

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO EM TECNOLOGIAS LABORATORIAIS EM CIÊNCIAS FORENSES

MICROBIOMA EM ANTIGAS POPULAÇÕES

Trabalho submetido por
Carolina Gonçalves Fradinho
para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologias Laboratoriais em
Ciências Forenses

novembro de 2023

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO EM TECNOLOGIAS LABORATORIAIS EM CIÊNCIAS FORENSES

MICROBIOMA EM ANTIGAS POPULAÇÕES

Trabalho submetido por
Carolina Gonçalves Fradinho
para a obtenção do grau de **Mestre** em Tecnologias Laboratoriais em
Ciências Forenses

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Helena Barroso

e coorientado por
Prof. Doutora Nathalie Antunes-Ferreira

novembro de 2023

MESTRADO EM TECNOLOGIAS LABORATORIAIS EM CIÊNCIAS FORENSES

CERTIFICADO DE ORIGINALIDADE

Certifico que sou responsável pelo trabalho submetido nesta dissertação e que o trabalho é original, não sendo copiado ou plagiado de outra fonte, excetuando o especificado nas referências. Adicionalmente, declaro que o trabalho em si contido não foi submetido anteriormente para qualquer outro propósito.

29 de **NOVEMBRO** de 2023

Assinatura:

Trabalho submetido por
CAROLINA FRADINHO
para a obtenção do grau de **Mestre** em Tecnologias Laboratoriais em
Ciências Forenses

Agradecimentos

Dirigir agora algumas palavras às pessoas que me ajudaram ao longo da minha jornada acadêmica direta ou indiretamente para este trabalho.

Em primeiro lugar, agradecer às minhas orientadora Prof. Doutora Helena Barroso e coorientadora Prof. Doutora Nathalie Antunes Ferreira pelo conhecimento transmitido, disponibilidade e paciência no decorrer desta dissertação.

À Chefe da Unidade de Patrimônio e Museologia Dra. Conceição Macieira que realizou as diligências institucionais para a aprovação da recolha de amostras a partir da série exumada na Necrópole de Bucelas.

À Professora Anabela Jorge pela prontidão e disponibilidade.

À minha Mãe e Pai. O constante orgulho que demonstraram sempre foi um incentivo para nunca desistir e perseguir os meus objetivos, superando todas as adversidades. Obrigada pela motivação, amor incondicional e por serem exemplos de coragem e garra.

À minha avó, tia e irmão que sempre me apoiaram à sua maneira, tornando este percurso sombrio mais leve.

Ao meu maninho Paulo Lacerda, do qual me aproveito por ser um nerd dos PCs, e que nunca me deixou ficar mal.

Ao Rafael Prazeres, que demonstrou ser um pilar tão importante quanto os meus pais. Por último, mas igualmente importante, quero expressar o meu apreço pela oportunidade de realizar esta longa jornada e chegar ao seu fim.

A todos, o meu mais sincero Obrigada.

Declaração de Honra

IMP-EM-EI-12

Declaro, por minha honra, que o presente trabalho acadêmico é original e foi elaborado por mim própria, Carolina Gonçalves Fradinho, não se tendo recorrido a quaisquer outras fontes, para além das indicadas, usadas, adotadas literalmente ou adaptadas a partir dos seus originais (em fontes impressas, não impressas ou na internet) e encontram-se adequadas, identificadas e citadas, com observância das convenções do trabalho acadêmico em vigor.

Mais declaro que esta Tese, *Microbioma em antigas populações*, não foi apresentada, para efeitos de avaliação, a qualquer outra entidade ou instituição, para além da(s) diretamente envolvida(s) na sua elaboração, e que os conteúdos das versões impressa e eletrónica são inteiramente coincidentes.

Declaro, igualmente, encontrar-me ciente de que a inclusão, neste texto, de qualquer falsa declaração terá consequências legais.

Data: 29/11/2023

Declaração Conflito de Interesses (DCI)

IMP-EM-EI-10

Eu Carolina Gonçalves Fradinho, referente a Tese, *Microbioma em antigas populações*, declaro que não possuo conflitos de interesse de ordem pessoal, comercial, académica, política ou financeira.

Data: 29/11/2023

Declaração de Financiamento

Código| IMP-EM-EI-14

Eu, Carolina Gonçalves Fradinho, referente à Tese *Microbioma em populações antigas*, declaro que este trabalho foi financiado pela Cooperativa de Ensino Superior Egas Moniz, que disponibilizou as instalações e permitiu a aquisição dos meios de cultura, reagentes e serviços necessários à conclusão do mesmo.

Resumo

No corpo humano, há mais organismos procarióticos do que células eucarióticas. Estes “hóspedes” desempenham muitas funções biológicas e mantêm o equilíbrio, evitando o aparecimento de doenças causadas por invasões de microrganismos patogênicos.

As características da cavidade oral promovem o crescimento e proliferação de diferentes microrganismos e, conseqüentemente, é considerada o segundo habitat com maior diversidade no organismo, sendo antecedida pelo intestino. O estudo efetuado nesta dissertação recai sobre o cálculo dentário, maioritariamente removido de incisivos, de uma série esquelética exumada numa necrópole dos séculos XV-XIX, em Bucelas.

O cálculo dentário é um depósito sólido que se forma e acumula na superfície dos dentes, captura e preserva micropartículas ao longo da vida de um indivíduo, sendo considerado um registo fossilizado do ambiente oral. A placa dentária é um biofilme bacteriano aderente responsável pelo desenvolvimento de doenças periodontais, que pode ocorrer supragengival ou subgengivalmente.

O objetivo deste trabalho foi realizar uma análise microbiológica do cálculo dentário, relacionando-a com características da população. Adicionalmente, pretende-se efetuar uma comparação entre os microrganismos responsáveis pelas patologias orais atuais e os microrganismos presentes no ambiente oral nos séculos XV-XIX. Pretende-se ainda efetuar a análise de proximidade e longevidade entre indivíduos do grupo populacional em análise.

A partir das amostras de cálculo foi efetuada a extração do DNA e sequenciação.

Foram identificados os microrganismos existentes e a abundância relativa de cada espécie foi determinada.

A análise taxonómica confirma a predominância de microrganismos orais nas amostras, com poucos sinais de contaminação externa. As amostras de cálculo dentário dos indivíduos analisados, independentemente do sexo, idade ou afinidades populacionais, mostram uma composição taxonómica consistente entre indivíduos.

Palavras-Chave: Série esquelética exumada, séculos XV-XIX, análise microbiológica, patologias orais e análise taxonómica.

Abstract

In the human body, there are more prokaryotic organisms than eukaryotic cells. These "guests" perform numerous biological functions, maintaining balance and preventing the onset of diseases caused by invasive pathogens.

The characteristics of the oral cavity promote the growth and proliferation of various microorganisms, making it the second most diverse habitat in the body, following the intestine. The focus of this dissertation lies in dental calculus, primarily removed from incisors, from a skeletal series exhumed in a cemetery dating back to the XV-XIX centuries in Bucelas.

Dental calculus is a solid deposit that forms and accumulates on the tooth surface, capturing and preserving microparticles throughout an individual's life, considered a fossilized record of the oral environment. Dental plaque, an adherent bacterial biofilm, is responsible for the development of periodontal diseases, which occurs both supragingivally or subgingivally.

The aim of this study was to conduct a microbiological analysis of dental calculus, correlating it with population characteristics. Additionally, we seek to compare the microorganisms responsible for current oral pathologies with those present in the oral environment during the XV-XIX centuries. We also aim to analyze proximity and longevity among individuals within the population group under study.

From calculus samples, DNA extraction and sequencing were performed. The existing microorganisms were identified, and the relative abundance of each species was determined.

Taxonomic analysis confirms the predominance of oral microorganisms in the samples, with few signs of external contamination. Dental calculus samples from the analyzed individuals, regardless of sex, age, or population affinities, exhibit a consistent taxonomic composition among individuals.

Keywords: Exhumed skeletal series, 15th-19th centuries, microbiological analysis, oral pathologies and taxonomic analysis.

Índice

1	– Introdução	13
1.1	– Bioarqueologia.....	13
1.2	– Microbioma Humano.....	14
1.2.1	– A Cavidade oral e o Microbioma Oral.....	18
1.3	– Biofilme dentário.....	21
1.4	– Cálculo Dentário	23
1.5	– Gene 16S rRNA	29
2	– Objetivos	33
3	– Materiais e Métodos	35
3.1	– Amostras	35
3.2	– Seleção de amostras	36
3.3	– Recolha de amostras	37
3.4	– Preparação de amostras	37
3.5	– Extração do DNA	38
3.6	– <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	38
3.7	– Eletroforese em gel de agarose.....	39
3.8	– Sequenciação do DNA.....	40
3.9	– Análise de dados.....	41
4	– Resultados	43
5	– Discussão	51
6	– Conclusão	57
7	– Referências	59
8	– Anexos	67

Índice de Figuras

Figura 1- Representação dos dois tipos de cálculo dentário, onde a letra A corresponde ao cálculo dentário supragengival e a letra B ao cálculo dentário subgengival (Adaptado de Metcalf et al., 2014).....	24
Figura 2- Planta do núcleo antigo de Bucelas, onde destacado com a cor azul, correspondem as inscrições funerárias romanas, com a cor laranja uma possível localização da Capela e o Hospital do Espírito Santo e a vermelho a área que a obra iria afetar (Adaptado de Antunes-Ferreira, 2022).	35
Figura 3- Representação gráfica da abundância relativa dos 10 Filos predominantes em cada amostra da população em estudo. Nota: o eixo do Y corresponde à abundância relativa e o eixo do X ao nome das amostras. A cor amarela representa o valor total da abundância relativa associada aos Filos que não fazem parte do grupo dos 10 principais.	47
Figura 4- Representação gráfica da abundância relativa das 10 Classes predominantes em cada amostra da população em estudo. Nota: o eixo do Y corresponde à abundância relativa e o eixo do X ao nome das amostras. A cor amarela representa o valor total da abundância relativa associada às Classes que não fazem parte do grupo das 10 principais.	47
Figura 5- Representação gráfica da abundância relativa dos 10 Géneros predominantes em cada amostra da população em estudo. Nota: o eixo do Y corresponde à abundância relativa e o eixo do X ao nome das amostras. A cor amarela representa o valor total da abundância relativa associada aos Géneros que não fazem parte do grupo dos 10 principais	48
Figura 6 - Representação gráfica da abundância relativa das 10 Espécies predominantes em cada amostra da população em estudo. Nota: o eixo do Y corresponde à abundância relativa e o eixo do X ao nome das amostras. A cor amarela representa o valor total da abundância relativa associada às Espécies que não fazem parte do grupo das 10 principais.	48
Figura 7 – Representação da árvore filogenética com clusters para estudar a proximidade entre indivíduos da população em estudo.	49

Índice de Tabelas

Tabela 1- Perfil demográfico da série esquelética exumada no Largo do Espírito Santo, em Bucelas.....	36
Tabela 2- Tabela informativa dos primers utilizados (Heuer et al., 1997)	39
Tabela 3- Estado das amostras após avaliação pela Entidade Externa para sequenciação.	43
Tabela 4- Classificação FID (Fédération Dentaire Internationale) e discriminada de cada dente analisado.....	44
Tabela 5- Classificação etária dos indivíduos em estudo.....	45
Tabela 6- Classificação do sexo de acordo com a categoria etária dos indivíduos exumados em Bucelas.....	45
Tabela 7- Correspondência entre denominações das amostras em estudo.....	46
Tabela 8- Identificação, Acrônimo/sigla do local, número do enterramento, quantidade de dentes utilizados, FID, identificação precisa do dente, idade à morte, sexo e afinidades populacionais dos esqueletos analisados na presente dissertação.....	67
Tabela 9- Tabela resumo do perfil patológico oral de cada indivíduo da população em análise	68

Lista de abreviaturas e siglas

aDNA – DNA antigo

DNA – ácido desoxirribonucleico

DVI – *Disaster Victim Identification*

EBV – Vírus Epstein-Barr

FDI – *Fédération Dentaire Internationale*

ISFG – *DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics*

Pb – Pares de bases

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação de polimerização em cadeia)

pH – Potência de hidrogénio

RNA – ácido ribonucleico

TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA

UV – Luz ultravioleta

V1-V4 – regiões hipervariáveis 1 à 4

1 – Introdução

A interdisciplinaridade entre a Microbiologia e a Bioarqueologia contribuiu para uma melhoria no conhecimento da evolução humana e das comunidades microbianas.

A Bioarqueologia estuda os remanescentes humanos exumados em contexto arqueológico. Amplamente conhecida como uma disciplina que analisa qualquer vestígio biológico (fauna ou flora), recuperado de um sítio arqueológico. Atualmente, o termo é utilizado com maior frequência, quando se trata de identificação e colheita de remanescentes humanos no local de escavação com propósito de análises subsequentes em laboratório, proporcionando novas abordagens para a compreensão de padrões culturais e acontecimentos passados (Krigbaum, 2008).

O esqueleto humano atua como uma valiosa fonte de informações devido à natureza dinâmica do tecido ósseo, que tem a capacidade de se remodelar ao longo da vida do indivíduo, em resposta às condições de vida (dietas, exposição a organismos patogênicos, ocupação, entre outros) (Radini & Nikita, 2022).

1.1 – Bioarqueologia

Os remanescentes humanos e o contexto funerário nos quais estão inseridos constituem uma fonte preciosa de informações, tanto no domínio biológico quanto cultural. Nesse sentido, a abordagem holística resultante da interdisciplinaridade e da complementaridade entre as áreas da Paleobiologia e da Antropologia funerária, aplicadas a contextos arqueológicos, desempenha um papel crucial na compreensão de antigas populações (Antunes-Ferreira, 2022).

Ao analisar grupos de indivíduos, é possível obter informações valiosas sobre uma determinada estrutura populacional em diferentes épocas (ex: pré-históricas), bem como perceber comportamentos culturais e padrões de doenças nas populações em questão (White et al., 2012).

As duas ciências que permitem obter estes conhecimentos são a Antropologia Funerária, que se dedica ao estudo dos mortos, e a Paleobiologia, que se associa à análise do mundo dos vivos.

No estudo intitulado “Antropologia Funerária e Paleobiologia, de um grupo populacional rural de Bucelas dos séculos XV ao XIX” de autoria de Nathalie Antunes-Ferreira com a

colaboração de Florbela Estêvão (2022), foi realizada uma análise do perfil biológico e patológico de 157 esqueletos exumados. De particular interesse a descrição da patologia oral dos indivíduos selecionados para a análise microbiológica (Anexo A – tabela 9) do presente estudo.

No âmbito da paleobiologia, a nível demográfico, morfológico e patológico, neste grupo populacional rural foi possível determinar o sexo, idade à morte, estatura, afinidades populacionais e eventuais alterações patológicas a nível do esqueleto (conhecimento do estado higiénico-sanitário, condições de vida, relação entre o indivíduo-patogénese e a resposta imunitária do mesmo) (Antunes-Ferreira, 2022).

A paleopatologia, no âmbito da disciplina de Antropologia, centra-se na investigação das doenças que afetaram populações no passado, incluindo a análise das suas origens e da sua distribuição ao longo do tempo e do espaço. O exame paleopatológico, em particular, foca-se nos tecidos biológicos que têm maior probabilidade de preservação ao longo do tempo, ou seja, ossos e dentes (Antunes-Ferreira, 2022).

Os resultados da análise patológica acima referida ajudam na interpretação do impacto dessas doenças na qualidade de vida e nos padrões dietéticos dos indivíduos pertencentes à população em estudo (Antunes-Ferreira, 2022).

Tanto os hábitos alimentares como o modo de preparação dos alimentos têm variado ao longo das épocas e encontram-se relacionados com a análise das patologias orais.

As cáries dentárias estão associadas aos alimentos cariogénicos, aos quais facilmente havia acesso, visto que os indivíduos se encontravam num meio rural.

1.2 – Microbioma Humano

Atualmente, é inegável o potencial que o esqueleto humano promove no conhecimento sobre populações do passado. Inúmeras pesquisas corroboram este facto e abrangem períodos que vão desde a pré-história até aos dias de hoje (White et al., 2012). Em contextos arqueológicos, o estudo do material genético, com exceção dos restos mumificados ou congelados, apenas pode ser feito através da análise de dois microbiomas: microbioma intestinal (material fecal) ou microbioma oral (placa dentária), uma vez que estes têm características que lhes conferem resistência à decomposição cadavérica (Nodari et al., 2021). Estes são também considerados os locais com maior incidência de colonização bacteriana (Kilian et al., 2016).

O campo de pesquisa no âmbito do microbioma evoluiu rapidamente, nas últimas décadas, tornando-se um tópico de interesse científico e público.

A pesquisa sobre a diversidade do microbioma humano teve início com Antonie Van Leeuwenhoek que, na década de 1680, comparou a sua microbiota oral com a fecal e encontrou diferenças significativas nos constituintes das mesmas. O mesmo aconteceu quando estudou a microbiota (oral e fecal) de indivíduos saudáveis e não saudáveis. Estas discrepâncias remontam ao passado, sendo consideradas simultaneamente bastante atuais (Ursell et al., 2012). Estas pesquisas só foram possíveis com a introdução dos primeiros microscópios, pois os microrganismos não são visíveis a olho nu (Berg et al., 2020).

Van Leuwenhoek investigou diversas bactérias, com as mais variadas formas, fungos e protozoários a partir de diferentes amostras, como, por exemplo, água e placa dentária. A placa dentária contribuiu para a descoberta de biofilmes – o primeiro indício de existência de interações entre microrganismos em comunidades complexas. Os biofilmes não são exclusivos da cavidade oral e são comuns nos mais variados ambientes líquidos ou semilíquidos, sendo extensivo a sistemas biológicos, industriais e ambientais. Embora a placa dentária seja amplamente estudada e sirva como “modelo” para a pesquisa dos biofilmes, é fundamental aprofundar o conhecimento nesta área. As formas bacterianas que o cientista designou por “animálculos” e descreveu inicialmente como “animais vivos muito pequenos, que se moviam de forma muito extravagante” existentes na placa, podem ser encontradas entre ilustrações desenvolvidas pelo cientista, das quais se destacam cocos, bacilos fusiformes e espiroquetas. Mais tarde, Robert Koch explicou a origem de doenças em humanos e animais, resultantes de infecções microbianas, e o desenvolvimento da patogenicidade. Todas estas descobertas são consideradas marcos importantes na área da Microbiologia (Berg et al., 2020; Bernimoulin, 2003; Cardoso, 2015; Warinner, Speller, & Collins, 2015).

As bactérias pertencem a um grupo bastante heterogêneo de organismos unicelulares denominado de procariotas e ao domínio *Bacteria*. Os três formatos mais comuns são: esférico, cilíndrico e helicoidal. A constituição das bactérias é muito simples, destacando a importância da parede celular que, além de definir o seu formato, também permite a distinção entre bactérias Gram-positivo e Gram-negativo. As bactérias Gram-positivo têm uma parede celular com uma camada de peptidoglicano com cerca de 20-80 nm de espessura, enquanto que nas Gram-negativo a camada é mais reduzida, com apenas 1-3 nm (Marinho & Taveira, 2020).

Os termos Microbiota e Microbioma são muitas vezes reconhecidos como sinónimos, porém com significados muito díspares. De acordo com Berg e colaboradores (2020), o termo Microbiota é geralmente definido como o “conjunto de microrganismos vivos presentes num ambiente definido”, enquanto que o termo Microbioma, tal como foi originalmente postulado por Whipps em 1988, inclui não só a comunidade dos microrganismos comensais, simbióticos e patogénicos que coabitam no nosso organismo (Dagli et al., 2015; Ursell et al., 2012), como também os elementos estruturais microbianos (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos e polissacarídeos), os metabolitos (toxinas, moléculas sinalizadoras e moléculas orgânicas e inorgânicas) e moléculas produzidas por hospedeiros coexistentes, estruturadas pelas condições ambientais onde se inserem (Berg et al., 2020).

O corpo humano é formado por diferentes habitats, que podem fornecer condições favoráveis ou desfavoráveis para a proliferação de microrganismos. O conjunto destes habitats, com condições favoráveis, forma o microbioma humano. Tal como em todos os vertebrados, a flora comensal microbiana do homem é muito abrangente. As bactérias são os microrganismos predominantes e a sua relação com o hospedeiro pode ser bastante específica, consequência das características peculiares deste microrganismo, tais como os mecanismos de aderência e a adaptação a determinados ambientes específicos (Martinelli, 2017; Silva, 2020).

As comunidades microbianas presentes no corpo humano desempenham uma panóplia de funções, realçando as metabólicas, fisiológicas, imunológicas, de barreira e preventivas contra invasores causadores de doenças (Deo & Deshmukh, 2019).

A forma como os microrganismos interagem com o hospedeiro pode ser positiva (relações de simbiose), negativa (como por exemplo: parasitismo e competição) ou neutra (Berg et al., 2020).

As associações/relações que uma determinada espécie que vive no corpo de outra sofre, de forma geral, denominam-se de simbioses. De forma sucinta, uma espécie utiliza o corpo de outra espécie maior como o seu meio ambiente e ambas beneficiam. Adicionalmente, são conhecidos três tipos de relações que o microrganismo pode ter com o hospedeiro: comensal, mutualista ou oportunista, tal como foi referido por Cardoso (2015). Consequentemente, desenvolve funções específicas para com o hospedeiro, tais como: auxiliar na digestão de alimentos, induzir a produção de proteínas e proteção contra microrganismos patogénicos, quando se trata de indivíduos saudáveis (Martinelli, 2017; Silva, 2020). A relação mutualista existe, quando os microrganismos protegem o

hospedeiro, competindo com os patogênicos e produzem nutrientes importantes para o desenvolvimento do sistema imunológico; a relação comensal ocorre quando a associação com o hospedeiro é neutra ou oportunista, provocando patologias aos hospedeiros debilitados. De acordo com o estado de saúde do hospedeiro, coinfeção e localização, a relação que este tem com o microrganismo pode passar de mutualista para comensal (Cardoso, 2015).

Os fatores ambientais e genéticos do hospedeiro, assim como as suas alterações determinam a constituição, diversidade e estabilidade do microbioma e, conseqüentemente, são encontradas diferentes comunidades de microrganismos específicas, não só de indivíduo para indivíduo, mas também de local para local. Como exemplo desses fatores, poder-se-ão encontrar a temperatura, a humidade, a nutrição, a resposta imunológica inata e específica contra os microrganismos, entre outros. O ser humano nasce sem microrganismos e a aquisição dos mesmos enriquece o microbioma. Normalmente, a boca de um recém-nascido é estéril, embora haja uma grande probabilidade de contaminação, visto que o bebé entra em contacto com a microflora do útero e da vagina da mãe durante o parto e, posteriormente, com os microrganismos presentes na atmosfera, no momento do nascimento (colonização por microrganismos), esta aquisição, por norma, é rápida (Deo & Deshmukh, 2019; Martinelli, 2017).

A flora de um determinado indivíduo é específica e vai evidenciar alguns fatores, tais como: idade, meio ambiente em que vive e estado nutricional do próprio indivíduo (Silva, 2020).

A definição do termo “Microbiota” facilita a discriminação entre os microrganismos pertencentes ao chamado microbioma autóctone, também conhecido como residente ou indígena, dos do alóctone, transiente ou não indígena (associados a estados específicos do microbioma ou condições ambientais restritas) de um determinado organismo. A microbiota alóctone altera ao longo do tempo, dependendo das condições ambientais, nutrientes disponíveis, entre outros fatores que condicionam o desenvolvimento dos microrganismos, enquanto que a microbiota autóctone permanece sem alterações significativas (Berg et al., 2020). Os microrganismos patogênicos podem ser alóctones ou autóctones (Cardoso, 2015).

As diversas partes do corpo humano como a pele, nariz, boca e tratos urinário e genital, que estão em contacto com o meio exterior, têm uma flora comensal, contrariamente aos órgãos internos que são estéreis (Silva, 2020).

1.2.1 – A Cavidade oral e o Microbioma Oral

De acordo com Dewhirst e colaboradores (2010) o microbioma oral humano é definido por “todos os microrganismos encontrados na cavidade oral humana até ao esófago distal”, cavidade essa que funciona como “processadora de comida onde os dentes são lambidos pela língua, banhados pela saliva e tocam todas as partículas de comida que passam os lábios” (Wasterlain, 2006).

Características como a complexidade na estrutura anatômica, conexão com o meio ambiente e o próprio ambiente húmido da cavidade promovem a proliferação dos mais variados microrganismos (Li et al., 2022). Esta comunidade denomina-se de microflora oral, microbiota oral ou, mais recentemente, microbioma oral. Atuam maioritariamente como comensais, isto é, coexistem harmoniosamente no corpo humano, mas podem adquirir características patogénicas em resposta a alterações no ambiente oral ou a outros desencadeantes, como, por exemplo, a qualidade da higiene pessoal de um indivíduo (Avila et al., 2009).

O microbioma oral é considerado a segunda maior comunidade microbiana existente no corpo humano, sendo antecedido apenas pelo intestino. Os 12 principais filos existentes na cavidade oral incluem Firmicutes, Fusobacteria, Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chlamydiae, Chloroflexi, Spirochaetes, SR1, Synergistetes, Saccharibacteria (TM7) e Gracilibacteria (GN02). Como principais géneros bacterianos encontramos *Streptococcus* e *Actinomyces* (Gram-positivo) e *Neisseria* e *Fusobacterium* (Gram-negativo). Não excluindo a existência de protozoários como *Entamoeba gingivalis* e *Trichomona tenax*, principalmente saprófitos, e *Candida* sp, como exemplo de fungos mais prevalentes na cavidade oral (Deo & Deshmukh, 2019; Warinner, Speller, & Collins, 2015). Não obstante, a maioria das investigações sobre biofilmes focarem-se mais no papel desempenhado pelas bactérias, as espécies fúngicas como *C. albicans*, podem exercer um papel na estrutura e função dos biofilmes. A presença desta levedura não é diretamente indicativo de doença, mas é conhecida a capacidade de formar biofilmes em superfícies sólidas, adotando estruturas tridimensionais que revelam uma notável resistência aos antifúngicos. Após a sua aderência inicial à superfície, os biofilmes formados por este microrganismo crescem nessa superfície e, subsequentemente, desenvolvem filamentos invasivos que penetram as células adjacentes (Avila et al., 2009.).

O aparecimento da maior parte das doenças presentes na cavidade oral, como por exemplo cáries, gengivite, periodontite (doenças das gengivas) e amigdalite, deve-se, pelo menos em parte, aos microrganismos que habitam e desregulam a cavidade oral. Além da complexidade das comunidades bacterianas nas placas dificultar a determinação de um único agente responsável pela cáries, poder-se-ão destacar os microrganismos patogênicos do género *Streptococcus* (*S. mutans* e *S. sobrinus*) e *L. acidophilus* (Cardoso, 2015; Dewhirst et al., 2010; Grice & Segre, 2012). De acordo com Wasterlain (2006), a definição de cárie, apesar de complexa, é a seguinte: “patologia infecciosa e transmissível, caracterizada pela desmineralização focal dos tecidos duros dentários por ácidos orgânicos produzidos pela fermentação bacteriana dos hidratos de carbono dietéticos”, e a periodontite “é caracterizada pela reabsorção da crista do osso alveolar, resultando numa morfologia óssea alterada e/ou reabsorção de lâmina cortical, de modo a revelar a sua estrutura trabecular porosa”. Esta última, quando não é tratada, pode causar alguma sintomatologia como: mau hálito, sangramento proveniente das gengivas, perda óssea e abscessos gengivais. Estas patologias, quando consequência de desequilíbrios no microbioma oral autóctone, promovem um aumento no número de microrganismos patogênicos orais dentro do biofilme (Cardoso, 2015; Metcalf et al., 2014). Filoche e colaboradores (2010) referem que a cárie dentária, ocorre, por norma nos dentes acima da linha da gengiva – supragengivalmente – e a doença periodontal abaixo, afetando os tecidos de suporte do dente. É possível ocorrerem as duas patologias em simultâneo no mesmo dente.

O conhecimento sobre a cavidade oral é fulcral para uma melhor compreensão das alterações que ocorrem na placa bacteriana (ou placa dentária ou biofilme dentário). A cavidade oral, no Homem, conta com a presença de uma grande diversidade de flora bacteriana, cerca de 700 grupos bacterianos. As bactérias dominantes na cavidade oral são os *Streptococcus*, no entanto, podem, igualmente, ser encontrados outros tipos de bactérias, tais como: *Veillonella*, *Gamella*, *Rothia*, *Fusobacterium* e *Neisseria* (Deo & Deshmukh, 2019; Silva, 2020). Algumas das bactérias pertencentes a estes grupos dão origem à formação da placa bacteriana, que pode ou não promover o desenvolvimento de doenças (Martinelli, 2017).

A distribuição das bactérias varia qualitativa e quantitativamente de acordo com o ambiente e é específica de habitat para habitat na cavidade oral, apesar das semelhanças. Em habitats como a língua, que possui numerosas papilas com poucos locais anaeróbicos prevalecem microrganismos como *S. salivarius*, *S. mitis* e *Veillonella spp.*, enquanto que,

na saliva, as espécies predominantes pertencem ao grupo *Streptococcus viridans*. Adicionalmente, é possível encontrar outros microrganismos, como *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Veillonella* sp., *Fusobacterium* sp., *Bacteroides* sp., *Actinomyces* sp., *Treponema* sp. e leveduras (*Candida* sp.). Enquanto que, no sulco gengival, se destaca a presença de bactérias anaeróbias, onde microrganismos como *Peptostreptococcus* sp. e os cocos anaeróbios relacionados são as mais comuns (Deo & Deshmukh, 2019; Silva, 2020). Relativamente às membranas mucosas, a informação disponível é muito reduzida devido à elevada escamação das células superficiais, salientando-se a presença de *S.oralis* e *S.sanguis*, que aparecem apenas depois da erupção da dentição (Cardoso, 2015). Após a erupção de um dente, este vai estar exposto aos elementos existentes na cavidade oral, principalmente saliva, restos alimentares, microrganismos, entre outros (Grice & Segre, 2012; Martinelli, 2017), acabando por tornar-se um local com condições favoráveis para a proliferação de microrganismos. Bactérias como *S.mutans*, *S.sobrinus*, *S.cricetus* e *S.rattus* proliferam muito bem nos dentes (Avila et al., 2009).

Um dos microrganismos conhecidos como colonizadores primários/espécies pioneiras são *Streptococcus salivarius*. Ao longo do primeiro ano, os microrganismos existentes na cavidade oral são predominantemente aeróbios, nomeadamente: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, *Neisseria* e *Veillonella*. Depois da colonização primária, estes microrganismos formam uma superfície onde irá realizar-se a colonização secundária que, na sua maioria, são bactérias Gram-negativo, incapazes de ligar-se à “superfície primária”, destacando *Streptococcus* e *Actinomyces*. Com o avançar da idade e, conseqüentemente, com o início da perda de dentição, a flora oral torna-se semelhante à de uma criança sem dentes (Cardoso, 2015; Martinelli, 2017).

A composição do microbioma oral é influenciada por diversos fatores que podem ser exógenos ou endógenos, nomeadamente hábitos alimentares, idade, função hormonal, fluxo salivar, condições imunológicas, higienização, alcoolismo, entre outros (Cardoso, 2015). Ambos afetam não só o desenvolvimento da microbiota oral, como também mantêm o equilíbrio dinâmico (Li et al., 2022). Este pode sofrer mudanças rápidas e notórias na sua composição causadas por disbiose, ou seja, variações na composição e função da comunidade microbiana que podem ser prejudiciais à saúde (Deo & Deshmukh, 2019).

Embora os lábios, palato, bochechas, língua e gengivas possam ser colonizados por diversos microrganismos, os mesmos são considerados ambientes com uma menor capacidade de aderência, consequência da constante mudança na superfície mucosa. Por

outro lado, os dentes são o “habitat” ideal para os microrganismos, pois fornecem as condições essenciais para que ocorra a colonização: superfícies duras e inalteráveis, não sendo constantemente renovadas pela queda de células epiteliais colonizadas (Wasterlain, 2006).

1.3 – Biofilme dentário

A Antropologia Dentária estuda os dentes humanos, destacando a sua evolução, características métricas e morfológicas, e todos os dados que possam fornecer pistas sobre a vida e os hábitos alimentares, de higiene e culturais, dos indivíduos. Demonstra, assim, ser uma importante área de investigação no âmbito do estudo do padrão de saúde oral das populações do passado (Wasterlain, 2006).

Os dentes desempenham um papel crucial na disponibilização de informações valiosas relacionadas com a idade, sexo, estado de saúde, dieta e relações evolutivas de mamíferos vivos ou extintos, incluindo os hominídeos (White et al., 2012).

Os dentes, dentro dos tecidos duros no corpo humano, promovem algumas vantagens ao serem selecionados para matéria prima num determinado estudo. Poder-se-á destacar entre outros, o facto de serem considerados 1) uma prova física duradoura *post-mortem*, consequência do elevado grau de mineralização dos tecidos dentários, que permite que resistam às alterações permanecendo bem preservados; 2) um marcador fundamental na vida dos seres vivos, no âmbito do estudo da evolução dos primatas e hominídeos; 3) uma amostra que regista, de forma permanente, todas as mudanças que ocorrem durante e após o desenvolvimento, pois não é sujeita a remodelações; 4) as únicas partes do corpo em contacto direto com o meio ambiente (Wasterlain et al., 2006).

O conhecimento relativamente aos dentes e tecidos envolventes teve avanços significativos durante os séculos XX e XXI, nomeadamente no que concerne à sua anatomia, desenvolvimento, fisiologia e patologia.

Os dentes fomentam o aparecimento de dois habitats microbianos diferentes: acima da margem gengival e abaixo, o que resulta em duas comunidades distintas, placa dentária ou biofilme dentário supragengival e subgengival, respetivamente. Estes compartilham semelhanças na composição química, estrutura microscópica e conteúdo microbiano, mas diferem em dois fatores: potencial redox e fontes nutritivas. A placa supragengival forma-se num ambiente mais aeróbico e os nutrientes são de origem salivar, devido à sua proximidade dos ductos das principais glândulas salivares (sub-lingual, sub-maxilar e

parótida), enquanto que, na subgingival, predomina um ambiente anaeróbico, cobrindo a superfície da raiz, sendo os nutrientes provenientes do fluido gengival crevicular (exsudado inflamatório da gengiva) (Li et al., 2022; Warinner, Speller, & Collins, 2015). A placa dentária é constituída por uma camada espessa de biofilme que cobre as superfícies expostas dos dentes (ou gengiva, língua, prótese e restaurações) e, no que diz respeito a microrganismos, tem uma natureza heterogénea, salientando a presença de *Streptococcus* do grupo *viridans*, como *Streptococcus mutans*, que fermentam os açúcares produzindo ácidos. A constituição desta varia entre os diferentes locais e faces dos dentes. Estas bactérias obtêm a maior parte dos seus nutrientes a partir da saliva e do fluido gengival, incluindo proteínas, péptidos, aminoácidos e glicoproteínas. A sua capacidade de metabolizar certos alimentos, como hidratos de carbono, também permite a obtenção de nutrientes (Cardoso, 2015; Silva, 2020; Soames & Southam, 2005; Wasterlain, 2006). A saliva é um constituinte da cavidade oral com elevada saturação em fosfato de cálcio, considerada a força motriz para a mineralização e posterior formação de placa dentária (Pateel et al., 2017). Acredita-se que exerça uma grande influência na colonização e eliminação de microrganismos e contém, na sua constituição, várias proteínas com capacidade de se ligarem à superfície do esmalte, formando uma barreira protetora contra os ácidos dos alimentos – película de esmalte adquirida, que se desenvolve antes ou simultaneamente com a colonização bacteriana. Esta consiste numa camada acelular de proteínas salivares e outras macromoléculas presentes nas superfícies dentárias, que a tornam um local favorável para a adesão e propagação de microrganismos (Wasterlain, 2006), formando o biofilme bacteriano. Dos microrganismos que aderem inicialmente, destacam-se *Streptococcus viridans* (maioritariamente microrganismos Gram-positivo) e as espécies de *Actinomyces* (Warinner, Speller, & Collins, 2015). As bactérias orais ligam-se à película e colonizam, dando origem à placa dentária (Salazar-García et al., 2023).

Na placa dentária, existem células mortas e biomoléculas complexas identificadas como centros de nucleação, cuja função é a formação espontânea de minerais. O biofilme da placa sofre eventos periódicos de calcificação, devido à formação espontânea de minerais, nos quais o fosfato de cálcio acaba por ser precipitado na matriz da placa o que, conseqüentemente, mineraliza o biofilme. De seguida, volta a formar-se a película de esmalte adquirida na superfície da placa calcificada e um novo biofilme. Este processo ocorre várias vezes e, por isso, há formação de deposições de cálculo dentário (camadas temporalmente ordenadas) (Salazar-García et al., 2023).

1.4 – Cálculo Dentário

A placa bacteriana está presente de forma abundante nas coleções esqueléticas, sob a forma de placa mineralizada na cavidade oral, também denominada de cálculo dentário ou tártaro (Wasterlain, 2006), descrito de acordo com Salazar-García e colaboradores (2023) como uma amostra “muito rica em proteínas humanas e bacterianas por peso seco e pelo menos 250 destas proteínas foram identificadas no cálculo dentário, desde proteínas digestivas (alfa-amilase 1), do sangue (por exemplo, hemoglobina, albumina) e do sistema imunitário (por exemplo, alfa-1-antitripsina, mieloperoxidase) a enzimas bacterianas (por exemplo, desidrogenases, cinases)”. Esta mineralização pode ser proveniente de um processo *in vivo* ou de uma semi-fossilização (Salazar-García et al., 2023).

O cálculo dentário resulta da mineralização progressiva da placa, tal como foi referido anteriormente, com precipitação de sais minerais, sobretudo fosfato de cálcio, nas superfícies dos dentes, provenientes das secreções salivares e do fluido gengival crevicular (Keyes & Rams, 2016). Por outras palavras, trata-se de microrganismos, restos de alimentos e outras partículas não alimentares que aderem à superfície dos dentes, que não são removidos ao longo do tempo e mineralizam, formando uma camada dura. É importante ressaltar que o cálculo dentário não é considerado tecido humano, mas sim a acumulação de depósitos de substâncias indesejadas na superfície dos dentes.

Tal como na placa bacteriana também o cálculo é classificado em supragengival e subgengival (figura 1). A acumulação de cálculo dentário pode ser pequena e localizada ou maciça e generalizada (Salazar-García et al., 2023).

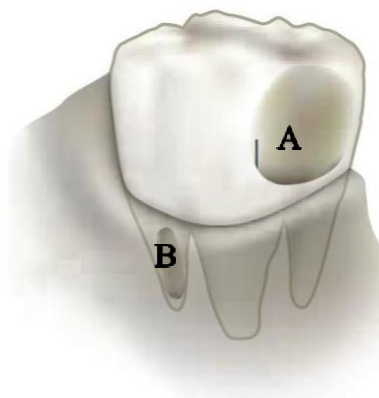


Figura 1- Representação dos dois tipos de cálculo dentário, onde a letra A corresponde ao cálculo dentário supragengival e a letra B ao cálculo dentário subgengival (Adaptado de Metcalf et al., 2014).

A sua constituição, a nível de biomassa, é maioritariamente formada por células bacterianas (cerca de 70%) (Mann et al., 2020).

Além da análise macroscópica, a investigação microscópica do cálculo dentário também teve avanços significativos durante os anos de 1980 a 1990. Durante a década de 1980, o cálculo dentário foi documentado em diversas populações arqueológicas e, conseqüentemente, foram desenvolvidos protocolos para registar a distribuição e gravidade do mesmo. No percorrer das décadas acima referidas, o interesse por esta amostra aumentou à medida que a sua ocorrência foi observada, tornando-se uma prática padrão na análise de restos humanos (Warinner, Speller, & Collins, 2015).

A descoberta de que o cálculo dentário não só armazena DNA antigo (aDNA) e microrresíduos de plantas, mas também proteínas e alcalóides, permitiu obter informações sobre a dieta, a saúde e o comportamento das populações ancestrais (Salazar-García et al., 2023).

Dobney & Brothwell (1988), com o seu trabalho pioneiro, revelaram uma grande diversidade de microfósseis microbianos e dietéticos bem preservados no cálculo dentário arqueológico. Paralelamente, com o aparecimento da microscopia eletrónica de varrimento, foi possível revelar a presença de formas bacterianas bem preservadas no cálculo dentário, que remontam ao Mioceno (há \pm 9 milhões de anos). Esta técnica permitiu observar a microbiota que se encontrava preservada na matriz do cálculo.

Nos anos 1990-2000, a existência de grânulos de amido e respetiva análise contribuíram, de forma fundamental, no âmbito da reconstrução de componentes das dietas humanas. A microscopia de microrresíduos (fitólitos e grãos de amido, por exemplo) tornou possível a reconstrução do uso e consumo de plantas por povos antigos (Salazar-García et al., 2023; Warinner, Speller, & Collins, 2015; Wright et al., 2021).

Com descobertas que datam apenas a algumas décadas, surgiu a chamada “Era da Paleomicrobiologia” - disciplina que estuda a flora oral antiga e as suas interações com o hospedeiro - quando o primeiro aDNA foi extraído de um músculo seco de uma espécie extinta semelhante à zebra (*Equus quagga*). Pouco depois, foi possível detetar o primeiro DNA humano num extrato de músculo de uma múmia egípcia. Krings e colaboradores (1997) conseguiram sequenciar espécimes de Neandertais e, conseqüentemente, promoveram grandes avanços nesta mesma área. Mais tarde, em Denisova, numa caverna, foi encontrado um molar, do qual foi extraído DNA para reconstrução da sequência mitocondrial completa e, no ano de 1975, iniciaram-se as análises ao cálculo dentário arqueológico pela primeira vez (Dagli et al., 2015).

A primeira investigação biomolecular do cálculo dentário foi realizada em 1966 com o objetivo de identificar o microrganismo *Streptococcus mutans* (um dos agentes causadores da cárie dentária) através de análise imunohistoquímica. Em 2011, a preservação do DNA bacteriano dentro do cálculo dentário foi confirmada através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão com marcação de anticorpos com ouro. Esta nova técnica, juntamente com abordagens genéticas direcionadas com base no PCR, permitiu a descoberta de outros microrganismos tais como: *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces naeshlundii*, entre outros (Warinner, Speller, & Collins, 2015).

Inicialmente, a investigação relativamente ao cálculo dentário centrou-se, maioritariamente, em evidências dietéticas. De destacar que, durante a sua formação, este pode conter partículas de diferentes naturezas, desde plantas a compostos químicos (Radini & Nikita, 2022).

Cronologicamente: Blondiaux & Charlier (2008) encontraram vários tipos de detritos minerais no cálculo dentário e, promovido por análises posteriores, foi possível detetar uma possível intoxicação relacionada com a ocupação, em Monterenzio Vecchia; Blatt e colaboradores (2011) recuperaram evidências de fibras de algodão (*Gossypium spp.*) *in situ* no cálculo dentário de esqueletos de Danbury, datados dos anos 900-1100 ; Hardy e colaboradores (2012) devido à possível identificação de compostos químicos específicos, foi possível detetar a exposição ao fumo e betume em indivíduos da população Neandertal exumados em Espanha; Radini e colaboradores (2019) recuperaram evidências de pigmentos, a partir do cálculo dentário de uma mulher do período Medieval e Wright e colaboradores (2021), através da extração de fitólitos de plantas, encontrados na superfície dos dentes de gado, concluíram que o biomaterial encontrado poderia ser útil na reconstrução das dietas antigas.

A presença do cálculo dentário está relacionada com elevadas quantidades de placa bacteriana que, por sua vez, é consequência de uma má higiene oral e elevado consumo de hidratos de carbono provenientes do tipo de dieta (Wasterlain, 2006).

Em vida, o cálculo dentário é considerado um agressor da região periodontal, não só por meios mecânicos, mas também por meios químicos. É ainda visto como uma fonte de microrganismos orais e de biomoléculas antigas provenientes de hospedeiros, sendo único de indivíduo para indivíduo (Mann et al., 2018).

De acordo com Tan e colaboradores (2004), há estudos epidemiológicos que demonstram uma correlação entre o cálculo dentário e as doenças orais superiores, quando comparadas com a placa dentária. Atualmente, o cálculo dentário por si só não é considerado prejudicial e este pode ser controlado por remoção mecânica de forma a controlar a camada de bactérias não mineralizadas, viáveis e metabolicamente ativas. Caso contrário, parece que a tendência a formar cálculo dentário está associada a fatores endógenos do indivíduo, nomeadamente na composição da saliva (Rosebury, 1944).

Sabe-se que a saliva não está distribuída uniformemente pela boca e que, conseqüentemente, a distribuição do cálculo também não. O cálculo supragengival mais abundante tende a depositar-se em superfícies dentárias expostas, próximas dos ductos salivares, enquanto que o subgengival menos evidente, não. A nível de dentição, o cálculo supragengival é mais comum em dentes inferiores nas superfícies linguais e nas superfícies bucais, nos primeiros e segundos molares, por outro lado, o cálculo subgengival está presente de forma significativa nas superfícies linguais e bucais dos dentes anteriores da mandíbula e nos molares superiores (Jin & Yip, 2002; X. Li et al., 2022; Rosebury, 1944; Warinner, Speller, & Collins, 2015).

A quantidade de cálculo dentário presente nos dentes varia não só entre indivíduos, como também entre dentes do mesmo indivíduo. A quantidade do referido cálculo é influenciada pelo tipo de dente, o estado de saúde do dente e do indivíduo (muita ou pouca carga bacteriana), a proximidade ou longevidade dos canais salivares e variação genética (altera as características da saliva), sendo também variável consoante o pH do meio. O pH pode ser alterado direta (ingestão de alimentos ácidos) ou indiretamente (metabólitos dos produtos bacterianos) pela alimentação, sendo também esta considerada como um dos fatores que influencia a formação do cálculo dentário (Salazar-García et al., 2023). Os canais salivares, quando localizados na parte superior, são denominados de parótida e, se se encontrarem na parte inferior, denominar-se-ão de sublingual. Os componentes

salivares são a fonte nutricional primária dos microrganismos, sendo necessários para o desenvolvimento de um microbioma equilibrado (Kilian et al., 2016).

Os constituintes salivares para além das funções a nível de defesa química, física e imunológica, contribuem para a homeostase do cálcio, existente na cavidade oral, sendo esta última função uma das mais importantes. Existem várias proteínas salivares importantes, de entre as quais se pode destacar a estaterina, considerada uma proteína protetora, cuja função é inibir o crescimento dos cristais de fosfato de cálcio em soluções supersaturadas e, conseqüentemente, a interação destas com várias bactérias orais. O excesso de cálcio salivar tem sido relacionado com o aparecimento de cálculo supra ou subgingival (Li et al., 2022; Pateel et al., 2017).

De acordo com os resultados de Pateel e colaboradores (2017), é possível afirmar que os níveis de estaterina divergem de forma inversamente proporcional consoante a quantidade de cálculo dentário existente.

Refutando os resultados dos primeiros estudos, em espécimes arqueológicas, a quantidade de ácidos nucleicos no cálculo dentário é superior à existente na dentina ou no osso do mesmo indivíduo (com ou sem patologias orais), tornando-o a fonte mais rica de DNA antigo endógeno no registo arqueológico. Esta elevada quantidade de ácidos nucleicos explica-se pelo facto do DNA conseguir ligar-se fortemente aos minerais de fosfato de cálcio (existentes na saliva), podendo o crescimento mineral ao redor e dentro das células bacterianas orais ajudar diretamente na sobrevivência dos referidos ácidos nucleicos (DNA existente no cálculo dentário) (Warinner, Speller, & Collins, 2015).

Tendo em conta que a densidade de células bacterianas é muito elevada, estes resultados não são propriamente uma surpresa (Salazar-García et al., 2023). Cada indivíduo contém cerca de 100 triliões de bactérias (calcula-se que a população bacteriana num adulto seja aproximadamente 10^{14} células), o que representa 1-3% do nosso peso corporal (Silva, 2020; Trivedi, 2012a).

Foi comprovado, com dentes diferentes, que, quanto maior for o volume de polpa, melhor será a fonte de recolha de DNA. Conseqüentemente, os molares são os dentes indicados nos protocolos de seleção de amostra, publicados pela Interpol – *Disaster Victim Identification* (DVI) Guide 2009 e pela *DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics* (ISFG) recomendações para DVI. Na ausência de molares, são utilizados os caninos, visto apresentarem maior volume de polpa (Higgins & Austin, 2013). Relativamente à presença de cálculo dentário, os molares superiores e os caninos

inferiores são os dentes com maior acumulação devido à proximidade dos ductos salivares.

Recentemente, adiantou-se que o cálculo dentário também poderia ser utilizado em estudos para investigações isotópicas, onde o colágeno não se encontre bem preservado ou em restos humanos em que não são permitidas análises destrutivas, visto não ser considerado parte integral ou inerente do corpo humano. A análise de isótopos estáveis encontrados no cálculo dentário foi considerada uma ferramenta essencial no âmbito de investigações relacionadas com a migração antiga e a reconstrução de paleodietas (Salazar-García et al., 2023). A matéria mineral constitui cerca de 70-80% da massa, destacando-se o cálcio e fósforo. O cálculo supragengival e subgengival contêm, respetivamente, 37% e 58% de conteúdo mineral em volume (Jin & Yip, 2002; Rosebury, 1944).

De acordo com vários estudos publicados, existem diferenças na quantidade de cálculo dentário encontrado nos indivíduos ao longo do tempo: Huynh e colaboradores (2016) referem que uma má higiene oral leva à formação de placa bacteriana e que, embora o cálculo dentário fosse raro na época dos caçadores-recoletores, ocorreu um aumento do número de casos nas populações pós-Neolítico.

Esta situação pode ser explicada pelas variações ocorridas nas dietas alimentares, nas quais existe uma relação proporcional entre a ingestão de hidratos de carbono e a presença de bactérias patogénicas. Quando a dieta consiste em hidratos de carbono, aumenta o número de bactérias presentes e, conseqüentemente, promove-se o aparecimento de doenças periodontais, como no caso das populações do Período Neolítico. Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas no microbioma oral, entre o Neolítico e a Idade Média (Huynh et al., 2016).

Por outro lado, visto que os ecossistemas microbióticos orais modernos são considerados menos diversificados, quando comparados com os das populações históricas, constata-se que estes podem contribuir para o aparecimento de doenças orais, nos estilos de vida pós-industriais. Estas doenças eram consideradas raras na época dos caçadores-recoletores (Adler et al., 2013).

Os produtos naturais consumidos pelos nossos antepassados foram substituídos por uma alimentação ocidental e geneticamente modificada, com abundância em alimentos processados, açúcar, óleo e sal, entre outros ingredientes artificiais (Warinner et al., 2015a).

Em 1980, foi demonstrado por Miller que a produção de ácidos era consequência de microrganismos específicos que cresciam nas partículas de comida, encontradas na cavidade oral. Isto foi corroborado e apoiado por estudos que consistiam na correlação entre a dieta e a cárie dentária. A cárie tornou-se uma doença endémica, que afetava entre 60 a 90% das crianças em idade escolar nos países industrializados e a doença periodontal ocorria entre 5 a 20% da população adulta a nível mundial (Adler et al., 2013).

Um dos resultados, corroborado em todos os estudos, prendeu-se com o facto de que os alimentos ricos em hidratos de carbono fermentáveis, nomeadamente açúcares, estão associados ao aumento da atividade metabólica das bactérias cariogénicas (Wasterlain, 2006).

1.5 – Gene 16S rRNA

Adler e colaboradores (2013) recorreram à análise do gene 16S rRNA, com a finalidade de demonstrar que o cálculo dentário preserva um perfil microbiológico oral, tendo conseguido ainda recuperar dados de microbioma de indivíduos que remontam à época do Mesolítico. Adicionalmente, investigaram duas alterações ecológicas a nível do filo que coincidem com o início da Agricultura e Industrialização (Warinner, Speller, & Collins, 2015).

Desde o momento em que a filogenia, baseada no gene 16S rRNA, foi descrita a partir de um grupo inicial de 11 filos bacterianos, em 1987, houve um crescimento exponencial na base de dados. Este crescimento levou à construção de um banco de dados ribossomais, que continha mais de 2 milhões de sequências de 16S rRNA e 35 filos, permitindo analisar a diversidade molecular de comunidades de microrganismos (Grice & Segre, 2012).

O gene 16S rRNA codifica a pequena subunidade do RNA ribossomal procariótico e é constituído por 9 regiões hipervariáveis (V1-V9) separadas por 10 regiões conservadas (Wright et al., 2021).

O 16S rRNA está presente em todos os procariotas e contém regiões variáveis únicas entre microrganismos, que podem ser utilizadas como meio de identificação. O facto de o gene não sofrer alterações ao longo do tempo, ser constituído por 1500 pb e ser bastante conservado são também características benéficas na escolha deste.

Pode ser extraído de amostras heterogéneas, amplificado e sequenciado, e depois comparado com bases de dados como a “Human Microbiome Database”, em português Projeto do Microbioma Humano. O culminar dos estudos dos investigadores K Li Bihan

e Methe, promoveram o aparecimento de um projeto denominado de Base de dados do Microbioma Oral, que permitiu construir um repositório de sequências genómicas de bactérias orais. O objetivo destes projetos era caracterizar as comunidades microbianas de forma geral (Projeto do Microbioma Humano) ou específica (Base de dados do Microbioma Oral) e analisar o papel desses microrganismos na saúde e doença do indivíduo. (Cardoso, 2015; Deo & Deshmukh, 2019; Grice & Segre, 2012; Kilian et al., 2016, Li et al., 2013).

A amplificação e sequenciação do gene 16S rRNA representam métodos robustos para a descoberta de novos grupos microbianos em comunidades mistas, eliminando a necessidade de crescimento dos microrganismos. No entanto, as tecnologias de sequenciação de leitura curta, como as utilizadas pela Illumina, não conseguem sequenciar completamente o extenso gene 16S rRNA. Em vez disso, geralmente permitem a análise de apenas uma ou duas das nove regiões hipervariáveis mais curtas desse gene. De ressaltar que mesmo essas regiões curtas frequentemente ultrapassam o tamanho da maioria dos fragmentos de DNA antigo. A capacidade de atribuir com precisão um grupo taxonómico, como género ou família, é reduzida, e essa redução, na resolução, varia entre os diferentes grupos microbianos, afetando alguns de forma mais pronunciada do que outros. Além disso, ao contrário da maioria dos genes microbianos, o número de cópias do gene 16S rRNA por genoma varia significativamente, com algumas bactérias, possuindo de 1 a 15 cópias ou mais (Warinner et al., 2017).

O termo "metagenómica", introduzido inicialmente por Jo Handelsman, da Universidade de Wisconsin (EUA), refere abordagens que não dependem do crescimento em meios de cultura, mas que se baseiam na análise das moléculas de DNA extraído diretamente das amostras (Cardoso, 2015).

O desenvolvimento da metagenómica veio permitir uma análise mais precisa dos genomas. (Kazarina et al., 2021).

Recentes estudos de metagenómica, impulsionados pelos avanços tecnológicos na sequenciação de próxima geração evidenciaram a viabilidade de recorrer ao cálculo dentário – placa mineralizada que se forma nas superfícies dos dentes ao longo da vida – de espécimes antigos como recurso para obter informação significativa relacionada com a dieta, higiene, saúde, estilo de vida e evolução genética das comunidades microbianas presentes nas amostras de aDNA e investigar os microbiomas orais do passado em determinados períodos históricos e regiões geográficas diferentes de seres humanos e homínídeos extintos. Assim, as biomoléculas de diversas origens presentes na matriz

mineral do cálculo dentário, abrangendo microrganismos e resíduos de alimentos, assumem-se como uma fonte valiosa de informações genéticas e microfósseis (Ottoni et al., 2019).

A metodologia utilizada nestes estudos tem vindo a ser cada vez mais otimizada com o intuito não só de permitir diminuir o número de amostras perdidas, como também de aumentar o conhecimento sobre os nossos antepassados.

A descoberta do aDNA na cavidade oral e o avanço na área de Biologia Molecular não só facilitou o estudo, como também permitiu explorar novos horizontes no “mundo antigo”.

2 – Objetivos

O objetivo deste trabalho é analisar um conjunto de amostras de cálculo dentário, provenientes de esqueletos da necrópole Moderna (séculos XV a XIX) situada no Largo do Espírito Santo, em Bucelas. Adicionalmente, este estudo visa estabelecer uma articulação entre a análise microbiológica do cálculo dentário e variáveis como o tipo de dente, afinidades populacionais e sexo dos indivíduos da amostra em estudo, com o propósito de identificar possíveis diferenças nas categorias taxonómicas entre indivíduos. Além disso, almeja-se comparar os microrganismos responsáveis por patologias orais, nomeadamente cáries e cálculo dentário, nos séculos XV-XIX e a sociedade atual. Terminando com uma tentativa de compreensão da relação de proximidade entre os indivíduos da população em estudo, utilizando a análise filogenética com clusters como abordagem analítica.

3 – Materiais e Métodos

3.1 – Amostras

A coleção de esqueletos, que pertencia a um grupo populacional rural de Bucelas dos séculos XV ao XIX, foi exumada entre 2018 e 2019 durante uma intervenção arqueológica de carácter urgente (Antunes-Ferreira, 2022). É constituída por 157 esqueletos, numerados de 1 a 157, provenientes de inumações primárias.

Foram identificados dois contextos arqueológicos (figura 2): o da necrópole cristã e o da época romana (Antunes-Ferreira, 2022).

Cada esqueleto estava acompanhado com uma *Ficha de Esqueleto* que continha informações como posição e orientação do corpo na sepultura, perturbações *post-mortem*, alterações patológicas nos ossos e dentes e perfil biológico (Antunes-Ferreira, 2022).

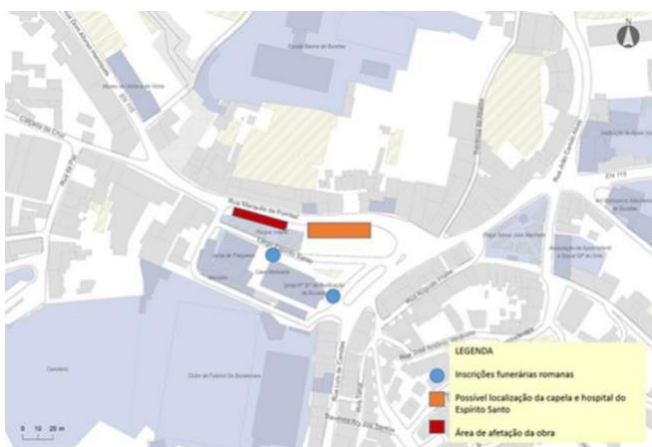


Figura 2- Planta do núcleo antigo de Bucelas, onde destacado com a cor azul, correspondem as inscrições funerárias romanas, com a cor laranja uma possível localização da Capela e o Hospital do Espírito Santo e a vermelho a área que a obra iria afetar (Adaptado de Antunes-Ferreira, 2022).

A escavação desta necrópole revelou ainda a presença de indivíduos com possíveis afinidades populacionais africanas (Antunes-Ferreira, 2022).

Tal como referido anteriormente, identificaram-se 157 indivíduos nas inumações primárias, dos quais 98 correspondiam a indivíduos adultos (59 do sexo masculino, 33 do sexo feminino e seis de sexo desconhecido) e 59 não adultos (Antunes-Ferreira et al., 2021).

A nível de ocupações profissionais, os registos históricos sugerem que a maioria dos habitantes de Bucelas, durante o período moderno, eram trabalhadores rurais, com

algumas referências a trabalhadores artesanais qualificados, como toneleiros, fabricantes de cestos, pedreiros, ferreiros e batedores de peles (Antunes-Ferreira et al., 2021). Neste contexto, era produzido trigo, cevada, milho, azeite e vinho em grande abundância. Adicionalmente, existiam pomares de frutas, nomeadamente cerejeiras e criação de gado (Antunes-Ferreira, 2022).

3.2 – Seleção de amostras

Apenas 15,2% da amostra, isto é, 24 dos 157 indivíduos atenderam aos critérios de inclusão para a análise paleomicrobiológica. Esses critérios incluíam a necessidade de serem indivíduos adultos (os 59 não adultos/crianças foram excluídos do estudo, resultando apenas 98 indivíduos) apresentarem crânio e não se observar perda total de dentes (*postmortem* ou *antemortem*).

Dos esqueletos selecionados (Anexo A- tabela 8) para análise microbiológica, 70,8% correspondiam a indivíduos do sexo masculino. A faixa etária mais comum era a de indivíduos adultos maduros (Tabela 1). Relativamente às afinidades populacionais, apenas consta um indivíduo africano (Esqueleto 82).

Tabela 1- Perfil demográfico da série esquelética exumada no Largo do Espírito Santo, em Bucelas.

Categoria etária	Feminino	Masculino	Indeterminado	Total
Adulto maduro	5	16	2	23
Adulto jovem	-	1	-	1

Os dentes utilizados para a extração de cálculo dentário foram: caninos, incisivos, pré-molares e molares, devidamente identificados e numerados pelo sistema implantado pela Fédération Dentaire Internationale (FDI) (Anexo A- tabela 8). O planeamento do procedimento é condicionado pela disponibilidade dos dentes em cada conjunto esquelético, uma vez que perdas de dentes *ante* e *post-mortem* são eventos comuns. O cálculo supra e subgingival deve ser recolhido e analisado separadamente, porém, na ausência de tecido mole, torna-se difícil a distinção. (Warinner, Speller, & Collins, 2015). A literatura sugere que a quantidade de cálculo dentário deve variar entre 50 a 100 mg, sendo possível combinar amostras de diferentes dentes para atingir essa quantidade mínima. No entanto, para alguns dos indivíduos, não foi possível obter a quantidade mínima recomendada.

3.3 – Recolha de amostras

Dado que se trata de uma técnica de amostragem destrutiva, é essencial fotografar a dentição e documentar informações como a localização e a gravidade do cálculo dentário antes de realizar o procedimento (Warinner, Speller, & Collins, 2015). Os dentes utilizados foram fotografados em várias posições anatómicas: mesial, distal, lingual e bucal.

A recolha da amostra foi feita diretamente no esqueleto e, conseqüentemente, todos os materiais utilizados para a mesma (pinças, bisturi, luvas e eppendorfs) eram estéreis. Para diminuir a probabilidade de contaminação, após a colocação das luvas, passaram-se as mesmas por etanol. Foi utilizada uma máscara, tanto na recolha como no procedimento laboratorial.

Os procedimentos que se seguem foram feitos em ambiente estéril.

3.4 – Preparação de amostras

A etapa de preparação de amostras foi uma etapa crucial para garantir a presença de DNA suficiente para a extração. A sua otimização exigiu pesquisa bibliográfica, da qual resultaram quatro procedimentos possíveis: utilizar elevadas quantidades de cálculo dentário, proceder à lavagem do mesmo com hipoclorito de sódio, exposição à radiação ultravioleta (UV) ou maceração. O procedimento escolhido foi descrito por Weyrich e colaboradores (2015) para descontaminação e controlo do DNA contaminante.

O processo consiste na junção das quatro hipóteses acima referidas: inicia-se pela exposição, durante 15 minutos, de ambas as faces da amostra à radiação UV, seguida da submersão em lixívia durante 5 minutos e, posteriormente, em etanol absoluto (100%), durante 3 minutos. Por último, deixa-se secar. Todo este procedimento foi feito na câmara de fluxo laminar.

Depois da etapa da secagem da amostra, macera-se a mesma dentro de um saco estéril, para posteriormente ser transferida para um tubo (NZYSpin Soil Bead Tube), iniciando a extração do DNA.

3.5 – Extração do DNA

O kit utilizado para a extração de DNA foi o NZY Soil gDNA Isolation kit (Nzytech). Este é concebido para a preparação de uma pequena quantidade, de forma simples e rápida, de DNA genómico altamente puro de uma grande variedade de microrganismos. As amostras são mecanicamente perturbadas, utilizando esferas de cerâmica. As proteínas e outros inibidores da PCR, presentes em solução, são precipitados com um tampão para o efeito, seguido de uma centrifugação com as esferas cerâmicas. Quaisquer substâncias húmidas residuais e outros inibidores da PCR são eficazmente removidos nas etapas de lavagem.

O procedimento seguiu as indicações do fabricante, com exceção das seguintes alterações: 1) na etapa da lise da amostra, onde o tempo de agitação foi aumentado, e 2) o tempo de centrifugação foi aumentado em dois momentos: após a adição do tampão para auxiliar na precipitação dos contaminantes e na etapa das lavagens, sem a adição de reagentes, com o objetivo de aumentar a eficácia e garantir a remoção completa de todos os resíduos.

O volume de tampão de eluição utilizado foi 30 μ L.

3.6 – *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Esta técnica permite a obtenção de um número elevado de cópias de DNA de interesse, promovido pela amplificação de sequências específicas.

A PCR baseia-se na amplificação enzimática *in vitro* de um fragmento de DNA de interesse (*target*) que é flanqueado por dois *primers* (iniciadores de cadeia). Estes hibridam com as extremidades 3' da dupla cadeia. O processo envolve 3 fases que se processam em vários ciclos. A primeira fase (+/- 94°C) corresponde à desnaturação, onde ocorre a separação da dupla cadeia, a segunda (+/- 60°C) corresponde à ligação (*annealing*) dos *primers* às extremidades 3' da dupla cadeia de DNA e a terceira à extensão dos *primers* pela taq polimerase (Pinheiro, 2010; VIDEIRA, 2011).

Neste estudo, as condições de PCR utilizadas, após otimização, foram: 94°C, durante 5 minutos, 30 ciclos de: 94°C, 54°C e 72°C, durante 30 segundos cada; e, por último, 10 minutos a 72°C.

A mistura de reação continha 12,5 µL de NZYTaqlII 2X Green Master Mix (Nzytech), 1,25 µL de cada *primers* forward (27F) e reverse (1492R) (tabela 2), 8 µL água ultrapura estéril e 2 µL de de DNA.

Uma vez que a sequenciação de *amplicons* de 16S rDNA geralmente seleciona uma ou várias regiões hipervariáveis de interesse, os *primers* universais, utilizados durante a amplificação por PCR, são concebidos com base nas regiões conservadas que englobam as regiões hipervariáveis de interesse, o que permite a identificação de microrganismos (Ghyselinc et al., 2013; Youssef et al., 2009).

Tabela 2- Tabela informativa dos primers utilizados (Heuer et al., 1997)

Primer		Sequência	Referência	Tamanho
27f	Forward	5' - aga gtt tga tcc tgg ctc ag - 3'	0032687 1	20 pb
1492r	Reverse	5' - ggt tac ctt gtt acg act t - 3'	00323697 2	19 pb

3.7 – Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese ou separação eletroforética é o método mais utilizado para purificar, identificar e separar os fragmentos de ácidos nucleicos (DNA ou RNA), de acordo com o tamanho. Este processo é normalmente feito em gel de agarose, juntamente com tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE), este último também tem como função “ajudar” durante a migração das amostras de DNA (negativas) do polo negativo para o polo positivo em pH neutro (VIDEIRA, 2011). Dependendo da percentagem de agarose utilizada, a “grelha” formada pode ser mais ou menos espessa, facilitando a passagem de moléculas menores ou maiores, respetivamente (VIDEIRA, 2011). Quanto maior a percentagem de agarose utilizada, mais espessa a grelha, promovendo a passagem de moléculas mais pequenas. A visualização das bandas formadas é possível à luz UV, pois, durante a preparação do gel, é adicionado um corante, que irá intercalar-se com as cadeias de DNA e emitir coloração, quando exposto à luz UV.

A eletroforese, neste procedimento laboratorial, foi efetuada com um gel a 1% para verificação de presença/ausência de DNA ou contaminações. Para esta eletroforese, foram utilizados 5 µL do marcador molecular NZYDNA Ladder VI e 13 µL de amostra proveniente do PCR.

O NZYDNA Ladder VI é um marcador de peso molecular pronto a usar, especialmente concebido para facilitar a quantificação e determinação do tamanho de pequenos fragmentos de DNA em géis de agarose. A concentração mínima recomendada para os

géis de agarose é entre 1- 2% (p/v), a fim de possibilitar uma identificação clara de cada banda.

Este marcador molecular produz um padrão de 17 bandas regularmente espaçadas, com tamanhos que variam entre os 50 a 1500 pb (NZYDNA Ladder VI , NZYTech).

A entidade externa selecionou os produtos de PCR por meio de eletroforese de gel de agarose a 2%, o que reduziu a amostra de 24 para 17 indivíduos, tal como demonstrado na tabela 3 (Resultados).

Quantidades idênticas dos produtos de PCR de cada amostra foram agrupadas e sujeitas a reparação das extremidades, isto é, adição de adenina nas exterminadas (*A-tailing*) e, subsequentemente, ligadas aos adaptadores da Illumina.

3.8 – Sequenciação do DNA

A determinação da sequência de nucleótidos que compõem um fragmento de DNA clonado representa um dos processos cruciais na análise de DNA (VIDEIRA, 2011).

Tanto a sequenciação do gene 16S rRNA como a metagenômica representam duas abordagens fundamentais de sequenciação de DNA utilizadas em comunidades microbianas orais (Deo & Deshmukh, 2019).

O RNA ribossômico 16S (rRNA) constitui um componente essencial da subunidade pequena 30S do ribossoma em células procariotas. Este contém 9 regiões hipervariáveis numeradas de 1-9, com extensões que variam aproximadamente entre 30 a 100 pares de bases. Estas regiões desempenham um papel crucial na estrutura secundária da subunidade pequena do ribossoma. As regiões mais conservadas estão frequentemente relacionadas com categorias taxonômicas mais abrangentes, ao passo que as regiões menos conservadas associam-se a níveis taxonômicos mais específicos, tais como gênero e espécie. Assim, o 16S rRNA revela-se uma valiosa ferramenta na elaboração de filogenias e na classificação de bactérias. A variação nas sequências do gene 16S é amplamente utilizada para caracterizar diversas comunidades microbianas (Caporaso et al., 2011; Hess et al., 2011; Youssef et al., 2009).

Para fins de classificação taxonômica, torna-se suficiente sequenciar regiões hipervariáveis específicas em vez do gene completo (metagenômica).

A sequenciação pode ser realizada pela forma clássica (Sanger) ou através da sequenciação por Nova Geração.

Optou-se por sequenciar o gene 16S rRNA de todas as amostras de cálculo dentário, utilizando a plataforma Illumina, por meio de um serviço externo. A região conservada 16SV34 foi a selecionada para a análise. As bibliotecas foram sequenciadas numa plataforma Illumina de leitura dupla (paired-end) com o intuito de gerar leituras de 250 pares de bases.

Este tipo de sequenciação permite determinar a quantidade de espécies presentes. Uma vantagem é a redução significativa do tempo necessário para a realização deste tipo de procedimento.

3.9 – Análise de dados:

A análise de dados só é possível devido aos avanços que têm ocorrido no ramo da bioinformática. Esta área promove a coleção, a organização, a análise e a comparação de sequências de DNA e de proteínas. Todas as sequências identificadas fortalecem as bases de dados existentes, tais como o *Genbank*.

A entidade externa processou bioinformaticamente os resultados da sequenciação e apresentou os mesmos num relatório que será objeto de análise.

4 – Resultados

Não foi possível proceder à análise estatística pois a amostragem era reduzida. Apenas 17 indivíduos atenderam aos critérios estabelecidos (qualidade e quantidade para sequenciação) pela entidade externa que fez a sequenciação (tabela 3).

Tabela 3- Estado das amostras após avaliação pela Entidade Externa para sequenciação.

Esqueleto	Identificação da amostra	Estado
Esqueleto 2	E2	não seguiu para sequenciar
Esqueleto 4	E4	seguiu para sequenciar
Esqueleto 14	E14	não seguiu para sequenciar
Esqueleto 22	E22	seguiu para sequenciar
Esqueleto 24	E24	seguiu para sequenciar
Esqueleto 34	E34	seguiu para sequenciar
Esqueleto 69	E69	seguiu para sequenciar
Esqueleto 75	E75	seguiu para sequenciar
Esqueleto 82	E82	seguiu para sequenciar
Esqueleto 83	E83	não seguiu para sequenciar
Esqueleto 88	E88	não seguiu para sequenciar
Esqueleto 98	E98	seguiu para sequenciar
Esqueleto 99	E99	seguiu para sequenciar
Esqueleto 102	E102	não seguiu para sequenciar
Esqueleto 105	E105	seguiu para sequenciar
Esqueleto 117	E117	seguiu para sequenciar
Esqueleto 131	E131	não seguiu para sequenciar
Esqueleto 133	E133	seguiu para sequenciar
Esqueleto 134	E134	não seguiu para sequenciar
Esqueleto 137	E137	seguiu para sequenciar
Esqueleto 141	E141	seguiu para sequenciar
Esqueleto 146	E146	seguiu para sequenciar
Esqueleto 148	E148	seguiu para sequenciar
Esqueleto 155	E155	seguiu para sequenciar

Esta seleção baseou-se na quantidade de DNA microbiano extraído do cálculo dentário dos dentes (tabela 4) dos indivíduos em estudo.

Tabela 4- Classificação FID (*Fédération Dentaire Internationale*) e discriminada de cada dente analisado.

Esqueleto	FID	Identificação precisa do dente
Esqueleto 4	42	Incisivo Lateral Inferior Direito
Esqueleto 22	43	Canino direito da mandíbula
Esqueleto 24	34	Pré-molar Inferior Esquerdo
Esqueleto 34	41	Incisivo Central Inferior Direito
Esqueleto 69	31	Incisivo Central Inferior Esquerdo
Esqueleto 75	41	Incisivo Central Inferior Direito
Esqueleto 82	33+34	Canino Inferior Esquerdo + Primeiro molar Inferior Esquerdo
Esqueleto 98	33+42	Canino Inferior Esquerdo + Incisivo Lateral Inferior Direito
Esqueleto 99	42	Incisivo Lateral Inferior Direito
Esqueleto 105	43	Canino inferior Direito
Esqueleto 117	41	Incisivo Central Inferior Direito
Esqueleto 133	41	Incisivo Central Inferior Direito
Esqueleto 137	31+32	Incisivo Inferior Central Esquerdo + Incisivo Inferior Lateral Esquerdo
Esqueleto 141	33	Canino Inferior Esquerdo
Esqueleto 146	42	Incisivo Lateral Inferior Direito
Esqueleto 148	41	Incisivo Central Inferior Direito
Esqueleto 155	32	Incisivo Lateral Inferior Esquerdo

A maioria pertencia a indivíduos adultos maduros, com exceção do esqueleto 34, que foi identificado como pertencente a um adulto jovem (tabela 5). Estas distinções foram feitas com base na avaliação da união epifisária em que, quando esta estava completa, o indivíduo era classificado como adulto maduro, e, quando a epífise da extremidade medial da clavícula estivesse parcialmente fundida, como adulto jovem.

Esta denominação é dada com base na informação encontrada no livro intitulado de “Standards for data collection from human skeletal remains” de autoria de Jane E. Buikstra and Douglas H (Buisktra & Ubelaker ,1994).

Tabela 5- Classificação etária dos indivíduos em estudo.

Esqueleto	Idade à morte
Esqueleto 4	Adulto maduro/idoso
Esqueleto 22	Adulto maduro/idoso
Esqueleto 24	Adulto maduro/idoso
Esqueleto 34	Adulto jovem Indicadores de Transição tardia
Esqueleto 69	Adulto maduro/idoso
Esqueleto 75	Adulto maduro/idoso
Esqueleto 82	Adulto maduro/idoso
Esqueleto 98	Adulto maduro/idoso
Esqueleto 99	Adulto maduro/idoso
Esqueleto 105	Adulto maduro/idoso
Esqueleto 117	Adulto maduro/idoso
Esqueleto 133	Adulto maduro/idoso
Esqueleto 137	Adulto maduro/idoso
Esqueleto 141	Adulto maduro/idoso
Esqueleto 146	Adulto maduro/idoso
Esqueleto 148	Adulto maduro/idoso
Esqueleto 155	Adulto maduro/idoso

Relativamente ao sexo (tabela 6), observa-se mais homens que mulheres, 68% e 25% respetivamente. Em relação à ancestralidade, apenas o Esqueleto 82 apresentava afinidade populacional africana.

Tabela 6- Classificação do sexo de acordo com a categoria etária dos indivíduos exumados em Bucelas.

Categoria etária	Feminino	Masculino	Indeterminado	Total
Adulto maduro	4	11	1	16
Adulto jovem	-	1	-	1

Com base nos resultados da sequenciação (Método Illumina), foram escolhidas as 10 principais categorias taxonómicas em cada amostra, em cada nível de classificação – Filo, Classe, Ordem, Família, Género e Espécie – a fim de criar um histograma representativo da distribuição da abundância relativa nas categorias anteriormente referidas,

possibilitando a visualização das mesmas e a sua proporção nos diversos níveis de classificação em cada amostra. Neste estudo apenas foram abordadas as categorias taxonômicas Filo, Classe, Género e Espécie (figuras 3 a 6).

Na tabela abaixo encontra-se a correspondência de denominações para as amostras em estudo.

Tabela 7- Correspondência entre denominações das amostras em estudo.

Esqueleto	Identificação da amostra
Esqueleto 4	BucelasT4
Esqueleto 22	BucelasT22
Esqueleto 24	BucelasT24
Esqueleto 34	BucelasT34
Esqueleto 69	BucelasT69
Esqueleto 75	BucelasT75
Esqueleto 82	BucelasT82
Esqueleto 98	BucelasT98
Esqueleto 99	BucelasT99
Esqueleto 105	BucelasT105
Esqueleto 117	BucelasT117
Esqueleto 133	BucelasT133
Esqueleto 137	BucelasT137
Esqueleto 141	BucelasT141
Esqueleto 146	BucelasT146
Esqueleto 148	BucelasT148
Esqueleto 155	BucelasT155

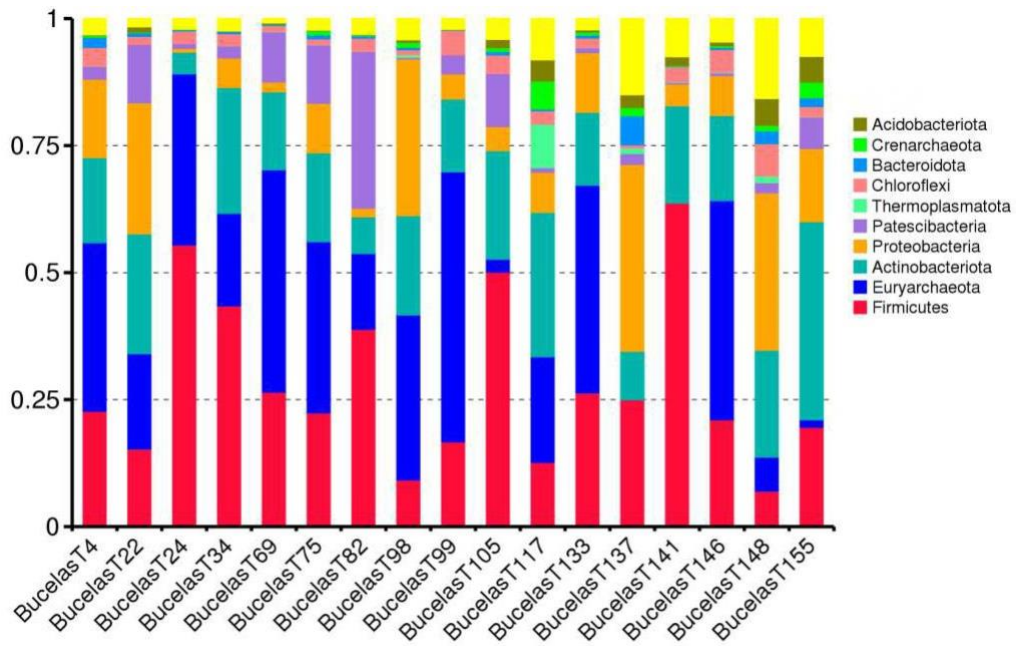


Figura 3- Representação gráfica da abundância relativa dos 10 Filos predominantes em cada amostra da população em estudo. Nota: o eixo do Y corresponde à abundância relativa e o eixo do X ao nome das amostras. A cor amarela representa o valor total da abundância relativa associada aos Filos que não fazem parte do grupo dos 10 principais.

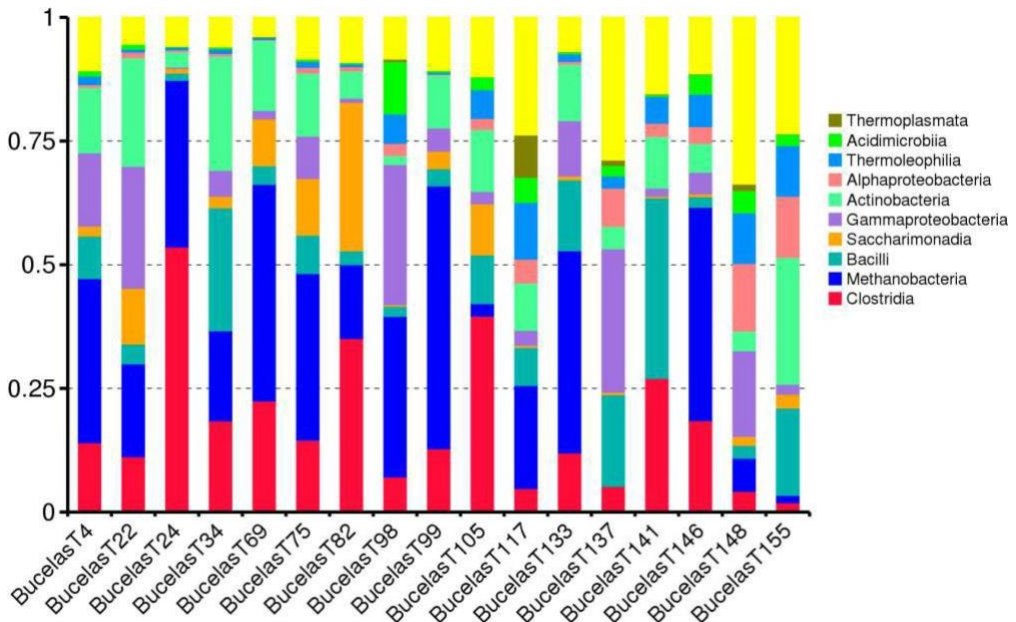


Figura 4- Representação gráfica da abundância relativa das 10 Classes predominantes em cada amostra da população em estudo. Nota: o eixo do Y corresponde à abundância relativa e o eixo do X ao nome das amostras. A cor amarela representa o valor total da abundância relativa associada às Classes que não fazem parte do grupo das 10 principais.

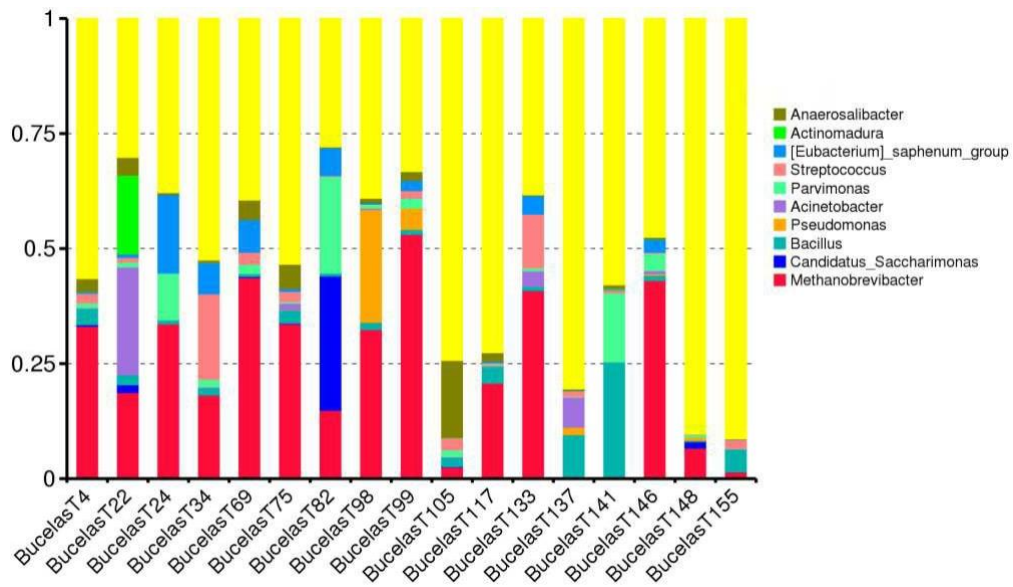


Figura 5- Representação gráfica da abundância relativa dos 10 Géneros predominantes em cada amostra da população em estudo. Nota: o eixo do Y corresponde à abundância relativa e o eixo do X ao nome das amostras. A cor amarela representa o valor total da abundância relativa associada aos Géneros que não fazem parte do grupo dos 10 principais.

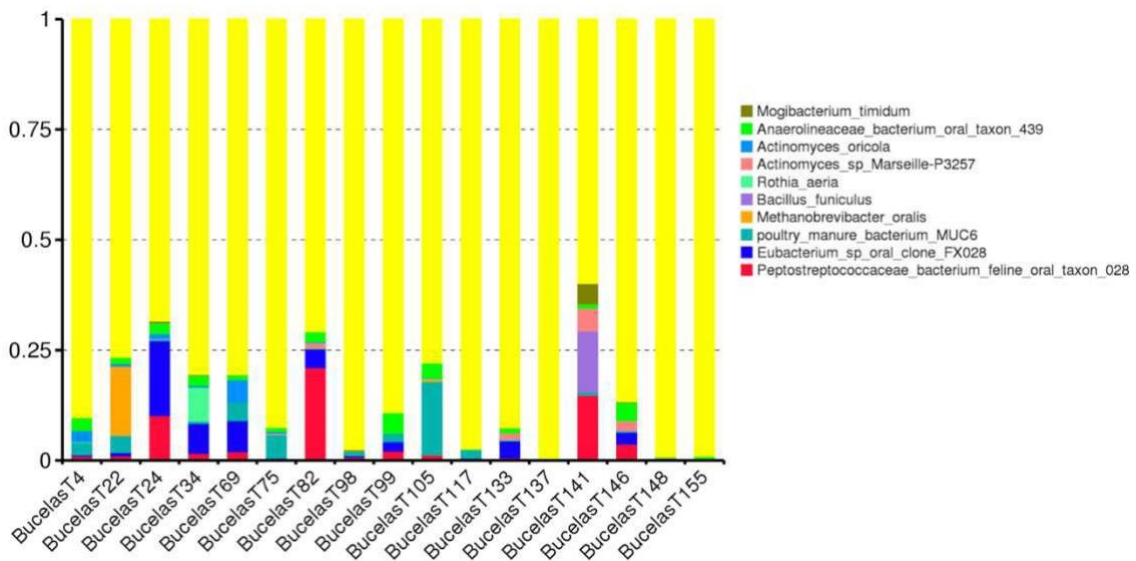


Figura 6- Representação gráfica da abundância relativa das 10 Espécies predominantes em cada amostra da população em estudo. Nota: o eixo do Y corresponde à abundância relativa e o eixo do X ao nome das amostras. A cor amarela representa o valor total da abundância relativa associada às Espécies que não fazem parte do grupo das 10 principais.

O estudo das possíveis relações taxonómicas entre indivíduos da população em estudo também foi possível a partir da árvore filogenética com clusters retirada do relatório fornecido pela entidade que fez a sequenciação.

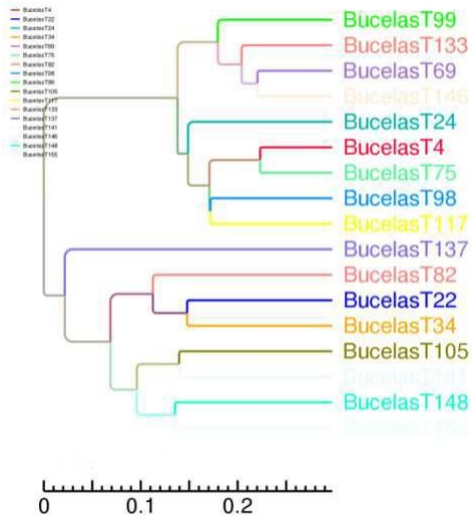


Figura 7 – Representação da árvore filogenética com clusters para estudar a proximidade entre indivíduos da população em estudo.

5 – Discussão

O objetivo deste trabalho foi realizar uma abordagem abrangente à análise microbiológica do cálculo dentário, relacionando-a com a idade à morte, afinidades populacionais e sexo dos indivíduos da população dos séculos XV-XIX, exumada na necrópole de Bucelas, com a finalidade de encontrar potenciais diferenças. Adicionalmente, pretendeu-se efetuar uma comparação dos microrganismos normalmente presentes no cálculo dentário na época contemporânea relativamente à época em que os indivíduos analisados viveram. Por último, aferir do relacionamento entre indivíduos através de análise filogenética. Não foi possível efetuar a análise estatística dos dados devido ao número reduzido de amostras.

Podemos aferir que a população em estudo pertence a um estatuto socioeconómico baixo, fator que promove o aparecimento da placa bacteriana e consequentemente o cálculo dentário (Filoche et al., 2010).

Conforme observado num estudo feito pelos cientistas Rosebury e Waugh, numa análise efetuada a partir de um grupo de esquimós do Alasca, foi constatado que aqueles que apresentavam cáries dentárias, geralmente, tinham menos cálculo dentário. De acordo com os resultados da presente dissertação, não foi encontrada qualquer correlação, pois foi retirado cálculo dentário de todos os indivíduos e todos apresentavam outras patologias orais, incluindo cáries.

Para a recolha de cálculo dentário, os dentes mais utilizados neste procedimento foram os incisivos mandibulares, que pode estar associado a uma placa subgingival, ou seja, maioritariamente microrganismos anaeróbios. De acordo com vários estudos (Fábián et al., 2012; Simón-Soro et al., 2013), *Streptococcus* spp. são encontrados na superfície labial de incisivos e caninos em 40-70% dos casos, mas nunca na superfície lingual.

A análise dos resultados permitiu a obtenção de informações sobre a abundância relativa no que respeita o Reino, Filo, Classe, Ordem, Família, Género e Espécie. Apenas quatro classes serão discutidas nesta dissertação: Filo, Classe, Género e Espécie.

Conforme apresentado na figura 3, e comparando com outros estudos (Shang et al., 2020), Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria e Bacteroidota são filós que, já nos séculos XV-XIX, se encontravam associados a patologias orais, nomeadamente ao cálculo dentário. Relativamente aos restantes filós descritos – Euryarchaeota, Patescibacteria, Thermoplasmatota, Chloroflexi e Crenarchaeota - não

foram encontradas informações na literatura que interligassem os mesmos a qualquer tipo de patologia oral.

Alguns destes Filos não são comuns na cavidade oral, mas sim no ambiente, o que pode ser indicativo de contaminação ambiental.

Os filios mais frequentes na amostra em estudo são Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Patescibacteria, Chloroflexi e Crenarchaeota, enquanto os menos frequentes são Euryarchaeota, Thermoplasmatota e Acidobacteriota. As frequências relativas destes variam de indivíduo para indivíduo.

Tal como demonstrado na figura 4, é possível verificar que as 10 classes representativas da população em estudo são Clostridia, Methanobacteria, Bacilli, Saccharimonadia, Gammaproteobacteria, Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Thermoleophilia, Acidimicrobia e Thermoplasmata.

É possível notar variações de abundância entre classes, dependendo do indivíduo. Consequentemente, podemos concluir que a classe Methanobacteria, assim como a Thermoplasmata, pertencentes ao Filo Euryarchaeota e Thermoplasmatota, respetivamente, não estão presentes em todos os indivíduos. Este resultado é corroborado pela figura 3, em que os Filos Euryarchaeota e Thermoplasmatota também não estão presentes em todos os indivíduos.

De acordo com Filoche e colaboradores (2010) apenas três – Bacilli, Grammaproteobacteria e Actinobacteria - das 10 classes mencionadas estão associadas com patologias orais, nomeadamente cáries e cálculo dentário. Relativamente à classe Bacilli, esta inclui algumas bactérias que podem estar associadas à cárie dentária como *Streptococcus mutans*, assim como a Classe Actinobacteria, que adicionalmente inclui o género *Actinomyces*, frequentemente associado ao cálculo dentário. Outro microrganismo que contribui para a formação das placas cariogénicas é *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, pertencente à classe Gammaproteobacteria (Filoche et al., 2010).

Relativamente ao sexo e tipo de dente, não há relevância para a análise a nível de classes. Uma análise do 16S rRNA revelou que, em pessoas saudáveis, os géneros *Corynebacterium*, *Rothia* e *Actinomyces* são os mais predominantes no Filo Actinobacteria; os géneros *Prevotella*, *Capnocytophaga* e *Porphyromonas* no Filo Bacteroidetes; os géneros *Streptococcus* e *Granulicatella* no Filo Firmicutes; o género *Fusobacterium* no Filo Fusobacteria; e os géneros *Neisseria* e *Haemophilus* no Filo Proteobacteria (X. Li et al., 2022).

Na literatura (Deo & Deshmukh, 2019; Warinner, Speller, & Collins, 2015), os principais gêneros bacterianos referidos, que atualmente habitam na cavidade oral, estão divididos entre bactérias Gram-positivo e Gram-negativo. Relativamente às bactérias Gram-positivo, *Streptococcus* e *Actinomyces* são os mais frequentes. De acordo com o gráfico da figura 5, os gêneros mais frequentes são *Methanobrevibacter*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Parvimonas*, *Streptococcus*, *Eubacterium_saphenum_group* e *Anaerosalibacter*. Embora faça parte do microbioma oral de todos os indivíduos em estudo, o Indivíduo 34 destaca-se com uma percentagem de 18% de microrganismos pertencentes ao género *Streptococcus*, um género muito comum no microbioma oral. É importante referir que este indivíduo é o único considerado “adulto jovem” (Anexo A – Tabela 8).

Pseudomonas, *Candidatus_Saccharimonas* e *Actinomadura* são os menos frequentes, estando ausentes do microbioma oral de alguns indivíduos da população.

De acordo com Avila e colaboradores (2009), as espécies mais comuns no microbioma oral são: *Streptococcus gordonii*, *mitis*, *orais* e *salivarius*; *Actinomyces naeslundii*, *Porphyromonasgingivalis*, *Prevotella loescheii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella atypica*, *Capnocytopha gingivalis*, *Capnocytophaga ochraceae*; *Treponema medium*.

Nas patologias orais, como as cáries, a pesquisa tradicional identificou patogénicos conhecidos, incluindo espécies como *Actinomyces israelii*, *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus mutans*. No entanto, avanços na sequenciação revelaram um aumento na abundância de microrganismos, como *Bifidobacterium* e *Prevotella*, que também desempenham um papel relevante. Além disso, outros microrganismos, como *Candida albicans* e o vírus Epstein-Barr (EBV), estão presentes na cavidade oral e podem estar envolvidos em processos patológicos. Essa diversidade de microrganismos destaca a complexidade das interações na saúde e na doença oral (X. Li et al., 2022).

Vários estudos indicam que existem várias espécies-chave que desempenham um papel no processo de doença e que foram agrupadas em complexos microbianos com base em parâmetros clínicos, estágio da doença e localização na cavidade oral. Estas espécies incluem *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum* (Filoche et al., 2010).

Apesar de ser difícil caracterizar e identificar espécies, foi possível selecionar as 10 mais comuns na amostra em estudo: *Mogibacterium_timidium*, *Anaerolineaceae_bacterium_oral_taxon_439*, *Actinomyces_oricola*, *Actinomyces_sp_Marseille-P3257*, *Rothia: aeria*, *Bacillus_funiculus*,

Methanobrevibacter_oralis, *Poultry_manure_bacterium_MUC6*,
Eubacterium_sp_clone_FX028, e
Peptostreptococcaceae_bacterium_feline_oral_taxon_028.

De acordo com a análise, as menos frequentes são: *Mogibacterium_timidium*,
Actinomyces_oricola, *Actinomyces_sp_Marseille-P3257*, *Rothia: aeria*,
Bacillus_funiculus, *Methanobrevibacter_oralis*.

Uma das espécies encontradas nesta população em estudo – *Mogibacterium timidium* – é descrito como um patogénico oral, geralmente detetado no ambiente subgengival e relacionado com a gravidade de deterioração periodontal (Corrêa et al., 2012).

Em comparação com a placa e o tártaro de populações atuais, o cálculo dentário antigo apresenta abundantemente microrganismos pertencentes ao domínio Archaea, nomeadamente do género *Methanobrevibacter* (Corrêa et al., 2012). Os dados obtidos neste estudo vão de encontro a esta informação, pois, este género, trata-se de um dos mais frequentes. Atualmente, *Methanobrevibacter oralis* é a única espécie de *Methanobrevibacter* isolada e caracterizada na microbiota oral. Esta espécie foi a única deste género encontrada nas amostras analisadas. De destacar que, de acordo com a literatura, há inúmeras espécies indeterminadas pertencentes a este género, encontradas em cálculo dentário antigo em elevada abundância (Granehall et al., 2021).

Por outro lado, o cálculo dentário também pode conter microrganismos que habitam a cavidade oral e que não são considerados patogénicos como por exemplos os que pertencem aos filos Euryarchaeota, Patescibacteria, Thermoplasmatota, Chloroflexi e Crenarchaeota associados a microrganismos ambientais.

Com o objetivo de explorar as semelhanças entre as diferentes amostras recorreu-se à construção de uma árvore filogenética com clusters, que permite identificar a proximidade e longevidade entre os indivíduos em estudo. A filogenia é uma descrição da forma como sequências ou espécies estão relacionadas entre si. Esta encontra-se dividida em dois clusters individualizados/principais. No primeiro cluster, encontram-se os indivíduos que correspondem aos esqueletos 4, 24, 69, 75, 98, 99, 117, 133 e 146 e no segundo os 22, 34, 82, 105, 137, 141, 148 e 155.

É relevante referir que, no primeiro cluster da árvore filogenética, para a maioria dos indivíduos, a extração do cálculo dentário foi feita de um dos incisivos, no entanto, é necessário fazer uma ressalva que para os esqueletos 24, 75 e 98, em que a recolha foi de um pré-molar, 1º molar e um canino, respetivamente. Relativamente aos esqueletos 75 e 98 também foi necessário recorrer à extração de um incisivo juntamente com o 1º molar

e o canino, respectivamente, devido à quantidade insuficiente de cálculo dentário para a análise.

Já no segundo cluster da árvore, observa-se uma variação no tipo de dente utilizado para a extração do cálculo dentário, com escolha entre caninos e incisivos, variando de acordo com o indivíduo. Para os esqueletos 82 e 137, também foi necessária junção de cálculo dentário de diferentes dentes, consequência da reduzida quantidade do mesmo. É relevante destacar que o único indivíduo com ancestralidade africana na população em estudo (esqueleto 82) se encontra neste ramo e o tipo de dente utilizado para a extração foi um molar.

No que diz respeito ao gênero, é importante notar que a maioria das mulheres se encontra agrupada no primeiro cluster da árvore filogenética, representando três das quatro mulheres neste estudo.

Não há diferenças significativas dentro dos clusters primários, no que concerne à localização dos dentes, visto que os dentes pertencem a ambos os lados da boca, direito e esquerdo. Relativamente aos clusters secundários dentro dos primários, verifica-se que em pelo menos um dos clusters há uma maior incidência na recolha de cálculo dentário na dentição do lado direito e outro no lado esquerdo.

O indivíduo mais distante é o pertencente ao esqueleto 137, pois o seu “ramo” parece “separado” dos outros todos do segundo cluster, isto é indicativo de diferenças entre este indivíduo e os restantes pertencentes à amostra em estudo. De destacar que, embora o esqueleto 82 seja mais próximo dos restantes que o 137, também se encontra “afastado”, consequência das diferentes afinidades populacionais – africana - do mesmo em relação aos outros indivíduos – não africanos.

Por outro lado, também observamos a existência de indivíduos que apresentam uma proximidade significativa entre si. Isso é evidente nos pares formados pelos esqueletos 69 e 146, 4 e 75, 98 e 117, 22 e 34, 105 e 141 bem como 148 e 155. Todos estes indivíduos compartilham um cluster específico, seja o primário ou o secundário, embora acabem por se agrupar em pares distintos dentro do cluster “primário” ou “secundário” a que pertencem. Essa organização sugere uma maior semelhança entre esses indivíduos, quando comparados com os demais que fazem parte do cluster.

6 – Conclusão

A análise do cálculo dentário revelou ser uma peça fundamental na compreensão da microbiota oral dos indivíduos em estudo, especialmente ao investigar a mudança nos tipos de microrganismos associados às patologias orais.

A microbiota oral é principalmente composta por microrganismos pertencentes aos Filos Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroides, Fusobacteria e Proteobacteria, que são indispensáveis para a saúde humana, devido à sua capacidade de inibir a proliferação de microrganismos exógenos e promover a homeostase e defesa do hospedeiro.

O facto de a série esquelética exumada estar associada a uma necrópole dos séculos XV-XIX e muitos indivíduos não cumprirem os requisitos mínimos impossibilitou o desenvolvimento de uma análise estatística, que por sua vez iria tornar os resultados mais robustos. Seria crucial obter uma amostra maior para viabilizar a análise microbiológica, e posteriormente uma avaliação estatística.

Sabe-se que este tipo de estudos só é possível quando há boa preservação dos restos cadavéricos e um número considerável de esqueletos, especialmente pertencentes a períodos mais recentes, onde os registos históricos podem reforçar a interpretação. No caso da série em estudo, embora seja uma amostragem reduzida, existem muitos registos históricos que podem reforçar a interpretação da mesma.

Nos últimos anos, o cálculo dentário tem sido objeto de um número crescente de investigações, nas mais variadas áreas da biologia, mas uma limitação é a quantidade de amostra disponível que, por norma, é baixa. Geralmente, porque em alguns casos apenas alguns dentes isolados foram recuperados de sítios arqueológicos.

O presente estudo forneceu algumas referências para estudos comparativos no âmbito da relação dos hábitos alimentares com a presença/ausência de determinados microrganismos na flora oral e, conseqüentemente, níveis de higiene oral e acesso à saúde dentária destes indivíduos.

Com base no perfil biológico e patológico dos indivíduos da população em estudo, pode concluir-se que a dieta destes indivíduos era rica em hidratos de carbono e revelavam hábitos de higiene deficientes. Tal como referido na tabela 9 em anexo, a maioria das patologias dos indivíduos estão associadas ao tipo de alimentação dos mesmos e, conseqüentemente, aos microrganismos identificados na análise microbiológica.

A caracterização taxonómica obtida demonstra que as amostras estudadas contêm principalmente microrganismos da cavidade oral e que há apenas poucos indícios de possível contaminação externa. Numa perspetiva futura poderiam ser feitos outros estudos para confirmar esta hipótese como, por exemplo, um PCR utilizando *primers* específicos para microrganismos presentes no ambiente e, posterior sequenciação e comparação com os existentes na base de dados.

No geral, as amostras de cálculo dentário dos indivíduos analisados, independentemente do sexo, idade e afinidades populacionais, apresentam uma composição taxonómica semelhante ao que foi encontrado anteriormente em estudos de cálculo antigo. Quando comparado com a atualidade é notável uma diminuição de *Streptococcus* spp e a presença de outros microrganismos, nomeadamente do género *Methanobrevibacter*.

Embora tenha sido viável obter dados sobre a abundância relativa de cada espécie, esta tarefa revela-se geralmente complexa devido ao fato de várias espécies bacterianas possuírem múltiplas cópias do gene 16S rRNA. Isto reflete-se nas percentagens da frequência relativa obtidas situarem-se, maioritariamente abaixo de 0,5%. Esta área de análise em rápida evolução precisa de uma integração mais eficaz com outras evidências para maximizar o seu potencial.

7 – Referências

- Adler, C. J., Dobney, K., Weyrich, L. S., Kaidonis, J., Walker, A. W., Haak, W., Bradshaw, C. J. A., Townsend, G., Sołtysiak, A., Alt, K. W., Parkhill, J., & Cooper, A. (2013). Sequencing ancient calcified dental plaque shows changes in oral microbiota with dietary shifts of the Neolithic and Industrial revolutions. *Nature Genetics*, 45(4), 450–455. <https://doi.org/10.1038/ng.2536>
- Avila, M., Ojcius, D. M., & Zlem Yilmaz, O. (2009). The Oral Microbiota: Living with a Permanent Guest. 28(8),405-11. <https://doi.org/10.1089/dna.2009.0874>
- ANTUNES-FERREIRA, N. (2022) – As descobertas realizadas: necrópole cristã (séculos XV-XIX) –Práticas funerárias e paleobiologia dos membros da comunidade sepultados. In ESTEVÃO, Florbela, & ANTUNES-FERREIRA, Nathalie (coord.) Intervenção Arqueológica no Largo do Espírito Santo, em Bucelas: dos sécs. I e II da Nossa Era à Revelação de Práticas Funerárias Modernas. Câmara Municipal de Loures, pp. 53-74
- Antunes-Ferreira, N., Prates, C., & Curate, F. (2021). Interpreting injury recidivism in a rural post-medieval male individual from Bucelas, Portugal. *International Journal of Osteoarchaeology*, 31(2), 243–251. <https://doi.org/10.1002/oa.2943>
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M. C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., ... Schloter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. In *Microbiome* (Vol. 8, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>
- Bernimoulin, J. P. (2003). Recent concepts in plaque formation. *Journal of Clinical Periodontology*, 30(SUPPL. 5), 7–9. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051X.30.s5.3.x>
- Blatt, S. H., Redmond, B. G., Cassman, V., & Sciulli, P. W. (2011). Dirty teeth and ancient trade: Evidence of cotton fibres in human dental calculus from Late Woodland, Ohio. *International Journal of Osteoarchaeology*, 21(6), 669–678. <https://doi.org/10.1002/oa.1173>
- Blondiaux, J., & Charlier, P. (2008). Palaeocytology in skeletal remains: Microscopic examination of putrefaction fluid deposits and dental calculus of skeletal remains from French archaeological sites. *International Journal of Osteoarchaeology*, 18(1), 1–10. <https://doi.org/10.1002/oa.931>

- Buikstra, J. E., & Ubelaker, D. (1994). Standards for data collection from human skeletal remains. Research series no. 44. Fayetteville, Arkansas: Arkansas archeological survey research series no 44.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(SUPPL. 1), 4516–4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>
- Cardoso, V. M. (2015). *O Microbioma Humano* [Mestre em Ciências Farmacêuticas]. Faculdade de Ciências da Saúde. https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/5545/1/PPG_21839.pdf
- Corrêa, R., Casarin, V., Saito, D., Santos, V. R., Pimentel, S. P., Mendes Duarte, P., Casati, M. Z., & Gonçalves, R. B. (2012). Detection of *Mogibacterium timidum* in subgingival biofilm of aggressive and non-diabetic chronic periodontitis patients. *Brazilian Journal of Microbiology*, 931–937. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220120003000012>
- Dagli, N., Dagli, R., Baroudi, K., & Tarakji, B. (2015). Oral Paleomicrobiology: Study of Ancient Oral Microbiome. *Journal of Contemporary Dental Practice*, 16(7), 588–594. <https://doi.org/10.5005/JP-JOURNALS-10024-1726>
- Deo, P. N., & Deshmukh, R. (2019). Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. In *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* (Vol. 23, Issue 1, pp. 122–128). Wolters Kluwer Medknow Publications. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_304_18
- Dewhirst, F. E., Chen, T., Izard, J., Paster, B. J., Tanner, A. C. R., Yu, W. H., Lakshmanan, A., & Wade, W. G. (2010). The human oral microbiome. *Journal of Bacteriology*, 192(19), 5002–5017. <https://doi.org/10.1128/JB.00542-10>
- Dobney, K., & Brothwell, D. (1988). *A scanning electron microscope study of archaeological dental calculus*. <https://www.researchgate.net/publication/281380969>
- Fábián, T. K., Hermann, P., Beck, A., Fejérdy, P., & Fábián, G. (2012). Salivary defense proteins: Their network and role in innate and acquired oral immunity. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 13, Issue 4, pp. 4295–4320). <https://doi.org/10.3390/ijms13044295>
- Filoche, S., Wong, L., & Sissons, C. H. (2010). Oral biofilms: Emerging concepts in microbial ecology. *Journal of Dental Research*, 89(1), 8–18. <https://doi.org/10.1177/0022034509351812>

- Ghyselinck, J., Pfeiffer, S., Heylen, K., Sessitsch, A., & De Vos, P. (2013). The effect of primer choice and short read sequences on the outcome of 16S rRNA gene based diversity studies. *PloS One*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071360>
- Granehall, L., Huang, K. D., Tett, A., Manghi, P., Paladin, A., O'Sullivan, N., Rota-Stabelli, O., Segata, N., Zink, A., & Maixner, F. (2021). Metagenomic analysis of ancient dental calculus reveals unexplored diversity of oral archaeal *Methanobrevibacter*. *Microbiome*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01132-8>
- Grice, E. A., & Segre, J. A. (2012). The human microbiome: Our second genome. In *Annual Review of Genomics and Human Genetics* (Vol. 13, pp. 151–170). <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-090711-163814>
- Hardy, K., Buckley, S., Collins, M. J., Estalrich, A., Brothwell, D., Copeland, L., García-Tabernero, A., García-Vargas, S., De La Rasilla, M., Lalueza-Fox, C., Huguet, R., Bastir, M., Santamaría, D., Madella, M., Wilson, J., Cortés, Á. F., & Rosas, A. (2012). Neanderthal medics? Evidence for food, cooking, and medicinal plants entrapped in dental calculus. *Naturwissenschaften*, 99(8), 617–626. <https://doi.org/10.1007/s00114-012-0942-0>
- Hess, M., Sczyrba, A., Egan, R., Kim, T. W., Chokhawala, H., Schroth, G., Luo, S., Clark, D. S., Chen, F., Zhang, T., Mackie, R. I., Pennacchio, L. A., Tringe, S. G., Visel, A., Woyke, T., Wang, Z., & Rubin, E. M. (2011). Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. *Science*, 331(6016), 463–467. <https://doi.org/10.1126/science.1200387>
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., & Wellington, E. M. H. (1997). Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 63, Issue 8). <https://doi.org/10.1128/aem.63.8.3233-3241.1997>
- Higgins, D., & Austin, J. J. (2013). Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: A Review. In *Science and Justice* (Vol. 53, Issue 4, pp. 433–441). <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2013.06.001>
- Huynh, H. T. T., Verneau, J., Levasseur, A., Drancourt, M., & Aboudharam, G. (2016). Bacteria and archaea paleomicrobiology of the dental calculus: a review. In *Molecular Oral Microbiology* (Vol. 31, Issue 3, pp. 234–242). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/omi.12118>

- Jin, Y., & Yip, H. K. (2002). Supragingival calculus: Formation and control. In *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* (Vol. 13, Issue 5, pp. 426–441). Intern. and American Associations for Dental Research. <https://doi.org/10.1177/154411130201300506>
- Kazarina, A., Petersone-gordina, E., Kimsis, J., Kuzmicka, J., Zayakin, P., Griškjans, Ž., Gerhards, G., & Ranka, R. (2021). The postmedieval latvian oral microbiome in the context of modern dental calculus and modern dental plaque microbial profiles. *Genes*, 12(2), 1–16. <https://doi.org/10.3390/genes12020309>
- Keyes PH, Rams TE. (2016) Dental Calculus Arrest of Dental Caries. *J Oral Biol (Northborough)*.3(1):4. <https://doi.org/10.13188/2377-987x.1000017>
- Kilian, M., Chapple, I. L. C., Hannig, M., Marsh, P. D., Meuric, V., Pedersen, A. M. L., Tonetti, M. S., Wade, W. G., & Zaura, E. (2016). The oral microbiome - An update for oral healthcare professionals. *British Dental Journal*, 221(10), 657–666. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2016.865>
- Krigbaum, J. (2008). Bioarchaeology. *Encyclopedia of Archaeology*, 924–927. <https://doi.org/10.1016/B978-012373962-9.00034-0>
- Krings, M., Stone, A., & Schmitz, R. W. (1997). Neandertal DNA Sequences and the Origin of Modern Humans. In *Cell* (Vol. 90). 11,19-30. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80310-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80310-4)
- Li, X., Liu, Y., Yang, X., Li, C., & Song, Z. (2022). The Oral Microbiota: Community Composition, Influencing Factors, Pathogenesis, and Interventions. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.895537>
- Mann, A. E., Fellows Yates, J. A., Fagernäs, Z., Austin, R. M., Nelson, E. A., & Hofman, C. A. (2020). Do I have something in my teeth? The trouble with genetic analyses of diet from archaeological dental calculus. *Quaternary International*. 653–654 4, 33-46. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2020.11.019>
- Mann, A. E., Sabin, S., Ziesemer, K., Vågane, Å. J., Schroeder, H., Ozga, A. T., Sankaranarayanan, K., Hofman, C. A., Fellows Yates, J. A., Salazar-García, D. C., Frohlich, B., Aldenderfer, M., Hoogland, M., Read, C., Milner, G. R., Stone, A. C., Lewis, C. M., Krause, J., Hofman, C., ... Warinner, C. (2018). Differential preservation of endogenous human and microbial DNA in dental calculus and dentin. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28091-9>

- Marinho, A., & Taveira, N. (2020) Princípios Gerais de Bacterologia . In L. Lidel- Edições Técnicas (Ed.), *Microbiologia Médica* (1st ed., Vol. 1, pp. 5–8).
- Martinelli, W. de F. (2017). *O Papel Da placa bacteriana calcificada na paleomicrobiologia* [Mestrado Integrado em Medicina Dentária]. Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto.
- Metcalf, J. L., Ursell, L. K., & Knight, R. (2014). Ancient human oral plaque preserves a wealth of biological data. *Nature Publishing Group*, 46. <https://doi.org/10.1007/s00248>
- Nodari, R., Drancourt, M., & Barbieri, R. (2021). Paleomicrobiology of the human digestive tract: A review. *Microbial Pathogenesis*, 157. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104972>
- NZYDNA Ladder VI Catalogue numbers: MB08901, 200 lanes MB08902, 500 lanes. <https://www.nzytech.com/en/mb089-nzydna-ladder-vi/>
- Ottoni, C., Guellil, M., Ozga, A. T., Stone, A. C., Kersten, O., Bramanti, B., Porcier, S., & Van Neer, W. (2019). Metagenomic analysis of dental calculus in ancient Egyptian baboons. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56074-x>
- Pateel, D. G. S., Gunjal, S., Math, S. Y., Murugesappa, D. G., & Nair, S. M. (2017). Correlation of Salivary Statherin and Calcium Levels with Dental Calculus Formation: A Preliminary Study. *International Journal of Dentistry*, 2017. 5. <https://doi.org/10.1155/2017/2857629>
- Pinheiro, M. de F. T. (2010). *Genética Forense - Perspectivas da identificação genética* (Edições Universidade Fernando Pessoa, Ed.).
- Radini, A., & Nikita, E. (2022). Beyond dirty teeth: Integrating dental calculus studies with osteoarchaeological parameters. *Quaternary International*. 653-654, 3–18. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2022.03.003>
- Radini, A., Tromp, M., Beach, A., Tong, E., Speller, C., McCormick, M., Dudgeon, J. V., Collins, M. J., Rühli, F., Kröger, R., & Warinner, C. (2019). ANTHROPOLOGY Medieval women’s early involvement in manuscript production suggested by lapis lazuli identification in dental calculus. *Science advances*. 5(1), <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau7126>.
- Rosebury T. (1944). The parasitic actinomycetes and other filamentous microorganisms of the mouth: A Review of Their Characteristics and Relationships, of the Bacteriology of Actinomycosis, and of Salivary Calculus in Man. *Bacteriological reviews*, 8(3), 189–223. <https://doi.org/10.1128/br.8.3.189-223.1944>

- Salazar-García, D. C., Warinner, C., Eerkens, J. W., & Henry, A. G. (2023). *The Potential of Dental Calculus as a Novel Source of Biological Isotopic Data* (pp. 125–152). https://doi.org/10.1007/978-3-031-32268-6_6
- Shang, Q., Gao, Y., Qin, T., Wang, S., Shi, Y., & Chen, T. (2020). Interaction of Oral and Toothbrush Microbiota Affects Oral Cavity Health. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00017>
- Silva, P. C. (2020). Flora Microbiana Comensal no Homem. In L. Lidel- Edições Técnicas (Ed.), *Microbiologia Média* (1st ed., Vol. 1, pp. 60–65).
- Simón-Soro, Á., Tomás, I., Cabrera-Rubio, R., Catalan, M. D., Nyvad, B., & Mira, A. (2013). Microbial geography of the oral cavity. *Journal of Dental Research*, 92(7), 616–621. <https://doi.org/10.1177/0022034513488119>
- Soames, J. V., & Southam, J. C. (2005). *Oral pathology*. Fourth ed. Oxford University Press.
- Tan, B., Gillam, D. G., Mordan, N. J., & Galgut, P. N. (2004). A preliminary investigation into the ultrastructure of dental calculus and associated bacteria. *Journal of Clinical Periodontology*, 31(5), 364–369. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2004.00484.x>
- Trivedi, B. (2012). Microbiome: The surface brigade. *Nature*. 492(7429), S60–S61. <https://doi.org/10.1038/492S60a>
- Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). Defining the human microbiome. *Nutrition Reviews*, 70(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x>
- VIDEIRA, A. (2011). *Engenharia Genética- Principios e Aplicações* (Lidel, Ed.; 2nd ed.).
- Warinner, C., Speller, C., & Collins, M. J. (2015). A new era in palaeomicrobiology: Prospects for ancient dental calculus as a long-term record of the human oral microbiome. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1660). <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0376>
- Warinner, C., Speller, C., Collins, M. J., & Lewis, C. M. (2015a). Ancient human microbiomes. *Journal of Human Evolution*, 79, 125–136. <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2014.10.016>
- Warinner, C., Herbig, A., Mann, A., Fellows Yates, J. A., Weiß, C. L., Burbano, H. A., Orlando, L., & Krause, J. (2017). A Robust Framework for Microbial Archaeology. *Annual review of genomics and human genetics*, 18, 321–356. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091416-035526>
- Wasterlain, R. S. C. N. (2006). “Males” da Boca: Estudo da Patologia oral numa amostra das Coleções Osteológicas Identificadas do Museu Antropológico da Universidade de

- Coimbra (*finais do séc. XIX/inícios do séc. XX*)t [Dissertação de Doutoramento]. Universidade de Coimbra. <https://estudogeral.uc.pt/handle/10316/1580>.
- Wright, S. L., Dobney, K., & Weyrich, L. S. (2021). Advancing and refining archaeological dental calculus research using multiomic frameworks. In *Science and Technology of Archaeological Research* (Vol. 7, Issue 1, pp. 13–30). Routledge. <https://doi.org/10.1080/20548923.2021.1882122>
- White, T. D. ;, Black, M. T. ;, & Folkens, P. A. (2012). *Human Osteology* (third ed). Elsevier INC.
- Weyrich, L. S., Dobney, K., & Cooper, A. (2015). Ancient DNA analysis of dental calculus. *Journal of Human Evolution*, 79, 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2014.06.018>
- Youssef, N., Sheik, C. S., Krumholz, L. R., Najar, F. Z., Roe, B. A., & Elshahed, M. S. (2009). Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(16), 5227–5236. <https://doi.org/10.1128/AEM.00592-09>

8 – Anexos

Anexo A) Dados sobre a série esquelética de Bucelas.

Tabela 8- Identificação, Acrónimo/sigla do local, número do enterramento, quantidade de dentes utilizados, FID, identificação precisa do dente, idade à morte, sexo e afinidades populacionais dos esqueletos analisados na presente dissertação.

Esqueleto	Identificação da amostra	Acrónimo ou sigla do local	Número do enterramento	Quantidade de dentes	FID	Identificação precisa do dente	Idade à morte	Sexo	Ancestralidade
Esqueleto 2	E2	Bucelas	2	1	41	Incisivo Central Inferior Direito	Adulto maduro/idoso	Indeterminado	Não africano
Esqueleto 4	E4	Bucelas	4	1	42	Incisivo Lateral Inferior Direito	Adulto maduro/idoso	Indeterminado	Não africano
Esqueleto 14	E14	Bucelas	14	2 dentes	32+31	Incisivo Lateral e Central Esquerdo da mandíbula	Adulto maduro/idoso	Masculino	Não africano
Esqueleto 22	E22	Bucelas	22	1 dente	43	Canino Direito da mandíbula	Adulto maduro/idoso	Masculino	Não africano
Esqueleto 24	E24	Bucelas	24	1	34	Pré-molar Inferior Esquerdo	Adulto maduro/idoso	Masculino	Não africano
Esqueleto 34	E34	Bucelas	34	1	41	Incisivo Central Inferior Direito	Adulto jovem Indicadores de Transição tardia	Masculino	Não africano
Esqueleto 69	E69	Bucelas	69	1	31	Incisivo Central Inferior Esquerdo	Adulto maduro/idoso	Masculino	Não africano
Esqueleto 75	E75	Bucelas	75	1	41	Incisivo Central Inferior Direito	Adulto maduro/idoso	Masculino	Não africano
Esqueleto 82	E82	Bucelas	82	2 dentes	33+34	Canino Inferior Esquerdo + Primeiro molar Inferior Esquerdo	Adulto maduro/idoso	Masculino	Africano
Esqueleto 83	E83	Bucelas	83	3 dentes	44+45+46	1° e 2° pré-molar direito + 1° Molar direito (M1 Dto.)	Adulto maduro/idoso	Masculino	Não africano
Esqueleto 88	E88	Bucelas	88	1	35	2° pré-molar inferior Esquerdo	Adulto maduro/idoso	Feminino	Não africano
Esqueleto 98	E98	Bucelas	98	2	33+42	Canino Inferior Esquerdo + Incisivo Lateral Inferior Direito	Adulto maduro/idoso	Masculino	Não africano
Esqueleto 99	E99	Bucelas	99	1	42	Incisivo Lateral Inferior Direito	Adulto maduro/idoso	Possivelmente Masculino	Não africano
Esqueleto 102	E102	Bucelas	102	1 dente	41	Incisivo Central Direito da mandíbula	Adulto maduro/idoso	Masculino	Não africano
Esqueleto 105	E105	Bucelas	105	1 dente	43	Canino Inferior Direito	Adulto maduro/idoso	Masculino	Não africano
Esqueleto 117	E117	Bucelas	117	1	41	Incisivo Central Inferior Direito	Adulto maduro/idoso	Feminino	Não africano
Esqueleto 131	E131	Bucelas	131	1	33	Canino Inferior Esquerdo	Adulto maduro/idoso	Masculino	Não africano
Esqueleto 133	E133	Bucelas	133	1	41	Incisivo Central Inferior Direito	Adulto maduro/idoso	Feminino	Não africano
Esqueleto 134	E134	Bucelas	134	1	31	Incisivo Inferior Central Esquerdo	Adulto maduro/idoso	Masculino	Não africano
Esqueleto 137	E137	Bucelas	137	2	31+32	Incisivo Inferior Central Esquerdo + Incisivo Inferior Lateral Esquerdo	Adulto maduro/idoso	Feminino	Não africano
Esqueleto 141	E141	Bucelas	141	1	33	Canino Inferior Esquerdo	Adulto maduro/idoso	Masculino	Não africano
Esqueleto 146	E146	Bucelas	146	1	42	Incisivo Lateral Inferior Direito	Adulto maduro/idoso	Feminino	Não africano
Esqueleto 148	E148	Bucelas	148	1	41	Incisivo Central Inferior Direito	Adulto maduro/idoso	Masculino	Não africano
Esqueleto 155	E155	Bucelas	155	1	32	Incisivo Lateral Inferior Esquerdo	Adulto maduro/idoso	Masculino	Não africano

MICROBIOMA EM ANTIGAS POPULAÇÕES

Tabela 9- Tabela resumo do perfil patológico oral de cada indivíduo da população em análise.

Esqueleto	Patologia Oral
4	Cáries, desgaste ligeiro a moderado
22	Não tem informação disponível
24	Cáries, inflamação periapical
34	Não tem informação disponível
69	Cáries, cálculo dentário moderado nas faces labial e lingual na dentição anterior e ligeiro na posterior, desgaste dentário, em média, ligeiro
75	Cáries, perda de dentes e inflamação periapical
82	Incisivos intencionalmente modificados (faces vestibulares removidas), desgaste oclusal ligeiro e moderado, cálculo dentário e dente supranumerário sobreposto(faces bucais dos dentes 17 e 18)
98	Perda de dentes <i>ante-mortem</i> , cáries, desgaste severo dos dentes e inflamação periapical
99	Perda de dentes <i>ante-mortem</i> , cáries, manchas castanhas viseis em alguns dentes sobretudo nas faces distal e mesial, desgaste variavel e inflamação periapical
105	Desgaste oclusal moderado e severo, cálculo dentário, cáries e 2 dentes com manchas interproximais.
117	Cáries, desgaste dentário moderado a severo, cálculo dentário ligeira, perda de dentes <i>ante mortem</i> e inflamação periapical
133	Desgaste oclusal moderado e severo, cálculo dentário, cáries e manchas nas áreas interproximais de vários dentes, arcadas com doença periodontal e inflamação periapical
137	Cáries, perda de dentes, cálculo dentário e desgaste oclusal
141	Desgaste oclusal moderado e severo, cálculo dentário, cáries, manchas castanhas nas áreas interproximais de vários dentes, arcadas com doença periodontal e 2 inflamações (abcesso)
146	Cáries, perda de dentes e desgaste oclusal
148	Desgaste oclusal ligeiro a moderado, cálculo dentário (incidência na dentição anterior inferior nas faces linguais e labiais), manchas castanhas nas areas interproximais (26 e 27 e arcadas com doença periodontal ligeira.
155	Perda de dentes, deposições tartáreas severas em toda a dentição inferior anterior (faces linguais e labiais) e desgaste oclusal dentário