



CATO'LICA
— **FACULDADE DE**
MEDICINA DENTÁRIA
UISEU

Validação de um índice microbiano para avaliação do risco cárie em adultos

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

Por:
Ana Karolina Nóbrega de Oliveira

Viseu, 2026



CATO'LICA
— **FACULDADE DE**
MEDICINA DENTÁRIA
UISEU

Validação de um índice microbiano para avaliação do risco cárie em adultos

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

Por:
Ana Karolina Nóbrega de Oliveira

Orientador: Professora Doutora Maria José Serol de Brito Correia
Coorientador: Professor Doutor Pedro Campos Lopes

Viseu, 2026

Membros do Júri das Provas Públicas

Presidente: Nuno Riccardo das Neves Rosa

Professor Associado da Faculdade de Medicina Dentária Universidade
Católica Portuguesa

Arguente: Cristiane Duque

Professora Associada Convidada da Faculdade de Medicina Dentária
da Universidade Católica Portuguesa

Orientador: Maria José Serol de Brito Correia

Professora Associada da Faculdade de Medicina Dentária da
Universidade Católica Portuguesa

Data das provas públicas: 21 / 7 / 2026

Classificação: 18 (dezoito) valores

“Se Deus plantou em você um sonho, é porque Ele já te viu vivendo a promessa”

Efésios 2:10

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me ter acompanhado ao longo de todo este percurso. Obrigada por me conceder força nos momentos de maior dificuldade, serenidade perante os desafios e por nunca me deixar perder a esperança de alcançar este objetivo.

À minha orientadora, **Professora Doutora Maria José Correia**, pela confiança depositada em mim, pela orientação científica, disponibilidade, exigência e paciência demonstradas ao longo deste percurso. Os seus conhecimentos, sentido crítico e constante incentivo foram fundamentais para a concretização deste trabalho e para o meu crescimento enquanto futura Médica Dentista.

Ao meu coorientador, **Professor Doutor Pedro Campos Lopes** pela disponibilidade, simpatia, dedicação e apoio prestado ao longo deste projeto

Ao **SalivaTec**, em especial à **Professora Doutora Karina Mendes**, à **Mónica** e à **Marla**, pela valiosa colaboração na componente laboratorial deste estudo, pela disponibilidade, profissionalismo e apoio demonstrados ao longo de todo o projeto.

À Instituição, Professores e funcionários por toda a ajuda ao longo desses anos.

À minha mãe e ao Gerard, por serem os meus maiores pilares e por nunca terem deixado de acreditar em mim. Obrigada por todo o amor, apoio, dedicação e pelos inúmeros sacrifícios que fizeram para que eu pudesse concretizar este sonho.

À minha filha, **Amelie**, o meu maior amor e a minha maior motivação. Obrigada por dares um sentido tão especial à minha vida e por seres a razão que me impulsiona a querer ser melhor todos os dias. Mesmo sem compreenderes o significado desta conquista, foste a minha maior força nos momentos de maior cansaço e a inspiração que nunca me deixou desistir.

À minha família, pelo apoio.

A todos os pacientes e participantes que se disponibilizaram para a realização deste estudo e pela confiança no meu trabalho.

Resumo

Introdução: A cárie dentária permanece uma das doenças orais mais prevalentes no mundo, apresentando etiologia multifatorial associada à interação entre fatores biológicos, comportamentais e ambientais. A integração de indicadores microbiológicos poderá complementar modelos convencionais de avaliação do risco, como o *Caries Management by Risk Assessment* (CAMBRA), permitindo uma caracterização mais abrangente do risco individual.

Objetivos: Explorar o potencial da integração de indicadores microbiológicos na avaliação do risco de cárie em adultos, analisando a distribuição de espécies bacterianas cariogénicas e associadas à homeostasia da microbiota oral.

Materiais e métodos: Realizou-se um estudo observacional transversal com 39 adultos da Clínica Dentária Universitária da Universidade Católica Portuguesa – Centro Regional de Viseu. Os participantes responderam a um questionário, foram submetidos a avaliação clínica intraoral e à recolha de saliva e biofilme oral. A análise microbiológica foi realizada por técnica molecular baseada no gene 16S rRNA, incidindo sobre *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mitis* e *Actinomyces johnsonii*. Os resultados foram analisados de acordo com os grupos de severidade de cárie.

Resultados: *Streptococcus mutans* foi detetada em todos os grupos, com maior prevalência nos indivíduos saudáveis. *Streptococcus sobrinus* apresentou distribuição irregular, enquanto *Streptococcus mitis* e *Actinomyces johnsonii* foram identificadas em todos os participantes. A presença isolada das espécies estudadas não permitiu discriminar os diferentes níveis de severidade de cárie.

Conclusão: Os resultados sugerem que os indicadores microbiológicos, quando interpretados isoladamente, apresentam capacidade limitada para discriminar o risco de cárie. A reduzida dimensão da amostra, a distribuição desigual dos participantes e o desenho transversal limitaram a validação plena do índice microbiológico. Assim, os achados devem ser interpretados como exploratórios e como contributo preliminar para futuros estudos de validação.

Palavras-chave: Cárie dentária; Avaliação do risco de cárie; Microbiota oral; Indicadores microbiológicos; CAMBRA; 16S rRNA.

Abstract

Introduction: Dental caries remains one of the most prevalent oral diseases worldwide, with a multifactorial aetiology associated with the interaction of biological, behavioural, and environmental factors. The integration of microbiological indicators may complement conventional caries risk assessment models, such as *Caries Management by Risk Assessment* (CAMBRA), allowing a more comprehensive characterisation of individual risk.

Objectives: To explore the potential of integrating microbiological indicators into caries risk assessment in adults by analysing the distribution of cariogenic bacterial species and species associated with oral microbiota homeostasis.

Materials and Methods: A cross-sectional observational study was conducted with 39 adults attending the University Dental Clinic of the Universidade Católica Portuguesa – Viseu Regional Centre. Participants completed a questionnaire, underwent an intraoral clinical examination, and provided saliva and oral biofilm samples. Microbiological analysis was performed using a molecular technique based on the 16S rRNA gene, focusing on *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mitis*, and *Actinomyces johnsonii*. The results were analysed according to caries severity groups.

Results: *Streptococcus mutans* was detected in all groups, with higher prevalence among healthy individuals. *Streptococcus sobrinus* showed an irregular distribution, whereas *Streptococcus mitis* and *Actinomyces johnsonii* were identified in all participants. The isolated presence of the studied species did not allow discrimination between different levels of caries severity.

Conclusion: The findings suggest that microbiological indicators, when interpreted individually, have limited ability to discriminate caries risk. The small sample size, unequal distribution of participants, and cross-sectional design limited the full validation of the microbiological index. Therefore, the findings should be interpreted as exploratory and as a preliminary contribution to future validation studies.

Keywords: Dental caries; Caries risk assessment; Oral microbiota; Microbiological indicators; CAMBRA.

Índice

Agradecimentos	5
Resumo.....	6
Abstract.....	7
Índice de Abreviaturas.....	10
Índice de Tabelas	11
Índice de Figuras.....	12
1. Introdução	14
1.1 Estrutura Dentária e a Relação com a Cárie	18
1.2 Microbiota Oral e Cárie Dentária.....	19
1.3 Avaliação do Risco de Cárie Dentária em Ambiente Clínico.....	21
1.4 Métodos de diagnóstico e avaliação do risco de cárie dentária	23
1.5 Fatores Comportamentais e Alimentares.....	24
1.6 Abordagens Preventivas	25
1.7 Evolução do Projeto de Investigação.....	26
1.8 Objetivos.....	28
2. Materiais e Métodos	30
2.1 Caracterização do Estudo	30
2.2 Caracterização da Amostra.....	30
2.3 Princípios Éticos	31
2.4 Recolha da amostra.....	31
2.4.1 Questionário	31
2.4.2 Avaliação clínica.....	31
2.4.3 Recolha das amostras biológicas.....	33
2.5 Análise microbiológica	33
2.6 Análise estatística	34
3 Resultados.....	35
3.1 Caracterização da amostra	35
3.2 Caracterização dos hábitos de higiene oral.....	36
3.3 Caracterização dos hábitos alimentares	38
3.4 Caracterização de fatores que predispõem a acumulação de placa bacteriana	39
3.5 Caracterização de resultados decorrentes da avaliação oral	40
3.6 Integração dos parâmetros microbiológicos na avaliação do risco de cárie.....	42
3.7 Prevalência de deteção bacteriana por grupo de cárie.	42
3.8 Quantificação da carga bacteriana das espécies analisadas.....	43
3.9 Análise estatística exploratória	44

4. Discussão.....	46
4.1 Caracterização da amostra	46
4.2. Hábitos de higiene oral	47
4.3 Hábitos alimentares	48
4.4 Fatores predisponentes à acumulação de biofilme dentário	48
4.5 Detecção das espécies bacterianas nos diferentes grupos de cárie	49
4.5.1. <i>Streptococcus mutans</i>	51
4.5.2 <i>Streptococcus sobrinus</i>	52
4.5.3 <i>Streptococcus mitis</i>	53
4.5.4 <i>Actinomyces johnsonii</i>	54
4.6 Integração dos indicadores microbiológicos na avaliação do risco de cárie	56
4.7 Limitações do estudo.....	58
5. Conclusão.....	60
6. Referências.....	61
7. Anexos.....	63
Anexo 1- Consentimento informado.....	63
Anexo 2-Questionário	66
Anexo 3- Sequência de primers.....	84
Anexo 4- Protocolo laboratorial.....	85

Índice de Abreviaturas

CAMBRA – Caries Management by Risk Assessment

CDU-UCP – Clínica Dentária Universitária da Universidade Católica Portuguesa

ICDAS – International Caries Detection and Assessment System

qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

rRNA – RNA ribossomal

Índice de Tabelas

<i>Tabela 1 Critérios clínicos utilizados para a classificação das lesões segundo o sistema ICDAS II.</i>	<i>29</i>
<i>Tabela 2 Caracterização demográfica e clínica da amostra estudada.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabela 3 Resultados das análises estatísticas exploratórias das espécies bacterianas. ...</i>	<i>41</i>

Índice de Figuras

<i>Figura 1 Representação do modelo ecológico da cárie dentária, evidenciando a transição de um biofilme em equilíbrio para um estado de disbiose cariogénica (adaptado de Marsh, 2003).</i>	11
<i>Figura 2 Equilíbrio entre fatores patológicos e fatores de proteção na progressão da cárie dentária (adaptado de Featherstone, 2008).</i>	12
<i>Figura 3 Curva de Stephan ilustrando a diminuição do pH da placa bacteriana após ingestão de açúcares e o subsequente período de recuperação. Adaptado de Fejerskov et al. (2015).</i>	14
<i>Figura 4 Mecanismo de ação do flúor na remineralização do esmalte e na inibição da atividade bacteriana. Adaptado de Featherstone (2008).</i>	14
<i>Figura 5 Estrutura anatômica do dente, evidenciando as camadas de esmalte, dentina e polpa. (adaptado de Fejerskov et al., 2015).</i>	16
<i>Figura 6 Representação da transição de uma microbiota oral em equilíbrio para um estado de disbiose cariogénica, com predomínio de microrganismos acidogénicos e acidúricos (adaptado de Marsh, 2003; Tanner et al., 2020).</i>	17
<i>Figura 7 Distribuição dos participantes por condição de saúde oral.</i>	32
<i>Figura 8 Distribuição dos participantes de acordo com a frequência diária de escovagem dentária.</i>	33
<i>Figura 9 Distribuição da amostra relativamente ao uso diário de fio dentário.</i>	34
<i>Figura 10 Distribuição da amostra relativamente à utilização diária de colutório de flúor (0,05 NaF).</i>	34
<i>Figura 11 Distribuição da amostra relativamente à aplicação de verniz de flúor por um Médico Dentista.</i>	35
<i>Figura 12 Distribuição da amostra de acordo com o consumo de açúcar nos lanches entre as refeições principais.</i>	35
<i>Figura 13 Distribuição da amostra de acordo com o número de lanches com consumo de açúcar.</i>	36
<i>Figura 14 Distribuição da amostra de acordo com a profundidade de sulcos e fissuras de pré-molares e molares.</i>	37

<i>Figura 15 Distribuição da amostra relativamente ao histórico de tratamentos realizados nos últimos 3 anos.....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 16 Distribuição da amostra relativamente à lesão de cárie avaliada usando a classificação ICDAS II (28).....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 17 Percentagem de amostras positivas para Streptococcus mutans, Streptococcus mitis, Streptococcus sobrinus e Actinomyces johnsonii nas diferentes condições de saúde oral.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 18 Distribuição da carga bacteriana das espécies analisadas por qPCR, considerando apenas as amostras com resultado positivo.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 19 Correlações de Spearman entre a carga bacteriana e os parâmetros clínicos de saúde oral.....</i>	<i>41</i>

1. Introdução

A cárie dentária é reconhecida como a doença crônica mais prevalente a nível mundial, afetando indivíduos de todas as idades e constituindo um importante problema de saúde pública. Apesar dos avanços nas estratégias preventivas e terapêuticas, a sua prevalência mantém-se elevada, particularmente na população adulta, onde a progressão da doença tende a ser cumulativa e frequentemente subdiagnosticada em fases iniciais (8,9). Tradicionalmente, a cárie foi descrita como uma doença infecciosa associada a microrganismos específicos, nomeadamente *Streptococcus mutans*. No entanto, esta perspetiva tem vindo a ser substituída por um modelo ecológico, no qual a doença resulta de um desequilíbrio da microbiota oral (disbiose), induzido por fatores ambientais, especialmente a ingestão frequente de açúcares fermentáveis (5,10).

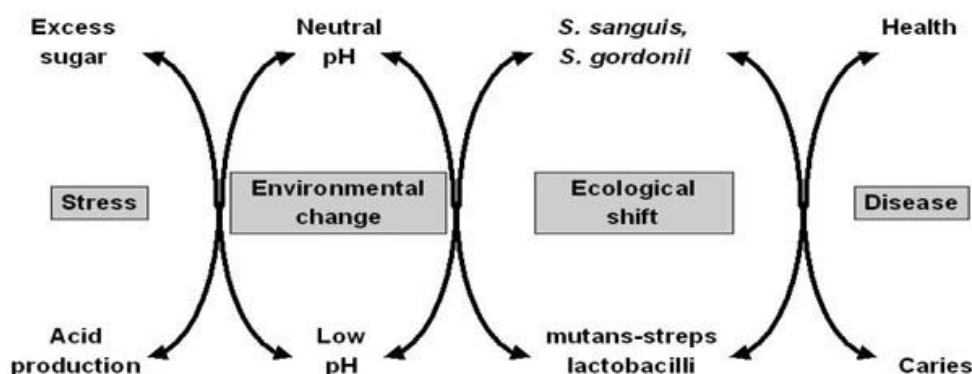


Figura 1 Representação do modelo ecológico da cárie dentária, evidenciando a transição de um biofilme em equilíbrio para um estado de disbiose cariogénica (adaptado de Marsh, 2003).

O biofilme dentário constitui um ecossistema altamente complexo e dinâmico, composto por uma vasta diversidade de microrganismos que interagem entre si e com o hospedeiro. Em condições de saúde, este sistema encontra-se em equilíbrio, sendo dominado por espécies comensais, como *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus salivarius*, que desempenham um papel protetor através da produção de substâncias alcalinas e inibitórias, contribuindo para a manutenção de um pH neutro. (1,5)

A patogénese da cárie não depende apenas da presença de microrganismos específicos, mas também das interações entre as diferentes espécies bacterianas e da sua capacidade de formar uma matriz extracelular rica em polissacarídeos. Esta matriz facilita a adesão bacteriana, aumenta a retenção de ácidos e dificulta a ação de agentes antimicrobianos, contribuindo para a persistência do ambiente cariogénico (2).

Adicionalmente, estudos recentes demonstram que a cárie dentária está associada a alterações na diversidade e estrutura da microbiota oral, caracterizadas por uma redução da diversidade microbiana e pelo predomínio de espécies cariogénicas. Este processo de disbiose resulta numa seleção de microrganismos adaptados a ambientes ácidos, promovendo um ciclo autossustentado de desmineralização (1).

A cárie dentária pode, assim, ser interpretada como o resultado de um desequilíbrio entre fatores patológicos e fatores de proteção, sendo a sua progressão dependente da interação entre microbiota, dieta, saliva e comportamento do hospedeiro (7).

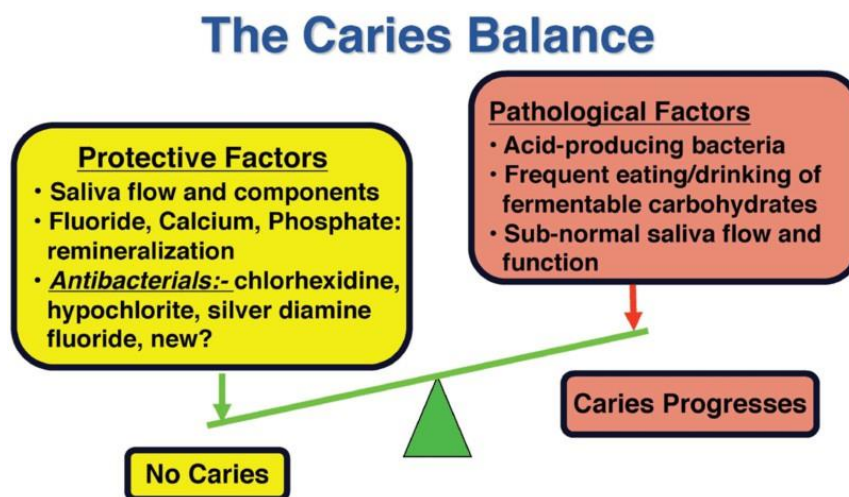


Figura 2 Equilíbrio entre fatores patológicos e fatores de proteção na progressão da cárie dentária (adaptado de Featherstone, 2008).

No âmbito da linha de investigação desenvolvida na Faculdade de Medicina Dentária da Universidade Católica Portuguesa, têm sido realizados estudos sucessivos com o objetivo de aprofundar a integração de indicadores microbiológicos na avaliação do risco de cárie. O trabalho desenvolvido por André Fonseca constituiu o ponto de partida desta linha de investigação, demonstrando a exequibilidade da aplicação de um índice de risco baseado no CAMBRA modificado, através da recolha de dados clínicos, questionários, saliva e biofilme oral (12). Posteriormente, Vanessa Ribeiro deu continuidade a este trabalho, aumentando a dimensão da amostra, realizando a reavaliação de parte dos participantes e introduzindo a quantificação de *Streptococcus sobrinus* como indicador microbiológico, contribuindo para o aperfeiçoamento da componente microbiológica do índice (13). Mais tarde, Mélanie Ferreira aprofundou esta abordagem através da integração

da quantificação de mais bactérias cariogénicas e outras potencialmente associadas à saúde oral, reforçando o interesse da caracterização microbiológica na avaliação do risco de cárie (4).

Dando continuidade a esta linha de investigação, o presente estudo centrou-se na análise de quatro espécies bacterianas (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mitis* e *Actinomyces johnsonii*) em amostras de saliva e biofilme oral, relacionando os indicadores microbiológicos com os dados clínicos obtidos através do sistema ICDAS II (18,19). Embora a reduzida dimensão da amostra e o desenho transversal do estudo não permitam validar plenamente um índice microbiológico para avaliação do risco de cárie, este trabalho constitui uma etapa adicional nesta linha de investigação, contribuindo para a avaliação exploratória do comportamento destes indicadores microbiológicos e para o desenvolvimento de futuros estudos de validação.

Neste contexto, a presente investigação justifica-se pela necessidade de aprofundar a avaliação de indicadores microbiológicos em adultos, procurando explorar de que forma a análise de espécies bacterianas específicas, em amostras de saliva e biofilme oral, pode contribuir para uma caracterização mais integrada do risco de cárie (1,2,8).

A frequência de ingestão de açúcares desempenha um papel determinante no desenvolvimento da cárie dentária. A curva de Stephan demonstra que exposições repetidas a hidratos de carbono fermentáveis provocam quedas sucessivas do pH no biofilme dentário, reduzindo os períodos de remineralização e favorecendo a progressão da doença (6).

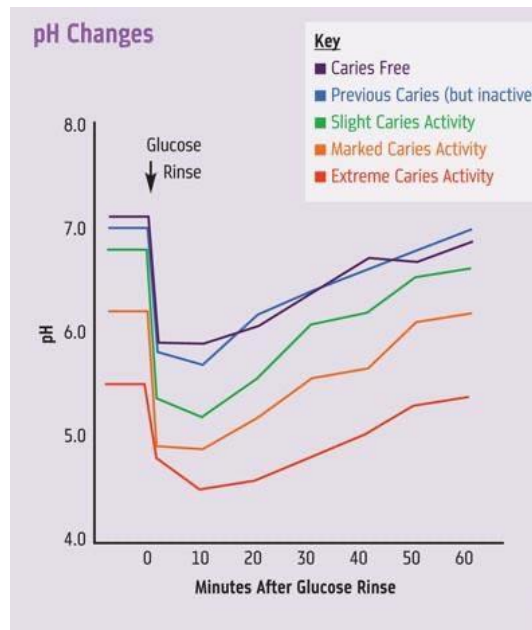


Figura 3 Curva de Stephan ilustrando a diminuição do pH da placa bacteriana após ingestão de açúcares e o subsequente período de recuperação. Adaptado de Fejerskov et al. (2015).

Paralelamente, a abordagem preventiva da cárie dentária tem evoluído no sentido de estratégias que visam não apenas o controlo dos fatores etiológicos, mas também a modulação da microbiota oral. Para além da utilização de flúor, têm emergido abordagens inovadoras, como os probióticos, que demonstram potencial na promoção de espécies carioprotetoras e na inibição de microrganismos cariogénicos, contribuindo para a restauração do equilíbrio ecológico do biofilme oral (11).

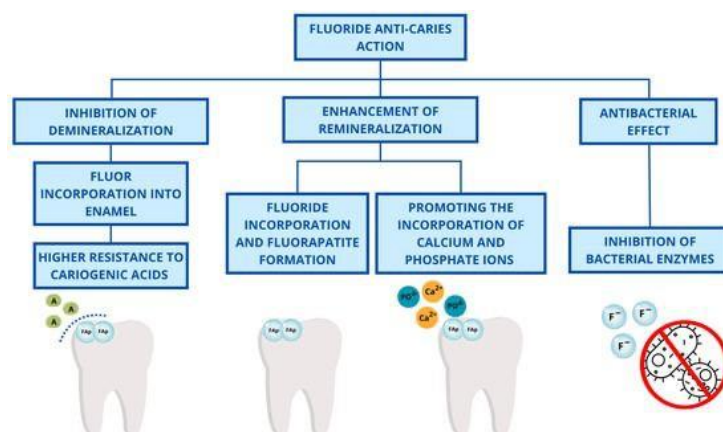


Figura 4 Mecanismo de ação do flúor na remineralização do esmalte e na inibição da atividade bacteriana. Adaptado de Featherstone (2008).

Apesar dos avanços na integração de parâmetros microbiológicos em modelos de avaliação do risco de cárie, continuam a existir limitações relativamente à validação destes índices em populações adultas específicas (1,2,8). A maioria dos estudos disponíveis utiliza

populações heterogêneas e existem ainda poucos dados relativamente à aplicabilidade destes modelos em adultos entre os 30 e os 50 anos, grupo no qual fatores como histórico cumulativo de doença, alterações salivares, hábitos alimentares e terapêutica medicamentosa poderão influenciar o perfil microbiológico e o risco de cárie (3,6,8). Neste contexto, torna-se relevante aprofundar o conhecimento sobre o comportamento dos indicadores microbiológicos nesta população específica e o seu potencial contributo para uma avaliação mais individualizada do risco de cárie.

1.1 Estrutura Dentária e a Relação com a Cárie

O dente é constituído por três estruturas principais: esmalte, dentina e polpa, cada uma com características específicas que influenciam a suscetibilidade ao desenvolvimento de lesões cariosas. O esmalte, sendo o tecido mais mineralizado do organismo, é composto maioritariamente por cristais de hidroxiapatita altamente organizados, conferindo-lhe elevada dureza e resistência mecânica. No entanto, esta estrutura apresenta vulnerabilidade à dissolução ácida quando exposta a ambientes de baixo pH, particularmente abaixo do valor crítico de aproximadamente 5,5 (6). A dentina, localizada imediatamente abaixo do esmalte, apresenta maior conteúdo orgânico e menor grau de mineralização, sendo composta por túbulos dentinários que facilitam a difusão de ácidos e a progressão da lesão cariosa em profundidade. Esta característica torna a dentina mais suscetível à rápida evolução da cárie após a perda da integridade do esmalte (7). O processo de desenvolvimento da cárie dentária é dinâmico e resulta do equilíbrio entre desmineralização e remineralização. A desmineralização ocorre quando ácidos produzidos por microrganismos do biofilme dentário dissolvem os cristais de hidroxiapatita, enquanto a remineralização depende da disponibilidade de iões cálcio, fosfato e flúor na saliva (7). Este equilíbrio é influenciado por fatores como a composição salivar, a frequência de ingestão de açúcares e a atividade microbiana.

A saliva desempenha um papel fundamental neste processo, atuando como sistema tampão, promovendo a neutralização dos ácidos e facilitando a remineralização do esmalte (6,7). Além disso, contribui para a remoção mecânica de resíduos alimentares e apresenta propriedades antimicrobianas, sendo essencial na manutenção da homeostasia oral (6).

Alterações na quantidade ou qualidade da saliva, como ocorre em situações de xerostomia, comprometem estes mecanismos de proteção, aumentando significativamente o risco de desenvolvimento de cárie dentária (3,6). Do mesmo modo, fatores anatômicos, como a profundidade de sulcos e fissuras dentárias, favorecem a retenção de biofilme e dificultar a higienização, contribuindo para o aumento da suscetibilidade à doença (6,7).

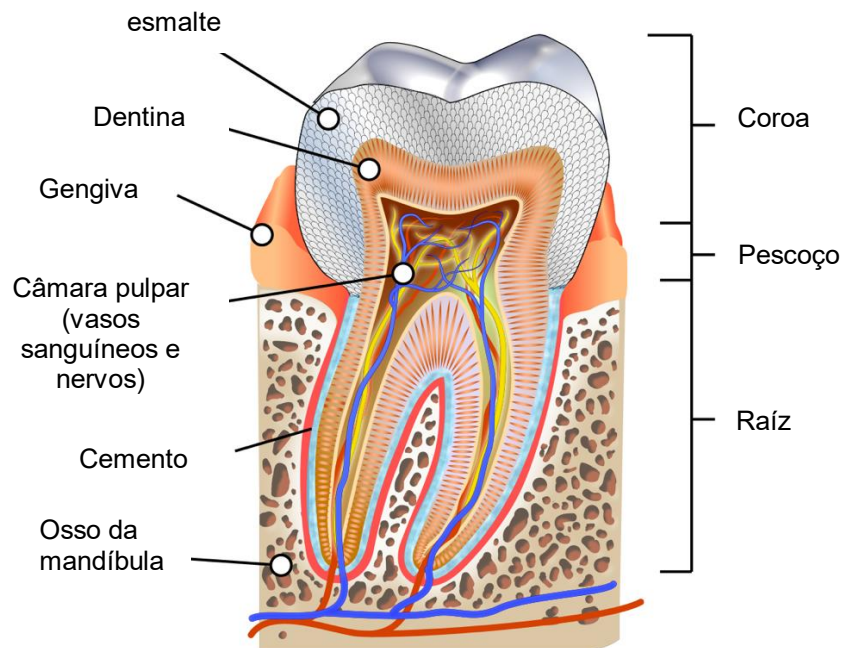


Figura 5 Estrutura anatômica do dente, evidenciando as camadas de esmalte, dentina e polpa. (adaptado de Fejerskov et al., 2015).

1.2 Microbiota Oral e Cárie Dentária

A microbiota oral constitui um ecossistema altamente complexo e dinâmico, composto por centenas de espécies microbianas que coexistem em equilíbrio com o hospedeiro. Em condições fisiológicas, este sistema encontra-se em homeostasia, sendo dominado por bactérias comensais que desempenham funções protetoras, incluindo a inibição de microrganismos patogênicos e a modulação da resposta imunitária local (17).

Entre as espécies associadas à saúde oral destacam-se *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus salivarius*, que contribuem para a manutenção de um ambiente equilibrado através da produção de substâncias alcalinas, como amônia, e compostos antimicrobianos, como o peróxido de hidrogênio. Estas bactérias competem com microrganismos cariogênicos, limitando a sua adesão e proliferação no biofilme dentário (1). No entanto, alterações no ambiente oral, nomeadamente a ingestão frequente de hidratos de carbono fermentáveis, podem desencadear um processo de disbiose, caracterizado por uma mudança na composição e função da microbiota oral. Este processo favorece a proliferação de microrganismos acidogênicos e acidúricos, como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e espécies do género *Lactobacillus*, que apresentam elevada capacidade de metabolizar açúcares e produzir ácidos orgânicos, particularmente ácido láctico (1,10).

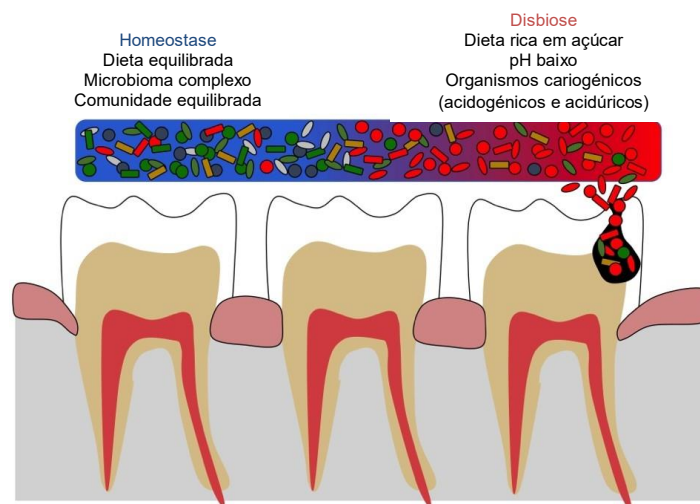


Figura 6 Representação da transição de uma microbiota oral em equilíbrio para um estado de disbiose cariogénica, com predomínio de microrganismos acidogênicos e acidúricos (adaptado de Marsh, 2003; Tanner et al., 2020).

A produção contínua de ácidos leva à diminuição do pH no biofilme dentário, criando um ambiente seletivo que favorece microrganismos adaptados a condições ácidas. Este fenómeno resulta num ciclo autossustentado, no qual a acidificação do meio promove a seleção de bactérias acidúricas, que por sua vez intensificam a produção de ácidos (5,10).

Para além da composição microbiana, a virulência do biofilme dentário está também associada à sua estrutura. A formação de uma matriz extracelular rica em polissacarídeos, sintetizada principalmente por *Streptococcus mutans*, desempenha um papel fundamental na adesão bacteriana e na coesão do biofilme, aumentando a retenção de ácidos e

dificultando a ação de agentes antimicrobianos (2). Adicionalmente, a cárie dentária está associada não apenas à presença de espécies cariogénicas, mas também a alterações na diversidade microbiana. Estudos recentes indicam que a redução da diversidade da microbiota oral está relacionada com um maior risco de doença, refletindo uma perda de estabilidade ecológica do biofilme (1).

A incorporação de técnicas moleculares e a caracterização detalhada da microbiota oral permitiram demonstrar que a cárie dentária não está associada apenas à presença de espécies tradicionalmente consideradas cariogénicas, como *Streptococcus mutans*, mas sim a alterações na composição, diversidade e atividade funcional da comunidade microbiana. Estes avanços reforçam a importância de avaliar a microbiota oral de forma integrada, contribuindo para uma compreensão mais precisa e individualizada do risco de cárie dentária (1,2).

Neste contexto, a microbiota oral assume um papel central não apenas na patogénese da cárie dentária, mas também como potencial biomarcador para a avaliação do risco individual, sendo a sua integração em modelos clínicos uma abordagem promissora para a medicina dentária personalizada (1).

1.3 Avaliação do Risco de Cárie Dentária em Ambiente Clínico

A avaliação do risco de cárie dentária constitui um componente fundamental na prática clínica contemporânea, permitindo a identificação precoce de indivíduos suscetíveis e a implementação de estratégias preventivas individualizadas. Ao contrário da abordagem tradicional centrada no tratamento das lesões estabelecidas, os modelos atuais privilegiam uma perspetiva preventiva, baseada na identificação e modulação dos fatores de risco associados ao desenvolvimento da doença (7,8). A cárie dentária é uma doença multifatorial, resultante da interação entre fatores biológicos, comportamentais e ambientais. Neste contexto, a avaliação do risco deve considerar variáveis como a presença de lesões cariosas prévias, a composição da microbiota oral, os hábitos alimentares, a higiene oral, o fluxo e a presença de áreas retentivas nos dentes e composição da saliva do hospedeiro, bem como fatores socioeconómicos e comportamentais (1,2).

Entre os modelos de avaliação de risco mais amplamente descritos na literatura destaca-se o CAMBRA (Caries Management by Risk Assessment), que propõe uma abordagem estruturada baseada no equilíbrio entre indicadores de doença, fatores de risco e fatores de proteção. Este modelo permite classificar os indivíduos em diferentes níveis de risco (baixo, moderado ou elevado), orientando a tomada de decisão clínica e a definição de estratégias preventivas personalizadas (7). O CAMBRA é um modelo amplamente utilizado para a avaliação individual do risco de cárie, baseado na análise de fatores de risco, fatores protetores e sinais clínicos da doença. Entre as suas principais vantagens destacam-se a abordagem preventiva e a personalização das estratégias terapêuticas. Contudo, apresenta limitações, como a dependência de informação clínica e comportamental e a reduzida integração de marcadores microbiológicos. Neste contexto, a análise microbiológica pode complementar o CAMBRA ao fornecer informações objetivas sobre a microbiota oral, contribuindo para uma avaliação do risco mais precisa e personalizada. Os indicadores de doença incluem a presença de lesões cariosas ativas, restaurações recentes e evidência de desmineralização, refletindo a atividade atual da doença. Os fatores de risco englobam a elevada carga bacteriana de microrganismos cariogênicos, como *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus spp.*, a ingestão frequente de açúcares fermentáveis e a redução do fluxo salivar. Por outro lado, os fatores de proteção incluem a exposição ao flúor, a adequada higiene oral, a capacidade tampão da saliva e a presença de uma microbiota oral equilibrada (1,7). Apesar de o modelo CAMBRA ser amplamente descrito na literatura como uma ferramenta eficaz para a avaliação do risco de lesões de cárie, a sua aplicação na prática clínica diária não é universal. Estudos indicam que, embora o CAMBRA seja recomendado por diversas instituições académicas e integrado em protocolos clínicos, a sua implementação rotineira por profissionais de saúde oral pode variar, sendo frequentemente limitada por fatores como o tempo clínico disponível, a complexidade do protocolo e a necessidade de formação específica (7,8). Apesar das suas limitações, diversos estudos demonstram que a utilização do CAMBRA favorece uma abordagem preventiva e individualizada, permitindo uma estratificação mais consistente do risco de cárie, a implementação de medidas preventivas direcionadas e uma tomada de decisão clínica mais fundamentada. No entanto, a sua eficácia depende da correta aplicação do protocolo e da integração dos diferentes fatores de risco e proteção avaliados (1,7,8).

No contexto da investigação desenvolvida na Universidade Católica Portuguesa, vários estudos têm procurado ultrapassar as limitações dos modelos tradicionais através da integração de parâmetros microbiológicos na avaliação do risco de cárie dentária. Fonseca (2022) demonstrou a aplicabilidade de um índice modificado baseado no modelo CAMBRA, evidenciando a importância da adaptação dos critérios à população adulta. Posteriormente, Ribeiro (2023) introduziu a quantificação de microrganismos específicos, como *Streptococcus sobrinus*, reforçando o papel dos indicadores microbiológicos na estratificação do risco, embora tenha identificado a necessidade de expandir a análise a um maior número de espécies bacterianas.

Apesar do crescente interesse na integração de parâmetros microbiológicos na avaliação do risco de cárie dentária, a sua aplicação clínica de rotina continua limitada. Entre os principais obstáculos destacam-se o custo associado às análises microbiológicas, a necessidade de equipamentos especializados, a complexidade técnica das metodologias moleculares e o consequente maior tempo de processamento laboratorial. Adicionalmente, muitos dos índices microbiológicos propostos ainda apresentam validação clínica limitada, particularmente em populações adultas, dificultando a sua integração na prática clínica diária (1,2,8). Assim, embora os parâmetros microbiológicos apresentem potencial na estratificação do risco de cárie, continuam a existir desafios relacionados com a sua aplicabilidade, padronização e custo-benefício em contexto clínico.

1.4 Métodos de diagnóstico e avaliação do risco de cárie dentária

O diagnóstico e a monitorização da cárie dentária baseiam-se na combinação de métodos clínicos e sistemas de avaliação do risco. Entre os métodos de diagnóstico clínico destaca-se o International Caries Detection and Assessment System (ICDAS II), que permite detetar e classificar as lesões de cárie em diferentes estádios de desenvolvimento, desde lesões iniciais não cavitadas até cavidades extensas. A sua utilização possibilita um diagnóstico precoce, uma monitorização padronizada da progressão da doença e uma tomada de decisão clínica mais adequada.

Para além do diagnóstico clínico, a avaliação do risco de cárie desempenha um papel

fundamental na medicina dentária preventiva. Neste contexto, destaca-se o Caries Management by Risk Assessment (CAMBRA), um modelo que integra indicadores de doença, fatores de risco e fatores de proteção para classificar os indivíduos em diferentes níveis de risco de cárie. Esta abordagem permite orientar estratégias preventivas e terapêuticas individualizadas, embora a sua avaliação continue a basear-se predominantemente em parâmetros clínicos e comportamentais.

A avaliação do risco de cárie em ambiente clínico envolve também o uso de índices e testes microbiológicos para monitorizar a presença de fatores de risco. Ferreira (2024) explorou a utilização de parâmetros microbiológicos como ferramenta complementar na avaliação do risco de cárie, analisando a integração de indicadores microbiológicos em modelos de classificação de risco. O índice Cariocheck tem sido proposto como uma ferramenta complementar na avaliação do risco de cárie, distinguindo-se dos modelos tradicionais, como o CAMBRA, pela integração mais direta de parâmetros microbiológicos quantitativos. Enquanto os modelos convencionais se baseiam predominantemente em indicadores clínicos e comportamentais, o Cariocheck incorpora a análise da carga bacteriana associada a microrganismos cariogénicos, permitindo uma avaliação mais objetiva do risco individual (1,2). Esta abordagem baseia-se na evidência crescente de que a composição e a atividade da microbiota oral desempenham um papel central na patogénese da cárie dentária, sendo a disbiose um fator determinante no desenvolvimento da doença (1,10,17). Assim, ao integrar dados microbiológicos, o Cariocheck apresenta potencial para melhorar a precisão da estratificação do risco, particularmente quando utilizado em conjunto com métodos clínicos convencionais (1,2). No entanto, apesar das suas vantagens teóricas, a evidência clínica relativa à sua aplicação ainda é limitada, sendo necessária a validação em diferentes populações, nomeadamente em adultos, para confirmar a sua utilidade na prática clínica (2). Neste contexto, alguns estudos têm procurado integrar indicadores microbiológicos em modelos de avaliação de risco, reforçando a importância de abordagens multidimensionais na medicina dentária contemporânea (1,8).

1.5 Fatores Comportamentais e Alimentares

Os fatores comportamentais e alimentares desempenham um papel determinante no desenvolvimento da cárie dentária, influenciando diretamente o equilíbrio ecológico da

microbiota oral. Entre estes, a ingestão frequente de açúcares fermentáveis constitui um dos principais fatores de risco, uma vez que favorece a produção de ácidos por microrganismos cariogênicos, reduzindo o pH do biofilme dentário e comprometendo os períodos de remineralização do esmalte. Assim, a frequência de consumo de açúcares apresenta maior impacto no desenvolvimento da doença do que a quantidade total ingerida, tornando a avaliação destes hábitos essencial na estratificação do risco individual (1,6,8,10).

A integração de fatores comportamentais em modelos de avaliação de risco, como o CAMBRA, permite uma abordagem mais abrangente e personalizada, combinando dados clínicos, microbiológicos e hábitos do paciente. A existência de um índice estruturado possibilita a quantificação e sistematização destes fatores, permitindo não apenas a identificação de indivíduos de maior risco, mas também a monitorização da eficácia de intervenções preventivas ao longo do tempo (7,8). Fatores comportamentais adicionais, como o consumo de bebidas ácidas, hábitos de alimentação noturna e condições associadas à redução do fluxo salivar, podem também influenciar o risco de cárie dentária, alterando o ambiente oral e favorecendo a disbiose (2,8). Além disto, hábitos de higiene oral inadequados contribuem para a acumulação de biofilme dentário e para o aumento da carga bacteriana de microrganismos cariogênicos, potenciando o desenvolvimento da doença (1). Por outro lado, a exposição ao flúor, através de dentífricos ou outros agentes, desempenha um papel protetor, promovendo a remineralização do esmalte e inibindo a atividade bacteriana (6).

Deste modo, a avaliação integrada dos fatores comportamentais e dietéticos, especialmente quando incorporada em índices de risco, constitui uma ferramenta essencial para a identificação precoce de indivíduos suscetíveis e para a implementação de estratégias preventivas eficazes e personalizadas (1,7).

1.6 Abordagens Preventivas

A prevenção da cárie dentária deve atuar sobre os principais fatores envolvidos na etiologia da doença, incluindo a composição da microbiota oral, a frequência de exposição a hidratos de carbono fermentáveis e o controlo do biofilme dentário. A redução da frequência de ingestão de açúcares contribui para diminuir os períodos de queda do pH oral, limitando a seleção de microrganismos acidogênicos e acidúricos e favorecendo a manutenção de uma microbiota oral mais equilibrada. Do mesmo modo, a remoção regular

do biofilme dentário e a manutenção de hábitos de higiene oral adequados contribuem para a prevenção da disbiose e para a preservação do equilíbrio ecológico da cavidade oral (5,6,8).

Entre as estratégias preventivas mais amplamente utilizadas destaca-se a aplicação de flúor, que desempenha um papel fundamental na remineralização do esmalte e na inibição da atividade metabólica de microrganismos cariogénicos. A utilização regular de dentífricos fluoretados tem demonstrado eficácia na redução da incidência de cárie dentária, sendo considerada uma das medidas mais importantes em para a manutenção da saúde oral (6,8).

Deste modo, a prevenção da cárie dentária deve ser entendida como uma abordagem multifatorial, que integra estratégias químicas, comportamentais e biológicas, incluindo a modulação da microbiota oral, com o objetivo de promover a saúde oral e reduzir o risco de desenvolvimento da doença (1,7).

1.7 Evolução do Projeto de Investigação

É neste contexto que na FMD investigações estão sendo desenvolvidas com o objetivo de avaliar indicadores a usar no cálculo de risco de carie. Neste momento já houve 4 dissertações desenvolvidas com o objetivo de estudar a viabilidade de inclusão de indicadores microbianos no cálculo de risco de cárie.

O trabalho desenvolvido por André Fonseca teve como principal objetivo a aplicação inicial de um modelo de avaliação do risco de cárie baseado no protocolo CAMBRA, adaptado através da inclusão de diferentes fatores de risco e proteção (12). Nesta fase inicial do projeto, foi realizado um estudo observacional transversal numa população adulta da Clínica Dentária Universitária da Universidade Católica Portuguesa, envolvendo 80 participantes. O estudo incluiu a aplicação de questionários, avaliação clínica intraoral, recolha de saliva e de biofilme oral. Entre os principais contributos desta dissertação destacam-se a adaptação do índice CAMBRA através da inclusão de novos parâmetros, como a utilização de fio dentário, o pH e o fluxo salivar, a quantificação bacteriana por 16S rRNA e a avaliação de bactérias associadas à carioproteção, bem como a definição e

otimização inicial dos protocolos clínicos e laboratoriais de recolha. O estudo permitiu ainda demonstrar a aplicabilidade do índice numa população adulta da CDU-UCP e estabelecer a base metodológica para o desenvolvimento das fases subsequentes do projeto longitudinal. Adicionalmente, foram identificadas limitações metodológicas, particularmente ao nível das análises microbiológicas e do processamento das amostras de biofilme oral, tendo sido propostas recomendações para o aperfeiçoamento futuro do protocolo, incluindo a continuação da aplicação do índice numa amostra mais alargada e o eventual desenvolvimento de uma ferramenta *chairside* para apoio à avaliação clínica do risco de cárie. Desta forma, o trabalho de André Fonseca (constituiu a fase inicial de implementação e consolidação metodológica do protocolo de avaliação do risco de cárie utilizado nas investigações subsequentes (12)

Posteriormente, Vanessa Ribeiro deu continuidade ao projeto iniciado por André Fonseca, aumentando a amostra total do estudo e aprofundando a componente longitudinal e microbiológica da investigação (13). A autora manteve a aplicação do índice de risco de cárie baseado no CAMBRA modificado, introduzindo novos avanços metodológicos, nomeadamente o aumento da amostra para 123 participantes, a realização de *recalls* em participantes previamente avaliados, permitindo analisar alterações do risco de cárie ao longo do tempo, e a inclusão da quantificação microbiológica de *Streptococcus sobrinus* como potencial indicador adicional de risco de cárie. Esta dissertação permitiu uma primeira abordagem longitudinal do projeto, através da reavaliação de 20 participantes após 8 a 10 meses, verificando alterações no nível de risco em alguns indivíduos avaliados. Além disso, Vanessa Ribeiro contribuiu para o aprofundamento da componente microbiológica do índice, demonstrando que a inclusão da quantificação de *Streptococcus sobrinus* originava alterações na estratificação final do risco de cárie em parte da amostra analisada. O trabalho permitiu ainda consolidar os protocolos de recolha e processamento das amostras biológicas, avançando no processamento das amostras de biofilme oral e reforçando a necessidade de incluir futuramente outras bactérias cariogénicas e associadas à saúde oral para melhorar a capacidade preditiva do modelo. Adicionalmente, foram propostos fatores a integrar numa futura ferramenta *chairside* destinada a facilitar a utilização clínica da avaliação do risco de cárie.

Mais recentemente, Mélanie Ferreira deu continuidade ao projeto através do aprofundamento da componente microbiológica da avaliação do risco de cárie, explorando

a integração de parâmetros microbiológicos no cálculo do risco. No seu estudo, foram quantificadas por qRT-PCR a carga bacteriana total, através do gene 16S rRNA, as espécies cariogénicas *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, bem como as espécies descritas como carioprotetoras, *Streptococcus mitis* e *Actinomyces johnsonii*. Os resultados desse trabalho contribuíram para reforçar a importância da caracterização microbiológica e para evidenciar a necessidade de reavaliar, em estudos futuros, a utilidade clínica destes indicadores na avaliação do risco de cárie (4). Os resultados demonstraram que, apesar da inclusão dos fatores microbianos alterar o índice CAMBRA, esta alteração não foi significativa na maioria dos participantes avaliados. Verificou-se associação entre bactérias cariogénicas e risco de cárie, mas não foi possível confirmar associação relevante entre as bactérias associadas à saúde oral estudadas e a proteção contra a doença cárie. Desta forma, o estudo permitiu concluir que o desenvolvimento de um modelo microbiológico de avaliação do risco poderá exigir a inclusão e quantificação de

um maior número de bactérias, particularmente espécies associadas à carioproteção, de forma a representar mais adequadamente a complexidade da microbiota oral. A presente dissertação deu continuidade à linha de investigação desenvolvida por Mélanie Ferreira, mantendo a avaliação dos mesmos indicadores microbiológicos (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mitis* e *Actinomyces johnsonii*) e a sua integração na avaliação do risco de cárie. No entanto, ao contrário do estudo anterior, realizado numa população adulta mais heterogénea, a presente investigação centrou-se exclusivamente em adultos entre os 30 e os 50 anos de idade. A seleção desta faixa etária foi motivada pela reduzida representatividade destes indivíduos nos estudos previamente desenvolvidos, procurando colmatar essa lacuna e ampliar o conhecimento sobre o comportamento dos indicadores microbiológicos neste grupo específico. Desta forma, este estudo permitiu avaliar a aplicabilidade do protocolo numa população anteriormente pouco representada, contribuindo para uma caracterização mais abrangente da relação entre os parâmetros microbiológicos e o risco de cárie em adultos.

1.8 Objetivos

O presente estudo tem como objetivo principal avaliar a capacidade preditiva de um índice microbiológico de risco de cárie numa população adulta entre os 30 e os 50 anos, através da integração de parâmetros microbiológicos, clínicos e comportamentais.

Especificamente, pretende-se:

- Quantificar microrganismos cariogénicos presentes na microbiota oral através de análise microbiológica das amostras de saliva e biofilme oral;
- Correlacionar os dados microbiológicos obtidos com a presença e gravidade de lesões de cárie avaliadas pelo sistema ICDAS II;
- Comparar a classificação de risco obtida pelo índice microbiológico com a classificação determinada pelo modelo CAMBRA;
- Avaliar se a inclusão de parâmetros microbiológicos melhora a estratificação do risco de cárie relativamente aos modelos clínicos convencionais;
- Analisar a aplicabilidade do índice microbiológico numa população adulta específica entre os 30 e os 50 anos.

A hipótese principal do estudo é que a integração de parâmetros microbiológicos quantitativos permite uma avaliação mais precisa do risco de cárie dentária quando comparada com modelos baseados exclusivamente em parâmetros clínicos e comportamentais.

2. Materiais e Métodos

2.1 Caracterização do Estudo

O presente estudo caracteriza-se como um estudo observacional transversal, integrado numa linha de investigação desenvolvida na Faculdade de Medicina Dentária da Universidade Católica Portuguesa, dedicada à avaliação do potencial contributo de indicadores microbiológicos na estratificação do risco de cárie dentária em adultos.

Foram recolhidos dados clínicos, comportamentais e microbiológicos com o objetivo de caracterizar o risco de cárie de forma multidimensional. Para tal, cada participante respondeu a um questionário estruturado, foi submetido a uma avaliação clínica intraoral utilizando o sistema International Caries Detection and Assessment System II (ICDAS II) e procedeu-se à recolha de amostras biológicas de saliva e biofilme oral.

2.2 Caracterização da Amostra

A amostra foi constituída por utentes da Clínica Dentária Universitária da Universidade Católica Portuguesa – Centro Regional de Viseu, selecionados por amostragem de conveniência durante o período de recolha de dados. Os participantes recorreram à clínica para tratamento dentário e aceitaram voluntariamente integrar o estudo, tendo assinado o consentimento informado antes da recolha dos dados.

Foram definidos critérios de inclusão e exclusão com o objetivo de obter uma amostra homogénea e minimizar fatores suscetíveis de influenciar a avaliação clínica e microbiológica.

Os critérios de inclusão foram:

- Adultos com idades compreendidas entre os 30 e os 50 anos;
- Aceitação voluntária da participação no estudo, mediante assinatura do consentimento informado.

Os critérios de exclusão foram:

- Ausência de consentimento informado;
- Idade inferior a 30 anos ou superior a 50 anos;

- Utilização recente de antibióticos nos últimos 3 meses;
- Realização de higiene oral ou ingestão de alimentos ou bebidas durante a hora que antecedeu a recolha das amostras biológicas.

2.3 Princípios Éticos

Todos os participantes assinaram o consentimento informado (Anexo 1), garantindo que entenderam o estudo. A confidencialidade dos dados foi assegurada, sendo utilizados exclusivamente para a investigação.

2.4 Recolha da amostra

A recolha de dados teve início em novembro de 2025, na Clínica Dentária Universitária da Universidade Católica Portuguesa – Centro Regional de Viseu. Todos os participantes foram submetidos, de forma sequencial, a um questionário estruturado, a uma avaliação clínica intraoral e à recolha de amostras biológicas para posterior análise microbiológica.

2.4.1 Questionário

Inicialmente, foi aplicado um questionário estruturado (Anexo 2), destinado à recolha de informação demográfica, hábitos de higiene oral, hábitos alimentares, antecedentes médicos e outros fatores de risco relevantes para a avaliação do risco de cárie dentária.

2.4.2 Avaliação clínica

A avaliação clínica intraoral foi realizada recorrendo ao sistema *International Caries Detection and Assessment System II* (ICDAS II), permitindo a deteção e classificação das lesões de cárie de acordo com o seu estágio de desenvolvimento. Antes da observação clínica, as superfícies dentárias foram limpas e secas, seguindo as recomendações do sistema ICDAS II, de forma a permitir uma correta identificação das lesões (18,19).

Tabela 1 Critérios clínicos utilizados para a classificação das lesões segundo o sistema ICDAS II. Adaptado de Dikmen et al. e Gupta et al

Código	Critério clínico
0	Superfície saudável, sem evidência de cárie após secagem.
1	Primeira alteração visual do esmalte após secagem.
2	Alteração visual distinta do esmalte visível com o dente húmido.
3	Perda localizada de esmalte sem dentina visível.
4	Sombra escura proveniente da dentina subjacente afetada por cárie.
5	Cavidade distinta com dentina visível.
6	Cavidade extensa com dentina visível.

Cada superfície dentária foi examinada sistematicamente e classificada de acordo com os critérios do ICDAS II. Para cada participante foi registada a classificação ICDAS de maior gravidade observada, bem como o número de dentes com lesões de cárie.

Com base na classificação ICDAS mais elevada registada durante o exame clínico, os participantes foram distribuídos em quatro grupos de severidade:

- Saudável: ausência de lesões de cárie (ICDAS 0);
- Cáries leves: presença de lesões classificadas como ICDAS 1 ou 2;
- Cáries moderadas: presença de lesões classificadas como ICDAS 3 ou 4;
- Cáries extensas: presença de lesões classificadas como ICDAS 5 ou 6.

Na presente amostra não foram observadas lesões classificadas como ICDAS 6. Esta estratificação permitiu comparar os indicadores microbiológicos entre participantes com diferentes níveis de severidade da doença, possibilitando a avaliação exploratória da relação entre o perfil microbiológico e a gravidade clínica da cárie dentária.

A classificação dos participantes foi efetuada de acordo com os critérios previamente definidos para o protocolo do estudo, considerando simultaneamente a classificação ICDAS de maior gravidade e o número de dentes com lesões de cárie

2.4.3 Recolha das amostras biológicas

Inicialmente foi recolhida saliva não estimulada durante dois minutos, uma vez que esta permite avaliar o fluxo salivar basal, refletindo as condições fisiológicas da cavidade oral em repouso. Nos casos em que o fluxo salivar era considerado moderado, procedeu-se posteriormente à recolha de saliva estimulada, através da mastigação de uma película de Parafilm CRT® Buffer, com o objetivo de avaliar a capacidade funcional das glândulas salivares e obter volume suficiente para a realização das análises microbiológicas. Foi igualmente efetuada a medição do pH salivar.

Adicionalmente, foram recolhidas amostras de biofilme oral recorrendo a uma técnica padronizada e utilizando instrumentos estéreis. Após a recolha, todas as amostras foram devidamente identificadas, acondicionadas e armazenadas em condições apropriadas até à realização da análise microbiológica.

As amostras de saliva e de biofilme oral foram posteriormente utilizadas na análise microbiológica por PCR quantitativa em tempo real (qPCR), permitindo a quantificação das espécies bacterianas em estudo. O procedimento detalhado de recolha e processamento das amostras encontra-se descrito no protocolo laboratorial apresentado no Anexo 4.

2.5 Análise microbiológica

A caracterização microbiológica foi realizada no laboratório SalivaTec através de PCR quantitativa em tempo real (qPCR), após extração do ADN genómico das amostras biológicas, de acordo com o protocolo previamente estabelecido para este projeto de investigação (Anexo 4).

Foram utilizados primers específicos para a quantificação de ***Streptococcus mutans***, ***Streptococcus sobrinus***, ***Streptococcus mitis*** e ***Actinomyces johnsonii***, bem como primers universais dirigidos ao gene 16S rRNA para determinação da carga bacteriana total. As sequências dos primers encontram-se apresentadas no Anexo 3.

A quantificação absoluta foi realizada através de curvas padrão previamente estabelecidas, permitindo estimar o número de cópias bacterianas presentes nas amostras analisadas. As condições experimentais da qPCR, incluindo a composição da mistura

reacional, os ciclos de amplificação e o protocolo de quantificação, encontram-se descritas no Anexo 4.

As amostras que não apresentaram amplificação para determinada espécie bacteriana foram classificadas como NA (não amplificado), correspondendo à ausência de detecção da espécie bacteriana alvo na respetiva amostra.

2.6 Análise estatística

Os dados foram analisados através de estatística descritiva e inferencial com carácter exploratório. As variáveis categóricas foram apresentadas sob a forma de frequências absolutas e relativas (%), enquanto as variáveis contínuas foram descritas através da mediana, intervalo interquartil (Q1–Q3), valores mínimo e máximo.

Considerando a reduzida dimensão da amostra, as análises inferenciais foram realizadas recorrendo a testes não paramétricos. O teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar a associação entre a detecção bacteriana e a severidade de cárie. A comparação da carga bacteriana entre participantes saudáveis e participantes com cárie foi efetuada através do teste de Mann–Whitney. A associação entre a carga bacteriana e o ICDAS mais elevado, bem como entre a carga bacteriana e o número de dentes com lesão, foi avaliada através do coeficiente de correlação de Spearman.

Os resultados classificados como NA corresponderam à ausência de detecção da respetiva bactéria na amostra do participante, tendo sido considerados como ausência de detecção nas análises estatísticas.

3 Resultados

3.1 Caracterização da amostra

Tabela 2 Caracterização demográfica e clínica da amostra estudada (n = 39).

Característica	n (%)
Número de participantes	39
Sexo feminino	21 (54)
Sexo masculino	18 (46)
Saudável	18 (46,2)
Cáries leves	11 (28,2)
Cáries moderadas	8 (20,5)
Cáries extensas	2 (5,1)

A amostra foi constituída por 39 participantes com idades compreendidas entre os 30 e os 50 anos. Verificou-se uma distribuição semelhante entre os sexos, com ligeira predominância do sexo feminino. Relativamente à condição clínica, observou-se uma maior representatividade dos participantes classificados como saudáveis, seguindo-se os grupos com cáries ligeiras, moderadas e extensas, permitindo a comparação dos indicadores microbiológicos entre diferentes níveis de severidade da cárie dentária.

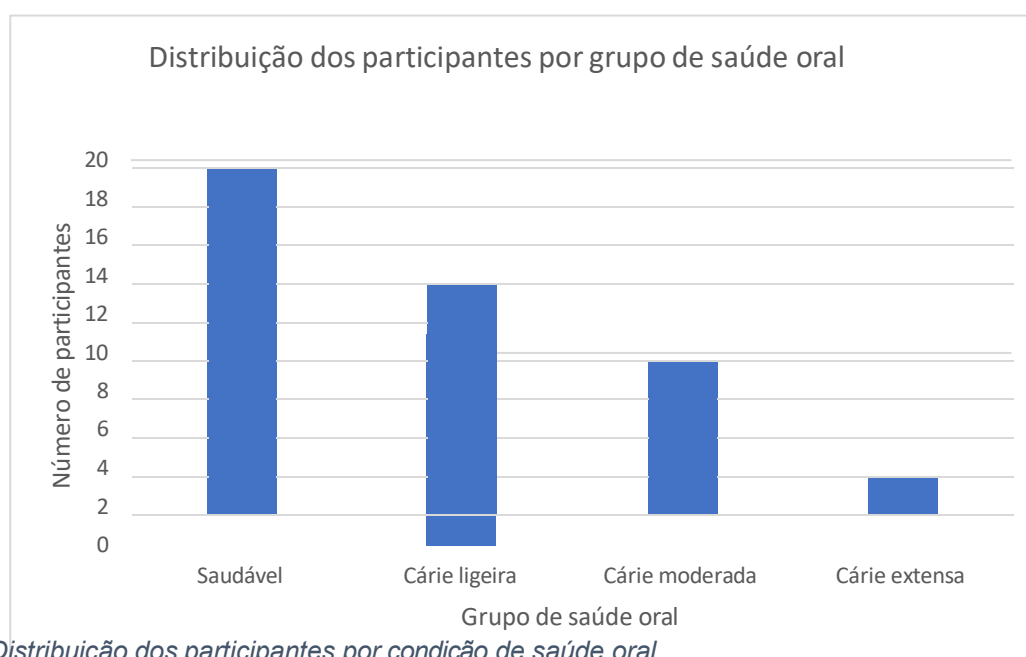


Figura 7 Distribuição dos participantes por condição de saúde oral.

Os participantes, evidenciaram quatro grupos de acordo com o nível de saúde oral. O grupo saudável foi o mais representado, com 18 participantes (46,2%), seguido do grupo com cárie ligeira, com 11 participantes (28,2%). O grupo com cárie moderada incluiu 8 participantes (20,5%), enquanto o grupo com cárie extensa foi o menos representado, com apenas 2 participantes (5,1%) (Figura 7).

3.2 Caracterização dos hábitos de higiene oral

Relativamente aos hábitos de higiene oral da população em estudo, verificou-se que todos os participantes escovavam os dentes diariamente (100%; $n = 39$). Destes, 9 participantes (23,08%) realizavam a escovagem uma vez por dia, 18 participantes (46,15%) duas vezes por dia e 12 participantes (30,77%) três vezes por dia, sendo que ninguém respondeu que escovavam quatro ou mais vezes.

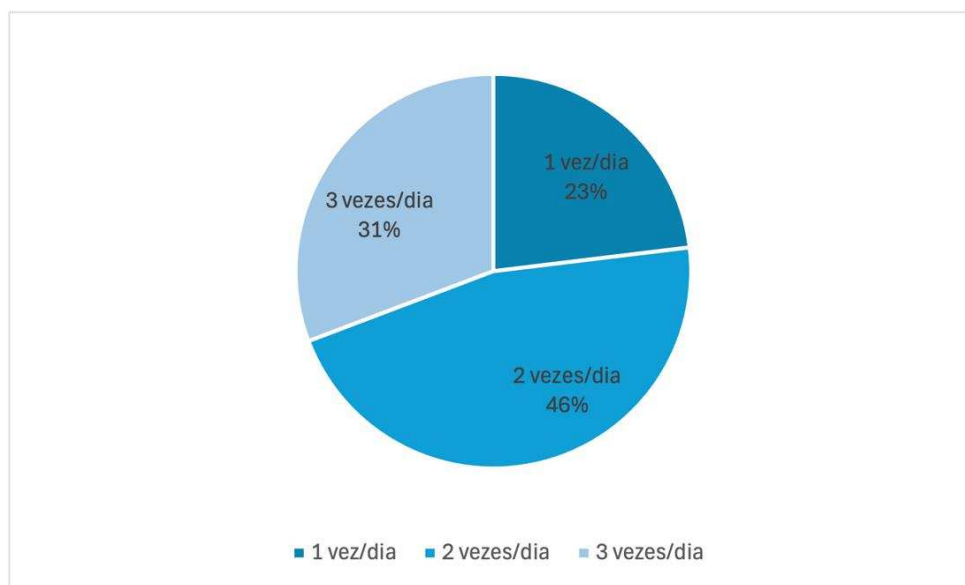


Figura 8 Distribuição dos participantes de acordo com a frequência diária de escovagem dentária.

Adicionalmente, foi realizada uma análise da distribuição do número de escovagens com pasta fluoretada diária de 5000ppm. Verificou-se que apenas 4 participantes disseram que utilizam.

A figura 9 mostra que 31% ($n=12$) dos participantes em estudo fazem uso de fio dentário diariamente e apenas 18% ($n=7$) fazem uso diário de colutório com flúor (figura 10).

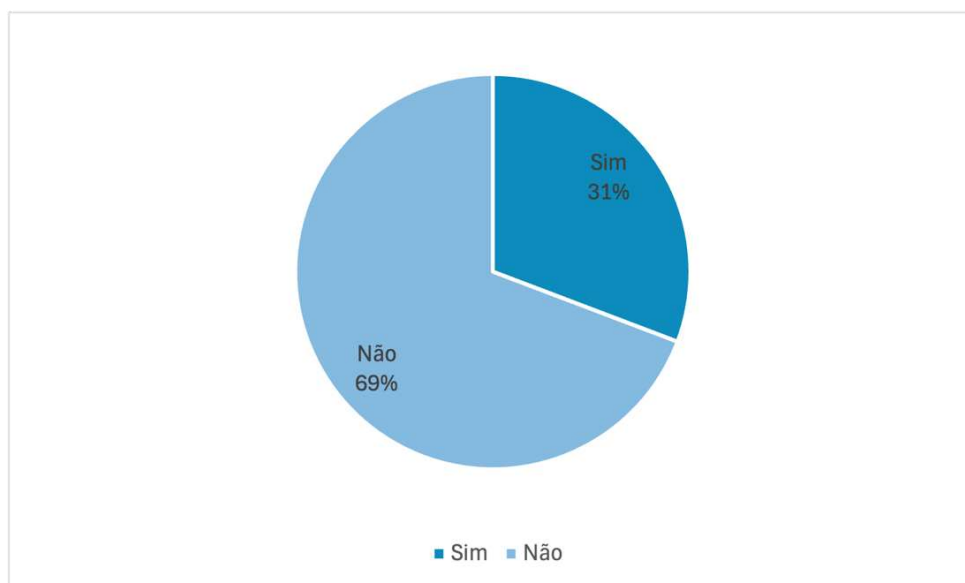


Figura 9 Distribuição da amostra relativamente ao uso diário de fio dentário.

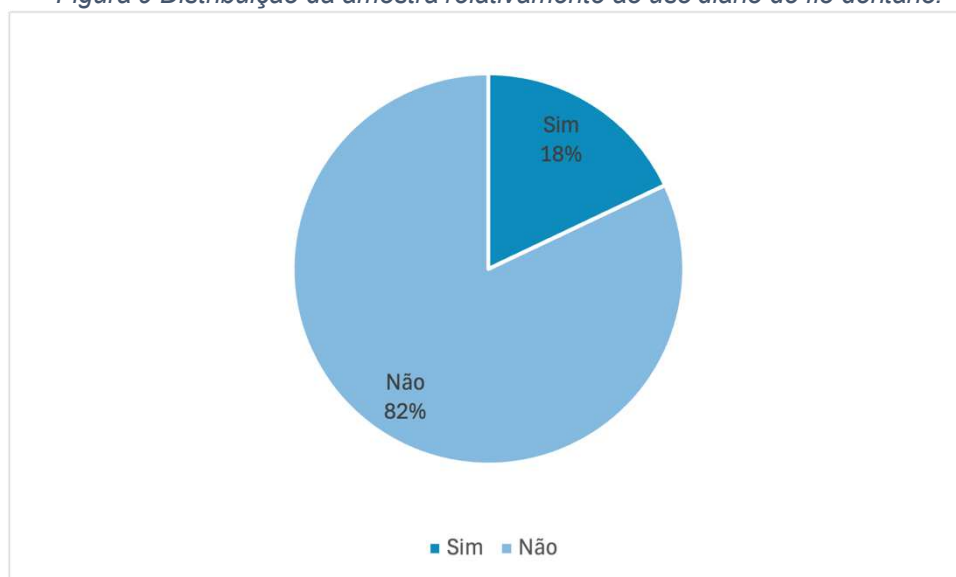


Figura 10 Distribuição da amostra relativamente à utilização diária de colutório de flúor (0,05 NaF).

Quando questionámos os participantes em estudo sobre o facto de lhes ter sido aplicado um verniz de flúor por um Médico Dentista nos 6 meses antes da recolha, podemos ver, segundo a figura 11, que apenas 5% (n=2) receberam este tratamento, 8% (n=3) não sabem, e 87% (n=34) não receberam o tratamento.



Figura 11 Distribuição da amostra relativamente à aplicação de verniz de flúor por um Médico Dentista.

Em relação ao uso de clorexidina, apenas 2 participantes dos 39 referiu usar durante o período em estudo.

3.3 Caracterização dos hábitos alimentares

Relativamente ao consumo de açúcares nos lanches, entre as refeições principais, constatamos que 38% (n=15) dizem consumir várias vezes ao dia açúcar (figura 12). Destes 38% (n=15), 60% (n=9) pessoas consumiam uma única vez açúcar durante os lanches, e 40% (n=6) consumiam duas vezes.

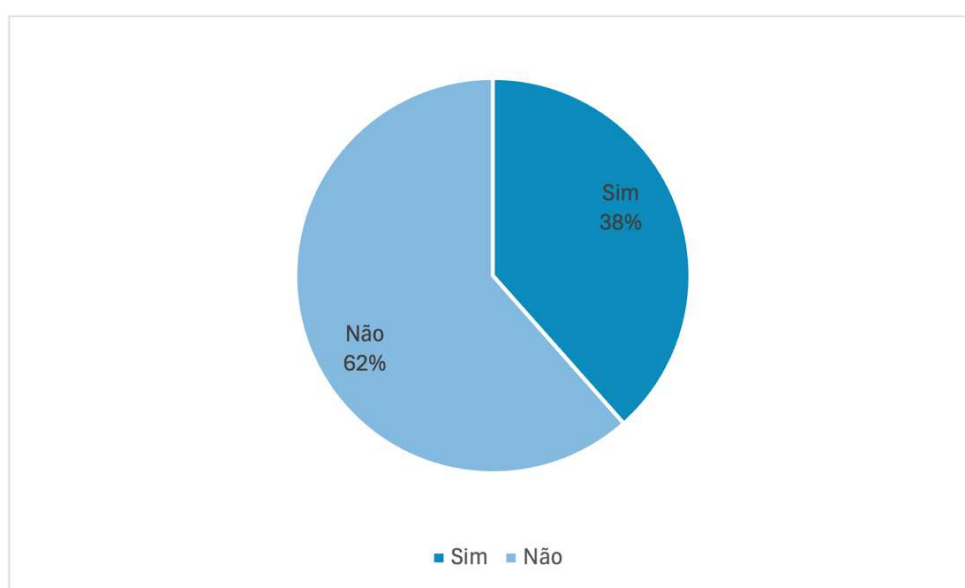


Figura 12 Distribuição da amostra de acordo com o consumo de açúcar nos lanches entre as refeições principais.

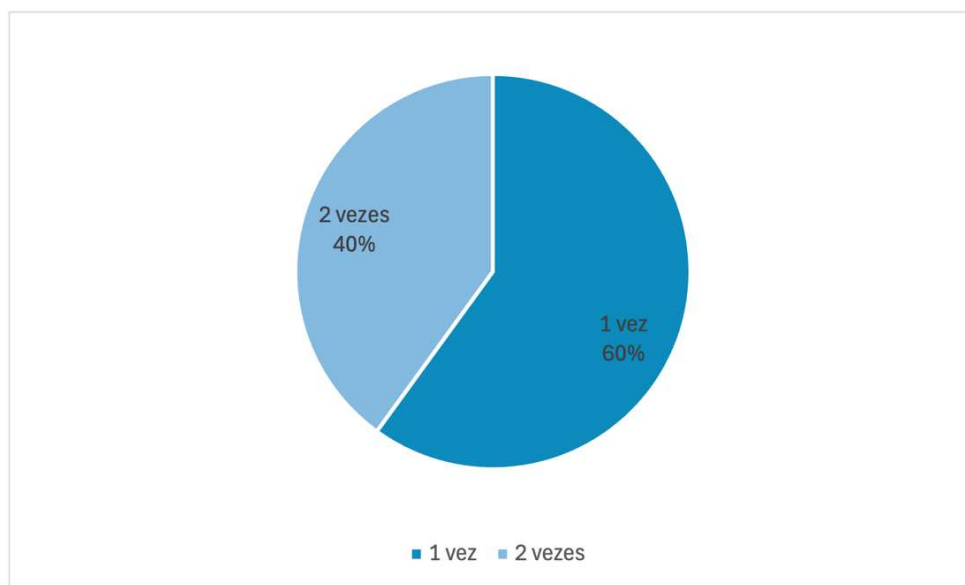


Figura 13 Distribuição da amostra de acordo com o número de lanches com consumo de açúcar.

3.4 Caracterização de fatores que predisõem a acumulação de placa bacteriana

Existem vários fatores predisponentes para a acumulação e retenção de placa bacteriana. Os participantes foram questionados sobre o uso de aparelho ortodôntico e os resultados mostram que nenhum paciente fazia uso do mesmo.

A profundidade de sulcos e fissuras em pré-molares e molares também é um fator predisponente para a acumulação de placa bacteriana. Na figura 14, podemos observar que 59% (n=23) apresentava sulcos rasos e 41% (n=16) apresentavam sulcos profundos.

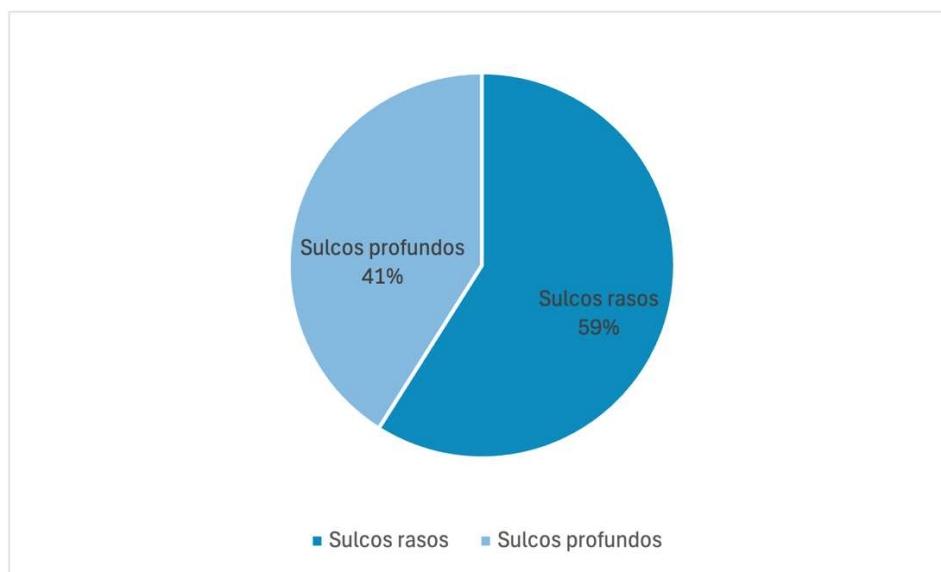


Figura 14 Distribuição da amostra de acordo com a profundidade de sulcos e fissuras de pré-molares e molares.

3.5 Caracterização de resultados decorrentes da avaliação oral

No questionário aplicado, foi perguntado aos participantes se realizaram algum tratamento dentário como restaurações, tratamento endodôntico radical e extrações nos últimos 3 anos e podemos observar na figura 15 que 72% (n=28) realizaram tratamentos dentários. Importa referir que o questionário apenas registou a realização de tratamentos dentários nos últimos três anos, não permitindo determinar a data exata da sua realização. Assim, não foi possível avaliar a eventual influência da proximidade temporal desses tratamentos na composição da microbiota oral nem na carga bacteriana observada.

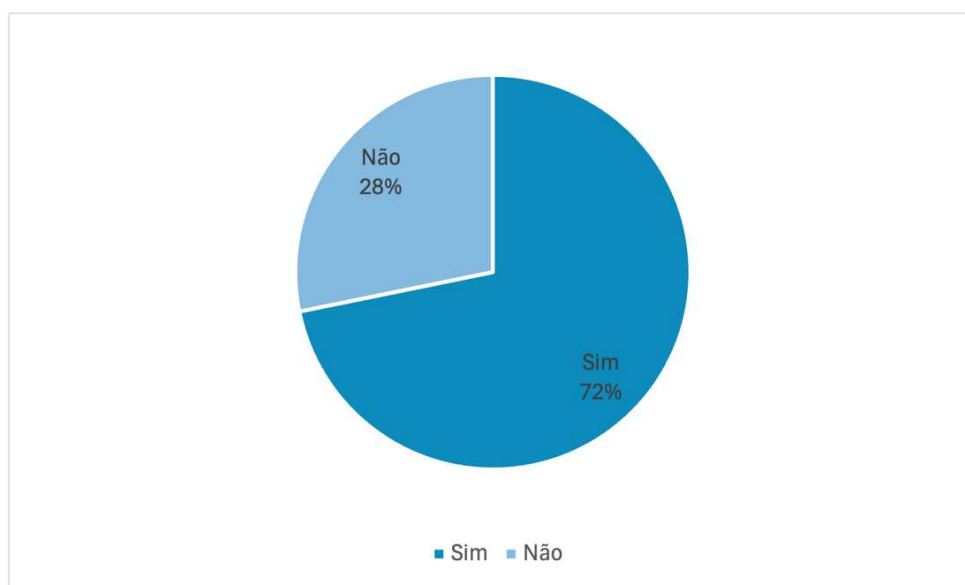


Figura 15 Distribuição da amostra relativamente ao histórico de tratamentos realizados nos últimos 3 anos.

Durante a observação intraoral, foi usada a classificação ICDAS II para a avaliação das lesões de cárie nos participantes do estudo. Acerca das lesões de cáries iniciais (ICDAS 1-2), podemos constatar que apenas 28% (n=11) apresentava esse tipo de lesão cariosa (Figura 16). Verificou-se que 21% (n=8) dos indivíduos em estudo apresentavam lesões de cárie moderadas (ICDAS 3-4) e que 5% (n=2) da população estudada apresentava lesões de cárie extensas (ICDAS 5-6).

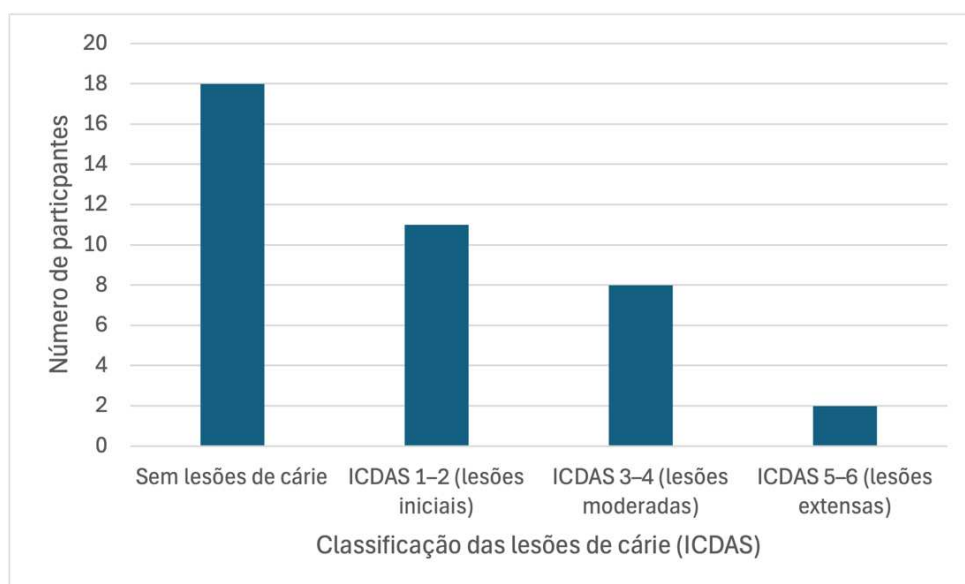


Figura 16 Distribuição da amostra relativamente à lesão de cárie avaliada usando a classificação ICDAS II (28).

3.6 Integração dos parâmetros microbiológicos na avaliação do risco de cárie

Embora estivesse inicialmente prevista a comparação entre a classificação obtida pelo modelo CAMBRA e a classificação resultante da integração dos parâmetros microbiológicos, a reduzida dimensão da amostra, a distribuição desigual dos participantes pelos diferentes grupos de severidade e a indisponibilidade de informação que permitisse uma comparação quantitativa rigorosa limitaram a realização dessa análise. Assim, os Embora não tenha sido possível realizar a comparação inicialmente prevista com o modelo CAMBRA, a análise exploratória permitiu caracterizar o comportamento dos indicadores microbiológicos em diferentes níveis de severidade da cárie, fornecendo informação útil para futuras investigações com amostras mais representativas.

3.7 Prevalência de detecção bacteriana por grupo de cárie.

Embora tenham sido recolhidas amostras de saliva e de biofilme oral, apenas as amostras de saliva foram analisadas no âmbito da presente dissertação, devido a limitações temporais. Consequentemente, todos os resultados microbiológicos apresentados referem-se às amostras de saliva.

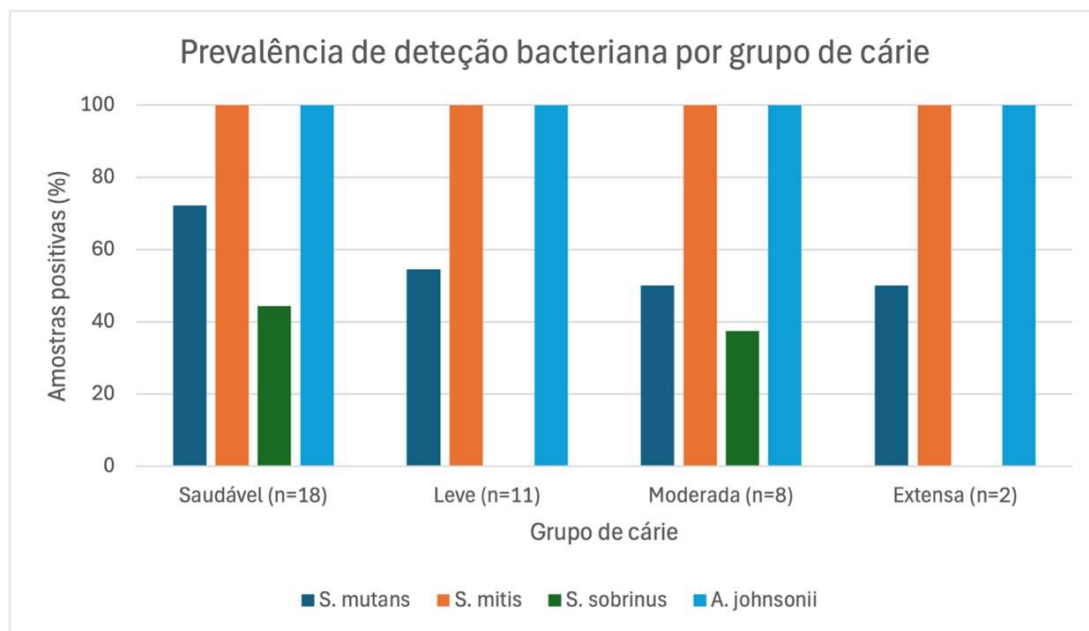


Figura 17 Percentagem de amostras positivas para *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sobrinus* e *Actinomyces johnsonii* nas diferentes condições de saúde oral.

A Figura 17 apresenta a prevalência de detecção das quatro espécies bacterianas

analisadas nos diferentes grupos de saúde oral. Observou-se que *Streptococcus mitis* e *Actinomyces johnsonii* foram detetadas em 100% das amostras em todos os grupos avaliados. Por outro lado, *Streptococcus mutans* apresentou uma prevalência variável, sendo detetado em 72,2% das amostras do grupo saudável, 54,5% do grupo com cárie ligeira e 50,0% dos grupos com cárie moderada e extensa. A detecção de *Streptococcus sobrinus* foi inferior, ocorrendo em 44,4% dos indivíduos saudáveis e em 37,5% dos participantes com cárie moderada, não tendo sido detetado nos grupos com cárie ligeira e cárie extensa.

3.8 Quantificação da carga bacteriana das espécies analisadas

A distribuição da carga bacteriana das espécies analisadas foi avaliada apenas nas amostras em que ocorreu amplificação por qPCR, excluindo-se os resultados classificados como NA. Considerando a assimetria dos valores de qPCR, os dados foram apresentados através da mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo.

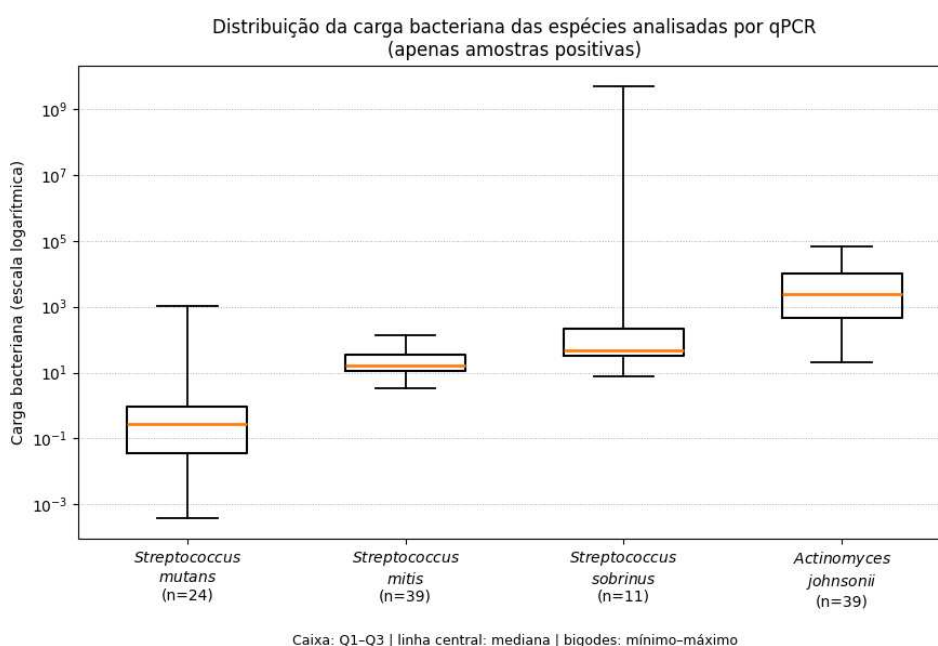


Figura 18 Distribuição da carga bacteriana das espécies analisadas por qPCR, considerando apenas as amostras com resultado positivo.

A distribuição da carga bacteriana das espécies analisadas encontra-se apresentada na Figura 18. Os resultados mostram uma elevada variabilidade na carga bacteriana entre as espécies analisadas, particularmente para *Streptococcus sobrinus*, que apresentou uma ampla dispersão dos valores.

3.9 Análise estatística exploratória

Com o objetivo de explorar possíveis associações entre os indicadores microbiológicos e os parâmetros clínicos avaliados, foram realizadas análises estatísticas inferenciais recorrendo a testes não paramétricos. Os resultados encontram-se apresentados na Tabela 3 e na Figura 17.

Tabela 3 Resultados das análises estatísticas exploratórias das espécies bacterianas.

Espécie bacteriana	Teste exato de Fisher (p)	Mann–Whitney (p)
<i>Streptococcus mutans</i>	0,323	0,408
<i>Streptococcus sobrinus</i>	0,072	0,049
<i>Streptococcus mitis</i>	—*	0,002
<i>Actinomyces johnsonii</i>	—*	0,345

* Não foi possível aplicar o teste exato de Fisher, uma vez que *Streptococcus mitis* e *Actinomyces johnsonii* foram detetadas em todos os participantes.

O teste exato de Fisher não demonstrou associação significativa entre a deteção de *Streptococcus mutans* e a presença de cárie ($p = 0,323$), verificando-se apenas uma tendência para *Streptococcus sobrinus* ($p = 0,072$). Não foi possível aplicar este teste para *Streptococcus mitis* e *Actinomyces johnsonii*, uma vez que ambas as espécies foram detetadas em todos os participantes.

A comparação da carga bacteriana entre participantes saudáveis e participantes com cárie revelou diferenças significativas para *Streptococcus sobrinus* ($p = 0,049$) e *Streptococcus mitis* ($p = 0,002$), não se observando diferenças significativas para *Streptococcus mutans* nem para *Actinomyces johnsonii*.

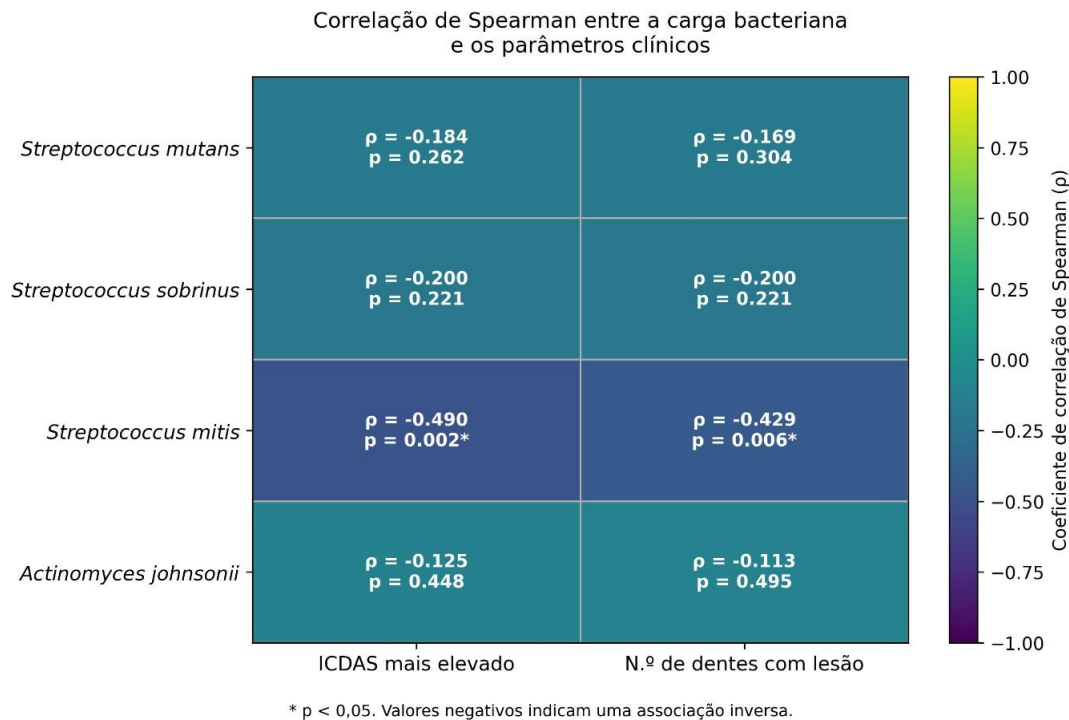


Figura 19 Correlações de Spearman entre a carga bacteriana e os parâmetros clínicos de saúde oral. *S.sobrinus* $n=11$; *S.mutans* $n=21$; *S.mitis* e *A.johnsonii* ($n=39$).

Cada célula apresenta o coeficiente de correlação de Spearman (ρ) e o respetivo valor de p . Os coeficientes negativos indicam uma associação inversa entre as variáveis. As correlações significativas, considerando $p < 0,05$, encontram-se assinaladas com um asterisco.

A análise de correlação de Spearman evidenciou uma correlação negativa moderada entre a carga bacteriana de *Streptococcus mitis* e o ICDAS mais elevado ($\rho = -0,490$; $p = 0,002$), bem como entre esta espécie e o número de dentes com lesão ($\rho = -0,429$; $p = 0,006$). Estes resultados sugerem que uma maior carga de *S. mitis* tende a estar associada a menor gravidade clínica da cárie e a um menor número de dentes afetados, reforçando a hipótese de que esta espécie poderá estar relacionada com um perfil de microbiota oral compatível com saúde. No entanto, dado o caráter exploratório do estudo e a reduzida dimensão da amostra, estes resultados devem ser interpretados com cautela e confirmados em estudos futuros. As restantes correlações não apresentaram significância estatística.

4. Discussão.

Os resultados obtidos permitem discutir não apenas a distribuição dos fatores clínicos e comportamentais da população estudada, mas também o comportamento das espécies bacterianas selecionadas e o seu potencial contributo para a integração em modelos de avaliação do risco de cárie. Embora os objetivos inicialmente definidos incluíssem a avaliação da capacidade preditiva de um índice microbiológico, a reduzida dimensão da amostra, a distribuição desigual dos participantes pelos diferentes grupos de severidade e a natureza transversal do estudo limitaram a possibilidade de validar plenamente esse índice. Assim, os resultados apresentados devem ser interpretados como uma avaliação exploratória do comportamento dos indicadores microbiológicos estudados e como um contributo preliminar para futuros estudos de validação.

4.1 Caracterização da amostra

A amostra analisada focou-se nesta faixa etária uma vez que era também objetivo aumentar a representatividade destas idades na coleção do SalivaTec. Por outro lado, permitiu reduzir a influência de fatores associados aos extremos de idade, nomeadamente alterações do fluxo salivar, perdas dentárias extensas ou modificações marcadas da microbiota oral, permitindo uma avaliação mais homogênea da relação entre os indicadores microbiológicos e o risco de cárie. Esta abordagem é consistente com a evidência de que a composição da microbiota oral sofre alterações ao longo da vida, podendo constituir um fator de confusão quando se analisam populações muito heterogêneas (1,2).

Observou-se um ligeiro predomínio do sexo feminino, embora a distribuição entre homens e mulheres tenha sido relativamente equilibrada. Este aspeto reduz a probabilidade de enviesamento relacionado com o sexo e contribui para uma interpretação mais consistente dos resultados microbiológicos obtidos. Apesar de alguns estudos sugerirem diferenças na prevalência de cárie entre homens e mulheres, a evidência disponível continua a demonstrar que fatores comportamentais, dietéticos e relacionados com a higiene oral parecem exercer uma influência mais determinante do que o sexo isoladamente (6,8).

Relativamente à distribuição pelos grupos de saúde oral, verificou-se uma predominância de indivíduos classificados como saudáveis, seguindo-se os grupos com cárie ligeira, moderada e extensa. Esta distribuição era expectável numa amostra de conveniência recrutada numa clínica universitária, onde coexistem indivíduos com diferentes perfis clínicos e preventivos. No entanto, o reduzido número de participantes com cárie extensa constitui uma limitação do estudo, podendo diminuir a capacidade para identificar diferenças significativas entre os grupos. Ainda assim, a inclusão de todos os níveis de gravidade permitiu analisar a evolução dos indicadores microbiológicos ao longo do continuum da doença, aspeto essencial para avaliar o potencial do índice microbiológico desenvolvido neste projeto.

4.2. Hábitos de higiene oral

No presente estudo, todos os participantes referiram escovar os dentes diariamente, sendo a escovagem duas vezes por dia a prática mais frequente. Estes resultados encontram-se de acordo com as recomendações atuais para a prevenção da cárie dentária e poderão refletir uma maior consciencialização relativamente à importância da higiene oral (8). Apesar disso, verificou-se uma reduzida utilização diária de fio dentário, de colutórios fluoretados e de verniz de flúor aplicado por um profissional. Estes resultados sugerem que, embora os hábitos básicos de higiene oral estejam bem implementados, as medidas preventivas complementares continuam a ser pouco utilizadas. A literatura demonstra que estas estratégias podem contribuir para a redução da acumulação de biofilme e para a prevenção da progressão das lesões de cárie, sobretudo em indivíduos com maior risco cariogénico (6,7).

De uma forma geral, os participantes apresentaram hábitos de higiene oral compatíveis com uma população relativamente sensibilizada para a prevenção da doença. No entanto, importa considerar que a ocorrência de cárie não depende exclusivamente da frequência da higiene oral, mas da interação entre múltiplos fatores, incluindo a dieta, a composição da microbiota oral, o fluxo salivar e a suscetibilidade individual (5,10).

4.3 Hábitos alimentares

A dieta constitui um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da cárie dentária, sendo a frequência de ingestão de açúcares fermentáveis mais determinante do que a quantidade consumida. A exposição repetida aos açúcares favorece a produção de ácidos pelas bactérias do biofilme, conduzindo a uma diminuição prolongada do pH e promovendo a desmineralização dos tecidos dentários (6,10).

No presente estudo, verificou-se que menos de metade dos participantes referiu consumir alimentos açucarados durante os lanches, sendo que, entre estes, a maioria referiu fazê-lo apenas uma vez por dia. Estes resultados poderão indicar uma frequência de exposição aos açúcares relativamente reduzida, aspeto que poderá ter contribuído para a elevada proporção de indivíduos classificados como saudáveis.

Apesar disso, a presença de indivíduos com lesões de cárie demonstra que o desenvolvimento da doença não pode ser explicado apenas pelos hábitos alimentares. A cárie dentária resulta da interação entre fatores comportamentais, microbiológicos e do hospedeiro, sendo a dieta apenas um dos elementos envolvidos neste processo multifatorial (5,7).

Estes resultados reforçam a importância de avaliar os hábitos alimentares em conjunto com outros indicadores clínicos e microbiológicos. Neste contexto, a integração de biomarcadores da microbiota oral poderá contribuir para uma avaliação mais precisa do risco de cárie, permitindo identificar indivíduos suscetíveis mesmo quando apresentam hábitos alimentares aparentemente adequados.

4.4 Fatores predisponentes à acumulação de biofilme dentário

A anatomia dentária desempenha um papel importante na retenção de biofilme e, consequentemente, no desenvolvimento da cárie dentária. Sulcos e fissuras profundos constituem áreas de difícil higienização, favorecendo a acumulação de microrganismos e a retenção de restos alimentares, aumentando o risco de desmineralização do esmalte (6).

No presente estudo, observou-se que a maioria dos participantes apresentava sulcos rasos, enquanto uma menor proporção apresentava sulcos profundos. Este resultado poderá traduzir um menor risco anatômico para o desenvolvimento de lesões de cárie na maioria da amostra. Contudo, a profundidade dos sulcos representa apenas um dos fatores envolvidos na etiologia da doença, sendo a sua influência dependente da interação com outros fatores, como os hábitos de higiene oral, a dieta, a composição da microbiota oral e a exposição ao flúor (5,7).

Relativamente ao histórico de tratamentos dentários realizados nos três anos anteriores, verificou-se que a maioria dos participantes referiu ter sido submetida a pelo menos um procedimento, nomeadamente restaurações, tratamentos endodônticos ou extrações. A existência de tratamentos prévios poderá refletir uma experiência anterior de doença e constitui um indicador frequentemente considerado nos modelos de avaliação do risco de cárie, uma vez que a experiência prévia de cárie constitui um indicador importante a considerar na avaliação do risco de novas lesões (7,8). No entanto, importa salientar que a realização de tratamentos dentários não traduz necessariamente atividade atual da doença, podendo refletir episódios passados de cárie já resolvidos. Assim, a interpretação destes resultados deve ser integrada com a avaliação clínica e microbiológica realizada no presente estudo, permitindo uma caracterização mais abrangente do risco individual de desenvolver novas lesões de cárie.

4.5 Deteção das espécies bacterianas nos diferentes grupos de cárie

A caracterização microbiológica da amostra permitiu avaliar a prevalência de deteção de espécies bacterianas associadas quer à saúde oral quer ao desenvolvimento da cárie dentária. De um modo geral, verificou-se que *Streptococcus mitis* e *Actinomyces johnsonii* foram detetadas em todos os participantes, independentemente do grupo de saúde **o r a l**, enquanto *Streptococcus mutans* e, sobretudo, *Streptococcus sobrinus* apresentaram uma distribuição mais variável entre os diferentes grupos.

A deteção de *Streptococcus mutans* em indivíduos saudáveis e com diferentes níveis de gravidade da doença confirma que a simples presença desta espécie não constitui, por si só, um indicador suficiente do desenvolvimento da cárie dentária. Apesar de *S. mutans* ser considerada uma das principais bactérias cariogénicas devido à sua elevada

capacidade acidogénica, acidúrica e de formação de biofilme, diversos estudos têm demonstrado que esta espécie pode integrar a microbiota oral de indivíduos clinicamente saudáveis, sem que isso implique necessariamente atividade de doença (1,5,10). Este achado sugere que a presença de *S. mutans*, por si só, não permite discriminar indivíduos saudáveis daqueles com cárie, reforçando a importância de considerar simultaneamente a carga bacteriana, a composição global da microbiota e os fatores clínicos e comportamentais na avaliação do risco. Estes resultados estão de acordo com o conceito ecológico da cárie, segundo o qual a doença resulta de um desequilíbrio da comunidade microbiana (disbiose) e não apenas da presença de um único microrganismo.

Por outro lado, *Streptococcus sobrinus* apresentou uma prevalência inferior, sendo detetado apenas em parte dos indivíduos saudáveis e dos participantes com cárie moderada. Estes resultados sugerem que esta espécie apresenta uma distribuição mais restrita na população estudada, o que está de acordo com a literatura, que refere uma menor frequência de deteção relativamente a *S. mutans*. No entanto, quando presente, *S. sobrinus* tem sido associado a um maior potencial cariogénico devido à sua elevada capacidade de produção de ácidos, podendo atuar de forma sinérgica com outras espécies cariogénicas (10).

Em contraste, *Streptococcus mitis* e *Actinomyces johnsonii* foram detetadas em todos os grupos avaliados. A presença universal destas espécies reforça a ideia de que muitas bactérias da microbiota oral desempenham funções compatíveis com a manutenção da homeostasia do biofilme e não podem ser classificadas exclusivamente como protetoras ou patogénicas. Em particular, *S. mitis* é reconhecida como uma espécie comensal e colonizadora precoce da cavidade oral, enquanto *A. johnsonii* tem sido descrita em indivíduos com saúde oral, embora o seu papel específico na prevenção da cárie continue a ser investigado (1,2).

A deteção universal desta espécie na população estudada demonstra que a sua presença, por si só, não permite distinguir indivíduos saudáveis daqueles com lesões de cárie. Assim, a eventual utilidade de *S. mitis* como biomarcador poderá estar mais relacionada com a sua abundância relativa ou com a interação ecológica estabelecida com outras espécies bacterianas do que com a sua simples presença.

Globalmente, estes resultados reforçam que a avaliação isolada da presença ou ausência de uma determinada espécie bacteriana apresenta limitações na estratificação do risco de cárie. A natureza multifatorial da doença e a elevada complexidade da microbiota oral sugerem que a abundância relativa das espécies, bem como as interações estabelecidas entre diferentes microrganismos, poderão constituir indicadores mais relevantes do que a simples deteção bacteriana. Neste contexto, torna-se pertinente analisar não apenas a prevalência das espécies estudadas, mas também a sua abundância relativa nos diferentes grupos de saúde oral, aspeto abordado na secção seguinte.

4.5.1. *Streptococcus mutans*

No presente estudo, *Streptococcus mutans* foi detetada em todos os grupos de saúde oral, verificando-se uma prevalência de 72,2% nos indivíduos saudáveis, 54,5% no grupo com cárie ligeira e 50,0% nos grupos com cárie moderada e extensa. Contrariamente ao que seria expectável, a maior frequência de deteção foi observada nos indivíduos classificados como saudáveis, não se verificando um aumento progressivo da prevalência com a gravidade da doença. Estes resultados sugerem que a presença desta espécie, por si só, não permitiu distinguir os diferentes grupos clínicos da população estudada.

Embora *S. mutans* continue a ser considerada uma das principais espécies associadas à cárie dentária, devido à sua elevada capacidade acidogénica, acidúrica e de síntese de glucanos extracelulares, atualmente reconhece-se que a sua presença não é exclusiva de indivíduos com atividade de doença (5,10). Estudos recentes demonstram que esta bactéria pode integrar a microbiota oral de indivíduos clinicamente saudáveis, permanecendo em baixas proporções sem desencadear alterações patológicas. O desenvolvimento da cárie depende sobretudo da alteração do equilíbrio ecológico da comunidade microbiana, favorecida pela exposição frequente a açúcares fermentáveis, diminuição do pH e seleção de microrganismos acidogénicos e acidúricos, mais do que da simples colonização por *S. mutans* (14,15,16).

Os resultados obtidos corroboram esta perspetiva, uma vez que a elevada prevalência de *S. mutans* em indivíduos saudáveis evidencia que esta espécie não deve ser interpretada como um biomarcador isolado de risco de cárie. Adicionalmente, investigações recentes demonstram que outras espécies, como *Scardovia wiggsiae*, *Bifidobacterium*

dentium, *Lactobacillus spp.*, *Prevotella spp.* e *Veillonella spp.*, desempenham igualmente um papel importante na progressão da doença, reforçando que a cárie apresenta uma etiologia polimicrobiana. Assim, a avaliação do risco deverá privilegiar a análise integrada da comunidade microbiana, em vez da detecção de um único microrganismo, sustentando a utilização de indicadores microbiológicos combinados, como os propostos no presente estudo (1,14,15).

Apesar de *Streptococcus mutans* ser amplamente reconhecida como uma das principais espécies associadas ao desenvolvimento da cárie dentária, a maior prevalência observada nos participantes saudáveis não contradiz necessariamente a literatura. Pelo contrário, é consistente com estudos que demonstram que esta espécie pode integrar a microbiota oral de indivíduos clinicamente saudáveis, sem que a sua presença isolada determine o desenvolvimento da doença.

4.5.2 *Streptococcus sobrinus*

Relativamente à detecção de *Streptococcus sobrinus*, observou-se uma prevalência inferior à verificada para *Streptococcus mutans*, estando presente em 44,4% dos indivíduos saudáveis e em 37,5% dos participantes com cárie moderada. Não foi detetada nos grupos com cárie ligeira nem nos participantes classificados com cárie extensa. Ao contrário do que seria esperado para uma bactéria tradicionalmente associada ao desenvolvimento da doença, a sua distribuição não acompanhou a gravidade clínica da cárie, sugerindo que a sua presença isolada apresenta reduzida capacidade discriminativa nesta amostra.

Apesar de *S. sobrinus* partilhar com *S. mutans* importantes fatores de virulência, incluindo elevada capacidade acidogénica, acidúrica e de produção de glucanos extracelulares, a literatura demonstra que esta espécie apresenta uma prevalência significativamente inferior na população e raramente atua como principal agente da doença. Pelo contrário, o seu maior impacto parece ocorrer quando coexiste com *S. mutans*, potenciando a acidificação do biofilme e favorecendo a progressão das lesões de cárie. Consequentemente, vários autores sugerem que a associação entre ambas as espécies possuem maior relevância clínica do que a detecção isolada de *S. sobrinus* (10,20).

A ausência de *S. sobrinus* em alguns participantes com experiência de cárie não deve,

contudo, ser interpretada como um resultado inesperado. Estudos baseados em técnicas de sequenciação de nova geração demonstram que a composição da microbiota cariogénica varia consideravelmente entre indivíduos, podendo diferentes comunidades microbianas conduzir ao mesmo fenótipo clínico. Nestes casos, espécies como *Scardovia wiggsiae*, *Bifidobacterium dentium*, *Lactobacillus spp.* e determinados *Actinomyces* podem assumir um papel predominante na progressão da doença, reduzindo a importância relativa dos *mutans streptococci*. Esta variabilidade reforça que a cárie dentária constitui uma doença ecológica e polimicrobiana, cuja interpretação não deve depender da presença de um único microrganismo. (14,15,16).

Assim, os resultados obtidos sugerem que *S. sobrinus* apresenta utilidade limitada quando interpretada isoladamente. No entanto, a sua inclusão num conjunto de indicadores microbiológicos poderá contribuir para uma caracterização mais completa da microbiota oral, permitindo uma avaliação do risco de cárie mais abrangente e biologicamente fundamentada. (7,8).

Estes resultados sugerem que *Streptococcus sobrinus*, embora apresente reconhecido potencial cariogénico, não constitui um marcador universal de risco, podendo a sua relevância depender das características microbiológicas individuais e da interação com outras espécies presentes no biofilme oral.

A baixa prevalência observada e a distribuição irregular entre os diferentes grupos clínicos limitam a utilidade de *Streptococcus sobrinus* como marcador microbiológico isolado do risco de cárie. A sua eventual relevância deverá ser interpretada no contexto da interação com outras espécies bacterianas e com os restantes fatores envolvidos na etiologia da doença.

4.5.3 *Streptococcus mitis*

Relativamente à deteção de *Streptococcus mitis*, verificou-se a sua presença em todos os participantes, independentemente do grupo de saúde oral, correspondendo a uma prevalência de 100%. Este resultado demonstra que esta espécie integra a microbiota oral da população estudada, estando presente tanto em indivíduos saudáveis como em participantes com diferentes níveis de gravidade da cárie.

A presença universal de *S. mitis* era expectável, uma vez que esta espécie constitui um dos principais colonizadores precoces da cavidade oral e desempenha um papel importante na formação inicial do biofilme dentário. Durante muitos anos foi considerada uma bactéria essencialmente associada à saúde oral, devido à sua capacidade de competir com microrganismos cariogénicos e contribuir para a estabilidade ecológica do biofilme. No entanto, a evidência científica mais recente demonstra que a microbiota oral saudável e a microbiota associada à cárie partilham um elevado número de espécies, diferindo sobretudo na abundância relativa dos microrganismos e nas interações metabólicas estabelecidas entre eles. Assim, a presença de *S. mitis* não deve ser interpretada, por si só, como um indicador de saúde oral. (5,10,15,16).

Os resultados obtidos corroboram este conceito, uma vez que *S. mitis* foi identificada em todos os grupos clínicos, incluindo indivíduos com experiência de cárie. Estes achados reforçam que a progressão da doença não depende da eliminação de espécies tradicionalmente associadas à saúde oral, mas da alteração do equilíbrio funcional da comunidade microbiana. Em condições de disbiose, espécies comensais podem coexistir com bactérias acidogénicas e acidúricas sem impedir o desenvolvimento da doença, refletindo a elevada complexidade ecológica do microbioma oral. (14,15,16).

A deteção de *Streptococcus mitis* em todas as amostras analisadas demonstra que a sua presença, por si só, não permite distinguir participantes saudáveis daqueles com lesões de cárie. Assim, a sua eventual utilidade poderá depender da sua abundância, da sua proporção relativa na microbiota oral ou da sua integração em modelos microbiológicos multiespécies.

4.5.4 *Actinomyces johnsonii*

Relativamente à deteção de *Actinomyces johnsonii*, verificou-se a sua presença em todos os participantes, correspondendo a uma prevalência de 100%, independentemente do grupo de saúde oral. Tal como observado para *Streptococcus mitis*, este resultado demonstra que esta espécie integra a microbiota oral da população estudada, estando presente tanto em indivíduos sem experiência de cárie como em participantes com diferentes níveis de gravidade da doença.

As espécies do género *Actinomyces* encontram-se entre os primeiros colonizadores da superfície dentária e desempenham um papel importante na organização inicial do biofilme oral. Embora algumas espécies deste género tenham sido associadas ao desenvolvimento de lesões de cárie radicular, *A. johnsonii* tem sido descrita predominantemente em microbiotas compatíveis com saúde oral e é frequentemente identificada em biofilmes estáveis. No entanto, a evidência atual demonstra que a sua presença não constitui, por si só, um marcador de saúde, uma vez que pode coexistir com microrganismos cariogénicos sem impedir o desenvolvimento da doença (1,14,15). A deteção universal de *A. johnsonii* na presente investigação reforça este conceito. Apesar de esta espécie estar frequentemente associada à homeostasia da microbiota oral, a sua presença em todos os grupos demonstra que o desenvolvimento da cárie não depende da ausência de bactérias compatíveis com saúde oral, mas sim das alterações no equilíbrio ecológico da comunidade microbiana. Assim, a coexistência de espécies comensais e de microrganismos acidogénicos representa uma característica expectável da microbiota oral, sendo a predominância funcional de comunidades adaptadas a ambientes ácidos o principal fator associado à progressão da doença (5,10,14).

Na presente amostra, *Actinomyces johnsonii* foi detetado em todos os participantes, independentemente da gravidade da cárie. Além disso, a carga bacteriana desta espécie não apresentou diferenças significativas entre os diferentes grupos de severidade nem associação com os parâmetros clínicos avaliados. Estes resultados sugerem que, nesta amostra, *A. johnsonii* não discriminou os diferentes níveis de gravidade da doença. No entanto, devido à reduzida dimensão da amostra, esta observação deve ser interpretada com cautela, não permitindo excluir um possível papel desta espécie na ecologia da cárie.

De forma semelhante, a deteção consistente de *Actinomyces johnsonii* em todos os participantes indica que a sua presença isolada apresenta reduzido valor discriminativo. Estudos futuros deverão explorar se diferenças quantitativas na sua abundância ou a sua integração em modelos microbiológicos multiespécies poderão contribuir para uma avaliação mais precisa do risco de cárie.

As análises estatísticas exploratórias complementaram a descrição dos resultados microbiológicos, permitindo identificar possíveis associações entre a carga bacteriana e alguns parâmetros clínicos avaliados. Contudo, estes resultados deverão ser interpretados

com prudência, tendo em conta a reduzida dimensão da amostra, a distribuição desigual dos participantes pelos diferentes grupos de severidade e o carácter exploratório das análises realizadas. Assim, os achados obtidos não permitem validar definitivamente o índice microbiológico, mas fornecem informação preliminar relevante para futuros estudos com maior robustez metodológica.

De um modo geral, os resultados obtidos reforçam o conceito atualmente aceite de que a cárie dentária constitui uma doença multifatorial e polimicrobiana. Embora determinadas espécies bacterianas apresentem reconhecido potencial cariogénico, a sua presença ou abundância isolada não foi suficiente para explicar a severidade clínica observada na população estudada. A progressão da doença resulta da interação entre fatores microbiológicos, salivares, clínicos, comportamentais e ambientais. Assim, os indicadores microbiológicos deverão ser interpretados como parte integrante de uma avaliação global do risco de cárie, e não como marcadores isolados da presença ou progressão da doença. Estes resultados reforçam a importância de uma abordagem multidimensional na avaliação do risco de cárie e sustentam a necessidade de futuros estudos que integrem diferentes biomarcadores e parâmetros clínicos.

4.6 Integração dos indicadores microbiológicos na avaliação do risco de cárie

Importa referir que o presente estudo apresenta um carácter exploratório, tendo como objetivo contribuir para a avaliação do potencial dos indicadores microbiológicos na estratificação do risco de cárie em adultos. Embora a investigação se enquadre no processo de desenvolvimento de um índice microbiano, a reduzida dimensão da amostra, a distribuição desigual dos participantes pelos diferentes grupos de severidade e o desenho transversal do estudo não permitem considerar que o índice tenha sido plenamente validado. Assim, os resultados deverão ser interpretados como um contributo preliminar para futuros estudos de validação.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a interpretação dos indicadores microbiológicos deve ir além da deteção isolada de espécies bacterianas tradicionalmente associadas à cárie. A elevada prevalência de *Streptococcus mutans* em

indivíduos saudáveis, a distribuição irregular de *Streptococcus sobrinus* e a detecção universal de *Streptococcus mitis* e *Actinomyces johnsonii* evidenciam que a presença de um único microrganismo não permite, por si só, caracterizar o risco individual de desenvolvimento da doença. Estes resultados encontram-se de acordo com o conceito ecológico da cárie, segundo o qual a doença resulta de alterações na composição e atividade da comunidade microbiana, em interação com fatores do hospedeiro e ambientais, e não da ação isolada de uma única espécie bacteriana (5,10,15,16).

Nos últimos anos, a evolução das técnicas de biologia molecular e de sequenciação permitiu demonstrar que diferentes perfis microbiológicos podem estar associados ao mesmo fenótipo clínico de cárie. Espécies como *Scardovia wiggsiae*, *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Prevotella spp.* e *Veillonella spp.* têm sido frequentemente identificadas em comunidades cariogénicas, reforçando que a doença apresenta uma etiologia polimicrobiana. Consequentemente, diversos autores defendem que a caracterização global da microbiota oral possui maior relevância clínica do que a detecção de uma única espécie bacteriana, impulsionando o desenvolvimento de modelos de avaliação do risco que integrem múltiplos biomarcadores microbiológicos, em associação com fatores clínicos e comportamentais (1,14,15,16).

Neste contexto, os resultados do presente estudo reforçam o potencial da utilização de um painel microbiológico constituído por diferentes espécies bacterianas. A inclusão simultânea de bactérias com reconhecido potencial cariogénico (*Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*) e de espécies frequentemente associadas à homeostasia do biofilme (*Streptococcus mitis* e *Actinomyces johnsonii*) permitiu uma caracterização mais abrangente da microbiota oral. Contudo, os resultados obtidos demonstram igualmente que estes indicadores deverão ser interpretados de forma complementar aos parâmetros clínicos e comportamentais, uma vez que nenhum biomarcador isolado apresenta capacidade suficiente para explicar, de forma independente, o desenvolvimento da cárie (7,8,15).

Deste modo, a integração dos indicadores microbiológicos com fatores clínicos, comportamentais e salivares poderá, futuramente, contribuir para uma avaliação do risco de cárie mais individualizada e apoiar a definição de estratégias preventivas mais ajustadas às necessidades de cada paciente. Contudo, essa aplicabilidade clínica depende ainda da

realização de estudos longitudinais, com amostras mais representativas e validação dos biomarcadores em diferentes populações. Apesar de serem necessários estudos longitudinais e da validação destes biomarcadores em amostras mais representativas, a evidência científica atual sugere que a sua integração na avaliação convencional do risco poderá constituir um passo importante para uma medicina dentária mais preventiva, personalizada e biologicamente fundamentada (8,14,15).

Este trabalho permitiu cumprir os objetivos definidos para a análise microbiológica das amostras de saliva e associação do ICDAS e número de dentes afetados com o perfil microbiológico da saliva. Todos os objetivos inicialmente traçados que implicavam o cálculo do risco não foram atingidos por não ter sido possível o cálculo do risco.

4.7 Limitações do estudo

O presente estudo apresenta algumas limitações que deverão ser consideradas na interpretação dos resultados. Em primeiro lugar, a reduzida dimensão da amostra ($n = 39$) limita a robustez das análises realizadas e a possibilidade de generalização dos resultados para outras populações. Adicionalmente, verificou-se uma distribuição desigual dos participantes pelos diferentes grupos de saúde oral, particularmente no grupo com cárie extensa, constituído apenas por dois participantes, o que impossibilita comparações estatísticas robustas entre todos os níveis de severidade.

Outra limitação prende-se com o desenho transversal do estudo, que apenas permite observar a relação entre os indicadores microbiológicos avaliados e a condição clínica dos participantes no momento da recolha, não possibilitando estabelecer relações de causalidade nem acompanhar a evolução das lesões de cárie ao longo do tempo. Assim, os resultados devem ser interpretados com prudência e como um contributo exploratório para a avaliação integrada do risco de cárie (8,16).

Importa igualmente salientar que a análise microbiológica incidiu apenas sobre quatro espécies bacterianas, não refletindo toda a complexidade da microbiota oral envolvida no processo de desenvolvimento da cárie dentária. Sendo a cárie uma doença multifatorial e polimicrobiana, outros microrganismos poderão desempenhar um papel relevante na sua progressão (8,10).

Finalmente, apenas foi analisada a saliva embora o objetivo inicial envolvesse também o biofilme. Este facto deve-se a limitações de tempo. Foi escolhida a saliva e não o biofilme

dado que por ser mais fácil de colher numa utilização futura será este o tipo de amostra a usar pelo médico dentista.

Apesar destas limitações, os resultados obtidos contribuem para aprofundar o conhecimento sobre o potencial papel dos biomarcadores microbiológicos na avaliação do risco de cárie e fornecem uma base para futuros estudos com amostras mais alargadas, desenho longitudinal e integração de um maior número de espécies bacterianas. Importa salientar que a capacidade preditiva de um índice de risco apenas pode ser verdadeiramente avaliada em estudos longitudinais, nos quais é possível verificar se os indivíduos classificados como apresentando maior risco desenvolvem efetivamente novas lesões de cárie ao longo do tempo. Dado que o presente estudo apresenta um desenho transversal, os resultados obtidos permitem apenas avaliar associações entre os indicadores microbiológicos e os parâmetros clínicos no momento da recolha, não sendo possível confirmar a capacidade preditiva do índice microbiológico. Assim, embora os objetivos do estudo incluíssem a avaliação da capacidade preditiva de um índice microbiológico para o risco de cárie, os dados obtidos não permitem uma validação plena do índice no sentido estatístico e clínico do termo. O presente estudo deve, por isso, ser interpretado como uma etapa exploratória no desenvolvimento e avaliação preliminar de indicadores microbiológicos associados à cárie em adultos.

Propõe-se que em trabalho futuro seja analisada toda a coleção de amostras relativas à carie presentes no SalivaTec de forma sistemática para ter o número de amostras suficientes para uma estratificação e análise mais robustas.

5. Conclusão

Os resultados obtidos sugerem que a detecção isolada de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mitis* e *Actinomyces johnsonii* não é suficiente para discriminar, de forma robusta, os diferentes níveis de severidade de cárie avaliados pelo sistema ICDAS II. Embora algumas associações tenham sido observadas, estas não permitiram estabelecer um padrão consistente que sustentasse a utilização destas espécies como marcadores microbiológicos isolados do risco de cárie. É ainda importante salientar que a quantificação das espécies parece ser mais relevante que apenas a presença ou ausência das mesmas.

Por outro lado, a análise quantitativa das espécies bacterianas permitiu evidenciar a variabilidade microbiológica existente entre os participantes, reforçando a importância da integração dos indicadores microbiológicos com parâmetros clínicos, salivares e comportamentais numa abordagem multidimensional da avaliação do risco de cárie.

O presente estudo representa, assim, uma etapa exploratória no desenvolvimento e avaliação de indicadores microbiológicos associados ao risco de cárie em adultos, constituindo uma base para futuros estudos com amostras de maior dimensão, desenho longitudinal e integração de um maior número de marcadores microbiológicos, de forma a consolidar a utilidade clínica destes biomarcadores na estratificação do risco de cárie.

6. Referências

1. Tanner ACR, Kressirer CA, Rothmiller S, Johansson I, Chalmers NI. The caries microbiome: implications for reversing dysbiosis. *Adv Dent Res*. 2018;29(1):78-85. doi:10.1177/0022034517736496.
2. Benseddik F, Pilliol V, Alou MT, Wasfy RM, Raoult D, Dubourg G. The oral microbiota and its relationship to dental calculus and caries. *Microorganisms*. 2024;12(12):2508. doi:10.3390/microorganisms12122508.
3. Pei XM, Zhou LX, Tsang MW, Tai WCS, Wong SCC. The oral microbial ecosystem in age-related xerostomia: a critical review. *Int J Mol Sci*. 2024;25(23):12815. doi:10.3390/ijms252312815.
4. Ferreira ML. Cariocheck: um índice microbiano preditor do risco de cárie? [dissertação de mestrado]. Viseu: Universidade Católica Portuguesa; 2024.
5. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*. 2003;149(Pt 2):279-294. doi:10.1099/mic.0.26082-0.
6. Fejerskov O, Nyvad B, Kidd E. Dental caries: the disease and its clinical management. 3rd ed. Oxford: Wiley Blackwell; 2015.
7. Featherstone JDB. Dental caries: a dynamic disease process. *Aust Dent J*. 2008;53(3):286-291. doi:10.1111/j.1834-7819.2008.00064.x.
8. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17030. doi:10.1038/nrdp.2017.30.
9. Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T, et al. Global, regional, and national prevalence, incidence, and disability-adjusted life years for oral conditions. *J Dent Res*. 2017;96(4):380-387. doi:10.1177/0022034517693566.
10. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res*. 2011;90(3):294-303. doi:10.1177/0022034510379602.
11. Grigaluskienė R, Slabšinskienė E, Vasiliauskienė I. Biological approach of dental caries management. *Stomatologija*. 2020;22(4):107-113.
12. Fonseca AF. Avaliação de um índice de risco de cárie numa população adulta [dissertação de mestrado]. Viseu: Universidade Católica Portuguesa; 2022.
13. Ribeiro VM. Inclusão de indicadores microbianos num índice de risco de cárie numa população adulta [dissertação de mestrado]. Viseu: Universidade Católica

Portuguesa; 2023.

14. Moussa DG, Aparicio C, Tenenbaum HC, Glogauer M, Quiñonez C, Winer DA, et al. Current state and challenges of the global outcomes of dental caries research in the meta-omics era. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:887907. doi:10.3389/fcimb.2022.887907.
15. Spatafora G, Li Y, He X, Cowan A, Tanner ACR. The evolving microbiome of dental caries. *Microorganisms.* 2024;12(1):121. doi:10.3390/microorganisms12010121.
16. Rosier BT, Marsh PD, Mira A. Resilience of the oral microbiota in health: mechanisms that prevent dysbiosis. *J Dent Res.* 2018;97(4):371-380. doi:10.1177/0022034517742139.
17. Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(12):745-759. doi:10.1038/s41579-018-0089-x.
18. Dikmen B. ICDAS II criteria (International Caries Detection and Assessment System). *J Istanbul Univ Fac Dent.* 2015;49(3):63-72. doi:10.17096/jiufd.38691.
19. Gugnani N, Pandit IK, Srivastava N, Gupta M, Sharma M. International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): a new concept. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2011;4(2):93-100. doi:10.5005/jp-journals-10005-1089.
20. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, et al. The biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr.* 2019;7(1):GPP3-0051-2018. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018.

7. Anexos

Anexo 1- Consentimento informado



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

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

Título do estudo: Microbioma Oral Humano

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

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

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

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

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

Este documento é composto por três páginas e feito em duplicado: uma via para o investigador e a outra para a pessoa que consente.

documento).

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

Medidas de Partilha de Benefícios:

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

Recolha de Dados:

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

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

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

Responsável pela Investigação:

Maria José Serol de Brito Correia

Tlm: 919871348

Email: mcorreia@ucp.pt

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

Data: ____/____/____

Assinatura do Investigador Principal: _____

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

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

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

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

Este documento é composto por três páginas e feito em duplicado: uma via para o investigador e a outra para a pessoa que consente.



Nome do participante no estudo: _____

Assinatura: _____

SE NÃO FOR O PRÓPRIO A ASSINAR POR IDADE OU INCAPACIDADE

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

Nome: _____

BI/CC nº: _____

Data ou validade ____/____/____

Grau de parentesco ou tipo de representação: _____

Assinatura: _____

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

Data Protection Officer - UCP

Dra. Frederica Campos de Carvalho

Contacto telefónico: +351 217214179

E-mail: compliance.rgpd@ucp.pt

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

Maria José Serol de Brito Correia

Tlm: 919871348

Email: mcorreia@ucp.pt

Este documento é composto por três páginas e feito em duplicado: uma via para o investigador e a outra para a pessoa que consente.

Anexo 2-Questionário



UNIVERSIDADE CATÓLICA
PORTUGUESA
VISEU



Questionário de dadores

A- Dados da amostra

Questão 1.

Código do dador

Questão 2.

Data da colheita

Questão 3.

Material Biológico

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

Questão 4.

Amostragem

- ☐ 1º amostragem
- ☐ Amostras follow-up

Questão 5.

Local de amostragem

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

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



Questão 6.

Investigador / Médico dentista responsável

B- Dados pessoais do dador

Questão 7.

Género

- ☐ Feminino
- ☐ Masculino
- ☐ Não binário
- ☐ Prefere não mencionar

Questão 8.

Data de nascimento

Questão 9.

Etnia

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

Questão 10.

Nível de escolaridade

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



C- Informações de saúde geral do dador

Questão 11.

Tem ou teve alguma patologia?

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

Questão 12.

Especifique o tipo de patologia (s)

Questão 13.

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

- ☐ Sim
- ☐ Não

Questão 14.

Se sim, há quanto tempo (anos)?

Questão 15.

Tem hipertensão?

- ☐ Sim
- ☐ Não



Questão 16.

Tem diabetes?

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

Questão 17.

Histórico familiar – Existem doenças na família como?

- ☐ Doenças cardíacas

- ☐ Diabetes

- ☐ Cancro

- ☐ Outras

D- Informações sobre a medicação

Questão 18.

Faz algum tipo de tratamento médico ou medicação com regularidade?

- ☐ Sim

- ☐ Não

- ☐ Não sabe



Questão 19.

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

- ☐ Sim
- ☐ Não
- ☐ Não sabe

Questão 20.

Fez antibiótico nos últimos 3 meses?

- ☐ Sim
- ☐ Não
- ☐ Não sabe

Questão 21.

Recebeu a vacina da gripe nos últimos 6 meses?

- ☐ Sim
- ☐ Não
- ☐ Não sabe

E- Hábitos – Consumo de tabaco

Questão 22.

Fuma ou já fumou?

- ☐ Sim
- ☐ Não
- ☐ Ex-fumador

Questão 23.

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

- ☐ Sabe
- ☐ Não sabe



Questão 24.

Quantos cigarros fuma ou fumava por dia?

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

Questão 25.

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

- ☐ Sabe
- ☐ Não sabe

Questão 26.

Usa drogas recreativas?

- ☐ Sim
- ☐ Não

F- Hábitos - Consumo de álcool

Questão 27.

Bebe ou já bebeu, regularmente bebidas alcoólicas?

- ☐ Sim
- ☐ Não

Questão 28.

Se bebe ou já bebeu, com que idade começou?

- ☐ Sabe

- ☐ Não sabe

Questão 29.

Se bebe ou já bebeu, preencha o seguinte quadro:

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



Questão 30.

Se deixou de beber foi com que idade?

- ☐ Sabe

- ☐ Não sabe

G- Hábitos - Alimentares

Questão 31.

Utiliza açúcar nos lanches entre refeições?

- ☐ Sim
- ☐ Não
- ☐ Não sabe

Questão 32.

Número de lanches com açúcar entra as refeições:

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

H- Nível hormonal

Questão 33.

Toma anticoncecionais?

- ☐ Sim
- ☐ Não

Questão 34.

Há quantos dias teve a última menstruação?



Questão 35.

Está grávida?

- ☐ Sim
- ☐ Não

Questão 36.

Se sim, de quantas semanas?

Questão 37.

Encontra-se na menopausa?

- ☐ Sim
- ☐ Não

Questão 38.

Se sim, há quantos anos?

I- Hábitos e comportamentos de higiene oral

Questão 39.

Costuma escovar os dentes diariamente?

- ☐ Sim
- ☐ Não

Questão 40.

Se sim, quantas vezes por dia?

- ☐ 1x
- ☐ 2x
- ☐ 3x
- ☐ Mais de 3x



Questão 41.

Escova os dentes com uma pasta fluoretada?

- ☐ Sim
- ☐ Não

Questão 42.

Utiliza uma pasta fluoretada 5000ppm diariamente?

- ☐ Sim
- ☐ Não

Questão 43.

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

- ☐ Sim
- ☐ Não

Questão 44.

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

- ☐ Sim
- ☐ Não

Questão 45.

Costuma utilizar fio dentário?

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

Questão 46.

Utiliza aparelho ortodôntico?

- ☐ Sim
- ☐ Não



Questão 47.

Quando foi a última vez que visitou um dentista?

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

Questão 48.

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

- ☐ Sim
- ☐ Não

Questão 49.

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

- ☐ Sim
- ☐ Não

Questão 50.

Sente que a sua boca esta "seca"?

- ☐ Sim
- ☐ Não

Questão 51.

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

- ☐ Sim
- ☐ Não



Questão 52.

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

- ☐ Sim
- ☐ Não

Questão 53.

Sente alguma alteração no paladar?

- ☐ Sim
- ☐ Não

J- Saúde oral – Lesões de cárie e diagnóstico periodontal

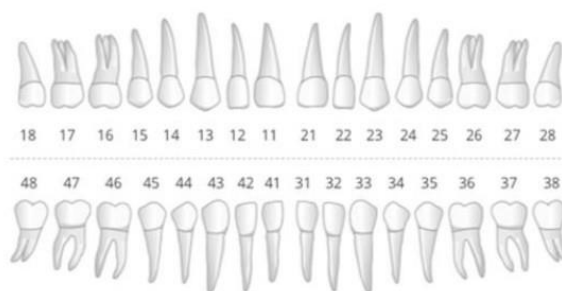
Questão 54. Condição atual de cada elemento dentário

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



37									
38									
41									
42									
43									
44									
45									
46									
47									
48									

Questão 55. ICDAS



Odontograma

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



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



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

Questão 56. Lesões de cárie

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



Questão 57.

Profundidade de sulcos e fissuras?

- ☐ Rasos
- ☐ Profundos

Questão 58.

Exposição radicular

- ☐ Sim
- ☐ Não

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

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

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

Questão 60.

BOP – Sangramento à sondagem



Questão 61.

Índice de placa

Questão 62.

Média da profundidade de sondagem

Questão 63.

Necessidade de tratamento médico-dentário?

- ☐ Sim
- ☐ Não

K- Saúde oral – Próteses dentárias

Questão 64.

Utiliza prótese dentária?

- ☐ Sim
- ☐ Não

Questão 65.

Em qual das arcadas?

- ☐ Superior
- ☐ Inferior
- ☐ Ambas

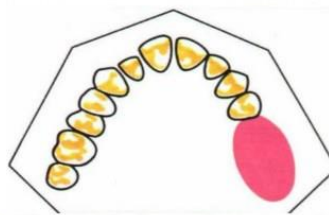
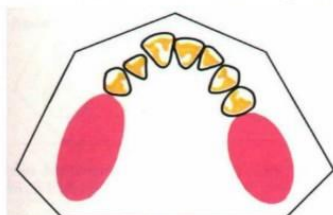
Questão 66. Qual o tipo de prótese?

	Total	Parcial acrílica	Parcial esquelética
Superior			
Inferior			

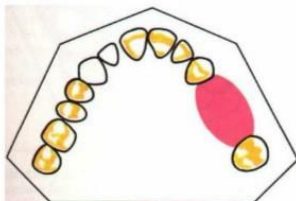


Questão 67. A que tipo de classificação de Kennedy corresponde a prótese que utiliza?

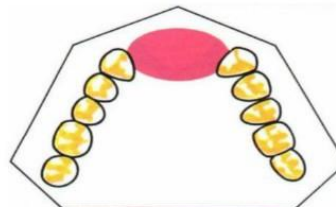
- Classe I: desdentado bilateral posterior ■ Classe II: desdentado unilateral posterior



- Classe III: desdentado unilateral posterior incompleto



- Classe IV: desdentado anterior



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

Questão 68.

Quando utiliza a(s) prótese(s)?

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

Questão 69.

Como faz a higienização da sua prótese?

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



Questão 70.

Quantas vezes por dia é feita essa higienização?

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

Questão 71.

Costuma tirar a prótese para dormir?

- ☐ Sempre
- ☐ Às vezes
- ☐ Raramente
- ☐ Nunca

Questão 72.

Há quanto tempo utiliza uma prótese dentária (anos)?

Questão 73.

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

Questão 74.

Qual a frequência de consultas de manutenção protética?

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

Questão 75.

Necessidade de reabilitação protética?

- ☐ Sim
- ☐ Não

Anexo 3- Sequência de primers.

Sequências de primers

16S

<i>Primer Forward</i>	5' AAACCTCAAAGAATTGACGG 3'
<i>Primer Reverse</i>	5' CTCACRRCACGAGCTGAC 3'

Actinomyces johnsonii

<i>Primer Forward</i>	5' AGCGCTTGCCTTTTGGTG3'
<i>Primer Reverse</i>	5' AACCCGCCATGCGACAGACCCG3'

Sreptococcus mitis

<i>Primer Forward</i>	5' CCCGAAGTCGGTGAGGTAAC3'
<i>Primer Reverse</i>	5' TCCCAAACGGCTGACTTGTT3'

Sreptococcus mutans

<i>Primer Forward</i>	5' TCGCGAAAAAGATAAACAAAC3'
<i>Primer Reverse</i>	5' GCCCCTTCACAGTTGGTTAG3'

Sreptococcus sobrinus

<i>Primer Forward</i>	5' GCAAGTGGAACGCATTGGTAA3'
<i>Primer Reverse</i>	5' GGTCCATCTGATAGTGAAGCAATG3'

Anexo 4- Protocolo laboratorial

QPCR protocol for absolute quantification

Quantification of total bacterial load:

Standard Curve:

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

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

Plasmid DNA concentration:

16S rRNA gene construct: 516,1 ng/μL

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

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

16S rRNA gene: annealing temperature 61.5 °C

10 μL final reaction mix:

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

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

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

DNA: 1 ng per PCR reaction

Nuclease-free water up to 10 μL

95 °C
40

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

Cycle PCR:
for 2 min
cycles;

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 CTCACRRACGAGCTGAC

Optimized annealing temperature

16S rRNA gene: Ta 50 °C

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

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

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

5 μL MM

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

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

x μL DNA

x μL H₂O

Negative control: x μL MM + x μL H₂O

Cycle PCR:

95 °C for 15 min

35 cycles:

94 °C for 30 sec

50 °C/45 °C for 30 sec

72 °C for 20 sec

72 °C for 10 min

4 °C infinite

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

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

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

Expected product size:

16S rRNA gene: 178 bp

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

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

After purification DNA was eluted in 30 µL of EB;

Purified DNA concentration (NanoDrop):

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

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

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

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

Insert preparation:

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

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

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

Vector size: 2,88 kb

Vector concentration: 50 ng/µL

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

Note: Final volume: 10 µL

Transformation:

Prepare LB agar plates containing 100 µg/mL ampicillin, 15 µg/mL tetracycline, 100 µg/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 µg) to use in quantitative real-time PCR experiments.