



CATÓLICA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

LISBOA · PORTO · VISEU

***CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME PERIODONTO-PATOGÉNICO NUMA
AMOSTRA DA POPULAÇÃO DE PACIENTES COM PERIODONTITE
CRÓNICA AVANÇADA DA UCP***

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

Por:

João Pedro Pereira Gonçalves

Viseu, 2017



CATÓLICA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

LISBOA · PORTO · VISEU

***CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME PERIODONTO-PATOGÉNICO NUMA
AMOSTRA DA POPULAÇÃO DE PACIENTES COM PERIODONTITE
CRÓNICA AVANÇADA DA UCP***

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

Por:

João Pedro Pereira Gonçalves

Orientadora: Professora Doutora Célia Coutinho Alves

Coorientadora: Professora Doutora Maria José Correia

Viseu, 2017

Epígrafe

“Um parvo em pé vai mais longe que um intelectual sentado”

- António Lobo Antunes

Agradecimentos

Quero agradecer a todas as pessoas que tornaram esta monografia possível, diretamente em termos académicos como indiretamente em termos pessoais.

À **Professora Dr.ª Célia Coutinho Alves**, não só agora pela paciência, apoio, motivação, disponibilidade e orientação neste projeto, como ao longo de todas as fases do meu percurso académico dos últimos 2 anos.

À **Professora Dr.ª Maria José Correia**, por ter acreditado na minha capacidade de me dedicar a este projeto, por estar sempre disposta a esclarecer-me as mais pequenas dúvidas sobre este tema e por ser um exemplo de professora excelente nos meus primeiros anos universitários, exigindo sempre mais de mim para além do ser bom com as palavras e dizer tudo não dizendo nada.

Ao **Professor Doutor Nuno Rosa, Professora Doutora Marlene Barros, Mestre Igor Cruz, Dr. Eduardo Esteves, Dr.ª Mónica Fernandes, à Dr.ª. Inês Pereira, à Telma Fernandes** e a toda a equipa do **SalivaTec**, pela ajuda e disponibilidade ao longo deste trabalho.

À **Mestre Sara Sousa**, pela amizade ao longo destes 5 anos de curso, culminando numa espécie de 3ª orientadora da minha tese, um muito obrigado pela disponibilidade e trabalho ao longo destes últimos meses.

Aos meus grandes amigos **André Cardoso, Pedro Andrade e Pedro Cabral** por serem um exemplo do que é uma verdadeira amizade e por não quererem saber se eu lhes agradeço ou não.

À **Inês “Ké” Martins** por este último ano de apoio incondicional e inabalável. Obrigado pelo equilíbrio e sentimento único presente em ti e por seres um corretor exímio da língua portuguesa presente na minha monografia.

Aos meus **Pais**, pela oportunidade de estudar, pelo apoio, amor, pressão e por me fazerem puxar sempre mais por mim e querer sempre mais do que tenho.

A todos, um enorme obrigado.

Lista de Abreviaturas

MIMD	Mestrado Integrado em Medicina Dentária
BOP	<i>Bleeding on Probing</i> / Sangramento à Sondagem
PCA	Periodontite Crónica Avançada
IP	Índice de Higiene Oral
PSR	<i>Periodontal Screening Record</i> / Registo Periodontal Simplificado
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
DMFT / CPO-d	<i>Decayed, Missing, Filled teeth index</i> / Índice de dentes cariados, perdidos e obturados
AAP	<i>American Association of Periodontology</i> / Associação Americana de Periodontologia
CPI	<i>Community Periodontal Index</i> / Índice Periodontal Comunitário
WHO	<i>World Health Organization</i> / Organização Mundial de Saúde
PGE2	Prostaglandina E2
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral
MMP	Metaloproteinases da Matriz
Ig	Imunoglobulina
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> / Reação em Cadeia da Polimerase
DNA / ADN	<i>Deoxyribonucleic acid</i> / Ácido Desoxirribonucleico
RNA / ARN	<i>Ribonucleic acid</i> / Ácido Ribonucleico
TAE	Tampão TRIS Acetato EDTA

Resumo

Introdução: A periodontite crónica avançada tem características muito específicas, sendo a evolução desta dependente do estado de saúde oral e periodontal do paciente, resultantes de fatores biológicos, hábitos de higiene e saúde, genética e idade dos indivíduos. No entanto, o fator de maior importância para a evolução da patologia periodontal é a presença de periodonto-patógenos responsáveis por se aproveitarem do estado periodontal fragilizado.

O objetivo deste estudo foi a caracterização do biofilme periodonto-patogénico numa amostra da população de pacientes com periodontite crónica avançada da UCP através da avaliação da saúde oral e periodontal e da deteção molecular de periodonto-patógenos específicos da PCA na saliva e no biofilme.

Materiais e Métodos: Uma amostra de 29 indivíduos foi estudada, constituindo-se o grupo de controlo com 10 pacientes totalmente saudáveis e o grupo teste com 19 pacientes com periodontite crónica avançada. Foram adotadas 3 estratégias para recolha de dados: questionário para recolha de dados sociodemográficos, avaliação clínica da saúde oral e periodontal e recolha de saliva e biofilme dentário.

Resultados: O estado saudável do grupo controlo foi confirmado tendo em conta a ausência de doença periodontal, sendo que estes apenas estão presentes em pacientes do grupo teste. O índice médio do CPO-d total do grupo controlo foi de $7 \pm 4,137$, ao contrário do grupo teste onde o índice médio do CPO-d total de $15,11 \pm 9,11$. *Porphyromonas gingivalis* e *Filifactor alocis* foram detetados no biofilme de pacientes com PCA sendo possível realizar uma confirmação não clínica da patologia nestas amostras.

Conclusão: No caso dos indivíduos com PCA, é observada a presença de doença periodontal instalada, através da presença de bactérias específicas desta periodontite no biofilme das bolsas periodontais do grupo teste, fazendo com que a recolha e análise de biofilme seja de maior confiança.

Palavras-Chave: saliva; saúde oral; periodontite crónica avançada; biofilme dentário; periodonto-patógenos.

Abstract

Introduction: The evolution of severe chronic periodontitis is reliant on the patients oral and periodontal health status due to resulting biological factors, hygiene and health related habits, genetical determinants and patients age. Despite this, the major factors that most influence the evolution of the periodontal disease are the specific periodontal pathogens responsible for taking advantage of a debilitated periodontal status that enhances periodontal disease progression.

The main objective was to study the periodontal pathogenic biofilm profile in individuals with severe chronic periodontitis disease from the dental clinic of UCP by evaluating oral and periodontal status and by molecular detection of periodontal pathogens in saliva and biofilm samples of healthy and periodontal patients.

Material and Methods: A sample of 29 patients was studied resulting in a control group with 10 completely healthy patients and a test group with 19 patients with severe chronic periodontitis. Three different data collection strategies were employed: sociodemographic data collection survey, clinical evaluation of oral and periodontal status and saliva and biofilm sample collection.

Results: The healthy status of the control group was confirmed and no periodontal disease was reported. The same could not be said about the test group where severe chronic periodontitis was present on all samples. The DMFT index average score for the control group was $7 \pm 4,137$ contrasting with the test group's average DMFT index of $15,11 \pm 9,11$. *Porphyromonas gingivalis* and *Filifactor alocis* were only detected on the dental biofilm of periodontal sockets of patients with severe chronic periodontitis making it possible to get a non-clinical confirmation of it.

Conclusion: It is possible to observe the installed periodontal disease in patients with severe chronic periodontitis through the presence of specific periodontal bacteria in the biofilm of periodontal sockets of the test group, making the biofilm sample and analysis more reliable.

Keywords: saliva; oral health; severe chronic periodontitis; dental biofilm; periodontal pathogens.

Índice

Epígrafe.....	i
Agradecimentos.....	iii
Lista de Abreviaturas.....	v
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Índice de Figuras.....	xii
Índice de Tabelas.....	xiii
Índice de Anexos.....	xiv
Introdução.....	1
1. Saúde Periodontal.....	1
1.1. Periodonto.....	2
1.2. Periodontite.....	2
1.3. Epidemiologia da periodontite.....	3
1.4. Etiologia da periodontite.....	5
1.5. Periodontite Crónica Avançada.....	6
2. Saliva como fluído diagnóstico de periodontite.....	7
3. Biofilme na deteção de periodontite.....	9
3.1. Biofilme na Periodontite.....	9
3.2. Complexos microbianos de Socransky.....	11
3.3. Complexo Vermelho associado a Periodontite Crónica Avançada.....	12
3.3.1. Treponema denticola.....	13
3.3.2. Tannerella forsythia.....	14
3.3.3. Porphyromonas gingivalis.....	14
3.3.4. Filifator alocis.....	15
Objetivos.....	17

Materiais e Métodos	21
1. Caracterização da população	21
1.1. População em estudo	21
1.1.1. Fatores de inclusão e exclusão da amostra.....	21
1.2. Questionário aplicado	22
2. Avaliação da saúde oral	22
3. Recolha das amostras de saliva	26
4. Recolha das amostras de biofilme.....	28
5. Escolha de primers.....	29
6. Isolamento de ADN	31
7. Amplificação de ADN em reação de PCR.....	33
8. Electroforese em gel de agarose	35
9. Análise Estatística	36
Resultados.....	41
1. Caracterização da população	41
1.1. Caracterização sociodemográfica	41
1.2. Saúde Sistémica da população.....	42
2. Avaliação oral.....	45
2.1. Avaliação periodontal	45
2.2. Parâmetros da Saliva	53
3. Periodonto-patógenos na saliva e biofilme dentário.....	55
3.1. Periodonto-patógenos na saliva	55
3.2. Periodonto-patógenos no biofilme.....	56
Discussão.....	61
1. Saúde sistémica e sociodemográfica.....	61
2. Saúde oral.....	63

3. Parâmetros da saliva: relação com PCA.....	64
4. Periodonto-patógenos na saliva e biofilme dentário.....	65
Conclusões.....	71
Referências.....	75
Anexos.....	85

Índice de Figuras

Figura 1 - Prevalência da diabetes. a) prevalência da diabetes na amostra total; b) prevalência da diabetes em indivíduos com PCA; c) prevalência da diabetes em indivíduos saudáveis.....	43
Figura 2 - Prevalência da hipertensão. a) prevalência da hipertensão na amostra total; b) prevalência da hipertensão em indivíduos com PCA; c) prevalência da hipertensão em indivíduos saudáveis.	43
Figura 3 - Prevalência de problemas cardiovasculares. a) prevalência de problemas cardiovasculares na amostra total; b) prevalência de problemas cardiovasculares em indivíduos com PCA; c) prevalência de problemas cardiovasculares em indivíduos saudáveis.	44
Figura 4 - Índice CPO Total de pacientes do grupo teste (PCA) e do grupo controle (saudável) (n=29).	46
Figura 5 - Índice CPO-C de pacientes do grupo teste e do grupo de controle (n=29).	47
Figura 6 - Índice CPO-P de pacientes do grupo teste e do grupo de controle (n=29).	48
Figura 7 - Índice CPO-O de pacientes do grupo teste e do grupo de controle (n=29).	49
Figura 8 - Índice de higiene oral de pacientes do grupo teste e do grupo de controle (n=29).....	50
Figura 9 - Registo periodontal simplificado (PSR) de pacientes do grupo teste e do grupo de controle (n=29).....	51
Figura 10 - Sangramento à sondagem (BOP) de pacientes do grupo teste e do grupo de controle (n=29).....	52
Figura 11 - pH salivar de pacientes do grupo teste e do grupo de controle (n=29).	54
Figura 12 - Fluxo salivar de pacientes do grupo teste e do grupo de controle (n=29).	54

Índice de Tabelas

Tabela I - Código Status Dentário	23
Tabela II - Valor do Registo Periodontal Simplificado (PSR)	25
Tabela III - Parâmetros clínicos de severidade e diagnóstico da periodontite (17,88).....	25
Tabela IV - Sequência de primers utilizados no estudo.	30
Tabela V - Caracterização sociodemográfica e estilo de vida dos indivíduos (n=29).	41
Tabela VI – Caracterização da saúde sistémica auto reportada dos indivíduos (n=29).	42
Tabela VII – Avaliação periodontal observada na totalidade da amostra (n=29).	45
Tabela VIII – Parâmetros da saliva na totalidade da amostra (n=29).	53
Tabela IX – Presença (x) dos periodonto-patógenos na saliva para cada indivíduo (n=29).	55
Tabela X – Presença (x) dos periodonto-patógenos no biofilme de cada indivíduo (n=29).	56

Índice de Anexos

Anexo 1 - Declaração de consentimento informado	85
Anexo 2 - Questionário aplicado	89
Anexo 3 - Questionário alimentação.	99
Anexo 4 – Protocolo de Recolha de Saliva Estimulada	101
Anexo 5 - Protocolo de colheita de biofilme	103
Anexo 6 - Protocolo de Isolamento de DNA.....	104
Anexo 7 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	105
Anexo 8 - Eletroforese em gel de agarose.....	106

Introdução

Introdução

1. Saúde Periodontal

Saúde periodontal é o conjunto do estado de perfeita função da dentição, conforto, estabilidade do periodonto e bem-estar físico e psicológico do paciente, tendo em conta que a estabilidade apenas pode ser verificada por um médico dentista (1).

Um periodonto saudável é aquele em que não existe perda de inserção quando se realiza sondagem, constituindo este fator a principal norma para diferenciar o estado de doença do periodonto (1,2). No entanto, apenas a ausência de perda de inserção não é suficiente para o indivíduo ser considerado periodontalmente saudável, dado que outros fatores biológicos como perda óssea, observada radiograficamente, e/ou grau de inflamação, medido através do sangramento à sondagem (BOP) (3), precisam ser inexistentes, sendo que a profundidade à sondagem deve estar compreendida entre 1 e 3mm para que se possa considerar o indivíduo saudável a nível periodontal (3–6). O diagnóstico periodontal, varia entre saúde periodontal, gengivite ou periodontite, sendo a última o estado mais grave das doenças periodontais, admitindo-se assim uma alteração da saúde do periodonto (7–9).

Segundo a *American Academy of Periodontology (AAP)* (10), deve ser sempre realizada uma avaliação exaustiva da história clínica médica e dentária do paciente, de modo a serem identificadas situações que possam facilitar a evolução de uma patologia periodontal, tendo também em atenção à principal queixa que resultou na visita ao consultório dentário. Para o paciente ser considerado periodontalmente saudável, estruturas externas, tecidos e estruturas intraorais, dentes ou os seus substitutos, radiografias atualizadas, índice de higiene oral, estado dos tecidos moles, profundidade de sondagem, relações mucogengivais e graus de furca devem ser observados, sendo que qualquer achado clínico deve ser documentado e posteriormente explicado ao paciente, assim como as hipóteses de tratamento e as consequências de não realizar este (6,10).

1.1. Periodonto

O periodonto, constituído por alvéolos dentários, ligamento periodontal, cemento e gengiva, tem como principal objetivo a manutenção das peças dentárias firmemente no mesmo sítio. Quando qualquer um destes constituintes não se encontra no seu estado saudável, toda a saúde periodontal do indivíduo é afetada, seja por perda óssea referente aos alvéolos dentários, perda de ligamento periodontal referente à inserção ou inflamação referente à gengiva (11).

1.2. Periodontite

A periodontite é relatada como sendo uma doença inflamatória e progressiva, caracterizada principalmente pela destruição dos tecidos periodontais de suporte, conseqüente perda óssea, podendo resultar na perda da peça dentária (8,12,13). É considerada doença periodontal quando pelo menos um ponto na arcada dentária apresenta 1mm de perda clínica de inserção (*attachment loss*) em conjunto com 4mm ou mais de profundidade de bolsa periodontal (14).

Apesar das parecenças histopatológicas com a gengivite, clinicamente a periodontite diferencia-se desta devido à perda de ligamento periodontal e disrupção da sua ligação ao cemento, assim como reabsorção do osso alveolar concorrente com a presença de inflamação gengival (15). A periodontite resulta da extensão do processo inflamatório, que se inicia na gengiva para os tecidos periodontais levando assim à formação de bolsas periodontais e a uma maior facilidade assim de acumulação de placa bacteriana (16).

Periodontite agressiva e periodontite crónica são diagnósticos possíveis para indivíduos com doenças periodontais de diferente carácter evolutivo. Por um lado, a periodontite agressiva é associada a indivíduos mais jovens com evidências de quebra periodontal recente, não sendo conhecido o estado atual de atividade da doença, nem a diferença de tempo entre o início de sinais característicos desta e o seu início biológico. Por outro lado, a periodontite crónica é o diagnóstico maioritário para a doença periodontal em adultos, que pode não mostrar sinais de progressão durante cinco ou seis anos em 85% dos

pacientes, mesmo após primeiro tratamento de controlo ou sem qualquer tipo de tratamento (15).

A periodontite crónica trata-se da doença periodontal mais comum em adultos, podendo ser classificada quanto à sua extensão e quanto à sua severidade. Periodontite crónica localizada e generalizada referem-se à extensão da doença, enquanto que periodontite crónica leve, moderada e avançada se referem à severidade desta relacionada com a perda de inserção (17). Segundo, a Academia Americana de Periodontologia (AAP) (15), a periodontite crónica localizada afeta até 30% das arcadas dentárias enquanto que a generalizada afeta mais de 30% destas (18,19). A periodontite crónica leve traduz-se numa perda clínica de inserção de 1-2mm, perda de 3-4mm é característica da periodontite crónica moderada e por fim a periodontite crónica avançada, com uma perda clínica de inserção de 5mm ou superior (17).

1.3. Epidemiologia da periodontite

Segundo Nazir, (20), prevê-se que 20-50% da população mundial sofra de doença periodontal (20), sendo esta avaliação baseada no Índice Periodontal Comunitário (CPI), que determina o dano causado pela doença periodontal assim como a necessidade de tratamento periodontal (21), e no Registo Periodontal Simplificado (PSR) que define a severidade periodontal por sextantes (22).

Um estudo nacional da OMD realizado por Calado e colaboradores, no ano de 2015 (23), referente à prevalência das doenças orais (23), a periodontite em Portugal mostrou ser mais presente em indivíduos adultos de 65-74 anos, estimando-se 29,5% de indivíduos periodontalmente saudáveis, 39,4% com hemorragia à sondagem, 12,3% de bolsas periodontais entre 4-5mm e 3,0% de bolsas periodontais \geq 6mm (23).

A Organização Mundial de Saúde (WHO) mantém uma base de dados atualizada sobre a distribuição mundial da doença periodontal por país e grupo etário usando o CPI, base de dados na qual Portugal não está incluído (24,25).

Esta base de dados da WHO mostra um estudo nacional no Camboja em 2011 (24), estipulou, para a mesma faixa etária de 65-74 anos, 2% de indivíduos periodontalmente saudáveis, 1% com hemorragia à sondagem, 52% com cálculos, 24% bolsas periodontais entre 4-5mm e 21% com bolsas periodontais \geq 6mm. Um estudo no Japão também em 2011 (24), estimou 11% de indivíduos periodontalmente saudáveis, 10% com hemorragia à sondagem, 26% com cálculos, 36% bolsas periodontais entre 4-5mm e 16% com bolsas periodontais \geq 6mm. Ainda outro estudo na Índia em 2011 (24), obteve 0% de indivíduos periodontalmente saudáveis, 0% com hemorragia à sondagem, 37% com cálculos, 37% bolsas periodontais entre 4-5mm e 26% com bolsas periodontais \geq 6mm (24).

A nível Europeu, apenas 2 países da base de dados da WHO mostraram valores de saúde periodontal superiores a Portugal (29,4%), com valores de 44% e 63%, tratando-se da Hungria e Eslováquia respetivamente, sendo que no que toca às bolsas periodontais, para estes 2 países, os valores mantêm-se próximos aos de Portugal, apresentando a Hungria 16% de bolsas periodontais entre 4-5mm e 3% \geq 6mm. A Eslováquia por sua vez, apresenta 11% de bolsas periodontais entre 4-5mm e 4% \geq 6mm (24). Estes dados sugerem que comparativamente ao resto do mundo, Portugal com a percentagem de 29% de indivíduos periodontalmente saudáveis para a faixa etária estudada, se situa acima da média a nível mundial (23).

1.4. Etiologia da periodontite

A periodontite, vista como uma doença infecciosa (26,27) durante anos, é agora relacionada com o resultado da interação complexa entre infecção bacteriana e resposta imunitária (28) resultando numa resposta exacerbada por parte do hospedeiro (7).

Esta infecção é causada por várias espécies bacterianas como: *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* (29,30). Estas alojam-se em vários nichos da cavidade oral como a superfície do dente, o sulco gengival, ou mucosas orais (31). Caso estas bactérias não sejam devidamente removidas através de uma boa higiene oral ou ajuda médica dentária ocorre uma resposta inflamatória por parte do organismo de forma a combater essa infecção (32).

Essa resposta inflamatória é composta por vários elementos entre os quais estão as células do sistema imunitário, que, libertando citocinas como a prostaglandina E2 (PGE2), interleucina IL-1 β , IL-6, ou fator de necrose tumoral (TNF- α) através de células presentes no epitélio gengival juncional e no tecido conjuntivo como os fibroblastos e macrófagos combatem a infecção. Após a libertação das citocinas, as células T e B segregam imunoglobulinas e antígenos específicos, sendo enzimas como as metaloproteinases da matriz (MMP-8, MMP-9 e MMP-13) produzidas pelas células do sistema imunitário e por osteoclastos que conseqüentemente levam à degradação do tecido conjuntivo e do osso alveolar (31,33,34). Uma libertação contínua de MMP's, devido à estimulação dos fibroblastos e osteoclastos por parte da PGE2, leva à destruição da matriz óssea que se reflete numa perda de inserção dentária, afetando a remodelação e degradação do periodonto (31,35,36).

Vários fatores de risco afetam o desenvolvimento da doença periodontal, como genética (37,38), idade (14,28), status socioeconómico (39), consumo de álcool (27) e tabaco (40–42), higiene oral (27), e relação com doenças sistémicas como diabetes *mellitus* e problemas cardiovasculares (43). Quanto a este último fator, sabe-se que existe uma correlação bidirecional sendo que segundo Yu e colaboradores (44) o risco de desenvolvimento de patologias cardiovasculares mostrou-se mais provável ocorrer no sexo feminino com periodontite já instalada.

1.5. Periodontite Crónica Avançada

Embora existam vários graus de periodontite crónica: leve, moderada e avançada, este trabalho de monografia irá incidir sobre a última, tratando-se esta de uma patologia permanente com alterações patológicas não reversíveis, requerendo longos períodos de observação, controlo e cuidados (12) tratando-se da mais comum das formas destrutivas de doença periodontal em adultos (45). É uma patologia caracterizada por inflamação gengival aguda, presença de cálculos infra gengivais, recessões gengivais, sangramento à sondagem (BOP), normalmente superior a 30%, elevados graus de mobilidade dos elementos dentários, uma perda clínica de inserção igual ou superior a 5 mm (17), perda de suporte da peça dentária, bolsas periodontais com profundidades superiores a 4mm, assim como elevada presença de placa bacteriana por toda a estrutura dentária (7,12,13,20,21).

2. Saliva como fluido diagnóstico de periodontite

A saliva é um fluido oral proveniente das glândulas salivares, responsável no auxílio de vários processos como a manutenção da homeostasia e saúde oral, percepção do paladar, digestão de comida constituindo ainda um mecanismo de defesa contra microrganismos patogênicos (47). É conhecido que a saliva reflete as variações locais e sistêmicas (48), pois permite o estudo de moléculas como o ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA), metabólitos, proteínas e do microbioma (49), sendo atualmente usada, entre outras áreas, para o diagnóstico da doença periodontal e outras doenças orais (48,50). Esta apresenta um protocolo de recolha seguro, não invasivo e acessível quando comparado com o sangue (31).

Imunoglobulinas (Ig) são importantes fatores de defesa, também presentes na saliva, distribuídos por diferentes classes. As que mais influenciam o microbioma oral são a IgA, IgG e IgM interferindo com a adesão das bactérias ou inibindo o metabolismo destas tratando-se IgA como a principal responsável por esta ação (31).

Pacientes com doença periodontal mostram uma concentração salivar mais elevada de IgA, IgG e IgM, específicos para patógenos periodontais em comparação com pacientes saudáveis (31). Pacientes que recorrem a tratamento periodontal mostram níveis das imunoglobulinas referidas anteriormente extremamente reduzidos, sendo assim, a triagem salivar, especialmente para o IgA tem sido discutido como uma possível técnica não invasiva para sinalização de indivíduos com risco de desenvolver doença periodontal ou a responderem a uma infecção periodonto-patogénica (31).

No entanto, apesar da possível deteção da periodontite através de imunoglobulinas, existe uma ferramenta padrão para pesquisa e diagnóstico não clínico em periodontologia, tratando-se esta da reação em cadeia da polimerase (PCR) (51). A PCR, tratando-se de uma técnica *in vitro*, permite a amplificação e estudo de DNA e os seus transcritos de RNA provenientes dos mais variados tecidos incluindo sangue, pele, cabelo, sêmen, e no caso deste estudo, fluido crevicular gengival e saliva (52). Cada ensaio da técnica de PCR requer a presença de DNA modelo, *primers*, nucleótidos e DNA polimerase (51,53).

O modelo de DNA é a sequência alvo conhecida que precisa de ser amplificada. *Primers* são pequenas sequências únicas de ácidos nucleicos (oligonucleótidos) selecionados para se emparelharem especificamente a um ácido nucleico alvo (54). DNA polimerase é a enzima chave para a replicação do DNA que une os nucleótidos individuais para formar o produto final da PCR e desta maneira amplificar as sequências alvo do DNA (51).

A recolha de amostras de saliva, seguida de isolamento de DNA e posterior análise com a técnica de PCR permitem uma rápida identificação de bactérias periodontais. Este método é a principal ferramenta para pesquisa e diagnóstico não clínico da periodontite devido à facilidade de quantificação, sensibilidade elevada, análise rápida, precisão, reprodutibilidade, controlo de quantidade e menor contaminação (51,55).

3. Biofilme na deteção de periodontite

3.1. Biofilme na Periodontite

Biofilme subgengival é descrito por Chandki (30) como sendo uma comunidade microbiana indefinível associada com a superfície de um dente, neste caso, situado apicalmente à margem gengival.

Através da reação de PCR, é possível identificar os periodonto-patógenos de modo a confirmar o estado da doença periodontal pois o biofilme tem como sua característica a proteção de bactérias colonizadoras face a microrganismos competidores, como os mecanismos de defesa do anfitrião da doença, fazendo com que seja possível a confirmação da doença periodontal após diagnóstico clínico (30,51).

Para se explicar o facto de um certo número de microrganismos se encontrar mais presente em locais com a doença, Bessa e colaboradores em 2011 (9), observou que as bactérias patogénicas estão dependentes de mudanças no meio ambiente, não sendo necessária uma etiologia específica. Esta última hipótese explica que se um determinado local na cavidade oral desenvolver condições propícias para o crescimento de certas espécies bacterianas, serão produzidos fatores de virulência que com o decorrer do tempo irão provocar destruição tecidual. (56)

O complexo equilíbrio entre as espécies residentes na cavidade oral é responsável pela manutenção de um estado de simbiose, ou seja, saudável, ou um estado de disbiose associado à doença (47). Para existir periodontite num indivíduo, tem que existir um estado de disbiose na sua cavidade oral, causado muitas vezes por alterações biológicas na vida de uma pessoa afetando o equilíbrio das comunidades bacterianas (47). Fatores como disfunção das glândulas salivares, fraca higiene oral, inflamação gengival e escolhas de estilo de vida incluindo alimentação e vícios gerem a evolução de um estado de simbiose para um de disbiose, potenciando assim o surgimento de patologias como a periodontite crónica avançada (47).

Uma comunidade microbiana em disbiose subverte a resposta imunitária do hospedeiro ao ponto de a maior parte do tecido lesado ser resultado de um

inapropriado e incontrolável nível de inflamação (57,58). As mudanças inflamatórias no ambiente periodontal fazem com que este fique privado de oxigênio, gerando condições perfeitas para o desenvolvimento de bactérias anaeróbias associadas à periodontite, como a *Porphyromonas gingivalis*, alterando o microbioma do seu estado de simbiose para disbiose (59,60).

A resposta inflamatória desregulada por parte do sistema imunitário resulta no fornecimento de nutrientes para as bactérias anaeróbias, continuando estas o seu processo evolutivo promovendo o estado de disbiose do biofilme e disrupção tecidual, criando-se assim um ciclo patogénico propício à evolução da doença periodontal (61).

3.2. Complexos microbianos de Socransky

Socransky e colaboradores em 1998 (29), confirmado por Chandki e colaboradores em 2011 (30), concluíram que, o biofilme oral é constituído por diferentes complexos microbianos periodontais, que se baseiam na frequência de recuperação dos microrganismos (30). Entende-se por complexos microbianos as associações específicas entre as várias espécies bacterianas que estão presentes no biofilme subgingival podendo-se distinguir 5 complexos distintos (29,30):

- Complexo roxo constituído por: *Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula*;
- Complexo amarelo constituído por: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus sanguis*;
- Complexo verde constituído por: *Eikenella corrodens*, espécies de *Capnocytophaga*, *Campylobacter concisus* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*;
- Complexo laranja constituído por: *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis*, *Eubacterium nodatum* e *Streptococcus constellatus*;
- Complexo vermelho constituído por: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*.

Estes complexos microbianos apresentam associações entre si, sendo que o complexo vermelho, por exemplo, é sempre observado com membros do complexo laranja presentes, no entanto, o complexo laranja é observado sem ser necessária a presença do complexo vermelho concluindo-se assim que o complexo vermelho apenas se forma após o complexo laranja (29).

Segundo Noiri e colaboradores (62), foi possível localizar as espécies que constituem os diferentes complexos por imunohistoquímica, onde foi verificado

que os microrganismos associados ao epitélio gengival pertencem ao complexo vermelho ao contrário dos microrganismos associados à superfície do dente que pertencem ao complexo amarelo, verde e roxo.

3.3. Complexo Vermelho associado a Periodontite Crônica Avançada

Segundo Bodet e colaboradores (63), *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* mostram uma elevada associação entre elas, estando estas bactérias, constituintes do complexo vermelho fortemente relacionadas com estados avançados de doença periodontal (63,64). O complexo vermelho encontra-se ainda relacionado com a existência de bolsas periodontais patológicas e sangramento à sondagem, parâmetros essenciais para o diagnóstico da periodontite (65).

Para além do complexo vermelho, em estudos recentes por Aruni e colaboradores em 2014 (66) e 2015 (67) e Gonçalves e colaboradores em 2016 (68), *Filifactor alocis* tem sido detetada em pacientes com periodontite crônica avançada. Este periodonto-patógeno tem sido estudado como um indicador de doença periodontal em pacientes juntamente com periodonto-patógenos conhecidos do grupo vermelho, visto não ter sido detetada, ou detetada em valores mínimos, no biofilme e saliva de pacientes saudáveis, podendo-se considerar uma bactéria específica associada à periodontite.(67,69)

3.3.1. *Treponema denticola*

Treponema denticola é uma bactéria com a forma de espiroqueta, gram-negativa e estritamente anaeróbia, móvel e altamente proteolítica envolvida na etiologia de várias doenças crônicas incluindo a periodontite crônica, assim como outras formas da doença periodontal (70). Na cavidade oral a presença de *Treponema denticola* é geralmente associada com doenças do periodonto, no entanto, segundo Dashper e colaboradores (70), esta bactéria faz também parte do biofilme oral normal de indivíduos saudáveis, embora em número reduzido. Aquelas que são associadas a doenças na cavidade oral não podem ser consideradas patógenos francos, concluindo-se que as interações com outras bactérias são importantes para a evolução da patologia (70). *T. denticola* pode existir sem *P. gingivalis*, no entanto, para que ocorra a colonização e presença de *T. denticola* na placa infragengival, *P. gingivalis* é necessário (70).

Segundo Mitchell e colaboradores (71), este periodonto-patógeno apresenta vários fatores de virulência como, sistemas toxina-antitoxina, dentilisina e transposases, sendo o de maior importância a dentilisina. Esta última é uma protease ativa localizada na superfície de células, que contribui para a progressão da doença periodontal através da interrupção da comunicação intercelular e degradação das proteínas da matriz celular do hospedeiro, permitindo a penetração por *T. denticola* nas camadas de células epiteliais (70). Os sistemas toxina-antitoxina consistem numa toxina estável, que inibe componentes essenciais celulares, e uma anti-toxina, geralmente instável, que neutraliza a ação da toxina necessitando de síntese constante (70). Segundo Kim e colaboradores (72), estes sistemas estão envolvidos em morte celular programada e bacteriostase reversível influenciando assim a formação de biofilme, e desenvolvendo um mecanismo de resistência face a antibióticos ou outros medicamentos (73). As transposases são enzimas que fazem uma cópia de uma porção genética e a transferem para outro local no mesmo genoma criando um clone dessa porção genética, podendo isto levar a uma extensa reorganização cromossômica podendo genes específicos de virulência serem transferidos e multiplicados no mesmo genoma (71).

As evidências, na periodontite crônica, de extensa penetração deste microrganismo em tecidos é reduzida, sendo no entanto detetada entre as células do epitélio juncional (70). No entanto, Nordhoff e colaboradores, em 2008 (74), através da biópsia do tecido periodontal lesado da zona de um canino mostraram que a penetração extensa por parte de *T. denticola* era possível, potenciando, todos estes fatores de virulência, a evolução da doença periodontal.

3.3.2. *Tannerella forsythia*

Tannerella forsythia é uma bactéria anaeróbia, gram-negativa em forma de bastonete associada mais frequentemente a gengivite, periodontite crônica e agressiva do que a um estado saudável, sendo, no entanto, detetada em cada um destes estados. Este microrganismo possui vários fatores de virulência que podem potenciar o desenvolvimento da doença periodontal incluindo a produção de uma protease *tripsina-like* degradando péptidos de pequenas dimensões e uma capacidade de penetração em células hospedeiras induzindo a sua apoptose mostrando estes que a sua atividade é mínima na patogénese da doença periodontal comparada aos fatores de virulência de *P. gingivalis* por exemplo (75,76).

3.3.3. *Porphyromonas gingivalis*

Trata-se de uma bactéria estritamente anaeróbia, gram-negativa em forma de bastonete revestida por uma cápsula constituída por hidratos de carbono, impedindo a opsonização pelo sistema imunitário, inibindo assim tanto a fagocitose por parte dos neutrófilos como a quimiotaxia dos leucócitos (77). *P. gingivalis* possui outros fatores de virulência, como lipopolissacarídeos que causam reabsorção óssea, fímbrias que afetam a aderência de bactérias à membrana exterior, e collagenases que causam a destruição de tecido periodontal, desencadeando respostas no hospedeiro que resultam em danos gengivais e ósseos característicos de doença periodontal, tornando-a no principal periodonto-patógeno na etiologia da periodontite (78).

Num trabalho de Bostanci e Belikasakis, em 2012 (79), foi observado que a *Porphyromonas gingivalis* se encontra maioritariamente nos sulcos infragengivais da cavidade oral humana, estando dependente da fermentação de

aminoácidos para produção de energia em bolsas periodontais profundas onde os níveis de açúcar são reduzidos.

Segundo Hajishengallis e colaboradores, em 2012, (80), entre vários agentes patogénicos periodontais, *P. gingivalis* aparece como sendo um dos principais agentes etiológicos na evolução da doença periodontal contribuindo em grande parte para o desenvolvimento da periodontite crónica. No estudo de Datta e colaboradores, em 2008 (81), esta bactéria foi encontrada em 85,75% das amostras de biofilme oral de pacientes com periodontite crónica (78). Segundo Lafaurie (82), a prevalência de *P. gingivalis* na periodontite crónica varia entre 28% e 97%, tratando-se do microrganismo mais encontrado em diferentes populações com periodontite crónica. A presença de *P. gingivalis* tem mostrado então ser elevada em pacientes com periodontite, e indetetável ou reduzida em pacientes com saúde infra gengival ou gengivite induzida por placa (83).

Devido à elevada associação da presença de *P. gingivalis* com o estado de doença periodontal avançado, prevê-se que ocorra uma interação com outros membros do microbioma do hospedeiro, sendo sintetizados vários fatores patogénicos, que, vão levar à progressão da lesão periodontal. No entanto, é desconhecida a forma como *P. gingivalis* comunica com as células do hospedeiro de modo a que estas produzam moléculas biológicas destrutivas desencadeando a conversão de um estado de saúde oral para um de doença (78).

3.3.4. *Filifator alocis*

Filifator alocis é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia que tem sido identificada em peri-implantites, infeções endodônticas e em pacientes com periodontite agressiva localizada ao longo dos anos, no entanto recentemente esta bactéria, que não era reconhecida como um patógeno associado à periodontite crónica, tem sido repetitivamente observada em elevados níveis nesse mesmo tipo de periodontite (66,69). Segundo Aruni (66), a capacidade de colonização e a potencial virulência de *F. alocis* propõe que esta seja incluída como um novo indicador de doença periodontal.

Riep e colaboradores, em 2009 (84), levantaram a questão do uso de *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia* como marcadores específicos para diferenciar estado de saúde e doença, baseando-se no facto de que existem

poucas razões para acreditar que bactérias de cultura fácil contribuam mais para o desenvolvimento de periodontite do que um organismo fastidioso como o *Filifator alocis* que só se desenvolve quando na presença de nutrientes específicos.

Filifator alocis apresenta vários fatores de virulência como evasão imunitária, formação de biofilme e indução da secreção de citocinas (66), fatores estes que, segundo Aruni (85) devido à relação molecular próxima aos fatores de virulência de *P. gingivalis*, mostram uma elevada sinergia com este periodontopatógeno, ocorrendo um aumento na formação de biofilme e um aumento na capacidade de aderência e invasão em células epiteliais quando ambas estão presentes. Estes resultados mostram que *F. alocis* tem fatores de virulência que podem aumentar a sua capacidade de sobreviver e persistir na bolsa periodontal podendo assim representar um enorme papel na doença periodontal induzida por infecção (85).

Objetivos

Objetivo Primário

- Caracterização do biofilme periodonto-patogénico numa amostra da população de pacientes com periodontite crónica avançada da UCP.

Objetivos Secundários

1. Deteção molecular de periodonto-patógenos em saliva e biofilme;
2. Estabelecer uma correlação entre algum(s) periodonto-patógeno(s) e periodontite crónica avançada no biofilme e na saliva;
3. Estabelecimento de um protocolo de recolha de saliva e biofilme para mais fácil identificação do grau de risco de desenvolvimento de PCA.

Materiais e Métodos

Materiais e Métodos

1. Caracterização da população

1.1. População em estudo

A população observada neste estudo clínico foi constituída por 31 indivíduos, pacientes na clínica dentária da Universidade Católica Portuguesa – Centro Regional de Viseu, sendo o grupo controlo constituído por 10 indivíduos periodontalmente saudáveis e o grupo teste por 19 indivíduos diagnosticados com periodontite crónica avançada.

1.1.1. Fatores de inclusão e exclusão da amostra

Foram aplicados os seguintes fatores de inclusão:

- Pacientes voluntários da clinica universitária da UCP, indivíduos em que foram recolhidos os dois tipos de amostras, nomeadamente saliva e biofilme;
- Prévia assinatura de consentimento informado.

Foram aplicados os seguintes fatores de exclusão:

- Amostras contaminadas com sangue;
- Recusa de recolha de amostras de saliva ou biofilme.
- Dois indivíduos foram excluídos do estudo devido a contaminação da amostra de saliva com sangue no caso da amostra 1767 e recusa na recolha do biofilme no caso da amostra 1610.

1.2. Questionário aplicado

Antes de qualquer procedimento, foi explicado individualmente a cada participante, o objetivo e em que consistia este estudo. Os participantes no estudo assinaram um consentimento informado (Anexo 1). Além disso, foi realizado um questionário a cada participante com informações sociodemográficas, alimentação (86) e estado de saúde.

Especificamente para a avaliação da adesão à dieta mediterrânea foi aplicado um questionário (Anexo 2), em que quando a soma do número de respostas afirmativas é superior ou igual a 10, de um total de 14, estas correspondem a uma adesão à dieta mediterrânea enquanto que inferior a 10 correspondem a uma dieta não mediterrânea (86).

2. Avaliação da saúde oral

Materiais

Espelho Intraoral	
Sonda Periodontal Click-Probe®	
Ortopantomógrafo – Planmeca pm 2002 ec proline manual	
Planmeca Dimaxis PRO	

Métodos

A saúde oral de cada paciente foi avaliada tendo em conta os métodos e os critérios de examinação recomendados pela Organização Mundial de Saúde (25). As examinações e diagnóstico clínico do estado de saúde oral foram realizados por alunos do 5º ano do Mestrado Integrado em Medicina Dentária (MIMD) da Universidade Católica Portuguesa – Centro Regional de Viseu, sendo validados por docentes responsáveis pela área de Periodontologia na clínica dentária universitária.

No questionário aplicado (Anexo 2) foi preenchida a alínea referente ao índice CPO, incluindo nos dados registados o número de dentes cariados, perdidos e obturados em cada paciente usando um espelho intraoral para observação (Tabela I) (25). Após realizada a observação de todas as peças dentárias foi obtido o índice CPO somando os dentes perdidos, cariados e obturados, incluindo terceiros molares (25). Para além da observação visual foi ainda realizada a inspeção tátil das peças dentárias assim como realizada uma ortopantomografia a cada paciente pré-consulta recorrendo ao programa Dimaxis.

Tabela I - Código Status Dentário

Código	Critério
0	Saudável
1	Lesão cariosa
2	Restauração com cárie
3	Restauração sem cárie
4	Dente perdido por cárie
5	Dente perdido (por outra razão)
6	Selante
7	Prótese ou Implante
8	Não erupcionado
T	Trauma
9	Não registado

Para avaliar a severidade e o grau de doença periodontal (saudável, gengivite, periodontite), foi realizado o PSR em cada paciente após uma sondagem periodontal a toda a cavidade oral usando uma sonda Click-Probe® (87). Com a conseqüente avaliação do sangramento à sondagem, presença de cálculos e recessões atribuiu-se por fim um diagnóstico do estado periodontal recorrendo também à radiografia panorâmica para avaliação da perda óssea.

Referente ao PSR, este classifica o estado do sextante avaliado em 5 possíveis graus que traduzem a saúde periodontal do paciente, variando entre 0 (saudável) e 4 (forma mais severa de periodontite) (Tabela II) (22). O estado periodontal está dividido em 4 graus sendo eles 1 – gengivite, 2 – leve, 3 – moderada e 4 – avançada (Tabela III) (87).

Tabela II - Valor do Registo Periodontal Simplificado (PSR) (22)

Valor	Critério
0	Saúde Periodontal
1	Sangramento à sondagem (BOP)
2	Cálculos detetados na sondagem, margem iatrogénica e/ou BOP
3	Bolsas periodontais com 3,5-5,5mm
4	Bolsas periodontais ≥ 6 mm
*	Presença de anormalidades periodontais (envolvimento de furca, mobilidade dentária, recessão gengival, problemas muco-gengivais)

Tabela III - Parâmetros clínicos de severidade e diagnóstico da periodontite (17,88)

Graus Clínicos de Severidade		Profundidade à Sondagem	Perda de Inserção	Envolvimento de furca	Mobilidade Dentária
Grau	Classificação				
1	Gengivite	1-3mm	-	-	-
2	Periodontite Leve	4-5mm	1-2mm	-	-
3	Periodontite Moderada	5-6mm	3-4mm	Grau 1	+
4	Periodontite Avançada	≥ 6 mm	≥ 5 mm	Grau 2 e grau 3	++

3. Recolha das amostras de saliva

Materiais

Tubo *falcon* 50mL e copo de gelo



Caixa *Isopor* Térmica com gelo



Parafilme



Medidor de pH (Hanna instruments)



Luvas, Máscara e Bata








Métodos

A recolha de saliva estimulada, foi realizada segundo Mussi e colaboradores (2016) (89), tendo por base o protocolo de recolha de saliva estimulada (Anexo 4) implementado pelo Laboratório SalivaTec da Universidade Católica Portuguesa – Centro Regional De Viseu. Este protocolo consiste na recolha de amostras de saliva em pacientes que se encontrem idealmente em jejum e não tenham realizado qualquer procedimento de higiene oral pelo menos 1 hora antes da recolha. Começou-se por adicionar gelo nos copos e de seguida colocar o tubo de 50mL dentro destes, sendo que só se voltou a retirar o tubo quando este foi armazenado. De seguida usou-se 25cm² de parafilme e dobrou-se em 4 instruiu-se o paciente a colocar o parafilme dobrado na boca mastigar a cada 2 segundos. Após 30 segundos, a 1^a acumulação de saliva foi descartada para dentro do copo, sendo as acumulações seguintes todas recolhidas para dentro do copo a cada 30 segundos. Repetir este passo durante 5 minutos ou até ser atingido um volume de 5mL. Terminando a recolha, tapou-se o tubo de 50 mL e colocou-se o copo e tubo numa caixa com gelo tendo o parafilme sido descartado para o copo ou para a folha de revestimento do parafilme. Por fim, procedeu-se ao processamento das amostras, caso este último passo não fosse possível proceder-se-ia ao armazenamento das amostras de saliva até estas poderem ser processadas (89). Após ser medido o pH e o fluxo salivar (volume de saliva por minuto de recolha) das amostras, estas foram armazenadas a -80°C para posterior utilização na PCR.

4. Recolha das amostras de biofilme

Materiais

Cone de papel esterilizado	
<i>Eppendorf</i> ou tubo de 1.5 mL	
Sonda Periodontal	
Arca congeladora -80°C	
Luvas, Máscara e Bata	

Métodos

De seguida foi recolhido biofilme de 4 zonas da cavidade oral, correspondentes às zonas com bolsas periodontais mais profundas. Com a ajuda de um cone de papel esterilizado, ou, em casos de maior resistência face ao uso do cone, de uma sonda periodontal para retirar o fluído crevicular presente nas bolsas dos pacientes, sendo este posteriormente armazenado num tubo de 1,5 ml (*ependorf*) com solução salina e colocado em gelo (89). As amostras foram armazenadas a -80°C para posterior processamento (Anexo 4).

5. Escolha de *primers*

A Tabela IV traduz o resultado no processo de escolha dos *primers*, que foi baseado na análise de outros estudos com a mesma, ou idêntica premissa na deteção de periodonto-patógenos na saliva ou biofilme, (90–92) tendo cada um dos pares de *primers* para o *16sRNA*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Filifator alocis* sido alinhado contra os genomas da base de dados da ferramenta *online Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), disponível no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), de forma a validar a sua especificidade para cada espécie bacteriana em estudo e ausência de alinhamento para *DNA* humano. Foi obtida especificidade entre 94% e 100% para cada espécie bacteriana.

Tabela IV - Sequência de *primers* utilizados no estudo.

Par de Primer	Sequência do primer	Temperatura de <i>annealing</i> (C°)	Tamanho esperado do fragmento (pb)	Ref
<i>16sRNA universal</i>	ACTCCTACGGGAGGCAG CCGRGAACGTATTCACCG	56	1049	(90)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	AGGCAGCTTGCCATATCTGGG ACTGTTAGCAAVTACCGATGT	57	404	(91)
<i>Tannerella forsythia</i>	GCGTATGTAACCTGCCCGCA TGCTTCAGTGTCAGTTATACCT	57	641	(91)
<i>Treponema denticola</i>	AGAGTTTGATCATGGCTC GTCGGCACCGAAGCTCTTGCCCCGACAC	57	900	(91)
<i>Filifator alocis</i>	CAGGTGGTTTAACAAGTTAGTGG CTAAGTTGTCCTTAGCTGTCTCG	55	594	(92)

6. Isolamento de ADN

Materiais







<i>InstaGene Matrix® Bio-Rad</i>	
Bloco de Aquecimento <i>Stuart Scientific</i>	
Agitador Magnético	
<i>Vortex Velp Scientific;</i>	
Micropipetas	
Pontas de 200µl e 1000µl	
<i>Eppendorf</i> ou tubo de 1.5 mL com biofilme ou <i>pellet</i> da saliva	
Centrifuga <i>Hettich Zentrifugen (Mikro 22R)</i>	
<i>NanoVue plus®</i>	
Luvas e bata	

Métodos

Foi realizada a extração de ADN das amostras, utilizando o protocolo do *InstaGene Matrix® Bio-Rad*, (Bio-Rad, USA, CA) que tem por base o método com fenol clorofórmio (Anexo 6). Para quantificação e verificação da qualidade do ADN extraído foi realizada a leitura das absorvâncias a 260 e 280 nm, num espectrofotómetro *NanoVue plus®*. (General Electric, USA, NY).

7. Amplificação de ADN em reação de PCR

Materiais

<i>CFX Connect Real Time-System[®]</i>	
<i>Primers</i>	
Micropipetas	
<i>NZYTaq 2x Green Master Mix</i>	
<i>DNA bacteriano de cada amostra</i>	
Controlo positivo adquirido de um banco de culturas para as estirpes <i>16sRNA</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Tannerella forsythia</i> e <i>Treponema denticola</i> .	
Água desionizada esterilizada	
Luvas e bata	

Métodos

As reações de amplificação de ADN (Reação em Cadeia da Polimerase) foram realizadas num termociclador, de modelo CFX Connect Real Time-System[®]. As condições de amplificação foram definidas em função da sequência dos *primers* utilizados, e dos fragmentos que se pretendiam amplificar (93,94).

A reação de PCR foi realizada com NZY[™]Taq 2x Green Master Mix num volume final de 25 µL com 1 µL de ADN para cada amostra e os respectivos *primers* a 10 µM. Foi realizada a amplificação com *primers* específicos para verificar a presença de bactérias (*primers* 16S do rRNA), de *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella Forsythia*, *Treponema denticola* e *Filifator alocis* sendo a temperatura de *annealing* alterada para cada primer segundo a Tabela IV (93,94). Foi ainda realizado o controlo positivo realizado a partir de de um banco de culturas para as estirpes *16sRNA*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*.

8. Electroforese em gel de agarose

Materiais

Tina de electroforese <i>Bio-Rad (power pac 300)</i>	
Agarose	
Micropipetas	
Pontas de 200µl e 1000µl	
TAE (solução tampão)	
Brometo de etídeo	
Transiluminador <i>UV Vilber Lournal</i>	

Marcador de peso molecular *NZYTech*

Métodos

Para se verificar o resultado da reação de PCR os produtos de amplificação foram corridos num gel de agarose (*Bio-Rad*[®]) a 1% realizado de acordo com as instruções do fabricante (Anexo 8). Foi adicionado brometo de etídio ao gel para possibilitar a visualização dos produtos de PCR num transluminador com fonte de ultravioletas. Durante as corridas foi utilizado o marcado *NZYTECH Ladder I* (Anexo 8).

9. Análise Estatística

Os dados obtidos foram registados em *Excel* e os testes estatísticos realizados com o programa *GraphPadPrism7.0*. Para cada uma das variáveis foi determinado se a distribuição da amostra era normal. Caso a amostra não fosse normal, realizava-se o teste de comparação não paramétrico – teste não paramétrico de *Mann Whitney*. Todos os testes foram utilizados considerando um erro alfa de 5%.

Resultados

Resultados

1. Caracterização da população

1.1. Caracterização sociodemográfica

A população observada neste estudo foi constituída por 31 indivíduos, pacientes na clínica dentária da Universidade Católica Portuguesa, sendo que 2 deles foram excluídos, um por não comparência na recolha de biofilme e outro porque as amostras biológicas recolhidas estavam contaminadas com sangue.

Na Tabela V são apresentados os dados sociodemográficos relativos à população em estudo. É possível constatar que a maioria (62%) é do sexo masculino e que a idade média é de 52 anos. Relativamente à dieta, esta é maioritariamente não mediterrânica (55%). É ainda importante salientar que 86% da amostra não tem hábitos tabágicos e que a maioria reside no meio urbano (55%).

Tabela V - Caracterização sociodemográfica e estilo de vida dos indivíduos (n=29).

Características		% indivíduos
Género	Feminino	37,93
	Masculino	62,07
Idade por género	Geral	Min. – Max. (Média ± DP)
	Feminino	21 – 83 (52,095 ± 12,625)
	Masculino	21 – 71 (51,36 ± 9,28)
		23 – 83 (52,83 ± 15,97)
Tipo de dieta	Mediterrânica	44,82
	Não mediterrânica	55,18
Hábitos Tabágicos	Fumador	10,35
	Não Fumador	86,21
	Ex-Fumador	3,44
Local de residência	Rural	44,83
	Urbano	55,17

1.2. Saúde Sistémica da população

Na Tabela VI são descritos os dados referentes à saúde sistémica da amostra podendo-se constatar uma reduzida taxa de diabéticos (10%), sendo 7% diabéticos tipo 1 e apenas 3% do tipo 2, pessoas com patologia cardiovascular (35%) e, inserida nesta, uma reduzida taxa de hipertensos (28%).

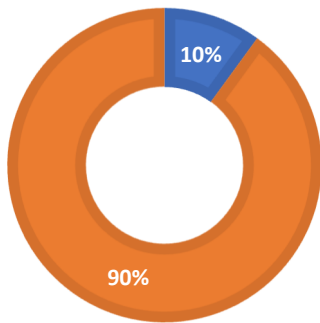
No entanto, estes valores são para a amostra inteira de 29 pacientes, sendo que os problemas de saúde são comuns ao grupo com patologia periodontal. Na Figura 1 está representado um aumento na taxa de diabéticos para 16% mostrando que estes são mais prevalentes no grupo teste do que no de controlo, o mesmo sendo observado na Figura 2, onde a prevalência da hipertensão aumenta para 42% e finalmente, na Figura 3, para pacientes com todo o tipo de problemas cardiovasculares a prevalência destes aumenta para 53%. O grupo de controlo é totalmente saudável, tendo em conta os problemas de saúde sistémica observados, como demonstram a Figura 1, 2 e 3.

Tabela VI – Caracterização da saúde sistémica auto reportada dos indivíduos (n=29).

Características		% indivíduos
Diabetes	Diabético	10,34
	Tipo 1	6,89
	Tipo 2	3,45
	Não Diabético	89,66
Hipertensão	Hipertenso	27,59
	Não hipertenso	72,41
Cardiovascular	Com patologia cardiovascular	34,48
	Sem patologia cardiovascular	65,52

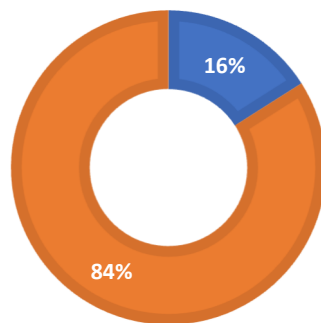
DIABETES (N=29)

■ Diabéticos ■ Não Diabéticos



DIABETES (N=19)

■ Diabéticos ■ Não Diabéticos



DIABETES (N=10)

■ Não Diabéticos

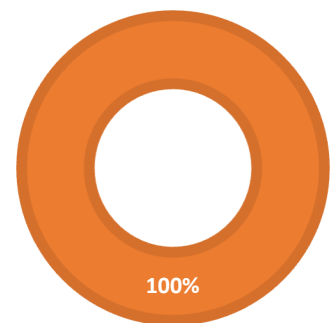
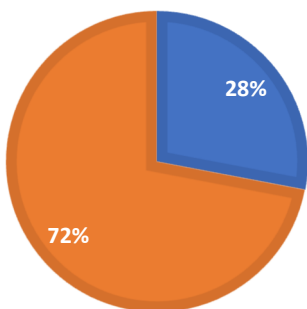


Figura 1 - Prevalência da diabetes. a) prevalência da diabetes na amostra total; b) prevalência da diabetes em indivíduos com PCA; c) prevalência da diabetes em indivíduos saudáveis

HIPERTENSÃO (N=29)

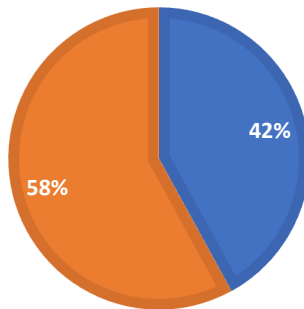
■ Hipertensos ■ Não Hipertensos



a)

HIPERTENSÃO (N=19)

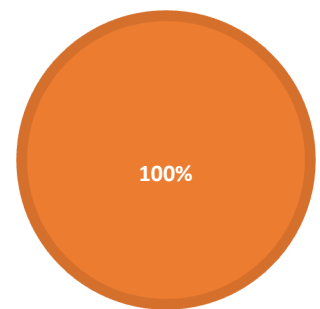
■ Hipertensos ■ Não Hipertensos



b)

HIPERTENSÃO (N=10)

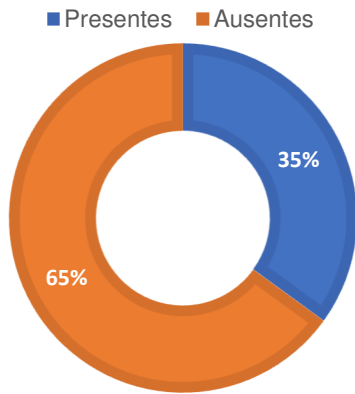
■ Não Hipertensos



c)

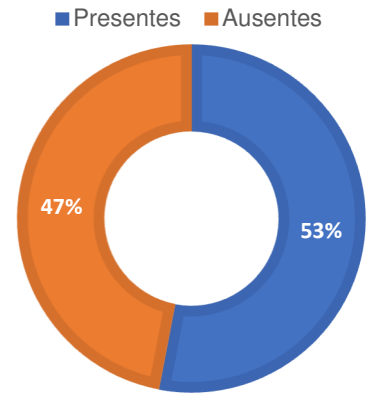
Figura 2 - Prevalência da hipertensão. a) prevalência da hipertensão na amostra total; b) prevalência da hipertensão em indivíduos com PCA; c) prevalência da hipertensão em indivíduos saudáveis.

PROBLEMAS CARDIOVASCULARES (N=29)



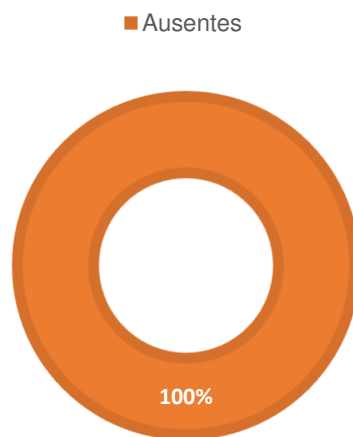
a)

PROBLEMAS CARDIOVASCULARES (N=19)



b)

PROBLEMAS CARDIOVASCULARES (N=10)



c)

Figura 3 - Prevalência de problemas cardiovasculares. a) prevalência de problemas cardiovasculares na amostra total; b) prevalência de problemas cardiovasculares em indivíduos com PCA; c) prevalência de problemas cardiovasculares em indivíduos saudáveis.

2. Avaliação oral

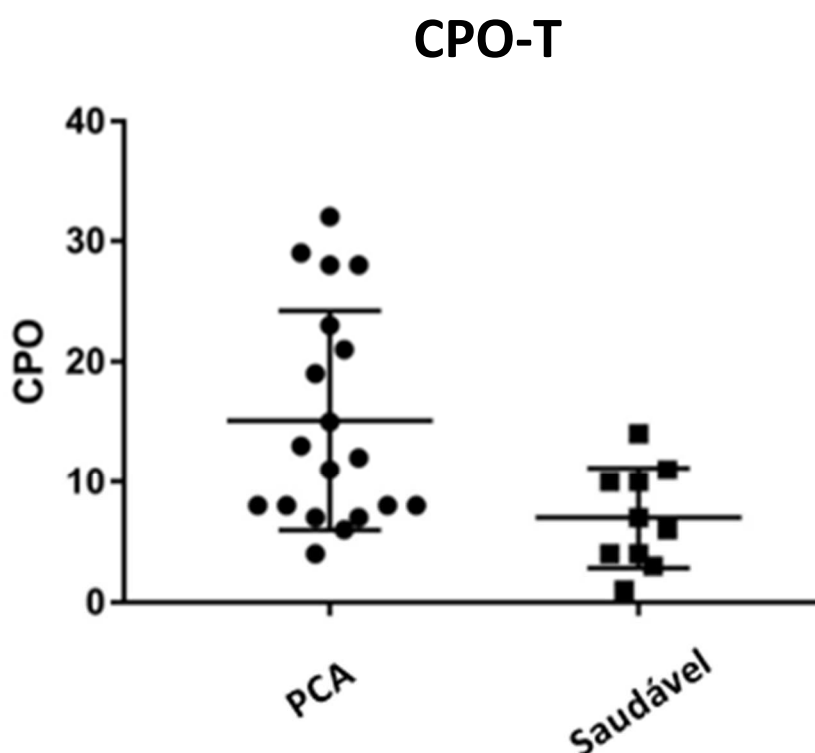
2.1. Avaliação periodontal

Na Tabela VII estão descritos os valores resultantes do exame clínico periodontal do grupo de controlo (saudável) e do grupo teste (PCA). No grupo teste verifica-se que o IP tem um valor médio de 78,47%, e BOP um valor médio de 39,91%, contrastando 29,88% de valor médio do IP e 1,853% de valor médio do BOP do grupo controlo.

Tabela VII – Avaliação periodontal observada na totalidade da amostra (n=29).

Código Quartzzy	Índice CPO-C	Índice CPO-P	Índice CPO-O	Índice CPO-CPO	Índice de Placa	PSR 1ºQ	PSR 2ºQ	PSR 3ºQ	PSR 4ºQ	PSR 5ºQ	PSR 6ºQ	BOP	Diagnóstico Periodontal
D01607	2	26	0	28	100	-	-	-	2	3	3	45	PCA
DO1608	2	6	0	8	54%	3	3	2	4	4	4	60,89	PCA
D01609	3	4	0	7	36,60	3	2	2	2	3	3	20,83	PCA
D01611	0	8	0	8	87%	3	3	3	3	4	-	82	PCA
DO1612	8	24	0	32	96,87	3	-	-	-	3	-	52,08	PCA
DO1613	3	3	2	8	80%	4	0	1	3	3	4	14,74	PCA
DO1614	0	4	0	4	100	4	3	4	4	3	3	14,88	PCA
DO1615	0	23	0	23	100	-	-	-	3	3	3	83,33	PCA
D01616	9	8	2	19	59,37	4	4	4	4	4	4	30,55	PCA
D01617	1	28	0	29	100	3	3	-	-	-	-	54,16	PCA
D01618	2	4	0	6	66,07	4	3	4	3	3	1	51,19	PCA
D01619	0	28	0	28	100	-	-	-	-	3	-	19,44	PCA
D01620	7	14	0	21	59,72	-	3	3	3	3	3	18,42	PCA
D01765	2	5	0	7	51,09	4	1	3	3	1	4	5,16	PCA
D01766	2	6	0	8	96,15	4	3	4	4	3	4	80,12	PCA
D01768	1	10	0	11	97,7	3	1	1	2	3	1	58,3	PCA
D01769	0	12	0	12	82	-	4	3	3	3	-	31,6	PCA
D01770	2	10	1	13	64,28	3	3	3	3	4	-	32,53	PCA
D01772	0	11	4	15	60	1	1	1	-	3	-	3,12	PCA
D01771	0	3	8	11	20	0	0	0	0	0	1	5	Saudável
D01773	3	0	4	7	32	0	0	0	0	0	0	0	Saudável
D01774	0	4	0	4	30	2	0	0	0	0	0	0	Saudável
D01775	0	3	11	14	30	0	0	0	0	0	0	2,13	Saudável
D01889	1	0	3	4	32	0	0	0	0	1	0	2	Saudável
D01890	0	0	10	10	31	0	0	0	0	0	0	1,13	Saudável
D01891	0	4	6	10	20	0	0	0	0	0	0	2,34	Saudável
D01892	0	0	1	1	34	0	0	0	0	0	0	3,12	Saudável
D01893	0	0	3	3	42	1	2	1	2	0	0	0,73	Saudável
D01894	0	2	4	6	27,8	0	0	0	0	1	0	2,08	Saudável
Valor médio					78,47%							39,91%	PCA
Valor médio					29,88%							1,853%	Saudável

Na Figura 4, quanto índice CPO-d Total, o grupo com patologia periodontal apresenta um valor médio de 15 dentes, com valor máximo de 32 e mínimo de 4, estes valores são mais acentuados devido aos dentes perdidos. Por outro lado, no grupo saudável os valores mais elevados são devidos a dentes restaurados, com um valor médio de 7 dentes, máximo de 14 e mínimo de 1. Com o teste de *Mann Whitney* verificou-se que as diferenças de valores são estatisticamente significativas ($p=0.0115$).



	PCA	Saudável
n (29)	19	10
Minimo	4	1
Percentil 25%	8	3.75
Mediana	12	6.5
Percentil 75%	23	10.25
Máximo	32	14
Média	15.11	7
Desvio padrão	9.11	4.137
Erro da média padrão	2.09	1.308
95% IC menor	10.71	4.044
95% IC maior	19.5	9.959

Tabela Analisada	Índice CPO total
Coluna B	Saudável
vs.	Vs.
Coluna A	PCA
Teste Mann Whitney	
P value	0.0115
P value exato ou aproximado?	Exato
Resumo P value	*
Significativamente diferente (P<0.05)?	Sim

Figura 4 - Índice CPO Total de pacientes do grupo teste (PCA) e do grupo controlo (saudável) (n=29).

A Figura 5 constitui os dentes cariados avaliados pelo índice CPO-d, sendo que o grupo com patologia periodontal apresenta um valor médio aproximado de 2 dentes, mínimo de 0 e máximo de 9 dentes. O grupo saudável apresenta um valor médio aproximado de 0 (0.4) dentes, mínimo de 0 dentes e máximo de 3. Com o teste de *Mann Whitney* verificou-se que as diferenças de valores são estatisticamente significativas ($p=0.0165$).

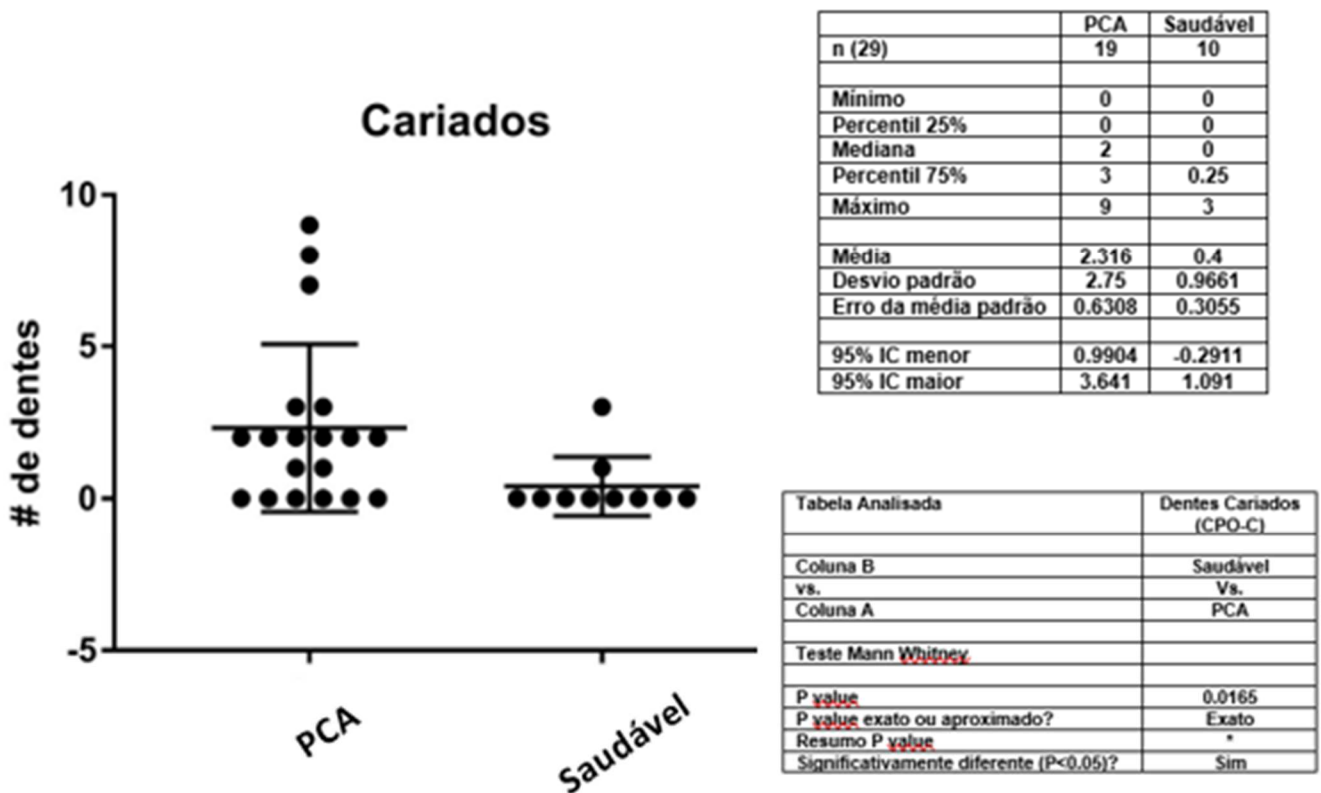


Figura 5 - Índice CPO-C de pacientes do grupo teste e do grupo de controlo (n=29).

A Figura 6 constitui os dentes perdidos avaliados pelo índice CPO-d, sendo que o grupo com patologia periodontal apresenta um valor médio aproximado de 12 dentes, mínimo de 3 e máximo de 28 dentes. O grupo saudável apresenta um valor médio aproximado de 2 (1.6) dentes, mínimo de 0 dentes e máximo de 4. Com o teste de *Mann Whitney* verificou-se que as diferenças de valores são estatisticamente significativas ($p < 0.0001$).

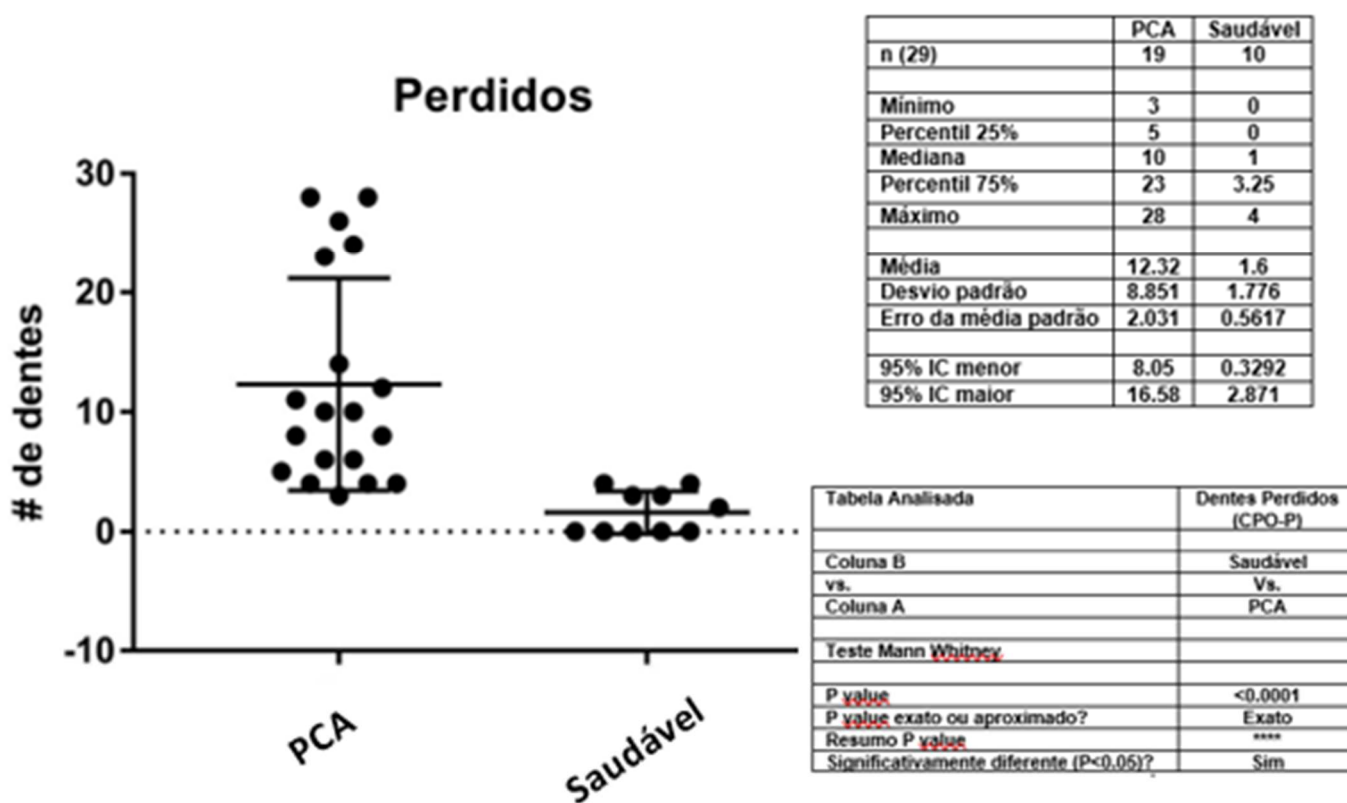


Figura 6 - Índice CPO-P de pacientes do grupo teste e do grupo de controlo (n=29).

A Figura 7 constitui os dentes obturados (restaurados) avaliados pelo índice CPO-d, sendo que o grupo com patologia periodontal apresenta um valor médio aproximado de 0 (0.4737) dentes, mínimo de 0 e máximo de 4 dentes. O grupo saudável apresenta um valor médio aproximado de 5 dentes, mínimo de 0 dentes e máximo de 11. Com o teste de *Mann Whitney* verificou-se que as diferenças de valores são estatisticamente significativas ($p < 0.0001$).

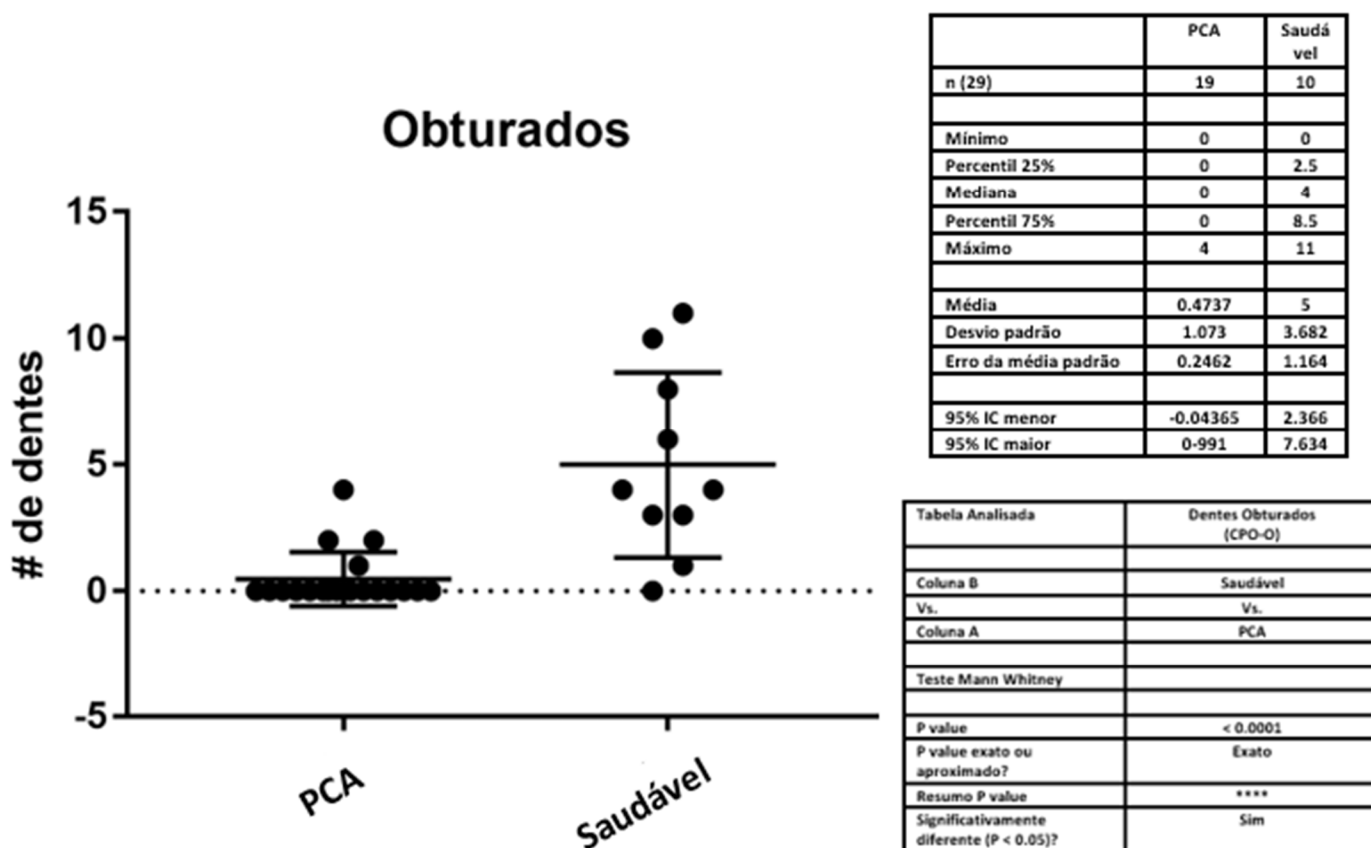
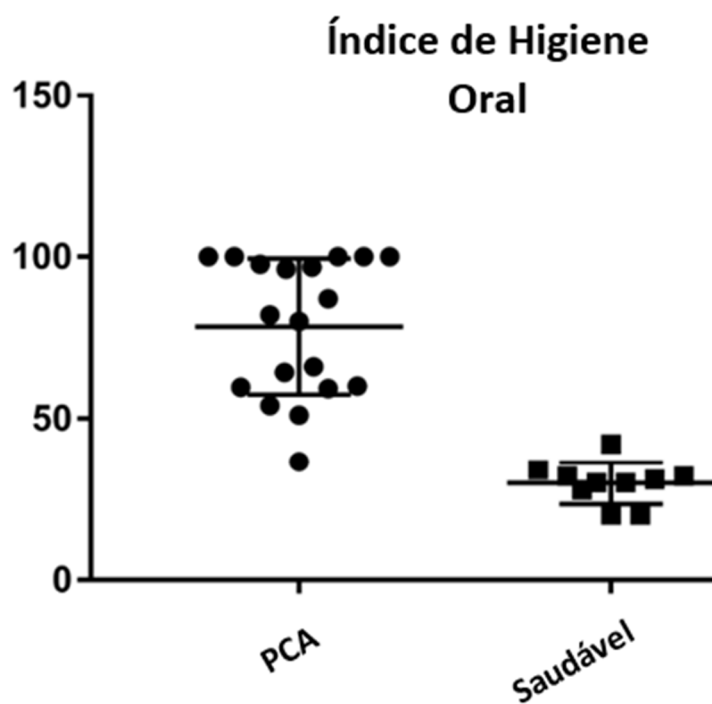


Figura 7 - Índice CPO-O de pacientes do grupo teste e do grupo de controlo (n=29).

A Figura 8, referente ao índice de higiene oral (IP), mostra que o valor médio de IP para o grupo com patologia periodontal é de 78.47%, com um valor máximo observado de 100% e mínimo de 36.6%, por outro lado o grupo saudável apresenta um valor médio de 29.88%, com um valor máximo observado de 42% e um mínimo de 20%. Com o teste de *Mann Whitney* verificou-se que as diferenças de valores são estatisticamente significativas ($p < 0.0001$).



	PCA	Saudável
n (29)	19	10
Mínimo	36.6	20
Percentil 25%	59.72	25.85
Mediana	82	30.5
Percentil 75%	100	32.5
Máximo	100	42
Média	78.47	29.88
Desvio padrão	21	6.444
Erro da média padrão	4.818	2.038
95% IC menor	68.34	25.27
95% IC maior	88.59	34.49

Tabela Analisada	Dentes Obturados (CPO-O)
Coluna B	Saudável
Vs.	Vs.
Coluna A	PCA
Teste Mann Whitney	
P value	< 0.0001
P value exato ou aproximado?	Exato
Resumo P value	****
Significativamente diferente (P < 0.05)?	Sim

Figura 8 - Índice de higiene oral de pacientes do grupo teste e do grupo de controlo (n=29).

A Figura 9, relativa ao *periodontal screening record* (PSR), mostra que no grupo saudável se observou um paciente com valores de PSR de 1 e 2. Por outro lado, no grupo com patologia periodontal, valores de PSR de 3 e 4 são comuns a todos os constituintes deste grupo, sendo que no grupo com patologia periodontal o valor médio é 3, sendo o máximo 4 e o mínimo 1 numa amostra de 10 pessoas. No grupo saudável o valor médio é 0 (0.2) dentes sendo o máximo 1 e o mínimo 0. Com o teste de *Mann Whitney* verificou-se que as diferenças de valores são estatisticamente significativas ($p < 0.0001$).

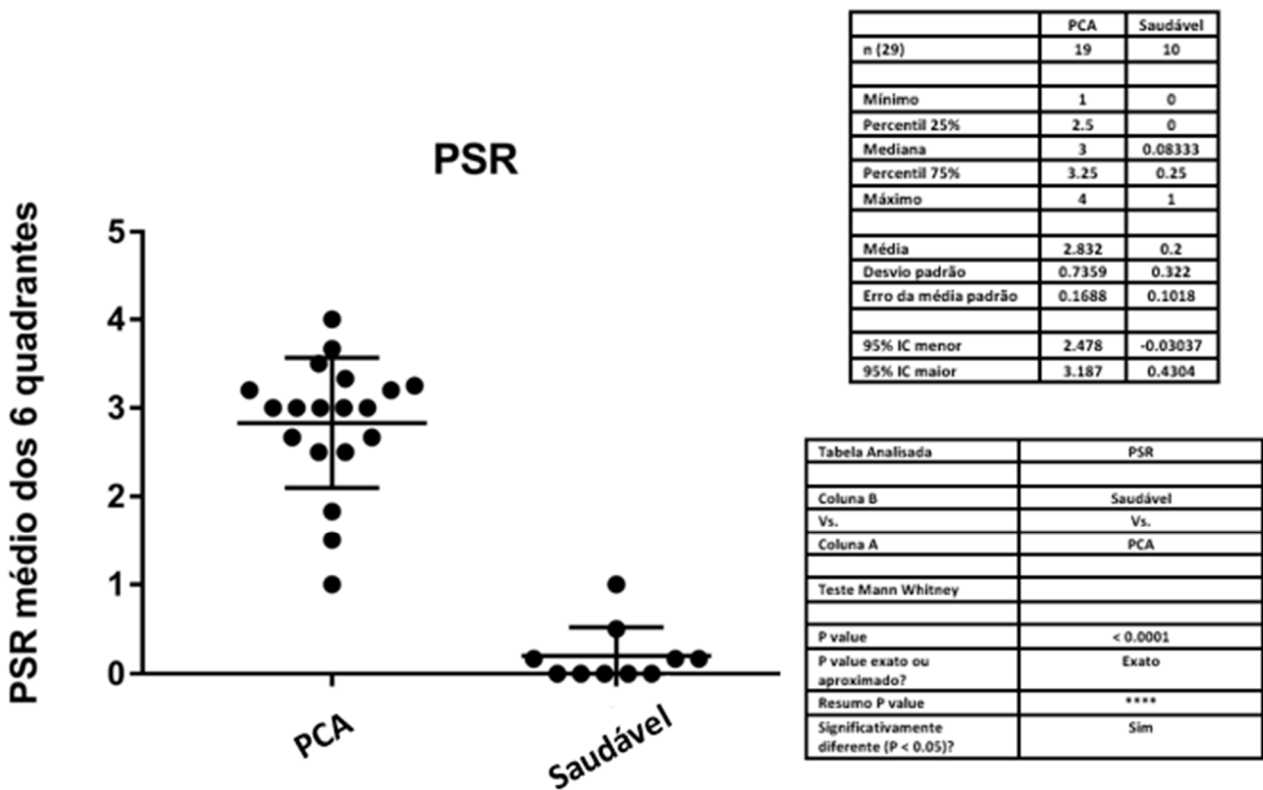
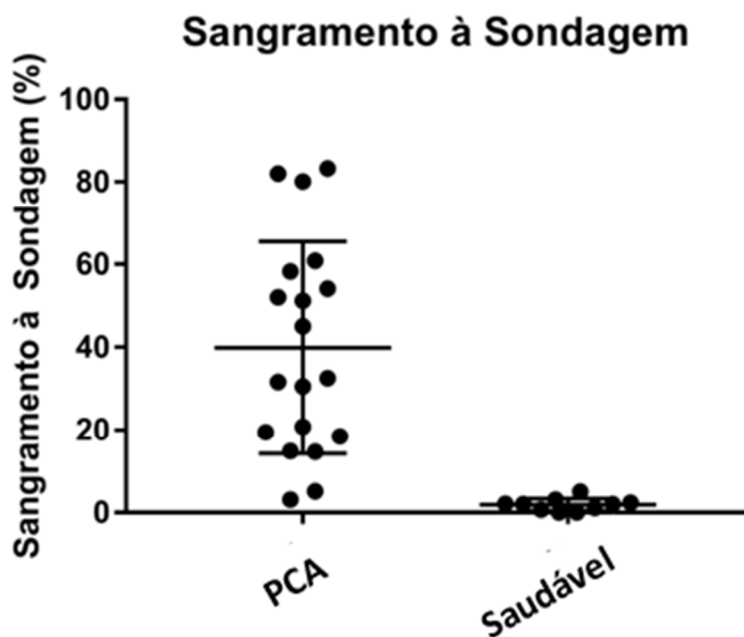


Figura 9 - Registo periodontal simplificado (PSR) de pacientes do grupo teste e do grupo de controlo (n=29).

A Figura 10, referente ao sangramento à sondagem (BOP), mostra que o valor médio de BOP para o grupo com patologia periodontal é de 39.91%, com um valor máximo observado de 83.33% e mínimo de 3.12%, por outro lado o grupo saudável apresenta um valor médio de 1.853%, com um valor máximo observado de 5% e um mínimo de 0%. Com o teste de *Mann Whitney* verificou-se que as diferenças de valores são estatisticamente significativas ($p < 0.0001$).



	PCA	Saudável
n (29)	19	10
Mínimo	3.12	0
Percentil 25%	18.42	0.5475
Mediana	32.53	2.04
Percentil 75%	58.3	2.535
Máximo	83.33	5
Média	39.91	1.853
Desvio padrão	25.64	1.551
Erro da média padrão	5.882	0.4778
95% IC menor	27.55	0.7721
95% IC maior	52.77	2.934

Tabela Analisada	Sangramento à Sondagem (BOP)
Coluna B	Saudável
Vs.	Vs.
Coluna A	PCA
Teste Mann Whitney	
P value	< 0.0001
P value exato ou aproximado?	Exato
Resumo P value	****
Significativamente diferente (P < 0.05)?	Sim

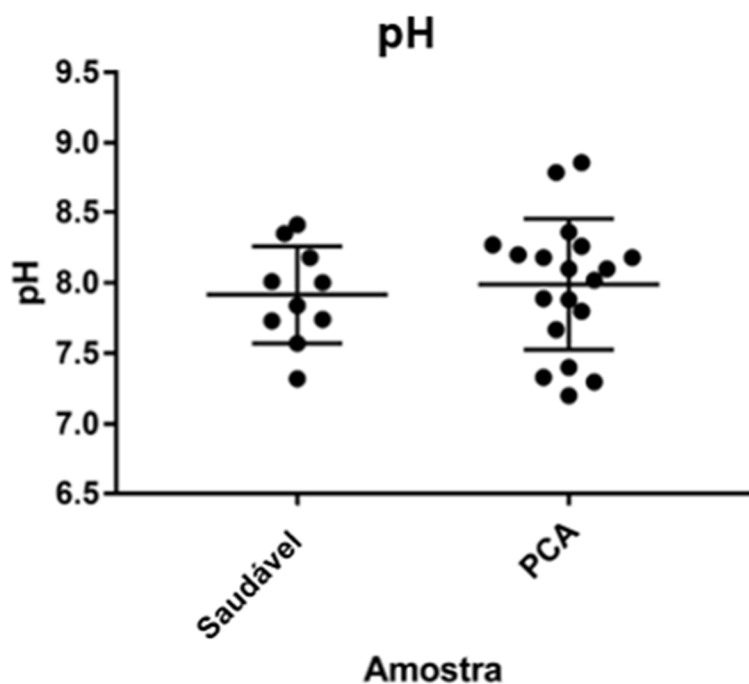
Figura 10 - Sangramento à sondagem (BOP) de pacientes do grupo teste e do grupo de controlo (n=29).

2.2. Parâmetros da Saliva

Na Tabela VIII e Figuras 11 e 12 são apresentados os dados do pH da saliva e do fluxo salivar dos indivíduos observados. Verifica-se que os pacientes com PCA têm tendência a apresentar um fluxo salivar menor (1471 μ L) do que o dos pacientes sem patologia periodontal (2226 μ L), embora as diferenças não sejam estatisticamente significativas ($p=0,1014$). Verifica-se pela figura que há um valor *outlier* em cada um dos grupos, no entanto, a remoção dos mesmos da análise não alterou os resultados. Na Figura 11, na qual estão representados os dados do pH das amostras, os valores são muito próximos uns dos outros, sendo a diferença de médias mínima, constatando-se que os pacientes com PCA apresentam um pH salivar médio ligeiramente superior (pH 7,989) ao pH salivar médio dos indivíduos sem patologia periodontal (pH 7,915).

Tabela VIII – Parâmetros da saliva na totalidade da amostra (n=29).

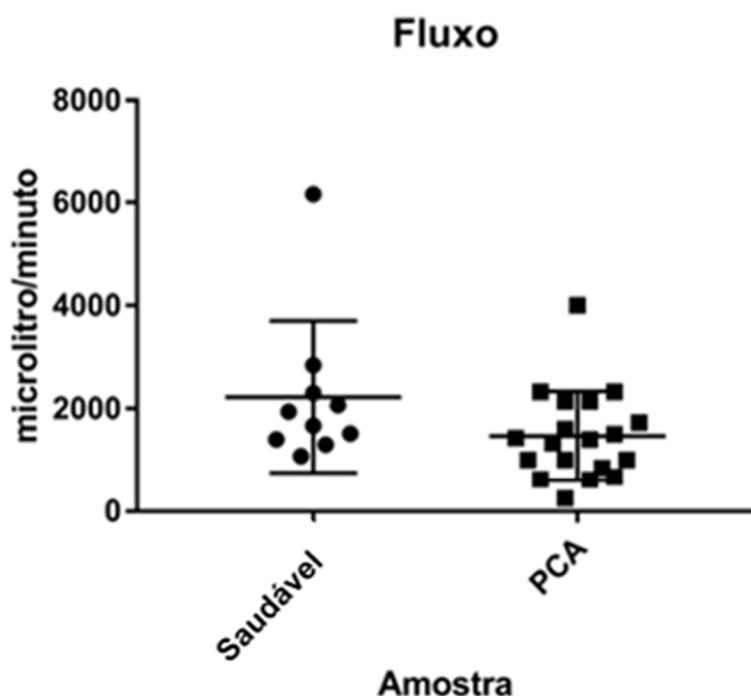
CÓDIGO QUARTZY	FLUXO (μ L/MIN)	PH	CONDIÇÃO PERIODONTAL
1607	625,0	7,33	PCA
1608	1404,0	7,67	PCA
1609	846,2	8,26	PCA
1611	1000,0	7,89	PCA
1612	1000,0	8,18	PCA
1613	1333,3	8,18	PCA
1614	1000,0	7,4	PCA
1615	666,7	8,1	PCA
1616	4000,0	8,1	PCA
1617	615,4	7,2	PCA
1618	1500,0	8,02	PCA
1619	250,0	7,8	PCA
1620	2142,9	8,79	PCA
1765	2333,3	8,86	PCA
1766	2333,3	8,2	PCA
1768	1428,6	8,27	PCA
1769	1733,3	8,36	PCA
1770	1600,0	7,88	PCA
1772	2142,9	7,3	PCA
1771	2066,7	7,74	Saudável
1773	1666,7	8	Saudável
1774	6153,8	7,57	Saudável
1775	1515,2	7,32	Saudável
1889	1076,9	8,35	Saudável
1890	2840,0	8,41	Saudável
1891	1942,9	8,18	Saudável
1892	1300,0	8,01	Saudável
1893	2300,0	7,84	Saudável
1894	1400,0	7,73	Saudável
VALOR MÉDIO	1471	7,989	PCA
VALOR MÉDIO	2226	7,915	Saudável



	Saudável	PCA
n (29)	10	19
Mínimo	7.32	7.2
Percentil 25%	7.69	7.67
Mediana	7.92	8.1
Percentil 75%	8.223	8.26
Máximo	8.41	8.86
Média	7.915	7.989
Desvio Padrão	0.3439	0.4637
Erro da média padrão	0.1087	0.1064
95% IC menor	7.669	7.765
95% IC maior	8.161	8.212

T-Test não emparelhado	
P value	0.6615
Resumo do valor do P	ns
Significativamente diferente (P < 0.05)?	Não
P value monocaudal ou bicaudal	Bicaudal
T, df	T = 0.4427, df = 27

Figura 11 - pH salivar de pacientes do grupo teste e do grupo de controlo (n=29).



	Saudável	PCA
n (29)	10	19
Mínimo	1077	250
Percentil 25%	1375	846.2
Mediana	1805	1404
Percentil 75%	2435	2143
Máximo	6154	4000
Média	2226	1471
Desvio Padrão	1475	867.3
Erro da média padrão	466.6	199
95% IC menor	1171	1053
95% IC maior	3282	1889

Tabela Analisada	Fluxo
Coluna B	PCA
vs.	vs.
Coluna A	Saudável
Mann Whitney test	
P value	0,1014
P value exato ou aproximado	Exato
Resumo P value	ns

Figura 12 - Fluxo salivar de pacientes do grupo teste e do grupo de controlo (n=29).

3. Periodonto-patógenos na saliva e biofilme dentário

3.1. Periodonto-patógenos na saliva

Na tabela IX estão descritos os resultados para a presença ou ausência, na saliva, de periodonto-patógenos específicos da PCA, verificando-se que todos os periodonto-patógenos estudados foram detetados tanto em pacientes saudáveis como em pacientes com patologia periodontal. *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* foram detetados em 100% (29/29) nos dois grupos da amostra, enquanto que *Porphyromonas gingivalis* foi detetado em 84% (16/19) do grupo teste e em 30% (3/10) do grupo de controlo. O *Filifator alocis*, por sua vez, foi detetado em 47% (9/19) do grupo teste e em 50% (5/10) do grupo de controlo.

Tabela IX – Presença (x) dos periodonto-patógenos na saliva para cada indivíduo (n=29).

	Código Biobanco	16S RNA	<i>Tannerella forsythia</i>	<i>Treponema denticola</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Filifator alocis</i>
PCA	DO1607	X	X	X	X	
	DO1608	X	X	X	X	
	DO1609	X	X	X	X	
	DO1611	X	X	X	X	
	DO1612	X	X	X	X	
	DO1613	X	X	X	X	
	DO1614	X	X	X	X	
	DO1615	X	X	X	X	X
	DO1616	X	X	X	X	X
	DO1617	X	X	X	X	X
	DO1618	X	X	X	X	X
	DO1619	X	X	X		
	DO1620	X	X	X	X	X
	DO1765	X	X	X		
	DO1766	X	X	X	X	
	DO1768	X	X	X	X	X
	DO1769	X	X	X	X	X
	DO1770	X	X	X	X	X
	DO1772	X	X	X	X	X
SAUDÁVEL	DO1771	X	X	X		
	DO1773	X	X	X		X
	DO1774	X	X	X		X
	DO1775	X	X	X		
	DO1889	X	X	X	X	X
	DO1890	X	X	X	X	X
	DO1891	X	X	X		X
	DO1892	X	X	X		
	DO1893	X	X	X		
	DO1894	X	X	X	X	

3.2. Periodonto-patógenos no biofilme

Na Tabela X estão descritos os resultados para a presença ou ausência, no biofilme, de periodonto-patógenos específicos da PCA, verificando-se que todos os periodonto-patógenos estudados foram detetados tanto em pacientes saudáveis como em pacientes com patologia periodontal à exceção de *Phorphyromonas gingivalis* e de *Filifator alocis*. *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* foram detetados em 100% (19/19) do grupo teste, sendo, no entanto, o primeiro detetado em 40% (4/10) do grupo de controlo e o segundo em 90% (9/10) desse mesmo grupo. *Porphyromonas gingivalis* foi detetado em 89% (17/19) do grupo teste e em 0% (0/10) do grupo de controlo enquanto que, *Filifator alocis*, foi detetado em 42% (8/19) do grupo teste e em 0% (0/10) do grupo de controlo.

Tabela X – Presença (x) dos periodonto-patógenos no biofilme de cada indivíduo (n=29).

	Código Biobanco	16S RNA	<i>Tannerella forsythia</i>	<i>Treponema denticola</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Filifator alocis</i>
PCA	DO1607	X	X	X	X	
	DO1608	X	X	X	X	
	DO1609	X	X	X	X	
	DO1611	X	X	X	X	X
	DO1612	X	X	X	X	
	DO1613	X	X	X	X	
	DO1614	X	X	X	X	
	DO1615	X	X	X	X	X
	DO1616	X	X	X	X	X
	DO1617	X	X	X	X	
	DO1618	X	X	X	X	X
	DO1619	X	X	X	X	
	DO1620	X	X	X	X	X
	DO1765	X	X	X		
	DO1766	X	X	X	X	
	DO1768	X	X	X	X	X
DO1769	X	X	X	X	X	
DO1770	X	X	X	X	X	
DO1772	X	X	X	X		
SAUDÁVEL	DO1771	X		X		
	DO1773	X		X		
	DO1774	X	X	X		
	DO1775	X	X	X		
	DO1889	X	X	X		
	DO1890	X		X		
	DO1891	X		X		
	DO1892	X				
	DO1893	X		X		
	DO1894	X	X	X		

Discussão

Discussão

A análise de dados é essencial para uma diferenciação, a nível microbiológico, de um estado periodontal saudável e de um com doença periodontal instalada. O estado de saúde e de doença periodontal serão relacionados com o tipo de população estudada, avaliação da cavidade oral com base em vários parâmetros e na presença ou ausência de patógenos popularmente ligados à periodontite crónica avançada.

1. Saúde sistémica e sociodemográfica

Os resultados da caracterização populacional deste estudo mostram que a maior parte dos indivíduos que aderiram ao estudo são do sexo masculino (62,07%) apresentando este estudo uma percentagem um pouco mais elevada do que os 48% normalmente analisados na população total e 42% na população acima de 65 anos (95,96). As mulheres que participaram neste estudo apresentam uma idade média praticamente igual à dos homens, devendo-se esta proximidade ao facto de terem sido recolhidas amostras de dois grupos etários diferentes devido à extrema dificuldade em encontrar pacientes mais idosos sem doença periodontal instalada na clínica universitária da Universidade Católica Portuguesa, fazendo com que as idades mínimas e máximas de cada um dos géneros apresente uma grande discrepância.

A maior parte dos participantes do estudo refere uma dieta não mediterrânica (55%) estando distribuídos tanto pelo grupo controlo como pelo de teste equitativamente assim como os indivíduos que referem dieta mediterrânica indo isto contra os resultados do estudo de Schröder, H e colaboradores (2011) (97), no qual foi concluído que uma maior aderência à dieta mediterrânica estaria associada com um elevado risco de problemas cardiovasculares, algo que não foi observado neste estudo.

A maior parte dos indivíduos habita numa zona urbana (55,17%) e são não fumadores (86,21%). A baixa percentagem de fumadores e de ex-fumadores (10,35% e 3,44% respetivamente) traduz-se em 4 pessoas, estando estas distribuídas por 2 fumadores no grupo controlo e 1 fumador e 1 ex-fumador no grupo teste. Estes dados permitem afirmar que embora o tabaco e a evolução da doença periodontal estejam associados, não foi possível observar tal neste estudo. No entanto, segundo um estudo de Chaffee e colaboradores (2016) (98) podemos concluir que os indivíduos fumadores do grupo de controlo correrão mais riscos em desenvolver doença periodontal do que os não fumadores pois estes encontram-se mais propensos a desenvolver, na sua cavidade oral, condições para periodonto-patógenos se instalarem (98).

Quanto à saúde sistémica, a maior parte dos indivíduos (89,66%) relatou não ser diabético, não hipertenso (72,41%) e sem patologias cardiovasculares (65,52%), sendo que estes resultados variam bastante dos valores da população portuguesa (99), onde 23,8% sofrem de diabetes, 71,3% são hipertensos e 30% morrem devido a patologia cardiovascular (96,100). Os valores obtidos, podem encontrar-se adulterados devido ao facto de estar a ser analisada a amostra total e não somente o grupo teste, onde todas as patologias estão presentes, sendo assim amenizados os números reais.

O grupo de controlo é um grupo aparentemente saudável em todos os aspetos, não apresentando qualquer indivíduo diabético, com hipertensão ou qualquer outro problema cardiovascular. O grupo teste por outro lado, já apresenta valores mais próximos e em alguns pontos mais graves do que a população normal portuguesa (99) com 16% de diabéticos neste grupo, 42% de hipertensos e 53% com problemas cardiovasculares (incluindo a hipertensão).

2. Saúde oral

Ambos os grupos foram avaliados quanto ao índice CPO-d, PSR, IP, BOP com o objetivo de estabelecer uma relação de causalidade entre a periodontite crónica avançada e um estado de saúde oral deteriorado.

Ao analisar resultados do índice CPO Total podemos observar que o grupo teste (PCA) apresenta 1 caso com 32 dentes afetados sendo que este é maioritariamente marcado por dentes perdidos ($12,32 \pm 8,851$), ou seja, dentes que após perda de inserção clínica e contínua higiene oral deficiente foi esfoliado (3,13). O valor máximo observado no grupo controlo para o CPO-d total é de 14 dentes, tratando-se de casos em que grande parte dos dentes estão restaurados ($5 \pm 3,682$) e os dentes perdidos são os dentes do siso ou nenhum ($1,6 \pm 1,776$). No entanto, os dentes perdidos são os que mais contribuem para a índice CPO-d, sejam do siso ou não, em paciente saudável ou não, como observado por Rebelo e colaboradores em 2015 (101).

O grupo controlo com uma média de CPO-d total de $7 \pm 4,137$ e sabendo-se que grande parte destes dentes são dentes obturados e não perdidos nem cariados não lhe confere gravidade elevada. Por outro lado, o grupo teste apresenta uma media do índice CPO-d total de $15,11 \pm 9,11$ colocando este grupo ao mesmo nível que a população estudada por Calado e colaboradores (23) em que a média era de CPO-d total era $16,17 \pm 0,28$.

Quanto ao índice de higiene oral foi possível observar que os pacientes do grupo de controlo apresentam baixos níveis de placa bacteriana com uma média de $29,88 \pm 6,444$, máximo de 42% e mínimo de 20%, em comparação com a média de $78,47\% \pm 21$, máximo de 100% e mínimo de 36,6%, $29,88 \pm 6,444$ do grupo teste. Os valores mais baixos de placa bacteriana no grupo teste podem ser explicados pelo facto da avaliação da placa bacteriana ter sido realizada numa consulta de controlo já tendo ocorrido tratamento periodontal prévio (12,13,21).

Quanto ao sangramento à sondagem, característico na periodontite crónica avançada (15), o grupo controlo apresenta uma média de $1,853\% \pm 1,551$, em que o máximo valor detetado de BOP foi de 5%, comparada com os elevados $39,91\% \pm 25,64$ de média do grupo teste, traduzindo-se assim um valor muito elevado de sangramento à sondagem no grupo teste (15).

O PSR do grupo controlo apresenta uma média de $0,2 \pm 0,322$ que comparado com os $2,832 \pm 0,7359$ do grupo teste traduzem uma gravidade periodontal extremamente acrescida neste último (22).

Tanto o índice de higiene oral, como o BOP, como o PSR nos ajudam a diagnosticar clinicamente a doença periodontal, e através da análise destes dados e, analisando as médias de cada um deles, obtemos valores típicos de um caso de periodontite crónica avançada, tendo sido estes os valores observados juntamente com ortopantomografia para diagnosticar a doença periodontal.

3. Parâmetros da saliva: relação com PCA

Para além de um agravar nos valores de IP, BOP e PSR, segundo Rosa e colaboradores (32) com a evolução da periodontite a produção de saliva também é afetada, o que foi observado nos resultados deste trabalho através da análise estatística do fluxo salivar. O grupo controlo apresenta uma média bem superior de fluxo salivar ($2226 \mu\text{L}/\text{min}$) comparativamente ao grupo teste ($1471 \mu\text{L}/\text{min}$) comprovando assim, até numa amostra modesta que o fluxo salivar é afetado assim como as defesas da cavidade oral em pacientes com periodontite crónica avançada (48).

O pH médio da saliva, neste estudo, apresenta praticamente os mesmos valores tanto no grupo teste como no grupo controlo indo contra o estudo de Rajesh e colaboradores (102) em que foi observado um aumento do pH em grupos com periodontite comparativamente a grupos saudáveis.

4. Periodonto-patógenos na saliva e biofilme dentário

Neste estudo, ao analisar os resultados referentes à presença de periodonto-patógenos na amostra total, foi possível observar uma grande diferença entre os dois grupos. Quando foi analisada a saliva não obtemos especificidade quanto à doença periodontal, pois todos os periodonto-patógenos foram detetados tanto no grupo controlo como no grupo teste, ou seja, indivíduos diagnosticados como saudáveis apresentam periodonto-patógenos específicos da PCA na sua saliva. Isto pode ser explicado pelo facto destes microrganismos poderem estar em presentes em carga suficiente na cavidade oral podendo ser detetados na saliva mesmo em pacientes saudáveis. Este facto pode ser confirmado pelos estudos de Schmidt (83) e Aruni (66) que comprovam a existência em baixos níveis de *Porphyromonas gingivalis* e de *Filifator alocis* na cavidade oral de indivíduos saudáveis, no entanto se não existirem bolsas periodontais estes não conseguem expressar os seus fatores de virulência (78). Quanto à presença de *Treponema denticola* e de *Tannerella forsythia* em pacientes saudáveis, estudos de Dashper (70) e Ezzo (75), mostram que estes microrganismos fazem parte do ecossistema oral saudável, explicando-se assim a presença de *T.denticola*, *T. forsythia*, *F. alocis* e de *P. gingivalis* na saliva de pacientes saudáveis neste estudo.

Quando se procedeu à análise do biofilme dentário nas bolsas, *Porphyromonas gingivalis* e *Filifator alocis* não foram detetados em pacientes saudáveis traduzindo-se isto num valor preditivo negativo na evolução da patologia periodontal. *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia* foram detetados em pacientes saudáveis. No entanto, devido a serem detetados nesse mesmo estado oral, com frequência (70,75,76), não é admitida gravidade face à sua deteção. Se não existir *Porphyromonas gingivalis* e *Filifator alocis* então não existem fatores de virulência capazes de comunicar com *T. denticola* e *T. forsythia* desencadeando a conversão de um estado de saúde oral para um de doença (78).

Filifactor alocis foi escolhido para este estudo devido à sua relação específica com a doença periodontal avançada progressiva comprovada em estudos por Aruni (66,67,85,103). A sua presença abundante no biofilme de bolsas periodontais de indivíduos com a doença pode ser usada como marcador para o diagnóstico desta. Devido às suas características únicas, *Filifactor alocis* pode ser considerado um microrganismo com um papel fundamental na dinâmica da comunidade microbiana devido à capacidade de estabelecer ligações sinérgicas com outras bactérias durante o estado de doença (66,85).

Segundo Aruni e colaboradores (85), *Filifactor alocis* mostra uma grande capacidade de maximizar os fatores de virulência de *P. gingivalis*. Ocorreu um maior desenvolvimento de biofilme e uma maior capacidade de aderência e penetração em células epiteliais quando ambos estavam presentes no biofilme comparativamente a quando se encontravam isolados (85).

Deste modo neste estudo pode-se concluir que os 8 pacientes nos quais foi detetado *F. alocis* no biofilme das bolsas periodontais apresentam uma doença periodontal mais avançada que os outros em que tal microrganismo não foi detetado. Outra hipótese é a intervenção de tratamento periodontal já realizado nos outros 9 pacientes do grupo teste não sendo detetado *F. alocis* mas sim *P. gingivalis*, deste modo a doença periodontal está presente mas não apresenta risco elevado de evolução (85).

Nos pacientes DO1619 e DO1765 não foi detetado *Porphyromonas gingivalis* nem *Filifactor alocis*, podendo tratar-se de doença periodontal em fase de tratamento ou controlada.

Conclusões

Conclusões

Este estudo permitiu a caracterização bem-sucedida de uma amostra da população de pacientes com periodontite crónica avançada na clínica dentária da Universidade Católica Portuguesa tanto a nível sociodemográfico como microbiológico. Com a deteção molecular de periodonto-patógenos em saliva e biofilme, foi possível distinguir os pacientes DO1619 e DO1765 como prováveis casos de PCA tratada (sobre diagnóstico periodontal) devido à ausência do principal microrganismo na evolução da PCA, a *Porphyromonas gingivalis*. Para além disto foi possível, a partir de comparações com outros estudos, estabelecer uma correlação entre periodonto-patógenos e a periodontite crónica avançada, como é o caso mais específico da *Porphyromonas gingivalis* e *Filifactor alocis* presentes em conjunto no biofilme de bolsas periodontais profundas.

Com este estudo, é possível concluir que o tratamento periodontal não tem como objetivo eliminar os periodonto-patógenos da cavidade oral do paciente, visto estes fazerem parte do ecossistema desta, mas sim eliminar ou reduzir as bolsas periodontais dos pacientes de modo a que os periodonto-patógenos não tenham condições de organização em simbiose para continuar a evolução da doença periodontal em locais específicos como bolsas periodontais.

Referências

Referências

1. Mariotti A, Hefti AF. Defining periodontal health. *BMC Oral Health* [Internet]. 2015;15(1):1–18. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4580771&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
2. Hefti a F. Periodontal probing. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1997;8(3):336–56.
3. Page RC, Eke PI. Case Definitions for Use in Population-Based Surveillance of Periodontitis. *J Periodontol* [Internet]. 2007;78(7s):1387–99. Available from: <http://www.joponline.org/doi/10.1902/jop.2007.060264>
4. Tonetti MS, Claffey N. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research: Group C Consensus report of the 5th European workshop in periodontology. In: *Journal of Clinical Periodontology*. 2005. p. 210–3.
5. Van Der Velden U. Purpose and problems of periodontal disease classification. Vol. 39, *Periodontology 2000*. 2005. p. 13–21.
6. Wolf DL, Lamster IB. Contemporary Concepts in the Diagnosis of Periodontal Disease. Vol. 55, *Dental Clinics of North America*. 2011. p. 47–61.
7. Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2004;34:9–21.
8. BEDRAN BL, NOGUEIRA NM, SPOLIDORIO C, ESTRELA C, SPOLIDORIO MP. Patógenos Periodontais: Comparação entre Cultura Bacteriana e PCR em Tempo Real para Teste Diagnóstico. *Rev Odontol Bras Central*. 2010;19(50).
9. Bessa AB. Estabelecimento de protocolos de diagnóstico de agentes microbianos associados à periodontite. Vol. Master, Centro Regional das Beiras - Departamento de Ciências da Saúde. Universidade Católica Portuguesa; 2011.
10. Examination CP. Parameter on comprehensive periodontal examination. *American Academy of Periodontology. J Periodontol*. 2000;71(5 Suppl):847–8.
11. Informed Health online. How does the periodontium work? [Internet]. PubMedHealth. 2014. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0072803/>
12. Nuto et al. SAS. Aspectos culturais na compreensão da periodontite crônica: um estudo qualitativo. *Cad Saúde Pública*. 2007;23(3):681–90.
13. Oliveira ACG. Caracterização do perfil microbiológico do biofilme subgengival de indivíduos com periodontite crônica e com saúde periodontal por meio do estudo de espécies bacterianas incomuns ou ainda não cultivadas. UnG Centro de Pós Graduação Pesquisa. Universidade de Guarulhos; 2011.
14. National Institute of Dental and Craniofacial Research. Periodontal Disease in Adults (Age 20 to 64) [Internet]. NICDR; 2014. Available from: <https://www.nidcr.nih.gov/DataStatistics/FindDataByTopic/GumDisease/PeriodontaldiseaseAdults20to64.htm>
15. AAP. The pathogenesis of periodontal diseases. *J Periodontol* [Internet]. 1999;70(4):457–70. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=10328661&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/doi/10.1902/jop.1999.70.4.457>

16. Giárola RC. Bolsa Periodontal. Universidade Estadual de Campinas; 1985.
17. Bianchini M. Periodontite Crônica: causas e identificação. PróteseNews [Internet]. 2015; Available from: <http://www.inpn.com.br/ProteseNews/Materia/Index/132223>
18. Armitage GC. Classifying periodontal diseases - a long standing dilemma. *Periodontol 2000*. 2002;9(23):309–23.
19. Santos NBM. Protocolos de diagnóstico de doença Periodontal baseados na evidência científica. 2010;17–24.
20. Nazir MA. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2017;1(2):72–80.
21. Lencová E, Broukal Z, Dusková J. Psychosocial, behavioural and oral health indicators--review of the literature. *Prague Med Rep* [Internet]. 2006;107(3):305–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17385403>
22. Landry RG, Jean M. Periodontal Screening and Recording (PSR) Index: precursors, utility and limitations in a clinical setting. *Int Dent J* [Internet]. 2002;52(1):35–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11931220>
23. Calado R, Ferreira CS, Nogueira P, Melo PR. III Estudo Nacional de Prevalência das Doenças Orais [Internet]. *Direção-Geral da Saúde*; 2015. p. 154. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27981568>
24. World. Health. Organization. Periodontal country profile. [Internet]. Geneva; 2010. Available from: <http://www.dent.niigata-u.ac.jp>
25. Who. Oral Health Surveys - Basic Methofd. *World Heal Organ*. 2013;1.137.
26. Nunn ME. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. *Periodontol 2000*. 2003;32(1):11–23.
27. Persson GR. What has ageing to do with periodontal health and disease? *Int Dent J* [Internet]. 2006;56(4 Suppl 1):240–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16972399>
28. Periodontology AA of. Position Paper Epidemiology of Periodontal Diseases. *J Periodontol 2005*. 2005;76(8):1406–19.
29. Socransky SS, Haffage AD, Cugini MA, SMith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25(2):134–44.
30. Banthia R, Chandki R, Banthia P. Biofilms: A microbial home. *J Indian Soc Periodontol* [Internet]. 2011;15(2):111. Available from: <http://www.jisponline.com/text.asp?2011/15/2/111/84377>
31. Giannobile W V., Beikler T, Kinney JS, Ramseier CA, Morelli T, Wong DT. Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: Current state and future directions. *Periodontol 2000*. 2009;50(1):52–64.
32. ROSA M. Patogênese Das Doenças Periodontais [Internet]. 1999. Available from: <http://tcc.bu.ufsc.br/Espodonto259153.PDF>
33. Ramseier CA, Kinney JS, Herr AE, Braun T, Sugai J V, Shelburne CA, et al. Identification of Pathogen and Host-Response Markers Correlated With Periodontal Disease. *J Periodontol*. 2009;80:436–46.
34. Kinney JS, Ramseier CA, Giannobile W V. Oral fluid-based biomarkers of alveolar bone loss in periodontitis. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007.

- p. 230–51.
35. Andrian E, Grenier D, Rouabhia M. Porphyromonas gingivalis-epithelial cell interactions in periodontitis. *J Dent Res* [Internet]. 2006;85(5):392–403. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16632751>
 36. Ozmeric N. Advances in periodontal disease markers. Vol. 343, *Clinica Chimica Acta*. 2004. p. 1–16.
 37. Mark L, Haffage A, Socransky S. Effect of the interleukin-1 genotype on monocyte IL-1 beta expression in subjects with adult periodontitis. *J Periodontal Res*. 2000;35:172–7.
 38. Cullinam M, Westerman B, Hamlet S. A longitudinal study of interleukin-1 gene polymorphisms and periodontal disease in a general adult population. *J Clin, Periodontol*. 2001;28:1137–44.
 39. Astrom A, Rise J. Socio-economic differences in patterns of health and oral health behaviour in 25-year old Norwegians. *Clin Oral Investg*. 2001;5:122–8.
 40. Amarasena N, Ekanayaka A, Herath L, Miyazaki H. Tobacco use and oral hygiene as risk indicators for periodontitis. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2002;30:115–23.
 41. Johnson G, Slach N. Impact of tobacco use on periodontal status. *J Dent Educ*. 2001;65:313–21.
 42. Johnson H. Cigarette smoking and the periodontal patient. *J Periodontol* [Internet]. 2006;15(2):251. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0959774305000120
 43. American Academy of Periodontology. Parameter on Systemic Conditions Affected by Periodontal Diseases. *J Periodontol* [Internet]. 2000;71(5):880–3. Available from: <http://www.joonline.org/doi/pdf/10.1902/jop.2000.71.5-S.880>
 44. Yu YH, Chasman DI, Buring JE, Rose L, Ridker PM. Cardiovascular risks associated with incident and prevalent periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2015;42(1):21–8.
 45. Santos SF, Loberto CS, Martins SP, Jorge OC. Prevalência e sensibilidade in vitro de enterobacteriaceae e pseudomonas isoladas da cavidade bucal e bolsa periodontal de pacientes com periodontite crônica. *Brazilian Dent Sci*. 2002;5(2).
 46. Santana TD. PARÂMETROS CLÍNICOS PERIODONTAIS E SEU IMPACTO NA QUALIDADE DE VIDA DE INDIVÍDUOS DIABÉTICOS. Vol. Mestre em. [Belo Horizonte]: Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - Faculdade de Odontologia; 2004.
 47. Kilian M, Chapple ILC, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AML, et al. The oral microbiome – an update for oral healthcare professionals. *BDJ* [Internet]. 2016;221(10):657–66. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.bdj.2016.865>
 48. Kaczor-Urbanowicz KE, Martin Carreras-Presas C, Aro K, Tu M, Garcia-Godoy F, Wong DT. Saliva diagnostics – Current views and directions. *Exp Biol Med* [Internet]. 2017;242(5):459–72. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1535370216681550>
 49. Aro K, Wei F, Wong DT, Tu M. Saliva Liquid Biopsy for Point-of-Care Applications. *Front Public Heal* [Internet]. 2017;5. Available from:

<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpubh.2017.00077/full>

50. Lim PW, Garssen J, Sandalova E. Potential Use of Salivary Markers for Longitudinal Monitoring of Inflammatory Immune Responses to Vaccination. *Mediators of inflammation*. 2016;
51. Maheaswari R, Kshirsagar JT, Lavanya N. Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. *J Indian Soc Periodontol* [Internet]. 2016;20(2):128–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27143822><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4847456>
52. Jervøe-Storm PM, Koltzsch M, Falk W, Dörfler A, Jepsen S. Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol*. 2005;32(7):778–83.
53. Belstrøm D, Sembler-Møller ML, Grande MA, Kirkby N, Cotton SL, Paster BJ, et al. Microbial profile comparisons of saliva, pooled and site-specific subgingival samples in periodontitis patients. *PLoS One*. 2017;12(8).
54. Tille PM. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology [Internet]. *Journal of Medical Microbiology*. 2014. 1193 p. Available from: <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/00222615-35-2-125b?crawler=true&mimetype=application/pdf%0Ahttp://labmed.oxfordjournals.org/content/44/4/e138.short>
55. Paju S, Pussinen PJ, Suominen-Taipale L, Hyvönen M, Knuutila M, Kivikari E. Detection of multiple pathogenic species in saliva is associated with periodontal infection in adults. *J Clin Microbiol*. 2009;47(1):235–8.
56. Bagg J, McFarlane T, Poxton R, Smith J. *Essentials of Microbiology for dental Students*. 2nd ed. 2006.
57. Meyle J, Chapple ILC. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000*. 2015;69:7–17.
58. Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2010;8(7):481–90. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro2337>
59. Marsh PD, Head DA, Devine DA. Ecological approaches to oral biofilms: Control without killing. In: *Caries Research*. 2015. p. 46–54.
60. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: Keystones, pathobionts, and host response. Vol. 35, *Trends in Immunology*. 2014. p. 3–11.
61. Hajishengallis G. The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. *Mol Oral Microbiol*. 2014;29(6):248–57.
62. Noiri Y, Li L, Yoshimura F, Ebisu S. Localization of *Porphyromonas gingivalis*-carrying fimbriae in situ in human periodontal pockets. *J Dent Res*. 2004;83(12):941–5.
63. Bodet C, Chandad F, Grenier D. [Pathogenic potential of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*, the red bacterial complex associated with periodontitis]. *Pathol Biol (Paris)* [Internet]. 2007;55(3–4):154–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17049750>
64. Haffage AD, Teles R, Socransky SS. The effect of periodontal therapy on the

- composition of the subgingival microbiota. *Periodontol 2000*. 2006;42:219–58.
65. Komiya Ito A, Ishihara K, Tomita S, Kato T, Yamada S. Investigation of subgingival profile of periodontopathic bacteria using polymerase chain reaction. *Bull Tokyo Dent Coll [Internet]*. 2010;51(3):139–44. Available from: <http://pubget.com/paper/20877160>
 66. Aruni W, Chioma O, Fletcher HM. *Filifactor alocis*: The Newly Discovered Kid on the Block with Special Talents. *J Dent Res [Internet]*. 2014;93(8):725–32. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0022034514538283>
 67. Aruni AW, Mishra A, Dou Y, Chioma O, Hamilton BN, Fletcher HM. *Filifactor alocis* - a new emerging periodontal pathogen. *Microbes Infect*. 2015;17(7):517–30.
 68. GONÇALVES C, SOARES GMS, FAVERI M, PÉREZ-CHAPARRO PJ, LOBÃO E, FIGUEIREDO LC, et al. Association of three putative periodontal pathogens with chronic periodontitis in Brazilian subjects. *J Appl Oral Sci [Internet]*. 2016;24(2):181–5. Available from: https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84964541208&partnerID=40&md5=8b805857d11316482aef121735342a6c%0Ahttp://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-77572016000200181&lng=en&tlng=en
 69. Schlafer S, Riep B, Griffen AL, Petrich A, Hübner J, Berning M, et al. *Filifactor alocis*, involvement in periodontal biofilms. *BMC Microbiol*. 2010;10(66).
 70. Dashper SG, Seers CA, Tan KH, Reynolds EC. Virulence factors of the oral spirochete *Treponema denticola*. *J Dent Res [Internet]*. 2011;90(6):691–703. Available from: <http://jdr.sagepub.com/content/90/6/691.short>
 71. Mitchell HL, Dashper SG, Catmull D V., Paolini RA, Cleal SM, Slakeski N, et al. *Treponema denticola* biofilm-induced expression of a bacteriophage, toxin-antitoxin systems and transposases. *Microbiology*. 2010;156(3):774–88.
 72. Kim Y, Wang X, Ma Q, Zhang XS, Wood TK. Toxin-antitoxin systems in *Escherichia coli* influence biofilm formation through YjgK (TabA) and fimbriae. *J Bacteriol*. 2009;191(4):1258–67.
 73. Lewis K. Programmed Death in Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev [Internet]*. 2000;64(3):503–14. Available from: <http://mmlbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.64.3.503-514.2000>
 74. Nordhoff M, Moter A, Schrank K, Wieler LH. High prevalence of treponemes in bovine digital dermatitis-A molecular epidemiology. *Vet Microbiol*. 2008;131(3–4):293–300.
 75. Ezzo PJ, Cutler CW. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. Vol. 32, *Periodontology 2000*. 2003. p. 24–35.
 76. Sharma A. Virulence mechanisms of *tannerella forsythia*. *Periodontol 2000*. 2010;54(1):106–16.
 77. Amornchat C, Rassameemasmaung S, Sripairojthikoon W, Swasdison S. Invasion of *Porphyromonas gingivalis* into human gingival fibroblasts in vitro. *J Int Acad Periodontol [Internet]*. 2003;5(4):98–105. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14604058>
 78. How KY, Song KP, Chan KG. *Porphyromonas gingivalis*: An overview of periodontopathic pathogen below the gum line. Vol. 7, *Frontiers in Microbiology*. 2016.

79. Bostanci N, Belibasakis GN. Porphyromonas gingivalis: An invasive and evasive opportunistic oral pathogen. Vol. 333, FEMS Microbiology Letters. 2012. p. 1–9.
80. Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2012;10(10):717–25. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro2873>
81. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. J Clin Pathol [Internet]. 2008;61(5):577–87. Available from: <http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.2007.048868>
82. Lafaurie GI, Contreras A, Barón A, Botero J, Mayorga-Fayad I, Jaramillo A, et al. Demographic, Clinical, and Microbial Aspects of Chronic and Aggressive Periodontitis in Colombia: A Multicenter Study. J Periodontol [Internet]. 2007;78(4):629–39. Available from: <http://www.joponline.org/doi/10.1902/jop.2007.060187>
83. Schmidt J, Jentsch H, Stingu C-S, Sack U. General Immune Status and Oral Microbiology in Patients with Different Forms of Periodontitis and Healthy Control Subjects. PLoS One [Internet]. 2014;9(10):e109187. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0109187>
84. Riep B, Edesi-Neuß L, Claessen F, Skarabis H, Ehmke B, Flemmig TF, et al. Are putative periodontal pathogens reliable diagnostic markers? J Clin Microbiol. 2009;47(6):1705–11.
85. Aruni AW, Roy F, Fletcher HM. Filifactor alocis has virulence attributes that can enhance its persistence under oxidative stress conditions and mediate invasion of epithelial cells by Porphyromonas gingivalis. Infect Immun. 2011;79(10):3872–86.
86. Afonso L, Moreira T, Oliveira A. Índices De Adesão Ao Padrão Alimentar Mediterrânico – a Base Metodológica Para Estudar a Sua Relação Com a Saúde. Rev Factores Risco. 2014;31:48–55.
87. Armitage GC. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. Ann Periodontol [Internet]. 1999;4(1):1–6. Available from: <http://www.joponline.org/doi/10.1902/annals.1999.4.1.1>
88. Yamanaka W, Takeshita T, Shibata Y, Matsuo K, Eshima N, Yokoyama T, et al. Compositional stability of a salivary bacterial population against supragingival microbiota shift following periodontal therapy. PLoS One. 2012;7(8).
89. Mussi MCM, Moffa E, Castro T, Ortega AL, Freitas G, Braga M, et al. Salivary parameters and oral health in the Mobius syndrome. Spec Care Dent. 2016;XX(X):1–6.
90. Guo X, Xia X, Tang R, Zhou J, Zhao H, Wang K. Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. Lett Appl Microbiol. 2008;47(5):367–73.
91. Blanc V, O’Valle F, Pozo E, Puertas A, León R, Mesa F. Oral bacteria in placental tissues: increased molecular detection in pregnant periodontitis patients. Oral Diseases. 2015;21:905–12.
92. Siqueira JF, Rôças IN. Detection of Filifactor alocis in endodontic infections associated with different forms of periradicular diseases. Mol Oral Microbiol. 2003;18(4):263–5.
93. Integrated DNA Technologies. A Basic Polymerase Chain Reaction Protocol

- [Internet]. 2011. Available from: <http://eu.idtdna.com/pages/docs/educational-resources/a-basic-pcr-protocol.pdf?sfvrsn=5>
94. Persing D, Tenover F, Versalovic J. *Molecular Microbiology*. 2004.
 95. Ine I. *Censos 2011–Resultados Provisórios*. Lisboa; 2011.
 96. Sousa S. ORAL MICROBIOME AND HOST HEALTH: IS THE FIRMICUTES/BACTEROIDETES RATIO AN INDICATOR OF ORAL AND SYSTEMIC HEALTH? Universidade Católica Portuguesa; 2017.
 97. Schroder H, Fito M, Estruch R, Martinez-Gonzalez MA, Corella D, Salas-Salvado J, et al. A Short Screener Is Valid for Assessing Mediterranean Diet Adherence among Older Spanish Men and Women. *J Nutr* [Internet]. 2011;141(6):1140–5. Available from: <http://jn.nutrition.org/cgi/doi/10.3945/jn.110.135566>
 98. Chaffee BW, Couch ET, Ryder MI. The tobacco-using periodontal patient: Role of the dental practitioner in tobacco cessation and periodontal disease management. Vol. 71, *Periodontology* 2000. 2016. p. 52–64.
 99. Portugal. Inquérito Nacional de Saúde 2014. DGS. 2016;(Ins 2014):1–10.
 100. Rui Ferreira, Rui Neves, Vanessa Rodrigues, Paulo Nogueira, Andreia Silva MR. Doenças cérebro-cardiovasculares em números Portugal. *Dgs*. 2014;12-14-55.
 101. Rebelo MAB, Cardoso EM, Robinson PG, Vettore MV. Demographics, social position, dental status and oral health-related quality of life in community-dwelling older adults. *Qual Life Res*. 2015;25(7):1735–42.
 102. Rajesh KS, Zareena, Hegde S, Arun Kumar MS. Assessment of salivary calcium, phosphate, magnesium, pH, and flow rate in healthy subjects, periodontitis, and dental caries. *Contemp Clin Dent* [Internet]. 2015;6(4):461–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4678541&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4678541/>
 103. Yost S, Duran-Pinedo AE, Teles R, Krishnan K, Frias-Lopez J. Functional signatures of oral dysbiosis during periodontitis progression revealed by microbial metatranscriptome analysis. *Genome Med* [Internet]. 2015;7(1):27. Available from: <http://genomemedicine.com/content/7/1/27>

Anexos

Anexos

Anexo 1 - Declaração de consentimento informado



UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA

salivaTec - UCP
Laboratório de Investigação
Interdisciplinar em Saliva

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

INFORMAÇÃO AO DADOR DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Título do projeto de investigação

Projeto de investigação que irá decorrer no SalivaTec (Laboratório de Investigação Interdisciplinar em Saliva) do Departamento de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa.

Objetivo do Estudo

A recolha de amostras biológicas humanas e seu posterior armazenamento no Biobanco de amostras do Instituto de Medicina Molecular (IMM) da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, permitirá a realização de investigação para o esclarecimento a nível molecular de doenças e para o desenvolvimento de diagnóstico e em múltiplas áreas da Saúde. Contudo, este objetivo só será cumprido com a colaboração dos doentes e de indivíduos saudáveis, através da doação de amostras biológicas que serão guardadas e preservadas em condições apropriadas de forma a serem utilizadas para futuros estudos. Caso o doente ou indivíduo saudável e/ou o seu representante legal decida participar, terá de fazer apenas os procedimentos habituais de uma consulta.

Procedimentos

No caso de concordar em participar neste projeto, ser-lhe-á colhida uma amostra biológica. A amostra habitualmente solicitada será realizada a partir da colheita de saliva. Para os indivíduos que estejam a realizar exames diagnósticos ou que estejam a ser sujeitos a tratamentos cirúrgicos poderá ser pedida autorização para colheita de uma pequena amostra do material removido durante o procedimento (como por exemplo tecidos removidos para biópsias ou removidos no decurso de cirurgias). Estas colheitas serão efetuadas sem alterar os procedimentos médicos habituais e sem interferir com a rentabilidade diagnóstica do procedimento ou com o sucesso da cirurgia. Esta amostra será preservada em condições apropriadas e as informações clínicas com ela relacionada serão introduzidas numa base de dados, passando a sua identificação pessoal a estar codificada e não acessível aos utilizadores das amostras.

A doação da amostra é voluntária e revogável, sendo que o dador, ou o seu representante legal, tem o direito de retirar a amostra e/ou interromper a colaboração assim que achar conveniente, sem necessidade de justificação e não podendo ser discriminado por isso. O dador ou o seu representante legal deverá manifestar por escrito a sua vontade em retirar a amostra ou interromper a colaboração e nestas situações a amostra será imediatamente destruída.

O SalivaTec propõe-se armazenar as amostras biológicas e seus possíveis derivados tais como DNA e RNA nas instalações do Biobanco do Instituto de Medicina Molecular. O SalivaTec não divulgará resultados envolvendo o material biológico. No entanto, o dador poderá escolher se quer ser informado dos resultados com potencial relevância para a sua saúde. O pedido de resultados deverá ser feito por escrito para o SalivaTec pelo dador ou representante legal e deve ser expresso no consentimento informado.

Serão cumpridas todas as normas éticas aceites internacionalmente para o uso de matérias biológicas para fins de investigação. Todos os projetos que fizerem uso das amostras depositadas no Biobanco serão submetidos à Comissão de Ética competente para a sua avaliação.

Identificação das amostras e Confidencialidade

A existência de um Biobanco pressupõe a existência de uma base de dados contendo informação clínica referente ao doente ou indivíduo saudável. Após a colheita, as amostras serão identificadas por um código de forma a preservar a privacidade.

Durante o desenvolvimento de um projeto de investigação, a equipa de investigação poderá ter necessidade de recolher informação do processo clínico para a execução do estudo. O anonimato será, contudo mantido, ou seja os dados constantes do seu processo clínico serão fornecidos ao investigador, mas sem qualquer identificação, ou qualquer informação que permita saber a quem pertencem.

A descodificação apenas poderá ser efetuada pelo médico (que será o responsável pela base de dados, de acordo com a informação fornecida à Comissão Nacional de Proteção de Dados - CNPD), em caso de absoluta necessidade, por motivos de saúde do dador e, a pedido deste, e sempre de acordo com as disposições legais em vigor.

Os dados serão tratados confidencialmente, de acordo com a Lei, com os regulamentos e de acordo com as normas éticas aprovadas pela Comissão de Ética da Universidade Católica Portuguesa.

Os dados resultantes dos estudos realizados serão alvo de publicação de uma forma anónima e agregada, em termos de percentagens ou de dados numéricos, nunca individualmente.

Tempo de conservação

As amostras serão conservadas por um período de 20 anos no Biobanco do Instituto de Medicina Molecular (IMM), sob a responsabilidade da Equipa ligada ao SalivaTec, enquanto este estiver devidamente credenciado pelas entidades competentes. As coleções de amostras serão avaliadas periodicamente, nomeadamente para aferir da sua qualidade, podendo ser destruídas ou, findo o período da conservação, poder-se-á solicitar a prorrogação da conservação. Nestas condições excecionais o SalivaTec poderá voltar a contactar os dadores.

Comunicação e divulgação de dados

Os dados genéticos e as amostras biológicas colhidas para fins de investigação científica podem ser transferidos para outras organizações ou centros de investigação, para fins de pesquisa e somente em projetos desenvolvidos conjuntamente com o SalivaTec, mediante consentimento do participante expresso na declaração de consentimento informado.

Possíveis Benefícios para os Participantes

Esta é uma doação altruísta, não havendo por isso qualquer compensação para o dador. Não se garante que este estudo envolva quaisquer benefícios diretos para o participante. Se algum dos estudos puder ser relevante para a saúde do dador, este será informado, se essa for a sua vontade expressa na declaração de consentimento informado. Contudo, a sua participação proporcionará a aquisição de conhecimentos que poderão vir a beneficiá-lo a si ou a terceiros no futuro.

Riscos físicos previsíveis

Na maioria dos casos, os riscos e o desconforto associados serão mínimos ou inexistentes. Nas colheitas associadas a procedimentos com fins diagnósticos ou terapêuticos, os riscos e o desconforto serão os inerentes ao procedimento em si. Em qualquer dos casos, o dador será sempre antecipadamente informado dos riscos e grau de desconforto associados aos procedimentos.

Participação Voluntária e Direitos de Abandono

O presumível dador terá toda a liberdade para se recusar a participar no estudo ou retirar o seu consentimento, suspendendo a participação em qualquer momento e, consequentemente, as amostras serão destruídas. A participação é voluntária e a sua recusa em participar não envolverá qualquer penalização ou perda de benefícios. A recusa ou abandono não colocarão em risco o direito a receber tratamento ou assistência médica, presentemente ou no futuro.

O dador poderá retirar o seu consentimento nas modalidades **sem contacto futuro** (as amostras poderão ser usadas normalmente até se esgotarem, mas não serão estabelecidos futuros contactos para a obtenção de mais amostras) ou **sem uso futuro** (não serão estabelecidos futuros contactos e as amostras serão imediatamente destruídas e os registos eliminados).

Se tiver qualquer dúvida, em qualquer momento, mesmo após a colheita, sobre este estudo poderá contactar a Diretora do SalivaTec: Prof. Doutora Marlene Barros, dirigindo-se a:

SalivaTec
Departamento de Ciências da Saúde
Universidade Católica Portuguesa
Tel. +351232419500 - Fax +351232428344
E-mail: mbarros@crb.ucp.pt

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Banco de amostras biológicas para fins de investigação biomédica

Investigador: _____ Local de recolha: _____
Nome do dador: _____
Número de estudo do dador: _____

Eu, _____, portador do bilhete de identidade/cartão do cidadão n.º [_____], declaro ter tomado conhecimento e aceitar participar neste projeto, de forma a contribuir para a criação de um banco de amostras biológicas com informação clínica associada, para fins de investigação biomédica.

Aceito que a minha amostra biológica seja utilizada em projetos de investigação de mecanismos das doenças, diagnóstico precoce, fatores de prognóstico e novos alvos terapêuticos em múltiplas áreas da medicina. Poderei revogar a autorização para utilização da minha amostra biológica e informação clínica em qualquer altura. O objetivo do banco de amostras biológicas foi-me claramente explicado e foi-me dada a oportunidade de colocar questões sobre o seu funcionamento, bem como os procedimentos relativos à colheita e utilização da minha amostra biológica e dados a ela associados.

Declaro que aceito participar, voluntariamente, neste estudo. Especificamente concordo com os seguintes pontos:

- Consinto a colheita de material biológico (saliva / /) e autorizo a conservação de amostras no Biobanco, de modo a que possam ser usados para pesquisas futuras, incluindo estudos genéticos por investigadores portugueses e estrangeiros, sem fins lucrativos;

Sim Não

- **Esta opção é para ser respondida apenas por participantes que já cederam amostras biológicas colhidas no âmbito de outros projetos.** Nestas circunstâncias, autorizo a transferência para o Biobanco das minhas amostras biológicas, previamente colhidas no âmbito de outros projetos, de modo que elas possam ser utilizadas em pesquisas futuras, incluindo estudos genéticos por investigadores portugueses e estrangeiros, mas sem fins lucrativos;

Sim Não

- Estou consciente de que a minha participação é voluntária e que posso em qualquer altura solicitar a destruição das minhas amostras biológicas, invalidando assim o consentimento informado prévio, sem justificar, tendo recebido a garantia de que o meu pedido não desenvolverá discriminação;

Sim Não

- Declaro que quero conhecer resultados que possam ser relevantes para a minha saúde.

Sim Não

- Autorizo ser contactado novamente pelo Biobanco para pedido de atualização sobre a minha situação clínica;

Sim Não

- Autorizo o contactado do Biobanco a familiares meus para pedido autorização de colheita de amostras biológicas e/ou informação clínica;

Sim Não

Data

Assinatura do Dador/Representante Legal

Em caso de representante legal, este atua na qualidade de:

- Titular do poder paternal, quando o dador é menor
- Tutor, quando o dador foi declarado interdito
- Herdeiro, quando o dador faleceu

Discuti este estudo de investigação com o participante e/ou o seu representante legal, utilizando uma linguagem compreensível e apropriada. Informei adequadamente o participante sobre a natureza deste estudo e sobre os seus possíveis benefícios e riscos, considerando que o participante compreendeu a minha explicação.

Data

Nome do Investigador/ Médico

Assinatura do Investigador/ Médico

Foi entregue um duplicado deste documento ao doente/representante legal.

Anexo 2 - Questionário aplicado

Questionário de Dadores

1.1. Data de Nascimento ____/____/____

1.2. Género

- Feminino
- Masculino

1.3. Dados Biométricos

Altura ____ (cm) Peso ____ (Kg) Perímetro Abdominal ____ (cm)

1.4. Etnia

- Caucasiana
- Negra
- Asiática
- Cigana
- Outra _____

1.5. Área de Residência

- Aldeia
- Vila
- Cidade

1.6. Estado Civil

- Solteiro
- Casado
- Vive maritalmente
- Viúvo
- Divorciado

1.7. Nível de Escolaridade

- Básico (até ao 9º ano)
- Médio (até ao 12º ano)
- Licenciatura, Mestrado e/ou Doutoramento
- Outro _____

1.8. Profissão _____

2.1 Fuma ou já fumou?

- Sim
- Não
- Ex-fumador

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

2.3 Se sim:

Com que idade começou a fumar? _____ anos

Quantos cigarros fuma por dia? _____ cigarros/dia

3.1 Bebe bebidas alcoólicas?

- Sim
- Não

Se sim, com que idade começou a beber? _____ anos

Frequência do consumo de álcool:

- Ocasionalmente
- Semanalmente
- Socialmente
- Diariamente

3.2 Frequência do consumo de álcool:

_____ Nº de copos de vinho / semana

_____ Nº de cervejas / semana

_____ Nº de digestivos / semana

3.3 Deixou de beber?

- Sim
- Não

3.4 Se sim, há quantos anos? _____ anos

4.1 Grupo Sanguíneo

- A
- B
- AB
- O
- Rh+
- Rh-
- Não Sabe

4.2 Toma regularmente medicamentos?

- Sim
- Não

4.2.1 Se sim, refira-os: _____

4.3 Tomou alguma medicação que não seja indicada acima nos últimos 30 dias?

- Sim
- Não

4.3.1 Se sim, refira-a: _____

4.4 Tomou algum antibiótico nos últimos 3 meses?

- Sim
- Não

4.4.1 Se sim, refira-o:

4.5 Tomou corticosteroides nos últimos 30 dias?

- Sim
- Não

4.6 Tomou bifosfonatos nos últimos 30 dias?

- Sim
- Não

4.7 Fez a vacina da gripe na última época Outono/Inverno?

- Sim
- Não

4.8 Está grávida?

- Homem
- Sim
- Não

4.8.1 Se sim, de quantos meses? _____ meses

4.9 Encontra-se na menopausa?

- Sim
- Não

4.9.1 Se sim, há quanto tempo? _____

4.10 Há quanto tempo teve a última menstruação? _____

4.11 Toma anticoncepcionais?

- Sim
- Não

4.11.1 Se sim, qual? _____

4.12 Nos últimos 12 meses foi consultado por um médico?

- Sim
- Não

4.12.1 Se sim, em que especialidade? _____

4.13 Qual a data das últimas análises que efetuou? ____/____/____

4.13.1 Foram encontrados valores anormais?

- Sim
- Não

4.13.1.1 Se sim, quais? _____

4.14. Tem hipertensão?

- Sim
- Não

4.15 Atualmente sofre de alguma efermidade?

- Sim
- Não

4.15.1 Se sim, qual? _____

4.15.2 Problemas Cardíacos

- Doenças das artérias coronárias
- Angina
- Arritmias
- Insuficiência cardíaca
- Ataque cardíaco
- Aneurisma da aorta
- Doença cardíaca congénita
- Doença cardíaca reumática
- Outra
- Não tenho

4.15.3 Diabetes

- Tipo 1
- Tipo 2
- Não tenho

Análise Clínica	Valores
Colesterol	

Glicose	
Resistência à insulina	
Hemoglobina glicosilada	
AGEs	
HDL	
LDL	
Triglicerídeos	

4.15.4 Doenças auto-imunes:

- Doença de Crohn
- Doença de Graves
- Doença de Behçet
- Síndrome de Sjogren
- Outra
- Não tenho

- Doenças de sangue. Quais? _____
- Doenças infeto-contagiosas. Quais? _____
- Doenças de fígado. Quais? _____
- Doenças de estômago. Quais? _____
- Doenças Renais. Quais? _____
- Epilepsia
- Asma
- Urticária
- Sinusite
- Acne
- Outra _____
- Não tenho

4.16 É alérgico a algum medicamento ou dispositivo médico?

- Sim
- Não

4.16.1 Se sim, qual? _____

4.17 É alérgico a algum alimento?

- Sim
- Não

4.17.1 Se sim, qual? _____

4.18 É alérgico a picadas de insetos?

Sim

Não

4.18.1 Se sim, quais? _____

4.19 Foi sujeito a algum tratamento de radioterapia ou quimioterapia?

Sim

Não

4.19.1 Se sim, há quanto tempo? _____

4.20 História Familiar - Existem doenças na família como?

Doenças Cardíacas

Diabetes

Cancro

Não sabe

Outras

Questionário Alimentação

5.1. Utiliza azeite como principal gordura culinária? **Sim (1) Não (2)**

5.2. Usa mais de 4 colheres de sopa de azeite por dia? Considere fritar, temperar saladas, refeições fora de casa, etc.). **Sim (1) Não (2)**

5.3. Come mais de 200g (1 porção) de hortícolas por dia? **Sim (1) Não (2)**

5.4. Come mais de 3 peças de fruta por dia (considere um sumo natural como uma peça de fruta). **Sim (1) Não (2)**

5.5. Come menos que uma porção de carne vermelha por dia? Considerar 100-150g de carne ou produtos como presunto, salsicha, fiambre, etc. **Sim (1) Não (2)**

5.6. Come menos que 12g de manteiga, margarina ou natas por dia? **Sim (1) Não (2)**

5.7. Bebe menos que 1 bebida açucarada ou gaseificada por dia? **Sim (1) Não (2)**

5.8. Bebe mais que 7 copos de vinho por semana? **Sim (1) Não (2)**

5.9. Come leguminosas (favas, lentilhas, feijão ervilha, etc.) mais que 3 porções por semana? **Sim (1) Não (2)**

- 5.10. Come peixe ou marisco (1 dose são 100-150 gramas de peixe ou seja 4-5 unidades ou 200g de marisco) mais que 3 porções por semana? **Sim (1) Não (2)**
- 5.11. Come bolos ou outros produtos de pastelaria (biscoitos, bolachas, etc.) menos de 3 vezes por semana? **Sim (1) Não (2)**
- 5.12. Come oleaginosas mais de 3 vezes (nozes, amêndoas, amendoins) por semana? **Sim (1) Não (2)**
- 5.13. Come preferencialmente frango, peru ou coelho em vez de vaca, porco ou salsichas? **Sim (1) Não (2)**
- 5.14. Come hortícolas, massa, arroz ou outros pratos com refogados (molho de tomate, cebola, alho francês ou alho e azeite) mais que duas vezes por semana?
Sim (1) Não (2)

Geriatric Oral Health Assessment Index (GOHAI)

Q1 Nos últimos 3 meses diminuiu a quantidade de alimentos ou mudou o tipo de alimentação por causa dos seus dentes?

SempreAlgumas vezes Nunca

Q2 Nos últimos 3 meses teve problemas para mastigar alimentos?

SempreAlgumas vezes Nunca

Q3 Nos últimos 3 meses teve dor ou desconforto para engolir alimentos?

SempreAlgumas vezes Nunca

Q4 Nos últimos 3 meses mudou o seu modo de falar por causa dos problemas da sua boca?

SempreAlgumas vezes Nunca

Q5 Nos últimos 3 meses sentiu algum desconforto ao comer algum alimento?

SempreAlgumas vezes Nunca

Q6 Nos últimos 3 meses deixou de se encontrar com outras pessoas por causa da sua boca?

SempreAlgumas vezes Nunca

Q7 Nos últimos 3 meses sentiu-se satisfeito ou feliz com a aparência da sua boca?

SempreAlgumas vezes Nunca

Q8 Nos últimos 3 meses teve que tomar medicamentos para passar a dor ou o desconforto da sua boca?

SempreAlgumas vezes Nunca

Q9 Nos últimos 3 meses teve algum problema na sua boca que o deixou preocupado?

SempreAlgumas vezes Nunca

Q10 Nos últimos 3 meses chegou a sentir-se nervoso por causa dos problemas na sua boca?

SempreAlgumas vezes Nunca

Q11 Nos últimos 3 meses evitou comer junto de outras pessoas por causa de problemas na boca?

SempreAlgumas vezes Nunca

Q12 Nos últimos 3 meses sentiu os seus dentes ou gengivas ficarem sensíveis a alimentos ou líquidos?

SempreAlgumas vezes Nunca

-----PARE AQUI-----

Status Dentário e Higiene Oral

6.1 Índice CPO

				55	54	53	52	51	61	62	63	64	65				
18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28		
48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38		
				85	84	83	82	81	71	72	73	74	45				

Code	Criteria
0	Healthy
1	Carious lesion
2	Filled cavities with carie
3	Filled cavities without carie
4	Lost tooth by carie
5	Lost tooth (by other reason)
6	Sealant
7	Prosthesis or implant
8	Not erupted
T	Trauma
9	Not registered

C ___ P ___ O ___ = _____

6.2 Índice de Higiene Oral - Total _____ (%)

6.3 Periodontal Screening Record (PSR)

1ºQ	2ºQ	3ºQ
6ºQ	5ºQ	4ºQ

Sangramento à sondagem (BOP): _____ %

6.4 Diagnóstico Periodontal: _____

Score	Criteria
0	Periodontal health
1	Bleeding on probe (BOP)
2	Dental calculus detected during probing, iatrogenic margin and/or BOP
3	Periodontal pocket 3,5-5.5 mm
4	Periodontal pocket 6 mm or more
*	Periodontal abnormalities present (furcation involvement, tooth mobility, gingival recession, muco-gingival problems)

Observações:

Anexo 3 - Questionário alimentação.

Código de Quartzzy	Utiliza azeite como principal gordura culinária?	Usa mais de 4 colheres de sopa de azeite por dia? Considere fritar, temperar saladas, refeições f...	Come mais de 200g (1 porção) de hortícolas por dia?	Come mais de 3 peças de fruta por dia (considere um sumo natural como uma peça de fruta.	Come menos que uma porção de carne vermelha por dia? Considerar 100-150g de carne ou produtos com...	Come menos que 12g de manteiga, margarina ou natas por dia?	Bebe menos que 1 bebida açucarada ou gaseificada por dia?
D01607	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
D01608	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
D01609	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
D01611	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
D01612	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
D01613	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
D01614	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
D01615	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
D01616	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim
D01617	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim
D01618	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim
D01619	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim
D01620	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não
D01765	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
D01766	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
D01768	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
D01769	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
D01770	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
D01772	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim
D01771	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
D01773	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim
D01774	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim
D01775	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
D01889	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim	Não
D01890	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim
D01891	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
D01892	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
D01893	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
D01894	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim

Bebe mais que 7 copos de vinho por semana?	Come leguminosas (favas, lentilhas, feijão ervilha, etc) mais que 3 porções por semana?	Come peixe ou marisco (1 dose são 100-150 gramas de peixe ou seja 4-5 unidades ou 200g de marisc...	Come bolos ou outros produtos de pastelaria (biscoitos, bolachas, etc) menos de 3 vezes por seman...	Come oleaginosas mais de 3 vezes (nozes, amendoas, amendoins) por semana?	Come preferencialmente frango, peru ou coelho em vez de vaca, porco ou salsichas?	Come hortícolas, massa, arroz ou outros pratos com refogados (molho de tomate, cebola, alho franc...	Score
Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim	10
Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim	9
Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	10
Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	9
Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim	9
Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim	10
Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim	11
Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	8
Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Sim	8
Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Sim	8
Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim	7
Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	7
Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	8
Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	10
Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	10
Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	14
Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	12
Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	10
Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	7
Não	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	9
Não	Não	Não	Sim	Não	Sim	Não	6
Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	5
Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	12
Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim	5
Não	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	8
Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	11
Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	10
Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Sim	7
Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim	11

Anexo 4 – Protocolo de Recolha de Saliva Estimulada

Protocolo de Recolha de Saliva Estimulada



Protocolo de Recolha de Saliva Estimulada

As amostras devem ser recolhidas entre as 8h-10h de manhã. Pedir aos dadores para não comerem, beberem ou terem qualquer procedimento de higiene oral pelo

1

menos 1h antes da recolha.

Aplicar o código correspondente à amostra no tubo de forma a evitar trocas.

2

Adicionar gelo nos copos e colocar o tubo de 50 mL dentro dos copos. Não retirar o tubo do copo com gelo, só retirando do copo quando for para armazenar.

3

Usar 25 cm² de parafilme (4 quadrados) e dobrá-lo ao meio 4 vezes.

4

Inserir o parafilme na boca e mastigar a cada 2 segundos.

Após 30 segundos, descartar a 1ª acumulação de saliva para o copo e, depois disso,

5

cuspir para o tubo de recolha a cada 30 segundos.

Repetir este passo 9 vezes (duração de 5 minutos) ou até atingir um volume 5 mL.

6

Após a recolha, tapar o tubo e colocar o copo numa caixa com gelo. O parafilme pode ser descartado ou para o copo ou para a folha de parafilme.

Processar de seguida as amostras. Caso não seja possível processar as amostras

7

imediatamente. Estas devem ser armazenadas a pelo menos -20°C até serem processadas.

Anexo 5 - Protocolo de colheita de biofilme

(A recolha microbiana deverá ser realizada em bolsas periodontais profundas que apresentem sinais clínicos de doença periodontal)

- Abrir, suavemente, a bolsa gengival com a ajuda de um instrumento estéril, como sonda ou pinça. Inserir cone de papel esterilizado até sentir alguma resistência durante 10 /30 segundos.
- Retirar o cone de papel com o cuidado de não tocar em nenhuma das outras superfícies da boca para não haver contaminação.
- Guardar o cone de papel no eppendorf.
- Processar as amostras o mais depressa possível ou congelá-las imediatamente.

Anexo 6 - Protocolo de Isolamento de DNA

  Standard Operating Procedures		
Isolamento de DNA		
Lab		
SOP-010	Data: 27 Outubro 2016	Versão 1.0

Objetivo

Obter ácidos nucleicos de amostras de saliva ou biofilme oral.

1. Equipamento

- Bloco de aquecimento
- Agitador magnético
- Vortex
- Micropipetas
- Centrifuga

2. Material

- Pontas de 200 μ l e 1000 μ l
 - Tubos eppendorf 1,5ml
- (todo o material deve estar previamente autoclavado)

3. Reagentes

- InstaGene Matrix® Bio-Rad

4. Segurança

- A utilização de luvas é obrigatória durante todo o procedimento

5. Procedimento

Volume de amostras inicial ideal de 1 ml (possível até cerca de 200µl)

Antes de iniciar o protocolo ligar o bloco de aquecimento a 56°C.

1. Centrifugar 1 min. a 10000-12000 rpm. Remover sobrenadante.
2. Adicionar 200µl de InstaGene Matrix a pellet e incubar entre 15-30 min a 56°C. (pipetar os 200µl com pipeta de 1000, com o reagente em agitação).
3. Vortex máximo durante 10 seg. Incubar durante 8 min a 100°C.
4. Vortex máximo durante 10 seg. centrifugar a 10000-12000 rpm durante 2-3 min.
5. Armazenar a -20°C o sobrenadante sem tocar no pellet para um novo tubo.

Anexo 7 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Reagentes para a reação de PCR

- NZYTaQ 2x Green Master Mix da nzytech
- Primers (10 µM)
- DNA (100 ng)
- Água desionizada esterilizada

Protocolo da reação de PCR

- 5 µl de amostra adicionar 45µl de master mix, (10 Mg²⁺, 50 mMGCi, dNTPs, Primer específico 1 µl foard e primer reverse 1µl, Taq).
- Colocar as amostras no termociclador respeitando o seguinte programa:
 - Desnaturação inicial 10 min a 95°C;
 - Desnaturação 30 seg. 95°C;
 - Annealing 1 min 60°C a 30 seg:
 - Extensão do primer a 72 °C durante 1 min;
 - Extensão final 72° C 10 min.
- Repetir a sequência 32 vezes

*depende dos primers

Anexo 8 - Eletroforese em gel de agarose.

Preparação de gel de agarose a 1%

1. Pesar 0,6 g de agarose (Biorad®).
2. Colocar num recipiente com 60 ml de TAE 1x.
3. Aquecer 2 minutos no micro-ondas até dissolver.
4. Aguardar que arrefeça ligeiramente e adicionar 1,2 µl de brometo de etídio e misturar.
5. Verter o líquido para o suporte previamente colocado na base.
6. Aguardar entre 20 a 30 minutos até que solidifique.

Corrida de eletroforese

1. Colocar aproximadamente 1L de TAE 1x na tina de eletroforese.
2. Colocar o gel na tina de eletroforese.
3. Carregar cada amostra e o marcador (ladder I nzytech) nos respectivos poços.
4. Colocar a tampa e correr a 80V durante 40 minutos.
5. Observar o resultado no transiluminador (luz UV).
6. Fazer um registo fotográfico e respectiva legenda.