e lingual, a face vestibular dos incisivos superiores, um 1º molar superior por vestibular e um 1º molar inferior por lingual.

No caso de ausência do 1º molar permanente a recolha foi realizada no dente mais posterior.

A recolha foi realizada utilizando um palito estéril, que foi utilizado para raspagem do biofilme e, em seguida, foi colocado numa solução salina dentro de um tubo graduado. Todas as amostras foram conservadas a -80° até à fase laboratorial. As amostras de biofilme foram processadas.

2.6. Análise estatística

Os dados recolhidos foram transferidos para uma folha de cálculo do Microsoft Office Excel®. Posteriormente, foram inseridos no programa IBM SPSS Statistics, criando, desta maneira, a base de dados.

Obteve-se a análise dos dados recorrendo a estatística descritiva adequada a cada variável, através de frequências absolutas e relativas.

Para avaliar a associação entre as variáveis, utilizou-se o teste exato de Fisher, com um nível de significância de 0,05.

3. Resultados

3.1. Caracterização demográfica da amostra em estudo

Para este estudo, a população selecionada foi obtida por meio de uma amostra de conveniência onde os pacientes que frequentaram a Clínica da Universidade Católica de Viseu durante o período de recolha de dados, e que atenderam aos critérios de inclusão/exclusão estabelecidos previamente foram incluídos. A amostra final contabilizou um total de 123 pacientes observados (43 durante o ano letivo 22/23 e 80 durante o ano letivo 21/22).

Conforme ilustrado na figura 4, observamos que 73 pacientes são do sexo feminino, o que corresponde a 59,35% da amostra e 50 pacientes, 40,65% da amostra são do sexo masculino.

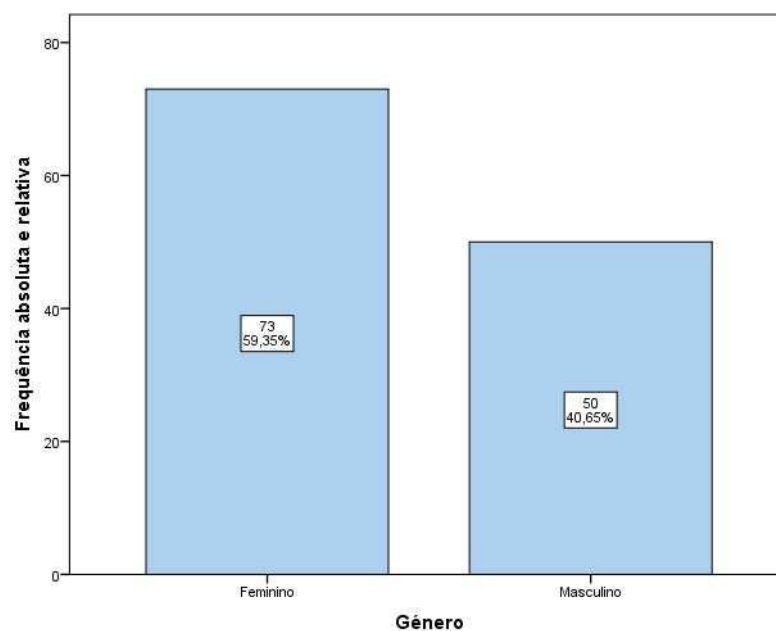


Figura 4. Distribuição da população de acordo com o gênero.

No que diz respeito à faixa etária, a recolha de dados foi realizada numa população adulta com uma média de idade de 37,76 anos. No entanto, a amostra apresenta uma notável variedade de idades, visto que o participante mais jovem tinha 19 anos, enquanto o mais velho tinha 79 anos. Não obstante, uma grande parte da população é jovem devido a ter sido inserido no projeto de forma aleatória estudantes da universidade para que fosse possível realizar o acompanhamento.

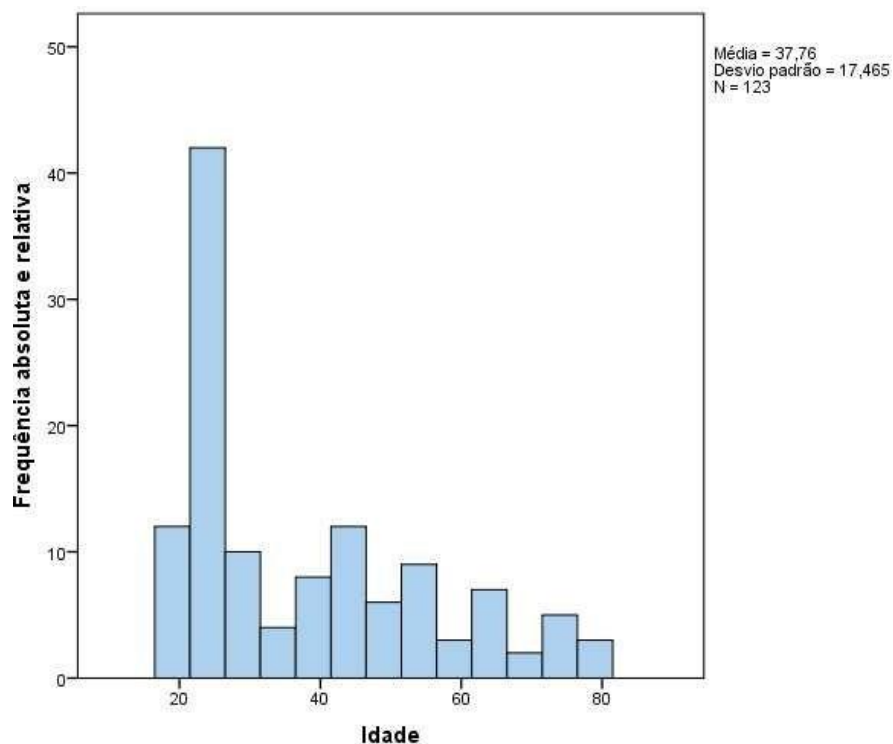


Figura 5. Histograma representativo da distribuição de idades dos indivíduos da amostra.

3.2. Caracterização dos hábitos de higiene oral

Relativamente aos hábitos de higiene oral da população em estudo, é possível verificar (figura 6) que a grande maioria dos pacientes escovava com uma pasta fluoretada (97,56%) (n=120).

Quanto ao número de vezes que escovavam os dentes, dos 120 pacientes que usavam pasta fluoretada, 9,02 (n=11) escovavam uma vez ao dia, enquanto os demais 90,98 (n=111) escovavam duas vezes ou mais ao longo do dia (figura 7).

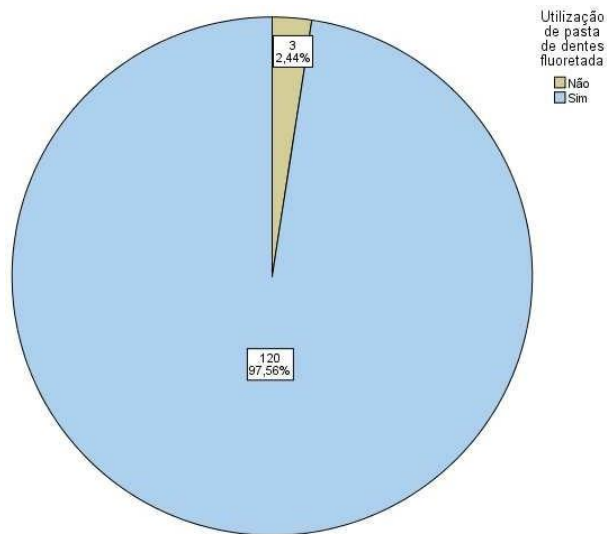


Figura 6. Distribuição da amostra relativamente ao uso de pasta dentífrica com flúor.

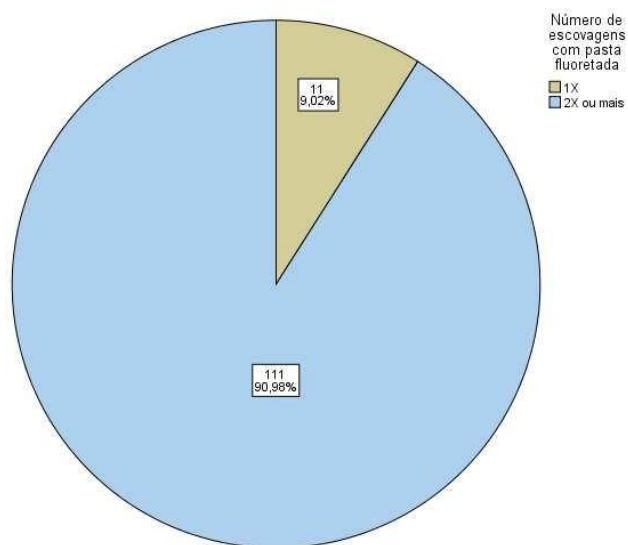


Figura 7. Distribuição da amostra relativamente ao número de escovagens com uso de pasta dentífrica com flúor.

Conforme demonstrado na figura 8, foi constatado que 56,10% (n=69) dos pacientes utilizava diariamente fio dentário e 43,90% (n=54) fazia uso diário de colutório com fluor (figura 9), o que permitiu obter informações mais abrangentes sobre os cuidados de higiene oral da população em estudo.

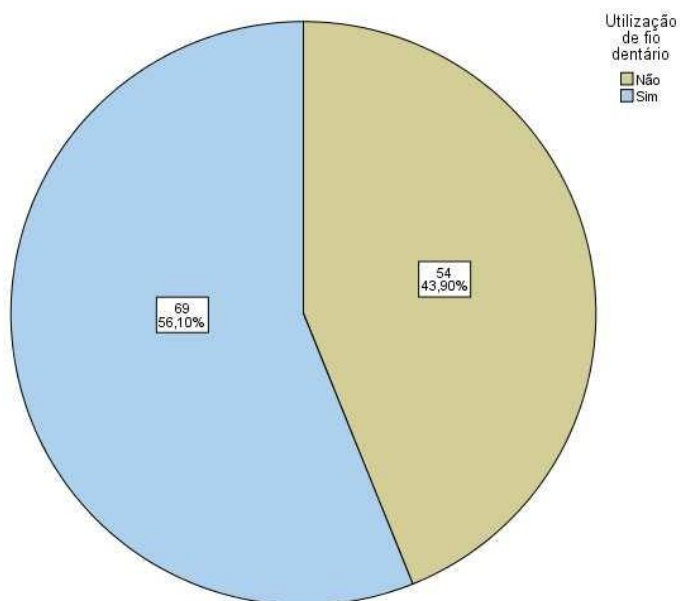


Figura 8. Distribuição da amostra relativamente ao uso de fio dentário.

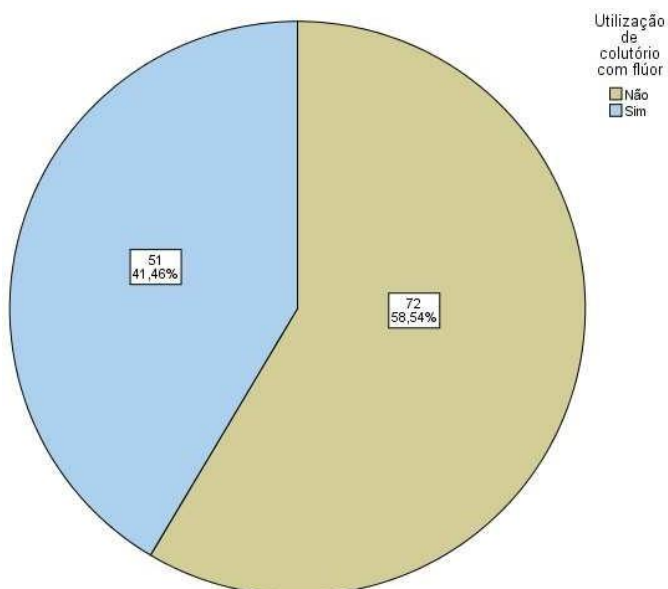


Figura 9. Distribuição da amostra relativamente à utilização de colutório com flúor (0,05% NaF)

Foi ainda realizada uma análise da distribuição do uso de fio dentário de acordo com a idade, utilizando o teste exato de Fisher ($p < 0,001$). Os resultados indicaram uma relação significativa entre as variáveis, em que a população mais jovem da amostra está relacionada com a percentagem de indivíduos que utilizava fio dentário (figura 10).

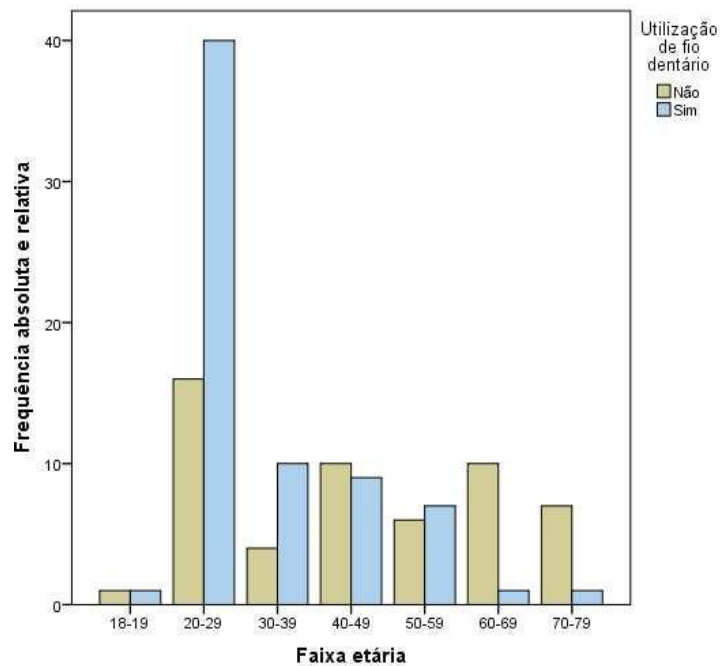


Figura 10. Relação entre o uso de fio dentário e a idade.

Adicionalmente, quando inquiridos sobre a possibilidade de terem recebido tratamento com verniz de flúor em consultório durante os últimos 6 meses, é possível constatar que apenas 4,07% dos pacientes ($n=5$) responderam afirmativamente.

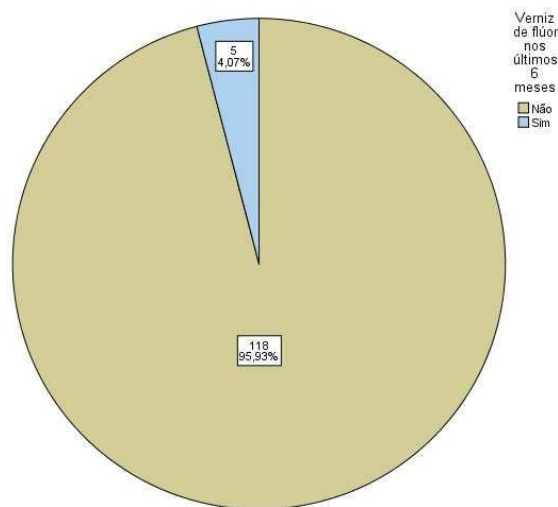


Figura 11. Distribuição da amostra de acordo com a utilização de verniz de flúor nos últimos 6 meses.

Quando questionados acerca da utilização de pasta fluoretada com 5000ppm diariamente, apenas 1 paciente referiu que a utilizava.

Relativamente à aplicação do flúor, desta vez em gel em moldeira no consultório nos últimos 6 meses, verificamos que nenhum dos pacientes realizou essa aplicação. Numa situação semelhante verificamos o uso de clorhexidina, em que também nenhum dos participantes do estudo referiu utilizá-la no período estipulado.

3.3. Caracterização dos hábitos alimentares

Em relação ao consumo de açúcar nos lanches entre as refeições principais, observamos que 64,23 % (n=79) utilizava. Desses 79 pacientes 30,89 % (n=38) consumia apenas 1 vez por dia, 26,83% (n=33) utilizava 2 vezes por dia, e 7,32% (n=9) consumia 3 vezes por dia (conforme ilustrado na figura 13).

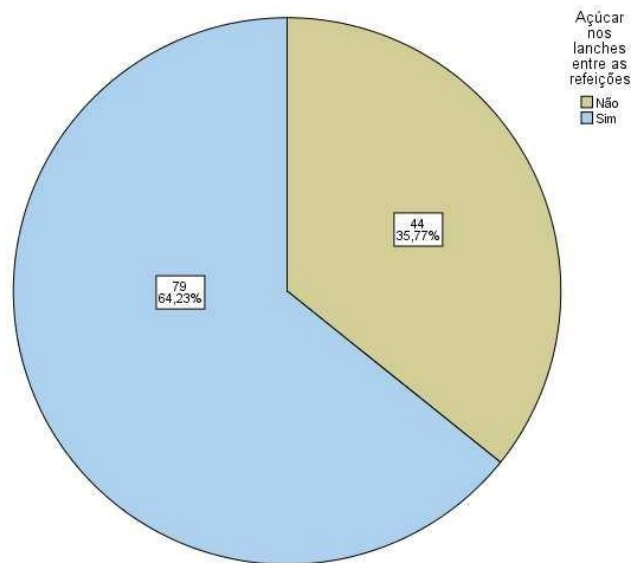


Figura 12. Distribuição da amostra de acordo com a utilização de açúcar nos lanches entre as refeições principais.

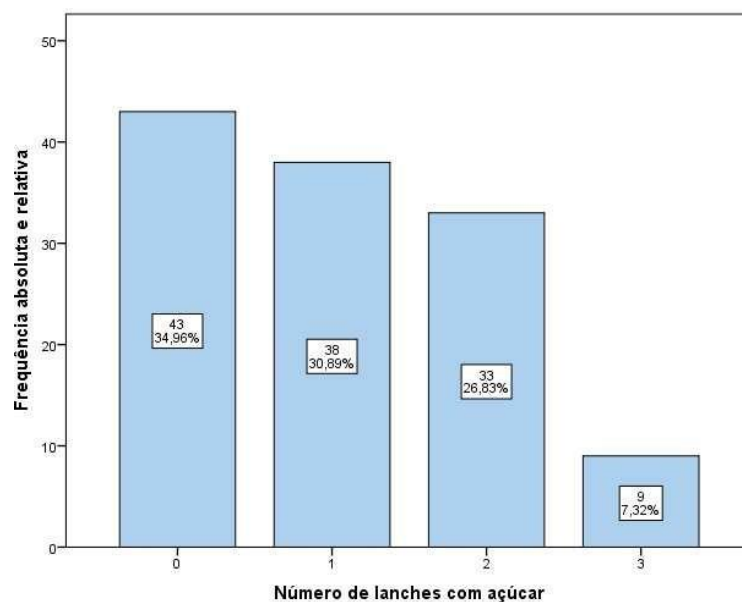


Figura 13. Distribuição da amostra relativamente ao número de lanches com açúcar.

3.4. Caracterização de fatores que predisõem a acumulação de placa bacteriana

Os pacientes que utilizam aparelho ortodôntico estão mais propensos à retenção de placa bacteriana, o que *per si* justifica a categorização dos mesmos.

Desta forma, entre os pacientes que participaram no estudo, apenas 4,88% (n=6) fazia uso de aparelho ortodôntico (como é possível verificar na figura 14).

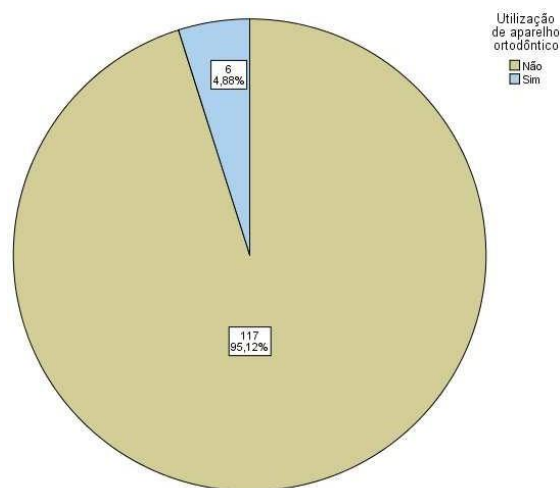


Figura 14. Distribuição da amostra relativamente à utilização de aparelho ortodôntico.

No que diz respeito à profundidade dos sulcos e fissuras de pré-molares e molares, que é um fator que pode favorecer o acúmulo de placa bacteriana, constatou-se que 6,50% (n=8) tinha sulcos profundos e 93,50% (n=115) sulcos rasos (figura 15).

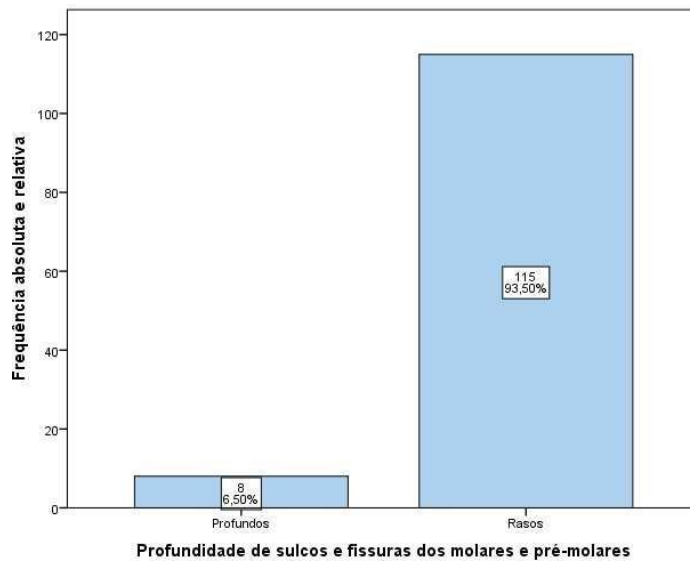


Figura 15. Distribuição da amostra de acordo com a profundidade de sulcos e fissuras de pré-molares e molares.

Sabe-se que a exposição radicular pode favorecer a formação e acumulação de placa bacteriana, por isso, foi crucial avaliar este parâmetro. Como podemos visualizar seguidamente, 15,45 % (n=19) apresentava exposição radicular (figura 16).

A distribuição da presença de exposição radicular com a idade foi analisada, com recurso ao teste exato de Fisher ($p < 0,001$). Assim, as variáveis estão significativamente relacionadas, onde a percentagem de pacientes com exposição radicular relaciona-se com a população mais velha (figura 17).

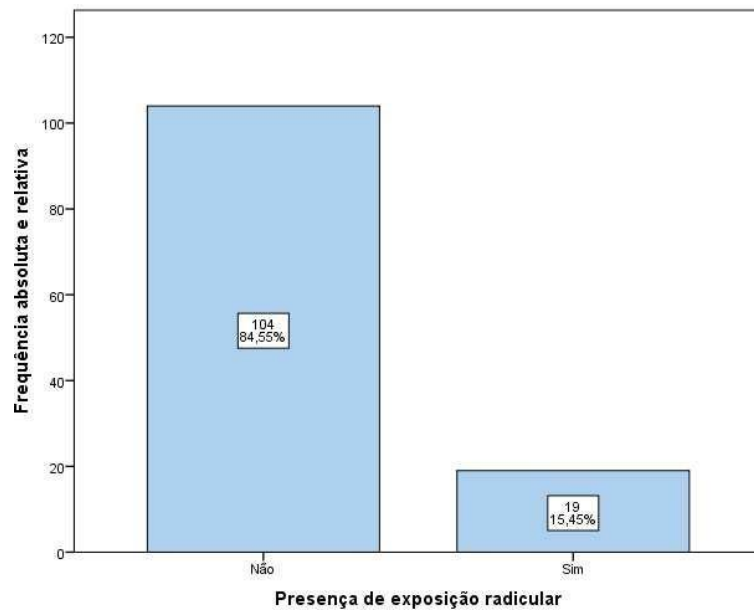


Figura 16. Distribuição da amostra relativamente à presença de exposição radicular.

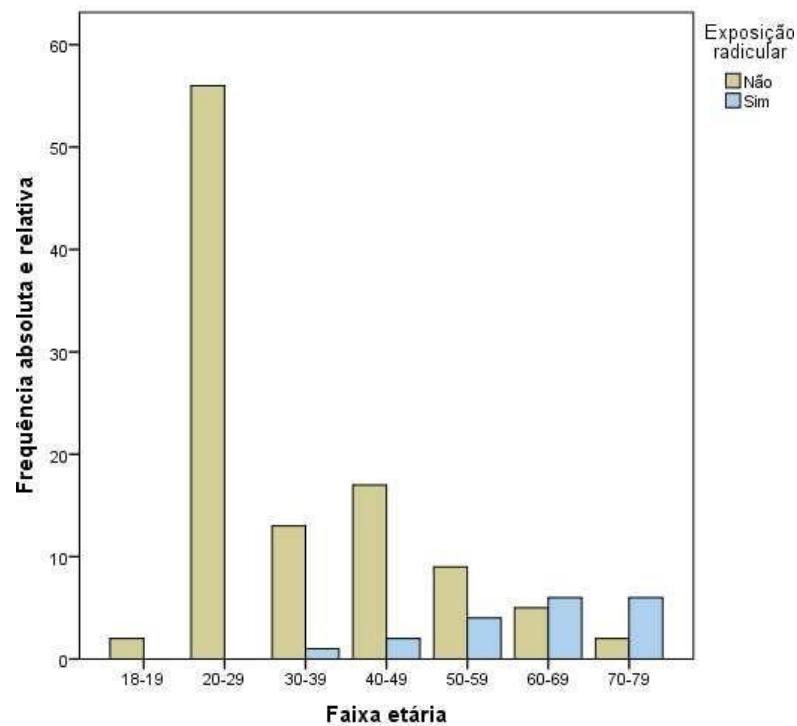


Figura 17. Relação entre a presença de exposição radicular e a idade.

3.5. Caracterização de fatores associados ao fluxo salivar

Relativamente ao registo do fluxo salivar não estimulado através do método de expelição, dos 123 pacientes analisados, apenas 12,20% (n=15) apresentava hiposalivação. (figura 18).

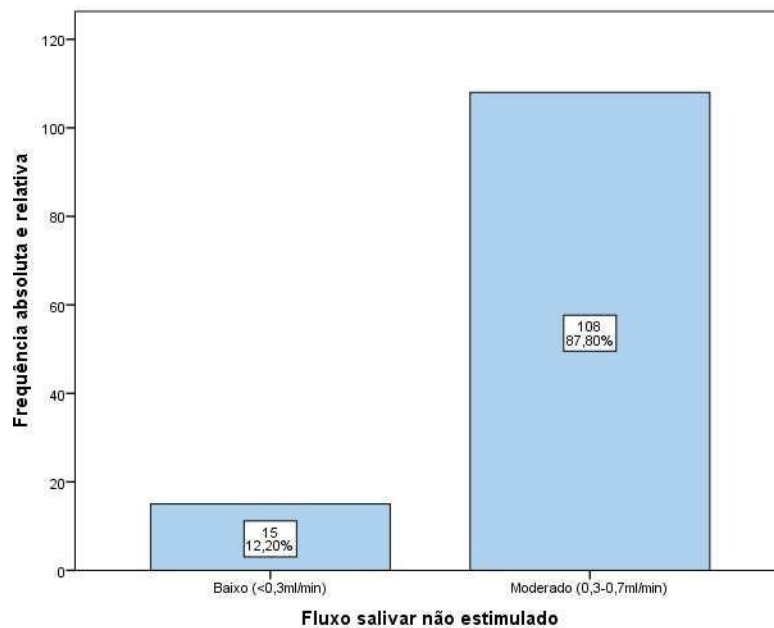


Figura 18. Distribuição da amostra relativamente à análise do fluxo salivar não estimulado.

Dos pacientes que apresentaram um fluxo salivar normal, podemos verificar que a maioria produzia saliva estimulada suficiente (figura 19).

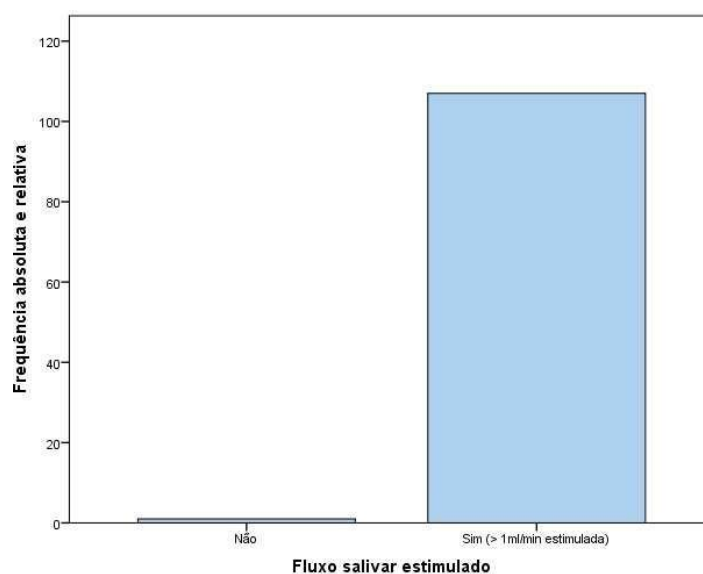


Figura 19. Distribuição da amostra relativamente à análise do fluxo salivar estimulado.

Cerca de 15,45% dos intervenientes (n=19) tinham algum fator que pode afetar o fluxo salivar como medicações, radiação e doenças sistémicas (figura 20).

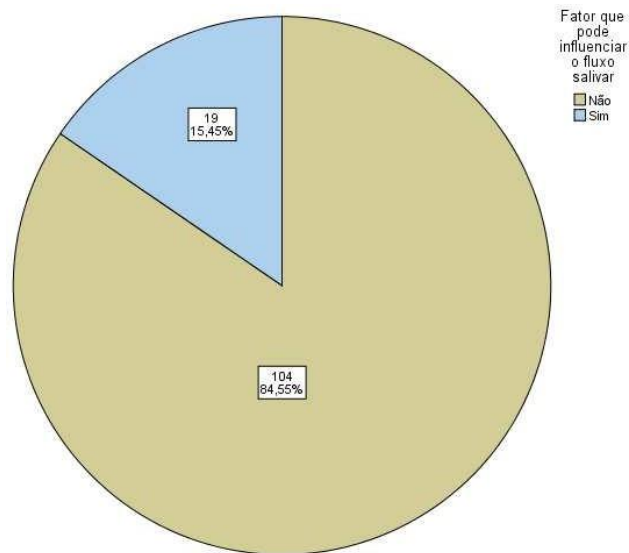


Figura 20. Distribuição da amostra relativamente à presença de algum fator que pode influenciar o fluxo salivar.

Quando questionados quanto ao uso de drogas recreativas verificou-se que nenhum dos pacientes referiu o seu uso.

3.6. Caracterização da análise salivar

No que diz respeito ao pH salivar, do total de amostras recolhidas, 6,50 % (n=8) apresentava um pH inferior a 6,5.

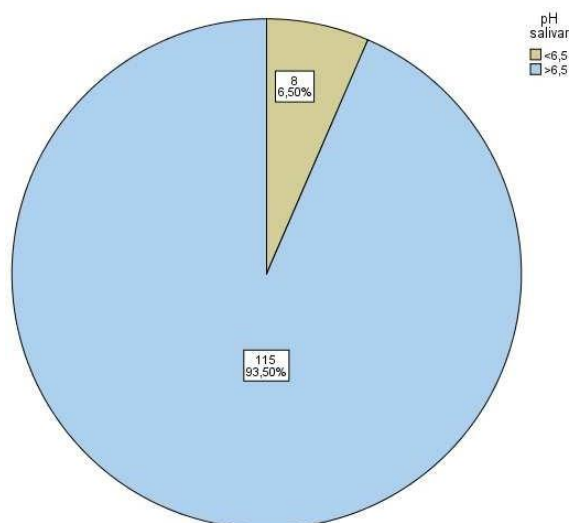


Figura 21. Distribuição da amostra relativamente ao pH salivar.

Foi realizado o estudo da distribuição da amostra em relação à quantificação molecular do 16sRNA bacteriano. Para determinar a carga bacteriana, foram estabelecidos critérios arbitrários. Valores inferiores a $1,0E+12$ nº de cópias/ μ l amostra foram considerados como carga bacteriana baixa, enquanto os valores entre $1,0E+12$ nº de cópias/ μ l e $1,49E+12$ nº de cópias/ μ l foram classificados como carga bacteriana moderada. Por outro lado, valores acima de $1,5E+12$ nº de cópias/ μ l foram considerados como carga bacteriana elevada. É importante ressaltar que esta classificação foi baseada na distribuição observada nesta amostra de conveniência, uma vez que não existem evidências literárias que estabeleçam pontos de corte específicos.

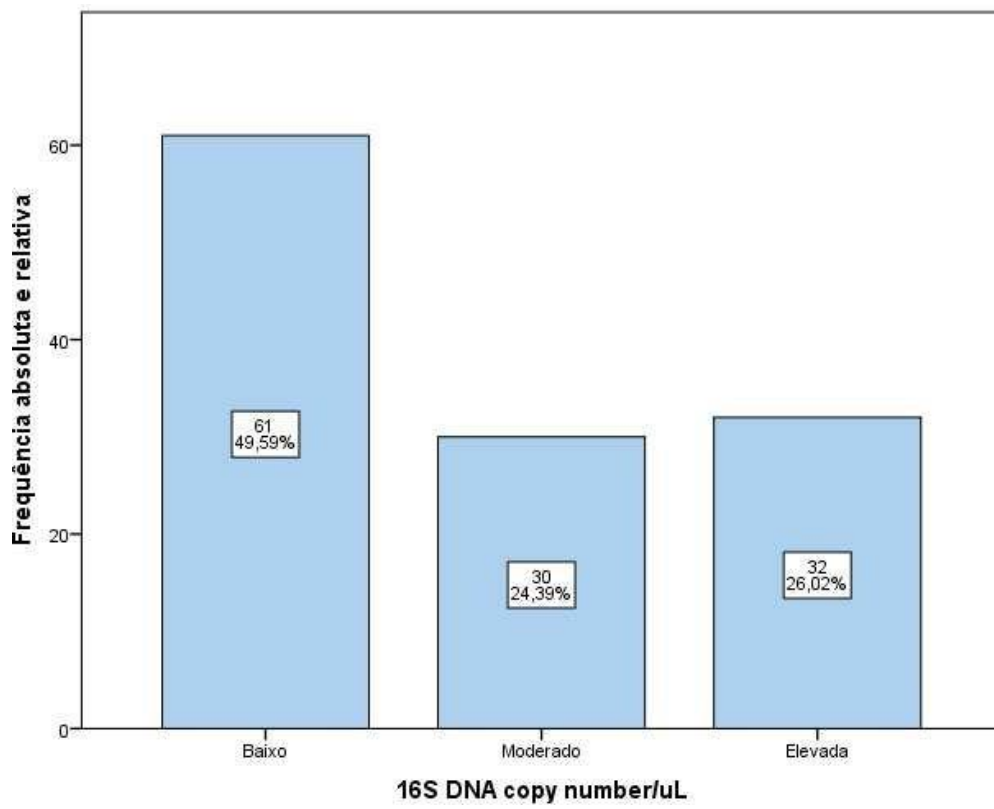


Figura 22. Distribuição da amostra relativamente à quantificação molecular de 16sRNA bacteriano.

3.6. Caracterização de resultados decorrentes da inspeção intraoral

Em relação aos tratamentos realizados nos últimos 3 anos devido a lesões de cárie, como restaurações, tratamento endodôntico radical e extrações, constatou-se que 53,66% (n=66) da amostra estudada passou por esses procedimentos (figura 23).

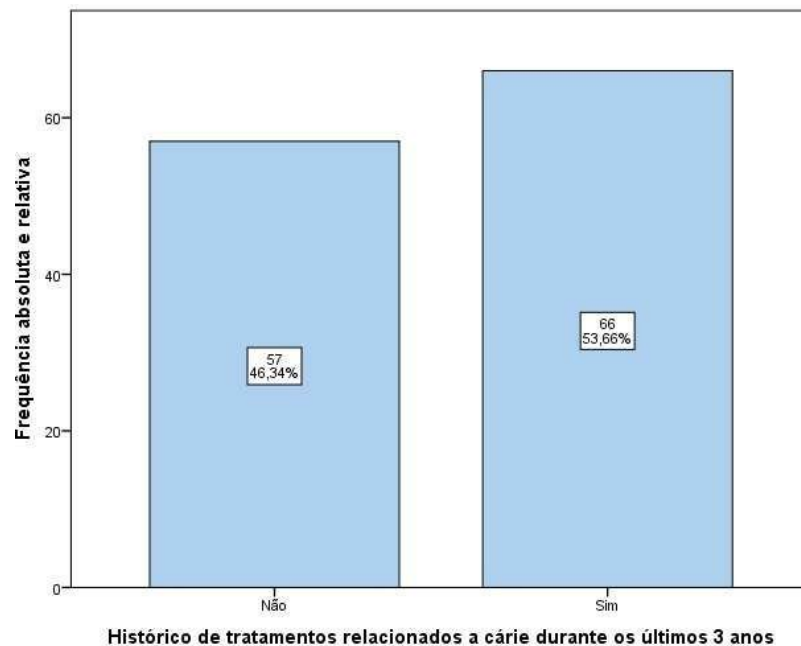


Figura 23. Distribuição da amostra relativamente ao histórico de tratamentos relacionados a lesões de cárie.

Utilizando a observação intraoral, adotou-se a classificação ICDAS II para avaliar as lesões de cárie nos pacientes. Dessa forma, entre os pacientes examinados, 25,20% (n=31) apresentava lesões de cárie iniciais (ICDAS 1-2).

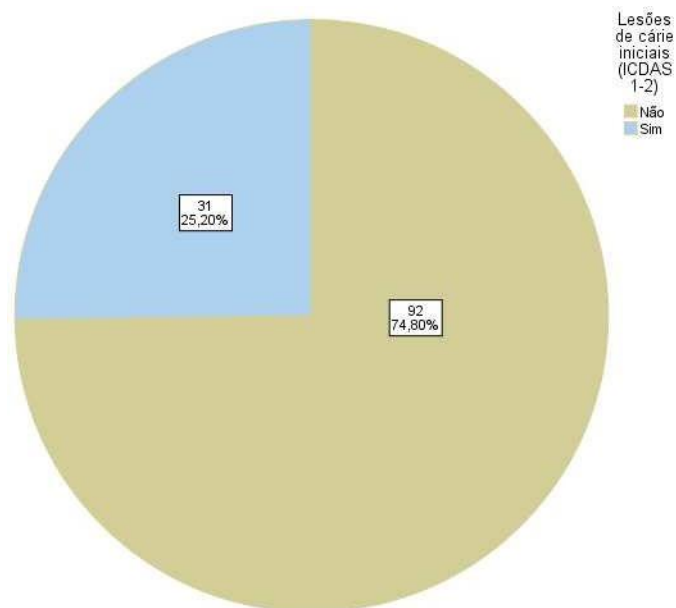


Figura 24. Distribuição da amostra relativamente à presença de lesões de cárie iniciais (ICDAS 1-2).

Verificou-se também, que 44,72% (n=55) apresentava lesões de cárie moderadas (ICDAS 3-4) (figura 25) e 17,89% (n=22) apresentavam lesões de cárie extensas (figura 26).

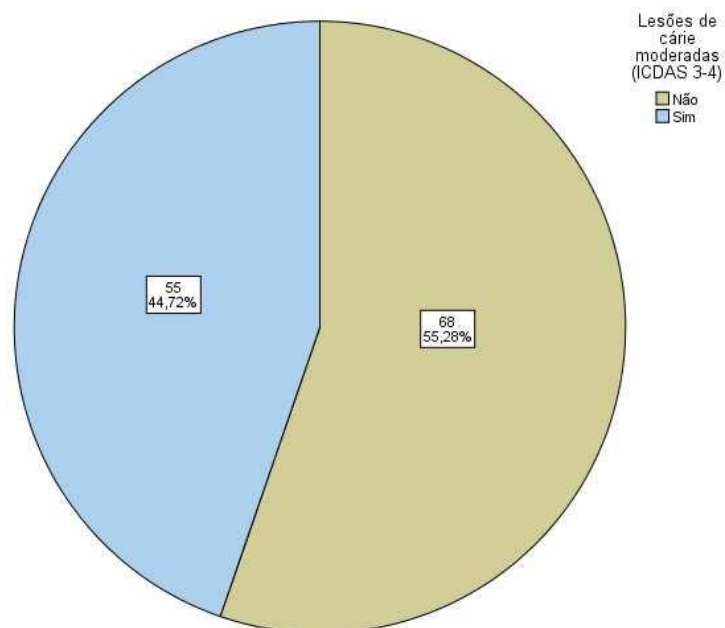


Figura 25. Distribuição da amostra relativamente à presença de lesões de cárie moderadas (ICDAS 3-4).

A distribuição da presença de lesões de cárie extensas (ICDAS 5-6) com a idade foi relacionada, e para tal, utilizou-se o teste exato de Fisher ($p=0,002$), logo, as variáveis estão significativamente relacionadas, em que a percentagem de indivíduos que apresentavam estas lesões está relacionada com a população com mais idade da amostra (figura 27).

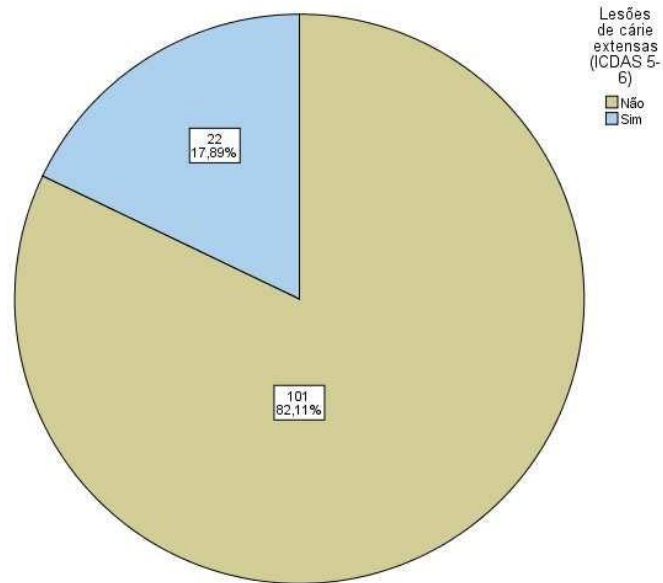


Figura 26. Distribuição da amostra relativamente à presença de lesões de cárie extensas (ICDAS -6).

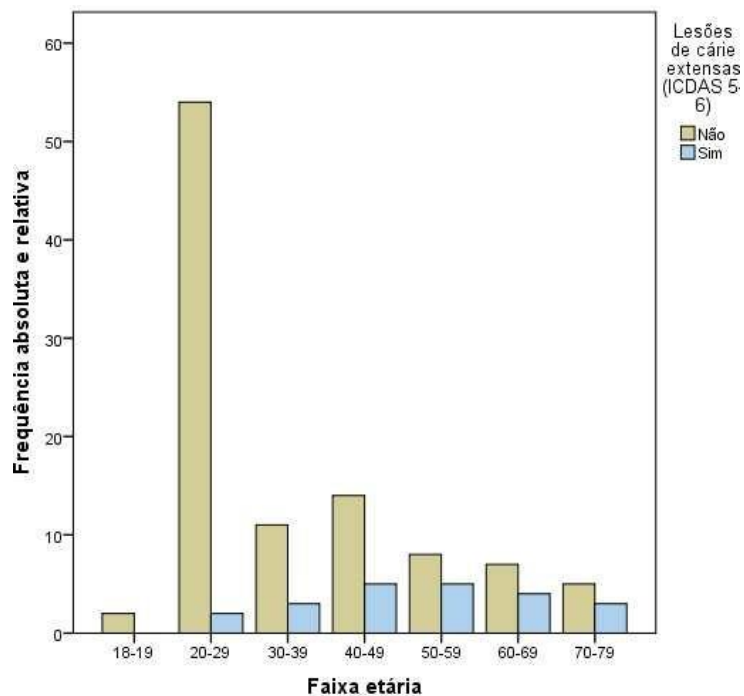


Figura 27. Relação entre a idade e a presença de lesões de cárie extensas (ICDAS 5-6).

3.7. Risco de desenvolver lesões de cárie

Após a obtenção de todos os dados relevantes, a determinação final do potencial de cárie foi alcançada através da quantificação de todas as informações adquiridas, considerando o peso atribuído a cada variável específica (ver anexo 3). É este cálculo final que permitirá personalizar o plano de tratamento de acordo com a predisposição individual dos pacientes para o desenvolvimento da doença. Dos 123 pacientes que foram avaliados, 58,54% (n=72) foram classificados como tendo risco baixo de desenvolver lesões de cárie, 28,46% (n=35) risco moderado, 11,38% (n=14) classificados com risco elevado e 1,63% (n=2) como risco severo.

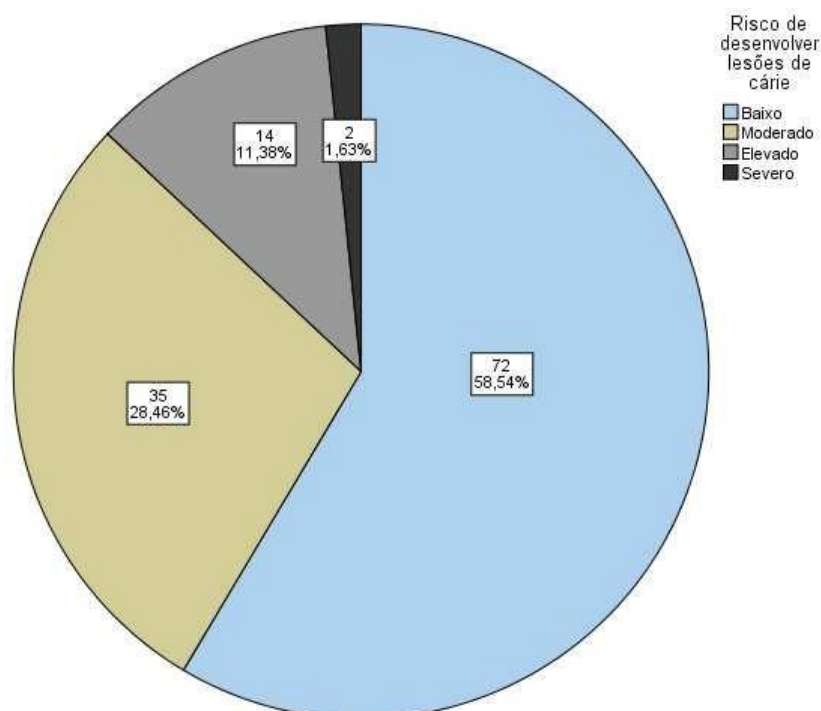


Figura 28. Classificação relativa ao risco de desenvolver lesões de cárie.

A análise da distribuição do risco de desenvolvimento de lesões de cárie com base na faixa etária foi realizada utilizando o teste exato de Fisher ($p < 0,001$). Observou-se uma associação significativa entre as variáveis, sendo que a proporção de indivíduos classificados como baixo risco está relacionada a um grupo etário mais jovem.

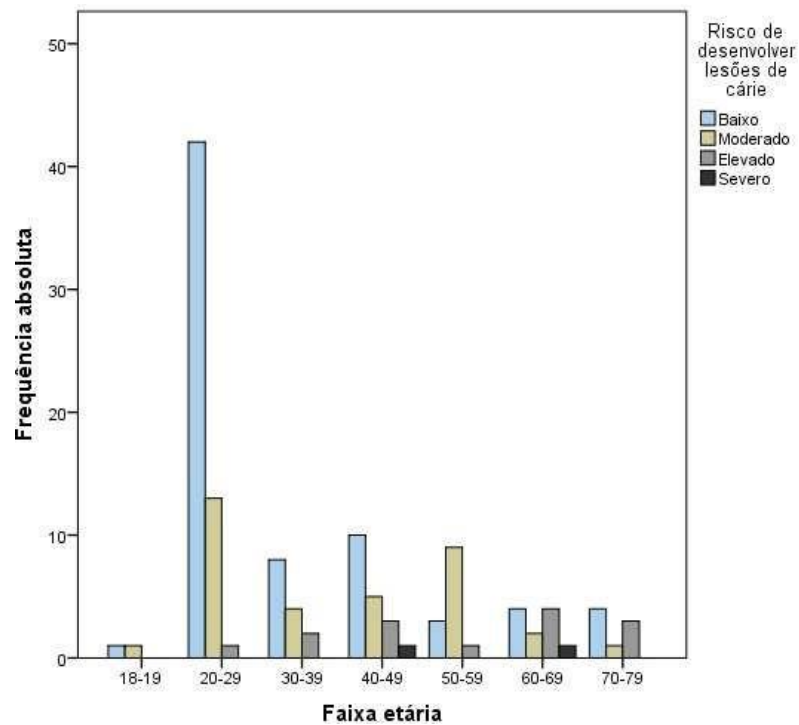


Figura 29. Relação entre a idade e o risco de desenvolver lesões de cárie.

Também foi realizada uma análise da distribuição do risco de desenvolvimento de lesões de cárie com base nos hábitos de higiene oral, com recurso ao teste exato de Fisher. Dessa forma, observamos que pacientes com baixo risco de cárie escovavam no mínimo duas vezes por dia com uma pasta fluoretada, com um resultado estatisticamente significativo ($p=0,004$).

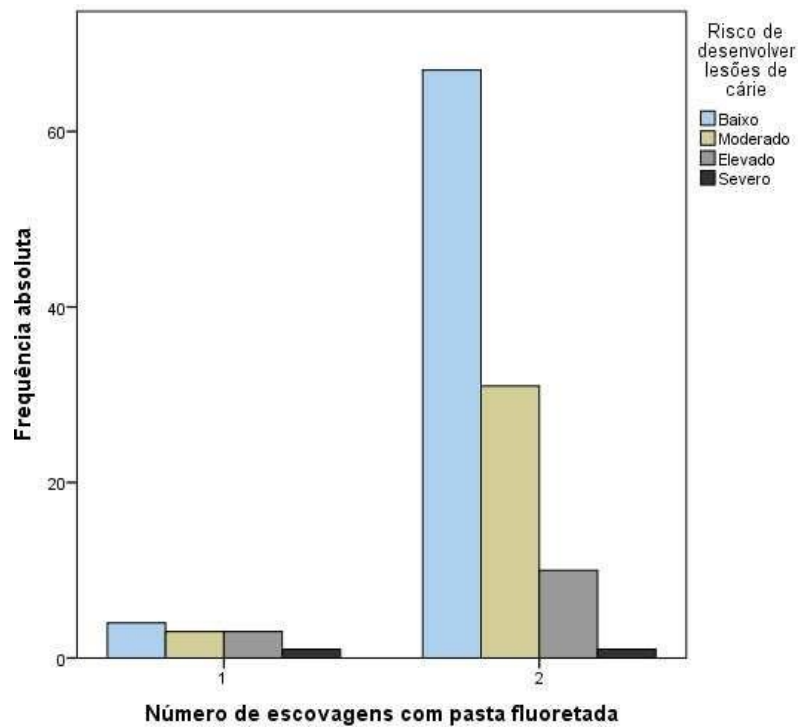


Figura 30. Relação entre o risco de desenvolver lesões de cárie e o número de escovagens com pasta fluoretada.

Além disso, constatou-se que a maioria dos pacientes de baixo risco adotavam o uso do fio dentário, enquanto os pacientes de risco severo não utilizavam fio dentário ($p < 0,001$) (figura 31).

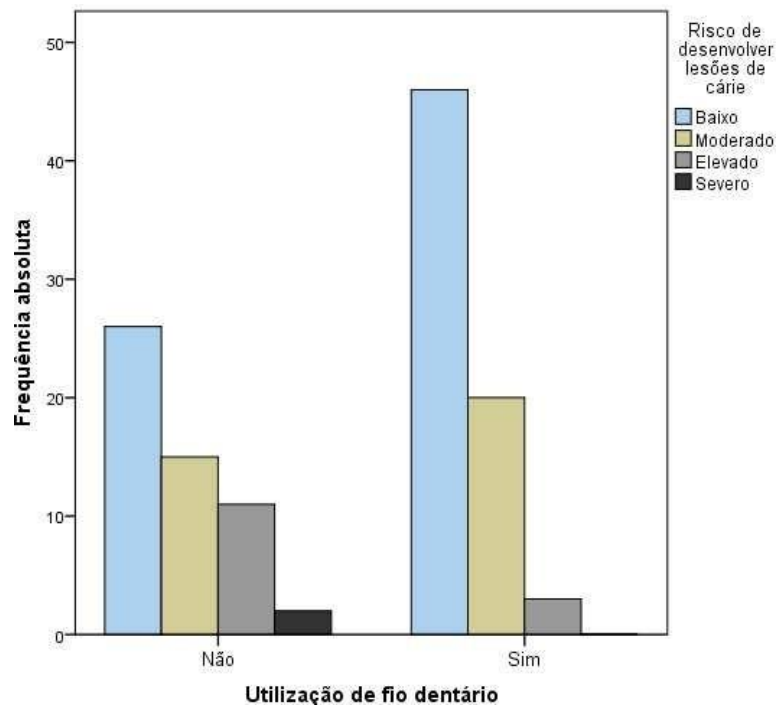


Figura 31. Relação entre o risco de desenvolver lesões de cárie e a utilização de fio dentário.

A distribuição do risco de desenvolver lesões de cárie com o número de lanches com açúcar foi avaliado através do teste exato de Fisher ($p=0,003$), verificando-se que a maioria dos indivíduos classificados com menor risco de cárie fazem menos lanches com açúcar.

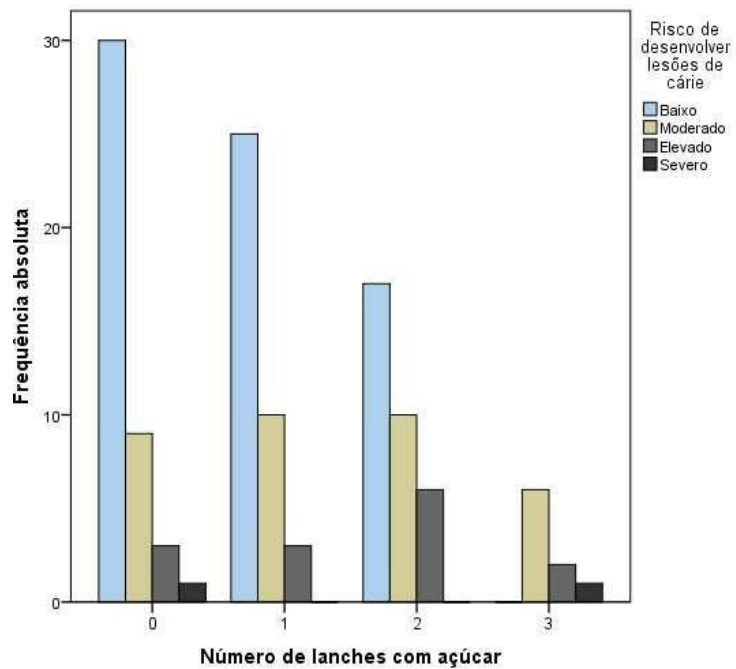


Figura 32. Relação entre o risco de cárie e o número de lanches com açúcar entre as refeições principais.

A distribuição do risco de desenvolver lesões de cárie, levando em consideração o histórico de tratamentos relacionados à cárie, foi analisada utilizando o teste exato de Fisher ($p < 0,001$). Os resultados revelaram que a maioria dos indivíduos com risco elevado e severo apresentava um histórico de tratamentos decorrentes de lesões de cárie nos últimos três anos.

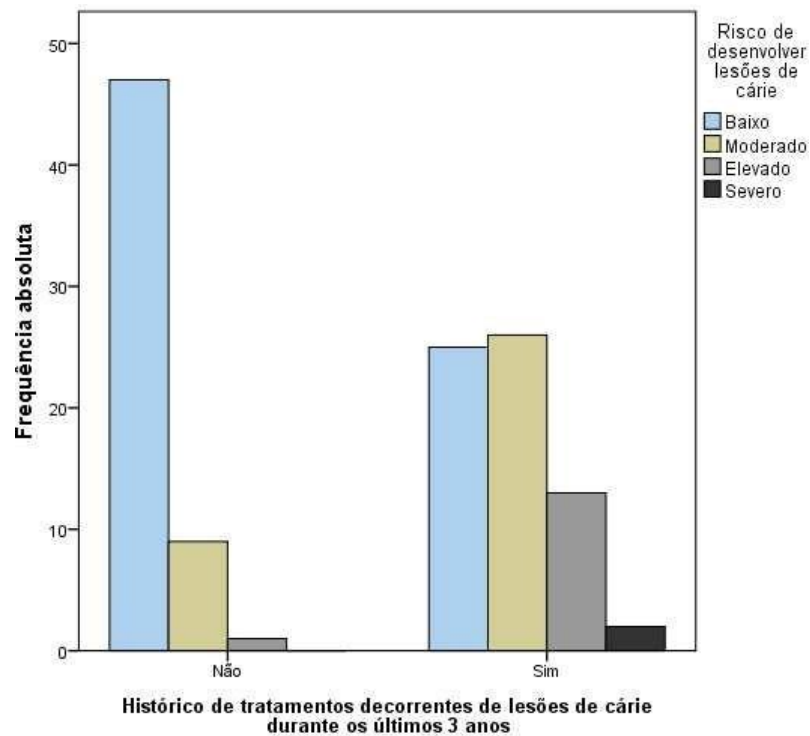


Figura 33. Relação entre o risco de cárie e o histórico de tratamentos decorrentes de lesões de cárie nos últimos 3 anos.

A relação entre o risco de desenvolver lesões de cárie e o pH salivar foi analisada utilizando o teste exato de Fisher ($p < 0,001$). Os resultados revelaram que a maioria dos indivíduos com risco baixo apresenta um pH superior a 6,5 e o total de indivíduos com risco severo apresenta um pH inferior a 6,5.

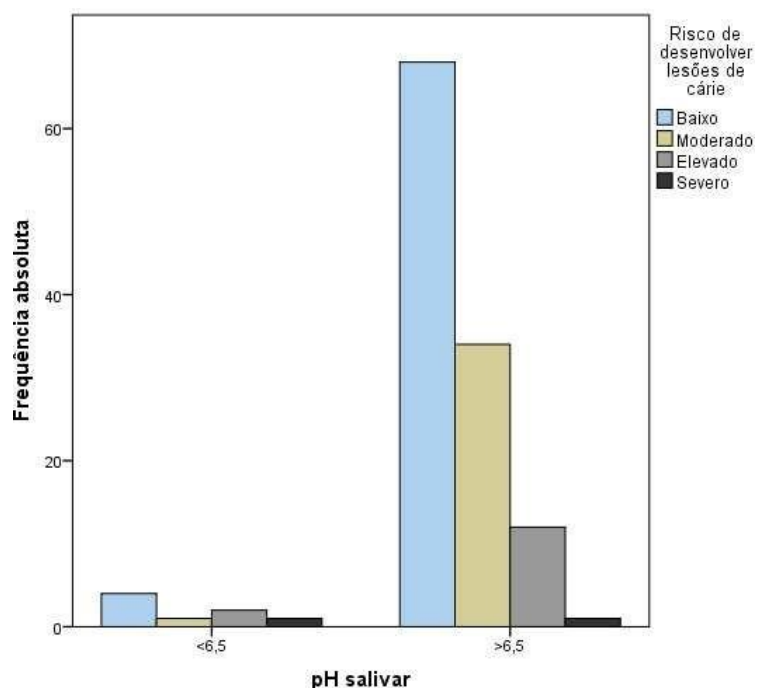


Figura 34. Relação entre o pH salivar e o risco de cárie.

Foi feita também a relação entre o risco de desenvolver lesões de cárie e a carga bacteriana total (16S DNA *copy number/uL*), ($p > 0,005$). É possível perceber que a maioria dos indivíduos com risco baixo de desenvolver lesões de cárie têm uma carga bacteriana baixa.

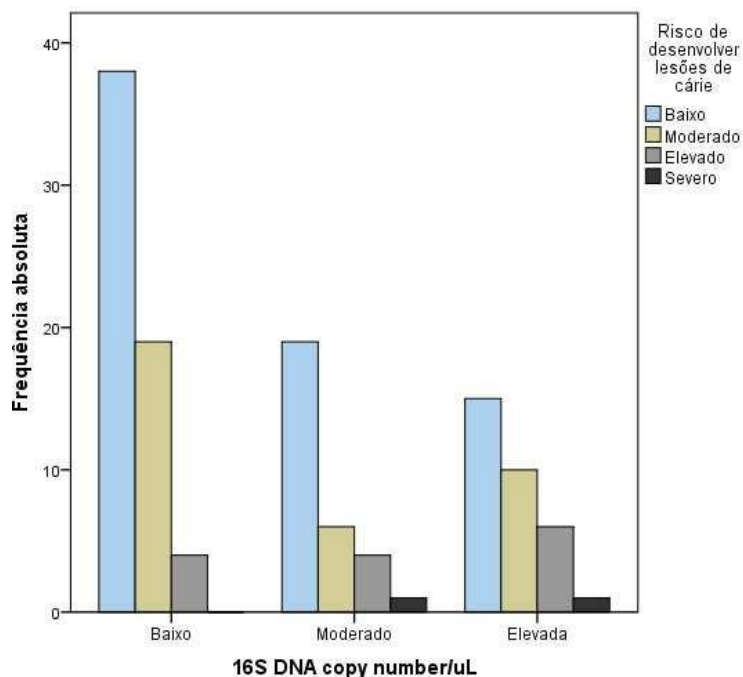


Figura 35. Relação entre o risco de desenvolver lesões de cárie e a carga bacteriana total.

3.8. Recalls

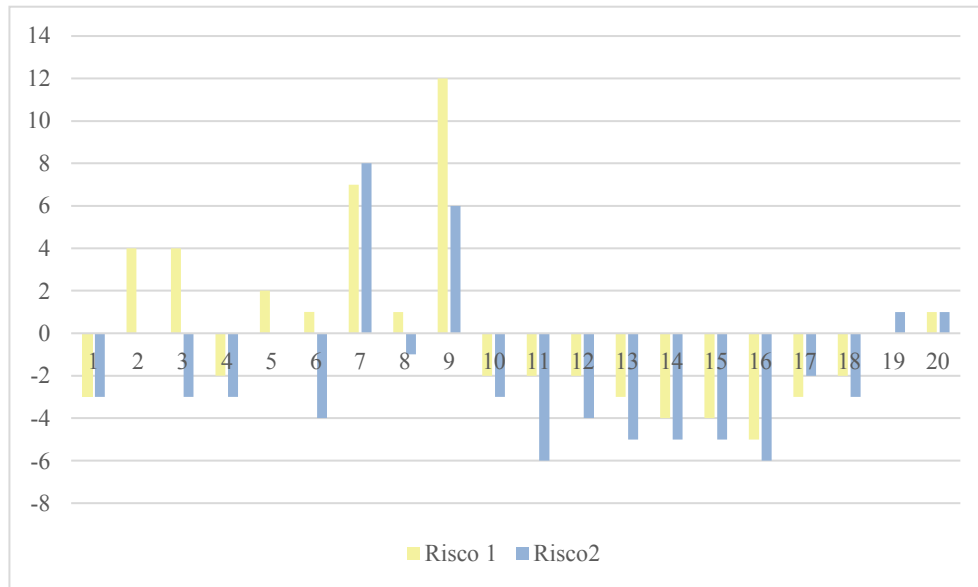


Figura 36. Comparação entre o risco apresentado na primeira avaliação e o risco apresentado na segunda avaliação

De entre os 20 pacientes de *recall*, 3 alteraram o risco de desenvolver lesões de cárie. Um transitou de um nível de risco elevado para um nível de risco moderado. Outro experimentou uma transição de um nível de risco elevado para um nível de risco baixo. E um terceiro, cujo risco de desenvolver cáries foi modificado, transitou de um nível de risco moderado para um nível de risco baixo.

3.9. Risco de desenvolver lesões de cárie com a adição da quantificação de *Streptococcus sobrinus*.

Foi realizado o estudo da distribuição da amostra em relação à quantificação de *Streptococcus sobrinus* nas amostras que se mostraram viáveis para o efeito (66 amostras). Foram estabelecidos critérios arbitrários. Valores inferiores a $1,0E+11$ n° de cópias/ μ l amostra foram considerados como carga bacteriana baixa, enquanto os valores entre $1,0E+11$ n° de cópias/ μ l e $2,0E+11$ n° de cópias/ μ l foram classificados como carga bacteriana moderada. Por outro lado, valores acima de $2,0E+12$ n° de cópias/ μ l foram considerados como carga bacteriana elevada. É importante ressaltar que esta classificação foi baseada na distribuição observada nesta amostra de conveniência, uma vez que não existem evidências literárias que estabeleçam pontos de corte. Assim, 40,91% (n=27) apresentaram uma carga baixa de *S.sobrinus*, 36,36% (n=24) apresentaram uma carga moderada e 22,73% (n=15) apresentaram carga elevada.

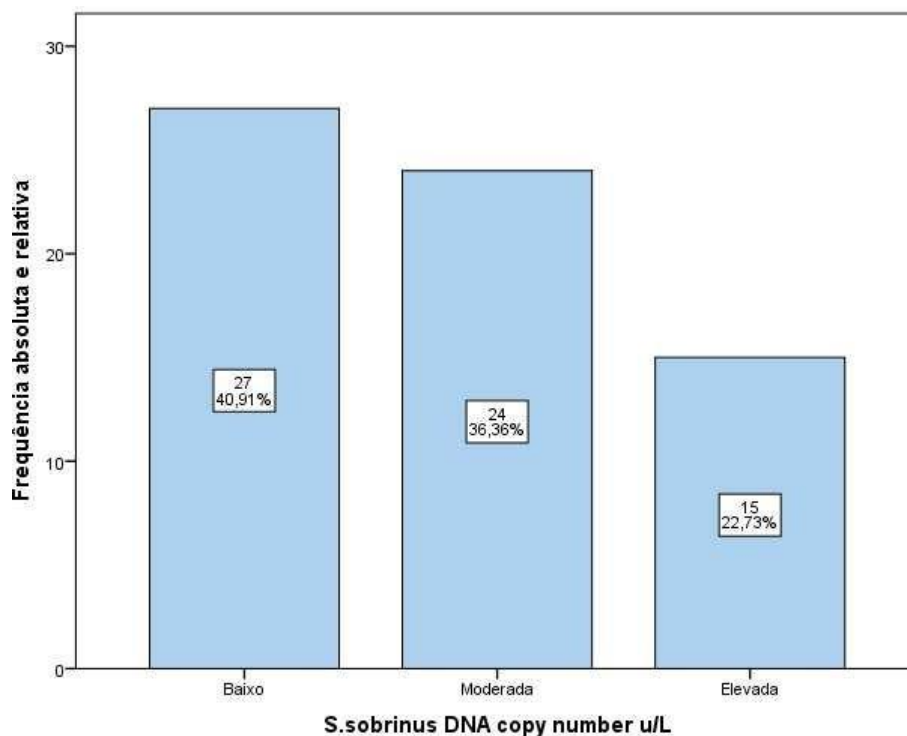


Figura 37. Distribuição da amostra relativamente à quantificação de *Streptococcus sobrinus*.

Dos 123 pacientes, em 66 foi feito o cálculo do risco de cárie com a adição da quantificação de *Streptococcus sobrinus* para comparação do risco sem essa variável. Relativamente ao risco de desenvolver lesões de cárie sem a adição da quantificação de *S.sobrinus* de entre esses 66 pacientes, 69,70% (n=46) apresentaram risco baixo, 25,76% (n=17) apresentaram risco moderado e 4,55% (n=3) apresentaram risco elevado.

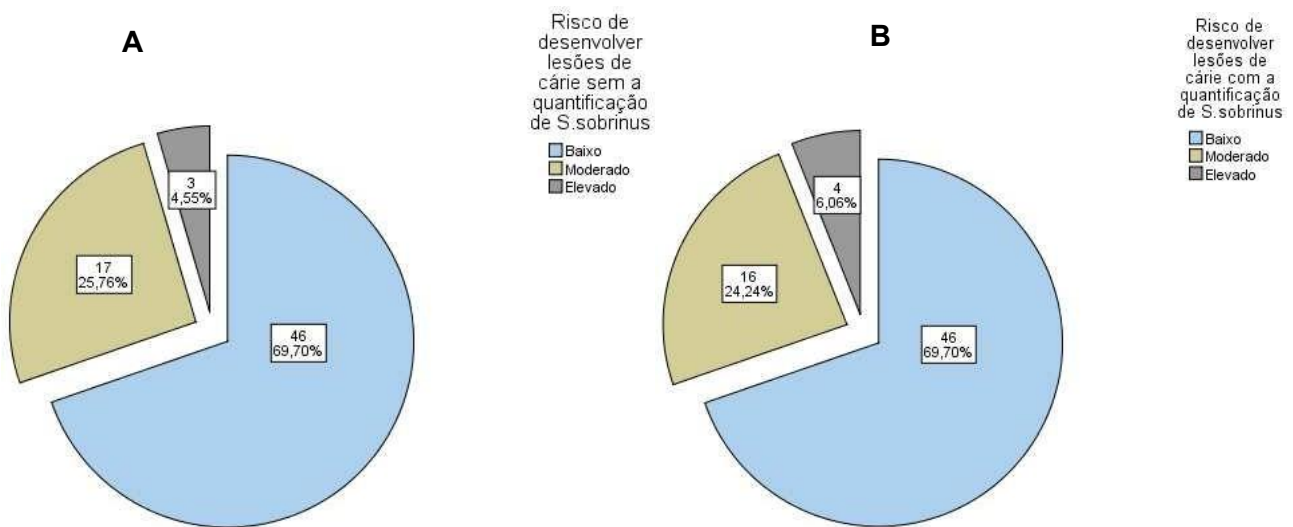


Figura 38. Classificação relativa ao risco de desenvolver lesões de cárie sem a adição da quantificação de *S.sobrinus* (A) e com a adição da quantificação de *S.sobrinus* (B).

Posteriormente foi feita a classificação mas, desta vez, com adição da quantificação da carga de *S.sobrinus*. Pode-se constatar que 69,70% (n=46) apresentava risco baixo, 24,24% (n=16) apresentava risco moderado e 6,06% (n=4) apresentava risco elevado. Resumindo, dos 66 pacientes, 5 alteraram o risco de cárie, atribuíveis a esta variável específica

4. Discussão de resultados

4.1. Hábitos de higiene oral

A higiene oral consiste na manutenção de uma cavidade oral limpa e saudável prevenindo assim a formação de placa que se fixa nas fendas e fissuras dos dentes e produz ácidos que, quando não removidos regularmente, gradualmente danificam o esmalte protetor dos dentes, resultando em cáries (24).

Sabe-se que a escovagem é uma das práticas de higiene oral primordiais recomendadas. É considerada uma medida primária para remover mecanicamente quantidades significativas de placa bacteriana, a fim de prevenir doenças orais, além de manter a estética e prevenir halitose (24).

Podemos ver no estudo, que a pasta de dentes fluoretada foi o método de aplicação mais utilizado, onde apenas 3 pessoas não a utilizavam. Este método, se aplicado de forma regular está associado a uma redução do aparecimento de cáries (25). Dos pacientes que referiram utilizar pasta fluoretada, a maioria referiu escovar pelo menos duas vezes por dia. Segundo o estudo de S. Kumar *et al*/ os pacientes que escovavam os dentes menos de 2 vezes por dia apresentavam um aumento significativo nas lesões de cárie em comparação com os que escovavam 2 ou mais vezes por dia. Ou seja, indivíduos que afirmam escovar os dentes com pouca frequência têm maior risco de desenvolver ou aumentar a ocorrência de novas lesões de cárie (26). Desta maneira percebemos que, no geral, os pacientes agem em conformidade com as diretrizes da literatura ao afirmarem que realizam a escovagem duas vezes ou mais por dia, no entanto, é imprescindível considerar a existência de um possível viés de resposta, no qual muitos pacientes são influenciados a responder de acordo com a sua percepção subjetiva do que é considerado mais adequado (27).

Para além das pastas fluoretadas, a aplicação de flúor pode ser feita com o uso de colutórios, sendo adotado por 41,46% (n=51) da amostra total, o que vai de encontro ao estudo realizado por Spratley, onde cerca de 29% dos pacientes utilizavam colutórios (28).

O fio dentário é considerado uma excelente ferramenta para remover o biofilme presente nas superfícies interproximais. No entanto, é observado que a frequência do uso do mesmo ainda é baixa na população mais idosa e podemos constatar isso pela amostra em estudo. É importante encorajar o paciente e fornecer conhecimento e informações sobre as doenças orais que surgem devido à falta de uso do fio dentário. Para além disso, é essencial que o médico dentista reforce as expectativas positivas e minimize as negativas, mostrando a eficácia do uso do fio na remoção do biofilme dentário (29).

Relativamente à aplicação de flúor em verniz, a ADA (*American Dental Association*) aconselhou a utilização de verniz de fluor para prevenção de cáries em pacientes jovens que apresentem um elevado risco (30). Neste estudo verificamos que apenas 4,07% (n=5) dos pacientes utilizou este método e nenhum usou flúor tópico em gel embora vários deles tivessem indicação para tal.

Outra maneira de obter flúor é através da fluoretação das águas, no entanto, em Portugal as concentrações de flúor são baixas (com exceção dos Açores e Madeira) e não há fluoretação artificial. Portanto, esse fator não foi considerado no índice, pois não apresenta caráter distintivo (31).

4.2. Hábitos alimentares

Uma dieta que contenha uma quantidade significativa de hidratos de carbono refinados, especialmente sacarose, cria um ambiente favorável para o crescimento de microrganismos patogénicos na cavidade oral, aumentando assim o risco de desenvolvimento de cáries tal como podemos constatar no presente estudo (32). A quantidade de açúcar presente nos lanches realizados entre as refeições principais é um elemento de risco para o surgimento de cáries. Ao analisar os hábitos alimentares da amostra recolhida, constatou-se que 64,23% (n=79) dos inquiridos consumiam açúcar entre as refeições, o que tem uma associação mais expressiva com a prevalência de cáries do que a ingestão durante as refeições principais (33).

Ao relacionar a frequência dos lanches com o consumo de açúcar verificou-se que 64,23% dos pacientes que consumiam açúcar nos lanches entre as refeições, a maioria o fazia uma ou duas vezes por dia tornando esta situação mais problemática uma vez que a sacarose é considerada o hidrato de carbono mais cariogénico (28).

Quando a prevalência de cáries aumentou no século XVI, a população mais abastada foi a mais afetada, pois tinham recursos para comprar e consumir sacarose. Atualmente, podemos observar um padrão semelhante em países africanos, onde a prevalência e a gravidade das cáries dentárias tende a ser maior em áreas urbanas abastadas, onde os açúcares estão mais disponíveis em comparação com as comunidades rurais. Em países recém-industrializados, a incidência de cáries aumenta quando as pessoas mudam a sua alimentação, deixando de depender de alimentos tradicionais ricos em amido para consumir hidratos de carbono refinados. Nos países industrializados, os indivíduos com um risco relativamente alto de cárie são encontrados em grupos socioeconómicos mais baixos (34).

4.3. Fatores que contribuem para a acumulação de placa bacteriana

A existência de aparelho dentário representa uma dificuldade acrescida para realizar uma higiene oral adequada e eficaz. Devido às formas irregulares dos seus constituintes, como *brackets*, bandas e outros componentes, o aparelho ortodôntico cria espaços propícios para a retenção de placa bacteriana, o que pode resultar no desenvolvimento de cáries no esmalte. *Gonçalves* relatou a comparação da quantidade de placa bacteriana retida entre indivíduos com e sem aparelho ortodôntico fixo e constatou que os pacientes com aparelho ortodôntico apresentavam um índice de retenção de placa mais elevado, o que torna estes pacientes mais sujeitos a desenvolver lesões de cárie (35). Uma avaliação do risco de cárie deve fazer parte integrante do processo de diagnóstico ortodôntico e deve ser efetuada previamente à colocação do aparelho, pois se o paciente apresentar um risco de cárie elevado, representa uma contraindicação para o tratamento ortodôntico. Nestas situações, o médico dentista deve adiar o procedimento até que o paciente colabore com o seu próprio tratamento (36).

Outro fator que interfere na retenção de placa bacteriana é a morfologia dos sulcos e fissuras dos dentes posteriores. No estudo de *Perez et al* a maioria dos participantes (86%) apresentava fissuras rasas e os restantes sulcos profundos (9). Similarmente no presente estudo, numa amostra de 123 pacientes, a grande maioria (93,50%, n=115) apresentou sulcos rasos, no entanto, 6,50% (n=8) dos pacientes apresentaram sulcos profundos, o que requer cuidados adicionais. Um dos cuidados a ter será a colocação de selantes, que são bastante eficazes na redução da incidência de cárie em áreas de superfície fissurada (37). Os indivíduos com sulcos profundos nos pré-molares e molares têm maior suscetibilidade à cárie (9).

Existe uma associação entre a exposição radicular e a idade, pois com o avançar da idade a gengiva tem tendência a retrair expondo a superfície radicular e, segundo *Featherstone et al* a maioria dos pacientes acima dos 35 anos apresenta exposição das raízes dentárias, o que vai de encontro ao estudo presente. Então, estes pacientes acabam por ser mais propensos à retenção de placa bacteriana (38).

4.4. Fatores que afetam o fluxo salivar

A redução na produção de saliva, conhecida como hipossalivação, é uma consequência observada em alguns dos medicamentos mais comumente prescritos, tais como aqueles utilizados no tratamento de alergias, asma, distúrbios mentais e cancro. O indivíduo que faça uso de múltiplos medicamentos com efeitos hiposalivatórios está mais propenso a ter um impacto mensurável no fluxo salivar e na função salivar. É essencial a análise do histórico médico e dentário do paciente para ser possível identificar o uso destas medicações que podem ser a causa subjacente de lesões de cárie. Além dos medicamentos, a hipossalivação pode ser causada por outros motivos, incluindo certas condições médicas e fatores genéticos (38).

Dos 123 pacientes, 12,20% (n=15) apresentaram um baixo fluxo salivar, ou seja, hipossalivação. Dos pacientes com um fluxo salivar normal, a maioria produzia saliva suficiente, sendo crucial para fortalecer a estrutura dentária, alterar a composição do biofilme e auxiliar na limpeza das superfícies dentárias (39).

4.5. Análise da saliva

O pH salivar desempenha um papel importante na cavidade oral e pode influenciar diversos processos, incluindo a saúde dos dentes e tecidos moles. Sendo assim, um pH salivar equilibrado é essencial para a manutenção da saúde oral. Sabe-se que alimentos e bebidas ácidas, refrigerantes e alimentos ricos em açúcar podem reduzir o pH salivar, tornando o ambiente mais ácido e propício ao desenvolvimento de cáries. É possível alcançar um pH salivar adequado através de uma dieta equilibrada, com baixa ingestão de alimentos ácidos e açucarados, além de uma correta higiene oral (40). Na amostra recolhida, foi definido como fator de risco um pH inferior a 6,5. Podemos constatar que apenas 6,50% (n=8) apresentavam um valor inferior a 6,5. Desses oito pacientes, estão incluídos os dois pacientes que apresentavam risco severo. A maioria dos pacientes com risco baixo um pH superior a 6,5.

4.6. Análise do Biofilme

Um fator comumente avaliado nos índices de risco de cárie é a carga microbiana, que é avaliada de forma indireta através da análise do índice de placa. Esse índice é avaliado visualmente pelo dentista, o que pode variar consoante o observador. No entanto, é possível quantificar a carga microbiana de maneira mais precisa e objetiva molecularmente, através da quantificação do 16sRNA bacteriano. Constata-se que a maioria dos pacientes (n=61) apresentava uma carga bacteriana total baixa.

4.7. Indicadores de doença

Certas observações clínicas, como presença de cavidades, manchas brancas ou áreas radiolúcidas, descrevem o histórico de cárie ou indicam a sua presença atual. Estes indicadores têm um impacto significativo na avaliação do risco de cárie, pois indicam que a doença continuará a progredir a menos que uma intervenção terapêutica seja realizada (9).

O Sistema ICDAS foi desenvolvido com o objetivo de estabelecer critérios clínicos padronizados para identificar e classificar lesões de cárie. Através da utilização deste sistema é feita uma avaliação mais precisa da presença e gravidade da lesão (41). Como visto anteriormente, no estudo presente, 25,20% (n=31) pacientes apresentava lesões de cárie iniciais (ICDAS 1-2). Foi importante a realização deste diagnóstico precoce de lesões de cárie não cavitadas, sendo altamente desejável que o mesmo seja uma prática recorrente, uma vez que permitirá um melhor controle da doença e da progressão das lesões, resultando em menores custos com tratamentos restauradores. Nestes pacientes com estas lesões, se não forem implementadas medidas preventivas, essas lesões continuarão a avançar até atingir um estágio em que se tornam irreversíveis (42). Desta maneira, foram dadas instruções preventivas aos pacientes.

Os indivíduos adultos podem ter um maior acúmulo de exposição aos fatores de risco para a cárie ao longo do tempo, como dieta inadequada, falta de hábitos de higiene oral e maior probabilidade de ter restaurações antigas que podem estar sujeitas a falhas (43). Aproximadamente 18% (n=22) do total dos pacientes apresentava lesões de cárie extensas (ICDAS 5-6), em que a percentagem de indivíduos que apresentavam estas lesões está relacionada com a população com mais idade da amostra.

4.8. Classificação relativamente ao risco de desenvolver lesões de cárie

Após a recolha de todos os dados, a informação foi analisada e o risco foi calculado utilizando um algoritmo predefinido que leva em consideração todos os fatores examinados (anexo 3). Assim, 58,54% da amostra (n=72) apresentava um risco baixo de desenvolver lesões de cárie, 28,46% (n=35) apresentava risco moderado, 11,38% (n=14) apresentava risco elevado e apenas 1,63% (n=2) apresentava risco severo. Segundo Tajra *et al* no seu estudo, 22,9% dos pacientes apresentavam risco baixo e 35,5% apresentavam risco elevado, o que difere muito dos resultados do presente estudo que são muito mais positivos (43). As discrepâncias notáveis entre os estudos podem ser explicadas pelas variações nas médias de idade, níveis socioeconómicos e pelo facto de alguns pacientes já estarem em acompanhamento clínico há algum tempo.

4.9. Recalls

De entre os 19 pacientes, 3 alteraram o risco de desenvolver lesões de cárie. O **primeiro paciente** transitou de um nível de risco elevado para um nível de risco moderado. Ao analisar as alterações que ocorreram para que isso acontecesse, podemos observar que: Iniciou o uso do fio dentário; diminuiu a frequência de consumo de lanches com adição de açúcar (no ano passado fazia dois lanches e este ano quando questionado, afirmou consumir apenas um lanche com açúcar); recebeu tratamento para uma lesão de cárie ativa ICDAS 5-6; houve uma diminuição da carga bacteriana total, passando de elevada para baixa.

O **segundo paciente** experimentou uma transição de um nível de risco elevado para um nível de risco baixo. Podemos constatar que ocorreram mudanças significativas para que esta transformação ocorresse, tais como: a adoção de uma rotina de escovagem mais frequente com uma pasta de dentes fluoretada, aumentando para duas vezes ao dia em comparação com o que fazia no ano passado; relatou o uso de colutório com flúor; reduziu a quantidade de lanches com adição de açúcar, limitando-se apenas a um lanche entre as refeições principais; recebeu

tratamento para uma lesão ativa ICDAS 5-6; houve uma diminuição na carga bacteriana total, que passou de moderada para baixa.

No caso do **terceiro paciente**, cujo risco de desenvolver cáries foi modificado, transitou de um nível de risco moderado para um nível de risco baixo. Essa melhoria está relacionada com os seguintes fatos: Deixou de consumir açúcar entre as refeições principais; recebeu tratamento para lesões ativas ICDAS 3-4; ocorreu uma diminuição na carga bacteriana total, que passou de alta para baixa.

4.10. Risco de desenvolver lesões de cárie com a adição da quantificação de *Streptococcus sobrinus*.

Foi realizado o cálculo de risco de cárie dentária com a adição da quantificação de *Streptococcus sobrinus*, o qual foi comparado com o risco calculado sem considerar esse parâmetro. Os resultados revelaram alterações no risco de cárie em alguns pacientes, atribuíveis a essa variável específica, o que evidencia a influência impactante deste fator no cálculo final do risco de cárie. Além disso, ressalta também a importância de encontrar não só outras bactérias cariogênicas, mas também carioprotetoras tendo assim um espectro mais abrangente de microrganismos orais a fim de aprimorar a capacidade preditiva do índice e conseqüentemente uma avaliação mais precisa do risco de cárie dentária.

4.11. Considerações finais

Através deste estudo foi possível constatar a viabilidade da implementação das alterações propostas no índice de risco de cárie. Salienta-se a importância dos *recalls*, uma vez que esta classificação é temporária e a avaliação deve ser repetida. É necessário observar quais os hábitos que os pacientes conseguiram adotar ou corrigir com base nas instruções fornecidas na primeira avaliação, bem como verificar se surgiram novas lesões. Explicar aos pacientes a importância da monitorização que ajuda a motivá-los a realizar consultas periódicas de controle. A integração desses programas preventivos requer um compromisso por parte dos pacientes, pois se eles

falharem o primeiro *recall*, qualquer avaliação posterior será tratada como se fosse um paciente novo. Antevê-se que este índice se torne uma ferramenta essencial na área da medicina dentária preventiva, ao promover o uso de técnicas minimamente invasivas. Neste sentido, estes tipos de programas devem ser precisos e que estejam em constante aprimoramento. Além disso, é importante simplificá-los por meio de métodos aplicáveis no consultório, facilitando assim a sua incorporação na prática diária do médico dentista.

Limitações e perspectivas futuras

Após a elaboração deste estudo é importante destacar as principais limitações encontradas:

- Impossibilidade de testar a relevância da distinção entre espécies cariogénicas e carioprotetoras na determinação do nível de risco;

- A integração das recolhas ocorreu antes dos procedimentos realizados nas consultas, o que, pode ter causado transtornos em relação ao tempo necessário;

- Relativamente aos *recalls*, é importante mencionar que nem todos os pacientes aderiram, o que resultou numa amostra reduzida.

Considerando essas limitações, análise dos procedimentos, dados e resultados, são apresentadas as seguintes sugestões para dar continuidade ao estudo:

- Ampliar o número de examinadores capacitados para aumentar a o número de pessoas disponíveis para realizar as recolhas;

- Incluir todos os novos pacientes que frequentam a Clínica Universitária neste estudo;

- Desenvolver métodos *chairside* que facilitem a integração dos biomarcadores salivares na prática clínica, uma vez que os métodos atualmente disponíveis são demorados e dispendiosos;

- Elaborar diretrizes que estabeleçam um plano de tratamento com base no risco de cárie, a ser utilizado na CDU-UCP.

4. Conclusões

Neste trabalho, foram alcançados os seguintes objetivos:

- Propor os fatores a incluir numa aplicação *chairside*;
- Classificar provisoriamente 123 pacientes em relação ao risco de cárie;
- Reavaliar 20 pacientes e verificar as mudanças ocorridas;
- Classificar provisoriamente 66 pacientes em relação ao risco de cárie com a adição da variável da quantificação de *Streptococcus sobrinus*;
- Educar os pacientes, uma vez que o acompanhamento se torna mais preciso e personalizado.

6. Bibliografia

1. Almerich-Torres T, Montiel-Company JM, Bellot-Arcís C, Iranzo-Cortés JE, Ortolá-Siscar JC, Almerich-Silla JM. Caries prevalence evolution and risk factors among schoolchildren and adolescents from valencia (Spain): Trends 1998–2018. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Sep 2;17(18):1–11.
2. Ramon De Moura Batista T, Gadelha Vasconcelos M, Vasconcelos RG. *Physiopathology of the Dental Care: Understanding the Caries Process*. 2020.
3. Mathur VP, Dhillon JK. Dental Caries: A Disease Which Needs Attention. Vol. 85, *Indian Journal of Pediatrics*. Springer; 2018. p. 202–6.
4. Proença F, Fernandes A, Ramazanov A, Proença Ana Fernandes Adélia Ramazanov Luís Fonseca Patrícia Caixeirinho Maria do Céu Machado Afonso Martins Marcelo Prates Editor Técnico F, Firmino Revisão I. *Revista de Estomatologia do CHULC-ONLINE*. 2022.
5. Young DA, Featherstone JDB. Caries management by risk assessment. In: *Community Dentistry and Oral Epidemiology* . 2013. p. 1–12.
6. Lagerweij MD, van Loveren C. Declining Caries Trends: Are We Satisfied? Vol. 2, *Current Oral Health Reports*. Springer Science and Business Media B.V.; 2015. p. 212.
7. Costa SM, Vasconcelos M, Haddad JPA, Abreu MHNG. The severity of dental caries in adults aged 35 to 44 years residing in the metropolitan area of a large city in Brazil: A cross-sectional study. *BMC Oral Health*. 2012 Jul 31;12(1).
8. Fonseca M. Estudo da prevalência de cárie e IMC de uma população pediátrica. *Instituto de Ciências da Saúde (2018)*, 1-123.
9. Hernández P, Sánchez MC, Llama-Palacios A, Ciudad MJ, Collado L. Strategies to Combat Caries by Maintaining the Integrity of Biofilm and Homeostasis during the Rapid Phase of Supragingival Plaque Formation. *Antibiotics* [Internet]. 2022;11(7):880. Available from: <https://doi.org/10.3390/antibiotics>
10. Sánchez-Pérez L, Irigoyen-Camacho ME, Molina-Frechero N, Zepeda-Zepeda M. Fissure depth and caries incidence in first permanent molars: A five-year follow-up study in schoolchildren. *Int J Environ Res Public Health*. 2019 Oct 1;16(19).
11. Degréve Clémentine. *Salivary Biomarkers and Early Childhood Caries*. [Porto]: Universidade Fernando Pessoa; 2017.
12. Zumaran J, Aguilar A. Prognosis method for risk assessment of dental caries induced by chocolate

- consumption [Internet]. Vol. 19. 2015. Available from: <http://www.medigraphic.com/facultadodontologiaunam>
13. Alves KT, Severi L. Componentes salivares associados à prevenção da cárie dental – revisão de literatura. *Rev Odontol Univ Cid São Paulo*. 2016;28(1):37–42.
 14. Araujo Muro CA. Relación entre el PH salival y la prevalencia de caries dental en escolares de 6 a 12 años de la institución educativa San Gabriel, Villa María del Triunfo, 2017. *Revista Científica Odontológica*. 2019 Dec 19;7(2):23–32.
 15. 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).
 16. Singla D, Sharma A, Sachdev V, Chopra R. Distribution of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in dental plaque of Indian pre-school children using PCR and SB-20M agar medium. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2016 Nov 1;10(11):ZC60–3.
 17. Gannam C v, Chin KL, Gandhi RP. Caries risk assessment. 2018.
 18. Reich E, Lussi A, Newbrun E. Caries-risk assessment. *Int Dent J*. 1999;49(1):15–26.
 19. Featherstone J, Ramos Gomez F. CAMBRA® Caries Management by Risk Assessment A Comprehensive Caries Management Guide for Dental Professionals [Internet]. Vol. 4, Article in *Journal of the California Dental Association*. 2019. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/334401386>.
 20. Fonseca A. Avaliação de um índice de risco de cárie numa população adulta. *Faculdade de Medicina Dentária*, (2022), 1-81.
 21. Twetman S, Fontana M. Detection, Assessment, Diagnosis and Monitoring of Caries. Vol. 21, *Monogr Oral Sci*. Basel, Karger. 2009.
 22. Riley P, Worthington H V., Clarkson JE, Beirne P V. Recall intervals for oral health in primary care patients. Vol. 2013, *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley and Sons Ltd; 2013.
 23. Schwendicke F, Krois J. Precision dentistry—what it is, where it fails (yet), and how to get there. Vol. 26, *Clinical Oral Investigations*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2022. p. 3395–403.
 24. Banava S, Fattah M, Kharrazifard MJ, Safaie T, Askarzadeh SH, Yazdi MS, et al. Clinical comparison of dental caries by DMFT and ICDA systems. Vol. 24. 2012.
- Iba B, Adamu &. *Orapuh Journal* Tooth brushing: An effective oral hygiene measure

- [Internet]. 2021. Available from: <https://orapuh.org/journal/>
25. Ten Cate JM. Contemporary perspective on the use of fluoride products in caries prevention. Vol. 214, *British Dental Journal*. 2013. p. 161–7.
 26. Kumar S, Tadakamadla J, Johnson NW. Effect of toothbrushing frequency on incidence and increment of dental caries: A systematic review and meta-analysis. Vol. 95, *Journal of Dental Research*. SAGE Publications Inc.; 2016. p. 1230–6.
 27. Schwarz N. Self-Reports. How the Questions Shape the Answers? *Science Watch*. 1999 Feb; 54:93–105.
 28. Spratley MB. Estudo sobre os hábitos, conhecimentos e atitudes em saúde oral de uma população adolescente. 2013.
 29. Mayumi F, Kubo M, Mialhe FL. Dental floss: from difficulty to success in the removal of interproximal biofilms. 2011.
 30. Carey CM. Focus on fluorides: Update on the use of fluoride for the prevention of dental caries. *Journal of Evidence-Based Dental Practice*. 2014;14(SUPPL.):95–102.
 31. Ministério da Saúde Direcção-Geral da Saúde Circular Normativa Assunto: PROGRAMA NACIONAL DE PROMOÇÃO DA SAÚDE ORAL Nº: 01/DSE DATA: 18/01/05 Para: Administrações Regionais de Saúde e todos os Serviços Prestadores de Cuidados de Saúde Contacto na DGS: Divisão de Saúde Escolar-Dr.^a Gregória Paixão von Amann.
 32. Cláudia A, Dias G, Raslan S, Scherma AP. Aspectos nutricionais relacionados à prevenção de cáries na infância. Vol. 3, *ClipeOdonto*. 2011.
 33. Mestaghanmi H, Labriji A, M'Touguy I, Kehailou FZ, Idhammou S, Kobb N, et al. Impact of Eating Habits and Lifestyle on the Oral Health Status of a Casablanca's Academic Population. *OAlib*. 2018;05(11):1–16.
 34. Touger-Decker R, Van Loveren C. Sugars and dental caries 1-4 [Internet]. Vol. 78, *Am J Clin Nutr*. 2003. Available from: <https://academic.oup.com/ajcn/article-abstract/78/4/881S/4690063>
 35. Gonçalves S. Cárie Dentária Associada ao Tratamento Ortodôntico Fixo. 2017.
 36. Opsahl Vital S, Haignere-Rubinstein C, Lasfargues JJ, Chaussain C. Risque carieux et traitement orthodontique. *Int Orthod*. 2010;8(1):28–45.
 37. Meneghel L. CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS E MORFOLÓGICAS RELACIONADAS À RETENÇÃO DE ALIMENTOS NA SUPERFÍCIE OCLUSAL DOS PRIMEIROS MOLARES DECÍDUOS. 2006.

38. 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*. 2021 Apr 27;2.
39. Lenander-Lumikari M, Loimaranta V. Saliva and dental caries. Vol. 14, *Advances in dental research*. 2000. p. 40–7.
40. Puy CL. E449 Clinical Dentistry Saliva and Oral Health The rôle of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. E450 *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11:449–55.
41. Dikmen B. ICDAS II CRITERIA (INTERNATIONAL CARIES DETECTION AND ASSESSMENT SYSTEM). *J Istanb Univ Fac Dent*. 2015 Oct 21;49(3):63.
42. Braga MM, Medeiros F, Thais M, Kim G, Ekstrand R. O Uso do ICDAS para diagnóstico e planejamento do tratamento da doença cárie. 2012.
43. Alves de Vasconcelos M, Alves Carneiro V, Holanda Teixeira E, Silvia Walter de Aguiar A. Artigo Original Fábio Solon Tajra (1) Theodora Thays Arruda Cavalcante (2) USO DO CARIOGRAM ® NA AVALIAÇÃO DO RISCO DE CÁRIE EM CRIANÇAS EM UM MUNICÍPIO BRASILEIRO: ESTUDO PILOTO Caries risk assessment in children using Cariogram ® in a Brazilian city: pilot study. Vol. 27.

7. Anexos

Anexo 1- Consentimento informado



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

(de acordo com a Declaração de Helsinquia 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 da equipa de investigação.

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 n°: _____

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

Start of Block: Informações pessoais

Q1 Idade do paciente

Q2 Sexo do paciente

Male (1)

Female (2)

Non-binary / third gender (3)

Prefer not to say (4)

Q3 N° do processo clínico

End of Block: Informações pessoais

Start of Block: Grupo A

Q42 Utiliza fio dentário?

Sim (1)

Não (2)

Q23 Escova os dentes com uma pasta fluoretada?

Sim (1)

Não (2)

Skip To: Q24 If Escova os dentes com uma pasta fluoretada? = Não

Q35 Quantas vezes por dia?

1x (1)

2x ou mais (9)

Page Break

Q24 Utiliza um colutório com flúor (0,05% NaF) diariamente?

Sim (1)

Não (2)

Q25 Utiliza uma pasta fluoretada 5000 ppm diariamente?

Sim (1)

Não (2)

Q26 Alguma vez lhe foi aplicado por um profissional de saúde verniz de flúor em consultório nos últimos 6 meses?

Sim (1)

Não (2)

Q27 Alguma vez lhe foi aplicado flúor tópico em forma de gel em consultório nos últimos 6 meses?

- Sim (1)
 - Não (2)
-

Q28 Durante os últimos 6 meses utilizou clorhexidina uma vez por semana?

- Sim (1)
 - Não (2)
-

Q15 Utiliza açúcar nos lanches entre as refeições?

- Sim (1)
- Não (2)

Skip To: Q21 if Utiliza açúcar nos lanches entre as refeições? = Não

Q36 Número de lanches com açúcar entre as refeições

- 1 (7)
 - 2 (8)
 - 3 (9)
 - ≥ 4 (6)
-

Q21 Utiliza aparelho ortodôntico?

- Sim (1)
 - Não (2)
-

Q17 Uso de drogas recreativas?

Sim (1)

Não (2)

Q19 Fatores que podem afetar a saliva (medicação, radiação, doenças sistêmicas)

Sim (1)

Não (2)

Q39 Fez algum destes tratamentos nos últimos 3 anos? (restaurações, TER, extrações)

Sim (1)

Não (2)

End of Block: Grupo A

Start of Block: Grupo B

Q7 Lesões de cárie inicial (ICDAS 1-2)?

Sim (1)

Não (2)

Skip To: Q5 If Lesões de cárie inicial (ICDAS 1-2)? = Não

Q6 Odontograma

Q5 Lesões de cárie moderada (ICDAS 3-4)?

Sim (1)

Não (2)

Skip To: Q9 If Lesões de cárie moderada (ICDAS 3-4)? = Não

Q33 Odontograma

Q9 Lesões de cáries extensas (ICDAS 5-6)?

Sim (1)

Não (2)

Skip To: Q16 If Lesões de cáries extensas (ICDAS 5-6)? = Não

Q34 Odontograma

Q16 Profundidade de sulcos e fissuras?

Rasos (1)

Profundos (2)

Q20 Exposição radicular

Sim (1)

Não (2)

End of Block: Grupo B

Start of Block: Grupo C

Q18 Fluxo salivar

Baixo (1)

Moderado (0,3-0,7ml/min) (2)

Skip To: Q40 If Fluxo salivar = Baixo (

Q31 Possui um adequado fluxo de saliva (estimulada)?

Sim (> 1ml/min estimulada) (1)

Não (2)

Q40 pH

Q41 Carga bacteriana total (μg) DNA.

Q13 Quantidade de bactérias cariogénicas (μg) DNA.

Q38 Bactérias com efeito protetor contra a cárie (μg) DNA.

End of Block: Grupo C

Anexo 3- Cálculo final do risco de cárie

	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

Anexo 4- Protocolos laboratoriais

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	
Forward Primer	926F AAACTCAAAGGAATTGACGG	Cycle PCR: for 2 min cycles:
Reverse Primer	1062R CTCACRRCACGAGCTGAC	

95 °C
40

95 °C for 5 sec

61.5 °C for 20 sec

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

DNA Copy Number determination:

Number of copies = (DNA concentration (ng/µl) x [6.022 x 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 EcoR V 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.