



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

**RAFAELA RIE NISHIYAMA**

**ESTUDO COMPARATIVO DE ABORDAGENS DE  
SEQUENCIAMENTO DE UM BANCO DE DADOS PÚBLICO  
PARA IDENTIFICAR O NÚCLEO DO MICROBIOMA DA SALIVA  
HUMANA**

PIRACICABA  
2021

**RAFAELA RIE NISHIYAMA**

**ESTUDO COMPARATIVO DE ABORDAGENS DE  
SEQUENCIAMENTO DE UM BANCO DE DADOS PÚBLICO  
PARA IDENTIFICAR O NÚCLEO DO MICROBIOMA DA SALIVA  
HUMANA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Cirurgião Dentista.

Orientador: Profa. Simone Gomes de Oliveira

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO APRESENTADO PELA ALUNA RAFAELA RIE NISHIYAMA E ORIENTADA PELA PROFA. SIMONE GOMES DE OLIVEIRA.

PIRACICABA  
2021

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
Marilene Girello - CRB 8/6159

N533e Nishiyama, Rafaela Rie, 1998-  
Estudo comparativo de abordagens de sequenciamento de um banco de dados público para identificar o núcleo do microbioma da saliva humana / Rafaela Rie Nishiyama. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Simone Gomes de Oliveira.  
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Microbiota. 2. Sequenciamento de nova geração. 3. Saliva. 4. Banco de dados. I. Oliveira, Simone Gomes de, 1965-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações adicionais, complementares

**Título em outro idioma:** Comparative study of sequencing approaches of a public database to identify the human saliva microbiome core

**Palavras-chave em inglês:**

Microbiota  
Next-generation sequence  
Saliva  
Databases

**Titulação:** Cirurgião-Dentista

**Data de entrega do trabalho definitivo:** 17-05-2021

## **DEDICATÓRIA**

Dedico aos meus pais Aparecida Harue Hayashi Nishiyama e Edson Hiroki Nishiyama e minha irmã Milena Rissa Nishiyama que desde o princípio estiveram ao meu lado me prestigiando e me apoiando em qualquer escolha feita, dificuldade enfrentada e conquistas realizadas ao longo da minha vida. Dedico este trabalho a todos que fizeram parte desta etapa da minha vida. Vocês são o meu motivo de felicidade, obrigada por tanto amor.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por me iluminar e abençoar minha trajetória.

Aos meus pais que sempre me incentivaram a correr atrás dos meus próprios sonhos e me fizeram chegar até aqui, sempre me apoiando e me amparando nos momentos mais difíceis e sendo assim, a minha maior motivação e fonte de força nesses anos.

A minha irmã, que me ensina todos os dias a encarar o mundo sob novas perspectivas, a valorizar as pequenas vitórias transformando limitações em desafios que podem ser superados dia após dia e principalmente me ensina todo dia que é possível viver sem sentimentos ruins enxergando o mundo de uma forma melhor.

Agradeço também a minha querida orientadora Simone Gomes de Oliveira por todo ensino, motivação, esforço e carinho durante minhas pesquisas, que me ajudou muito no meu aprendizado profissional e principalmente pessoal.

Agradeço ao apoio do Prof. Dr. Flávio Baggio Aguiar, pelo apoio dado, pela orientação e pela oportunidade de desenvolvimento, que foi fundamental para a execução do trabalho.

Agradeço ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de bolsas PIBIC.

Aos meus queridos amigos, sem vocês eu não superaria todas as dificuldades. Com vocês pude celebrar as conquistas e aproveitar os momentos que vivemos juntos ao longo de todos esses anos. Levo vocês comigo desde 2017 para todo o resto da minha vida.

Aos meus professores pelos ensinamentos e conhecimentos. Aos funcionários pela paciência e carinho. E aos meus pacientes, pela confiança. Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram e participaram na realização desse sonho. E que mesmo não citados aqui, participaram na construção da pessoa que sou hoje.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 124015/2019-0.

## RESUMO

O objeto deste estudo foi identificar o núcleo do microbioma salivar humano a partir de dados depositados em um banco de dados público de projetos metagenômicos e avaliar a qualidade das sequências e dos dados depositados. Os dados de sequenciamento obtidos por Amplicon e Shotgun foram recuperados de amostras salivares depositadas no MG-RAST. Os dados foram comparados pelo teste U de Mann-Whitney e a associação entre as variáveis *Failed*, *Unknown*, *Predicted*, *Alpha* e *Rarefaction*, pela correlação de Spearman. Os núcleos dos microbiomas foram inferidos pela Análise de Componentes Principais. Todos os testes estatísticos utilizaram  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas com 3 projetos, utilizando 245 metagenomas de Amplicon e 164 metagenomas de Shotgun. Todas as comparações entre as variáveis, segundo a abordagem de sequenciamento, apresentaram diferenças significativas, exceto *Predicted*. Em Shotgun, a correlação mais alta foi entre *Rarefaction* e *Failed* ( $r = -0,78$ ) e a mais baixa entre *Alpha* e *Unknown* ( $r = -0,12$ ). Em Amplicon, *Rarefaction* e *Unknown* ( $r = 0,63$ ) tiveram a maior associação e a menor foi entre *Alpha* e *Predicted* ( $r = -0,03$ ). A maior diversidade foi observada em Shotgun. *Propionibacterium*, *Lactobacillus* e *Prevotella* foram os gêneros mais representativos em Amplicon. Em Shotgun, os gêneros mais representativos foram *Escherichia*, *Chitinophaga* e *Acinetobacter*. O núcleo e a diversidade do microbioma da saliva humana dependem das abordagens de sequenciamento. Os dados disponíveis sugerem que Shotgun e Amplicon possuem sensibilidades semelhantes para detectar o nível taxonômico investigado, embora Shotgun permita uma análise mais profunda da diversidade de microrganismos.

**Palavras-chave:** Microbioma. Sequenciamento de nova geração. Saliva. Base de dados de sequências.

## ABSTRACT

The aim of this study was to identify the core of the human saliva microbiome from data deposited in a public database of metagenomic projects and evaluate the quality of the sequences and deposited data. Sequencing data obtained by Amplicon and Shotgun were recovered from salivary samples deposited in MG-RAST. Data were compared using Mann-Whitney U test and the association among *Failed*, *Unknown*, *Predicted*, *Alpha* and *Rarefaction* variables, by Spearman's correlation. Microbiomes cores were inferred by Principal Component Analysis. All statistical tests used  $p < 0.05$ . Analyses were carried out with 3 projects, using 245 Amplicon metagenomas and 164 Shotgun metagenomas. All comparisons among variables, according to the sequencing approach, showed significant differences, except for *Predicted*. In Shotgun, the highest correlation was between *Rarefaction* and *Failed* ( $r = -0.78$ ) and the lowest between *Alpha* and *Unknown* ( $r = -0.12$ ). In Amplicon, *Rarefaction* and *Unknown* ( $r = 0.63$ ) had the highest association and the lowest was between *Alpha* and *Predicted* ( $r = -0.03$ ). The greatest diversity was observed in Shotgun. *Propionibacterium*, *Lactobacillus* and *Prevotella* were the most representative genera in Amplicon. In Shotgun, the most representative genera were *Escherichia*, *Chitinophaga* and *Acinetobacter*. Core and diversity of human saliva microbiome depend on sequencing approaches. Available data suggest that Shotgun and Amplicon have similar sensitivities to detect the investigated taxonomic level, although Shotgun allows a deeper analysis of the diversity of microorganisms.

**Key words:** Microbiome. Next generation sequencing. Saliva. Sequence database.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 ARTIGO: O CORE DO MICROBIOMA DA SALIVA HUMANA: UMA ANÁLISE DOS DADOS DO MG-RAST	13
3 CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	31
ANEXOS	34
Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio	34
Anexo 2 – Comitê de Ética em Pesquisa	36
Anexo 3 – Iniciação Científica	37
Anexo 4 – Submissão do Artigo	38
Anexo 5 – Premiação por Mérito Científico no XXVIII Congresso de Iniciação Científica da UNICAMP	40

## 1 INTRODUÇÃO

Doenças bucais como a cárie e as doenças periodontais ainda são consideradas problemas de saúde pública, seja decorrente de suas incidências e prevalências, seja pelo impacto às condições de saúde que acarretam progressivamente ao longo da vida (Tonetti et al., 2017; Lamont et al., 2018; Peres et al., 2019). Apesar do avanço no desenvolvimento de materiais e técnicas de prevenção e tratamento, os últimos vinte e cinco anos não foram suficientes para modificar a importância dessas doenças (Kassebaum et al., 2017).

O termo microbioma representa o ambiente em que uma complexa comunidade de microorganismos o compartilha, uma região do organismo no hospedeiro em que a microbiota nele se mantém por meio de relações comensais e/ou simbióticas (Lederberg, 2004). Assim, enquanto o hospedeiro fornece um ambiente seguro, úmido e nutritivo, a microbiota fornece benefícios essenciais como a exclusão de potenciais patógenos e a colonização de superfícies, contribuindo para o desenvolvimento das defesas do hospedeiro (Blum, 2017).

A cavidade oral humana abriga uma complexa microbiota, com cerca de 700 taxa bacterianas, além de protozoários, arqueas, vírus e fungos (The Human Microbiome Project, 2012; Chen e Jiang, 2014). Essa complexa comunidade é o principal agente da manutenção da sua estabilidade (homeostase) ou de mudanças que levam ao seu desequilíbrio (disbiose), resultando em condições que propiciam o surgimento de doenças bucais como a cárie e as doenças periodontais. No entanto, fatores como o local em que a microbiota se estabelece e a idade, o estilo de vida e a genética do hospedeiro podem fazer variar a composição do microbioma (Kilian et al., 2016). Hospedeiros saudáveis podem manter por até sete anos a composição de seus microbiomas orais em cerca de 99,7% (Rasiah et al., 2005; David et al., 2014; Rosier et al., 2018).

A transição entre o estado de saúde para o de doença é caracterizado pela mudança da estrutura do microbioma. Sua estrutura é alterada tanto em composição (diversidade), como pela a quantidade (abundância) dos componentes do microbioma, acompanhadas pelo surgimento e o predomínio de novos constituintes (Fakhruddin et al., 2019). Fatores como a elevada ingestão de carboidratos e a inflamação representam forças motrizes que promovem mudanças na composição da microbiota oral (Tanner et al., 2018). Na cárie a mudança das condições ambientais, torna o meio mais ácido e propenso à seleção de bactérias acidúricas e acidogênicas (Tanner et al., 2018), como os gêneros *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, que desempenham função importante no desenvolvimento da doença (Takahashi e Nyvad, 2011) formando polissacarídeos

extracelulares e impermeáveis (Tanner et al., 2018; Willmann et al., 2018). Por outro lado, amostras de indivíduos saudáveis com baixa experiência de cárie foram associadas a maior abundância dos gêneros *Neisseria*, *Haemophilus* e *Fusobacterium* das quais, a maioria das espécies desses gêneros fermentam levemente o açúcar (Belstrøm et al., 2017).

As doenças periodontais, por sua vez, são caracterizadas pela inflamação promovida pelo acúmulo de placa, levando ao aumento da proporção de bactérias anaeróbias e com ação proteolítica (Sanz et al., 2017). *Eubacterium saphenum*, *Tannerella forsythia*, *Filifactor alocis*, *Streptococcus mitis / parasanguinis*, *Parvimonas micra*, *Prevotella sp.*, *Phocaeicola sp.* e *Fretibacterium sp.* (Lundmark et al., 2019) são associadas ao aumento da placa ao redor da margem gengival, estimulando a resposta inflamatória no hospedeiro. Enquanto que o aumento dos níveis de bactérias anaeróbias, incluem espécies proteolíticas Gram-negativas (Noguera-Julian et al., 2017), especialmente pertencentes aos gêneros *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Tannerella*, *Fusobacterium* e *Treponema* (Willmann et al., 2018).

O crescente conhecimento sobre a dinâmica do microbioma oral tem enfatizado a importância da composição de espécies para a manutenção das condições de saúde (Tanner et al., 2018). Apesar de não estarem associadas aos mesmos grupos de microorganismos, a cárie e as doenças periodontais são desencadeadas e mantidas pela interação da microbiota com o hospedeiro (Lamont et al., 2018). No entanto, os microorganismos associados a ambas as doenças têm como principais características a elevada especialização metabólica e a capacidade de se organizarem em biofilmes microbianos multiespécies (Sanz et al., 2017).

A caracterização de perfis microbianos das doenças bucais (Tanner et al., 2018; Fakhruddin et al., 2019; Nibali et al., 2020; Nomura et al., 2020) tem sido alvo de interesse dos pesquisadores a fim de se identificar padrões de composição do microbioma oral às condições de saúde bucal. Para isso, é importante utilizar marcadores biológicos (biomarcadores) representativos. Com o avanço recente dos ensaios de proteínas, altamente sensíveis, a saliva e o fluido crevicular gengival passaram a ser utilizados para a identificação de biomarcadores importantes, com várias aplicações na odontologia (Papagerakis et al., 2019).

A saliva é um fluido biológico contido nas secreções glandulares (parótida, submandibular, sublingual e glândulas salivares menores), desempenhando um papel fundamental para a manutenção e estabilidade da homeostase do ambiente intra-oral (Rosier et al., 2018). Além disso, sua coleta é fácil, não invasiva, de baixo custo, não causa desconforto ao paciente e é representativa do ambiente intra-oral (Dawes e Wong, 2019). Nela podem ser encontradas células da mucosa oral, sangue, fluido crevicular gengival e,

similarmente ao soro e outros biofluidos, contém biomoléculas como DNA, mRNA, microRNA, proteínas, metabólitos e microrganismos (Spielmann e Wong, 2011). Mudanças na concentração destes constituintes podem ser usadas para a identificação precoce de desequilíbrios associado a doenças orais e sistêmicas, auxiliar na avaliação de prognósticos, de riscos de doenças e no acompanhamento da resposta a tratamentos (Buzalaf et al., 2020).

A limitação dos métodos tradicionais para a identificação de microrganismos e o crescente interesse nas comunidades das microbiotas pode, através do desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento de DNA, investigar não só os microrganismos cultiváveis mas, também os não cultiváveis e explorar suas relações ecológicas, isto é, com o ambiente e entre os demais constituintes da microbiota.

As abordagens de sequenciamento mais recentes são denominadas Sequenciamento de Nova Geração (NGS) (Vincent et al., 2017). Uma característica importante dessas abordagens é a elevada produção de dados gerados a serem tratados e analisados (Boers et al., 2019; Gupta et al., 2019; Liu et al., 2020).

Amplicon e Shotgun são as duas abordagens de NGS utilizadas atualmente. A técnica de sequenciamento genético de Amplicon é realizada a partir do produto gerado pela reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction - PCR), que amplifica marcadores genéticos como o gene 16S rRNA do genoma bacteriano. Esse marcador representou o padrão para os estudos da composição das comunidades bacterianas, e permite estudar e diferenciar bactérias sequenciando diferentes regiões do gene. A utilização do gene 16S rRNA impulsionou a identificação de microrganismos não cultiváveis já que seu sequenciamento não depende de métodos de cultura e, portanto, muitas espécies bacterianas que antes não eram detectadas por não poderem ser cultivadas, passaram ser detectadas (Roberts e Darveau, 2015). Porém, embora consiga identificar diferentes espécies de bactérias, esse método é limitado, uma vez que não é capaz de identificar subespécies nem identificar microrganismos que não sejam detectados pelo marcador genético (Caselli et al., 2020). Por sua vez, a técnica de sequenciamento de Shotgun, é capaz de sequenciar diretamente todo o DNA extraído de uma amostra, produzindo informações de todos os genes detectados, incluindo o gene 16S rRNA. Esse método pode fornecer informações sobre quais genes estão presentes na amostra e detectar microrganismos não detectáveis por Amplicon (Boers et al., 2019).

O crescente desenvolvimento das metodologias de sequenciamento aprimorou a qualidade e a rapidez dos resultados a um custo mais acessível. Mas, ampliou também a elevada quantidade da geração de dados, requerendo o uso de ferramentas computacionais

específicas para o tratamento, processamento e análise dos resultados. Dados gerados por sequenciamento, normalmente são depositados em bases de dados de domínio público (Boers et al., 2019; Nibali et al., 2020). Um dos pioneiros em plataformas de armazenamento e análise de dados metagenômicos é o portal Metagenomics - Rapid Annotation using Subsystems Technology (MG-RAST), lançado em 2008 que pode ser acessado no endereço <https://www.mg-rast.org/>. O MG-RAST é um sistema de código aberto em que são depositados e disponibilizados gratuitamente dados metagenômicos (Meyer et al., 2008). Por meio dele, pode-se capturar dados de forma agrupada, por projetos ou tipo de amostras, dados da diversidade de microrganismos, de qualidade das sequências e compará-las a sequências já descritas em outros bancos de dados, permitindo assim reconhecer se estas sequências correspondem a de microrganismos presentes nas amostras (Paczian et al., 2019).

Com o intuito de conhecer a composição e a inter-relação entre os componentes do microbioma oral humana este trabalho investigou a diversidade da microbiota salivar e seus componentes mais representativos (*core*), através de sequências obtidas por Amplicon e Shotgun depositadas na base MG-RAST. O estudo do *core* do microbioma salivar humano é crucial para a identificação precoce de disbioses promotoras de doenças bucais e sistêmicas, para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e de prevenção e para o desenvolvimento de novos fármacos, capazes de atuar de forma balanceada no equilíbrio ecológico do microbioma oral.

## 2 ARTIGO: O CORE DO MICROBIOMA DA SALIVA HUMANA: UMA ANÁLISE DOS DADOS DO MG-RAST

Submetido no periódico BMC Oral Health (Anexo 4)

Oliveira *et al.*

### ORAL HEALTH

#### Core do microbioma da saliva humana: uma análise dos dados do MGRAST

Simone G Oliveira<sup>1,2†</sup>, Rafaela R. Nishiyama<sup>1</sup>, Claudio A.C. Trigo<sup>1</sup>, Ana Luiza de M

Guaraldi<sup>3</sup>, Alberto M R Davila<sup>4</sup>, Rodrigo Jardim<sup>4\*\*†</sup> e Flavio H.B. Aguiar<sup>1</sup>

\* Correspondence:

[rodrigo.jardim@fiocruz.br](mailto:rodrigo.jardim@fiocruz.br) <sup>4</sup>

Computational and Systems

Biology Laboratory, Oswaldo Cruz

Institute, Oswaldo Cruz

Foundation, Av. Brasil, 4365, Rio de

Janeiro, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

<sup>†</sup> Equal contributor

#### Resumo

**Antecedentes:** A microbiota oral é considerada a segunda mais complexa do corpo humano e sua disbiose pode ser responsável por doenças bucais. As interações entre as comunidades de microrganismos e o hospedeiro permitem estabelecer os perfis microbiológicos. Identificar o *core* do microbioma é essencial para prever doenças e mudanças na microbiota oral.

**Métodos:** Foi recuperada uma busca no portal MG-RAST sobre os projetos depositados entre 2014 e 2019 e contendo o termo "SALIVA". Todos os dados foram verificados quanto à normalidade e homocedasticidade. Os conjuntos de dados metagenômicos Amplicon e Shotgun foram comparados usando o teste U de Mann-Whitney. A associação entre as variáveis *Failed*, *Unknown*, *Predicted*, *Alpha* e *Rarefaction* foi realizada pela correlação de Spearman. Os *cores* dos microbiomas foram inferidos por Análise de Componentes Principais. Para todos os testes estatísticos, foi utilizado  $p < 0,05$ .

**Resultados:** O estudo foi realizado com 3 projetos, envolvendo 245 sequências de Amplicon e 164 de Shotgun. Todas as comparações das variáveis, de acordo com o tipo de sequenciamento, apresentaram diferenças significativas, exceto *Predicted*. Em Shotgun a associação mais elevada foi entre *Rarefaction* e *Failed* ( $r = -0,78$ ) e a mais baixa entre *Alpha* e *Unknown* ( $r = -0,12$ ). Em Amplicon as variáveis *Rarefaction* e *Unknown* ( $r = 0,63$ ) apresentaram a associação mais alta e a mais baixa foi entre *Alpha* e *Predicted* ( $r = -0,03$ ). Shotgun apresentou maior diversidade que Amplicon. *Propionibacterium*, *Lactobacillus* e *Prevotella* foram os gêneros mais representativos no sequenciamento por Amplicon. Em Shotgun os gêneros mais representativos foram *Escherichia*, *Chitinophaga* e *Acinetobacter*.

**Conclusões:** O *core* do microbioma salivar e a diversidade de gêneros são dependentes das abordagens de sequenciamento. Os dados disponíveis sugerem que Shotgun e Amplicon possuem sensibilidades semelhantes para detectar o nível taxonômico investigado, embora Shotgun permita uma análise mais profunda da diversidade de microrganismos. A escolha das abordagens metagenômicas deve considerar suas características e limitações. Foram identificados 20 gêneros no *core* do microbioma salivar, independente do estado de saúde do hospedeiro. Algumas bactérias do *core* precisam de estudos adicionais para compreender melhor seu papel na cavidade oral. **Palavras-chave:** Microbioma; Saliva; MG-RAST; Amplicon; Shotgun; eHOMD.

## Introdução

Metagenômica é uma técnica capaz de identificar DNA de microrganismos não cultiváveis obtidas de amostras ambientais (Handelsman et al, 1998). Desde o desenvolvimento do sequenciamento de nova geração (NGS), esta técnica tem sido amplamente utilizada em vários estudos científicos (Fróes et al, 2016; Mardis, 2008; Tierney et al, 2019). Um dos desafios da metagenômica é trabalhar com um grande volume de dados gerados por sequenciamento e análise. Na bioinformática, os dados de sequenciamento devem ser depositados em banco de dados públicos para amplo acesso e normalmente é acompanhada pela publicação de um estudo científico. Desde 2008 várias bases de dados especializadas têm permitido o depósito de dados brutos e analisados de projetos de metagenômica (Leinonen et al, 2011; Meyer et al, 2008). Um dos pioneiros em plataformas de armazenamento para análise de dados metagenômicos é o portal de acesso público MG-RAST (Meyer et al, 2008).

No portal Metagenomics - Rapid Annotation using Subsystems Technology (MG-RAST) estão depositados projetos gerados a partir de diferentes abordagens metagenômicas como Amplicon, Shotgun e Metatranscriptômica. O sequenciamento do Amplicon (ou metabarcoding) é feito usando produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR), que amplifica genes marcadores como 16S rRNA, 23S rRNA e 18S rRNA. A metagenômica Shotgun é empregada para o sequenciamento total de DNA de amostras ambientais, enquanto a Metatranscriptômica é usada para sequenciar todo o RNA extraído das amostras.

O microbioma oral humano é considerado o segundo mais complexo do corpo humano e é composto por mais de 700 espécies (Dewhirst et al, 2010) das quais 54% são cultiváveis, 14% cultiváveis mas não identificáveis, além de 32% de microrganismos impossíveis de cultivar e de identificar (Caselli et al, 2020).

Estudos recentes comprovaram a existência de uma relação intrínseca entre as condições ambientais e os perfis do microbioma (Caselli et al, 2020; Fróes et al, 2016; Wang et al, 2020). A disbiose da microbiota oral pode ser responsável por doenças orais, como cáries, placa bacteriana e doenças periodontais (Nibali et al, 2020; Nomura et al, 2020; Papapanou et al, 2020). As interações entre o hospedeiro e a microbiota permitem estabelecer diferenças nos perfis do microbioma devido às condições de saúde ou doença (Tanner et al, 2018). Nas últimas décadas, o desenvolvimento de metodologias e análises para a identificação e caracterização de microbiomas tem permitido prever doenças associadas a mudanças no ambiente e seus reflexos na microbiota, particularmente aquelas que compartilham o mesmo nicho (Shade e Handelsman, 2012). O conjunto de microrganismos que compartilham o mesmo nicho é chamada de núcleo ou *core* (Shade e Handelsman, 2012). A Identificação do microbioma *core* é possibilita prever o quão “saudável” esse ambiente se encontra (Shade e Handelsman, 2012). A literatura aponta que os 10% de microrganismos prevalentes no *core* devem ser considerados dominantes na microbioma. Por outro lado, os 65% menos predominantes devem ser considerados raros (Ugland e Gray, 1982). No entanto, ainda não necessários estudos que investiguem a relação do *core* com o meio ambiente e a saúde do hospedeiro, a fim de auxiliar a prevenção de doenças, a resposta a tratamentos e o restabelecimento das condições de saúde (Shade e Handelsman, 2012).

## TEXTO PRINCIPAL

### Métodos

Este estudo teve como objetivo investigar o núcleo do microbioma oral em amostras de saliva, independentemente das condições do hospedeiro, utilizando o banco de dados do portal MG-RAST, durante o período de cinco anos.

Foram selecionados projetos cadastrados entre 2014-2019, contendo como palavrachave o termo “saliva” na variável Material (material = 'SALIVA'). Um script desenvolvido em *Python* foi desenvolvido para automatizar a recuperação de dados para projetos selecionados. Os dados recuperados foram armazenados em uma planilha. Apenas projetos de metagenômica foram considerados para este estudo. Apenas os resultados obtidos por Amplicon e Shotgun foram investigados. Além disso, apenas projetos com ambas as abordagens e com três ou mais conjuntos de dados de metagenomas foram considerados para este estudo.

As variáveis *Failed*, *Unknown*, *Predicted*, *Alpha* e *Rarefaction* (Tabela 1) foram selecionadas para avaliar a qualidade e a predição taxonômica das sequências, além da riqueza e abundância de espécies. Dados taxonômicos, em nível de gênero, foram recuperados dos projetos selecionados para o estudo do núcleo do microbioma.

VARIÁVEL	DESCRIÇÃO	NOME MG-RAST
<i>Failed</i>	<i>Reads</i> com qualidade baixa	QC failed
<i>Unknown</i>	<i>Reads</i> sem taxonomia	QC unknown
<i>Predicted</i>	<i>Reads</i> com taxonomia	QC predicted
<i>Alpha</i>	Índice de Shannon da diversidade alfa	ALPHA
<i>Rarefaction</i>	Valor do ponto mais alto da curva de rarefação	RAREFACTION
<i>Type</i>	Abordagem de sequenciamento	Sequence type
<i>Taxonomy</i>	Taxonomia no nível de gênero	Taxonomy

Tabela 1: Variáveis recuperadas no MG-RAST. As variáveis *Failed*, *Unknown*, *Predicted*, *Alpha* e *Rarefaction* foram utilizadas na análise descritiva e de correlação. O tipo representa a abordagem de sequenciamento (Amplicon ou Shotgun). A variável *Taxonomy* contém os gêneros encontrados nas amostras que foram usadas no estudo de Análise de Componentes Principais (PCA).

O software R versão 3.6.1 (R Core Team 2020) foi usado para a análise estatística. Todos os dados foram verificados quanto à normalidade e homocedasticidade. O sequenciamento por Amplicon e por Shotgun foram comparados usando o teste U de Mann-Whitney. A associação entre a qualidade das sequências, a previsão taxonômica e a diversidade identificada e esperada foram realizadas pela correlação de Spearman. Os cores dos microbiomas foram obtidos por Análise de Componentes Principais (PCA), para avaliar os organismos mais representativos nas amostras. O nível taxonômico de gênero foi utilizado para padronizar os resultados. Para todos os testes estatísticos, foi utilizado  $p < 0,05$ .

O diagrama de Venn foi usado para comparar os *cores* entre obtidos por Amplicon, Shotgun e o depositado no banco de dados *expanded Human Oral Microbiome Database* (eHOMD) (Escapa et al, 2018).

## Resultados

O script em Python recuperou 476 conjuntos de dados de metagenoma, dos quais 332 foram de Amplicon, 142 de Shotgun e 2 metatranscriptomas. Para este estudo, os metatranscriptomas foram descartados. Os 474 metagenomas restantes representaram 12 projetos de sequenciamento. Destes, apenas 4 projetos tinham metagenomas com abordagens de sequenciamento por Amplicon e por Shotgun. Assim, 8 projetos foram descartados. Além disso, 1 projeto tinha apenas 1 metagenoma para cada tecnologia e também foi descartado. O estudo foi realizado com 3 projetos, com 245 obtidos por Amplicon e 164 por Shotgun (Tabela 2).

Projeto	Abordagem	Quantidade de metagenomas
mgp3474	Amplicon	95
mgp4843	Amplicon	97
mgp7236	Amplicon	53
mgp3474	Shotgun	8
mgp4843	Shotgun	73
mgp7236	Shotgun	83

Tabela 2: Quantidade de metagenomas por projeto e abordagem de sequenciamento.

A Figura 1 mostra os resultados da análise descritiva das variáveis numéricas. Para os conjuntos de dados de sequenciamento por Amplicon, não houve sequência com problemas de qualidade. Todas as variáveis de ambas as abordagens apresentaram distribuição não gaussiana, com exceção da variável *Alpha* em Shotgun. Todas as comparações das variáveis, segundo o tipo de sequenciamento, apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), exceto a variável *Predicted* ( $p = 0,4307$ ).

O estudo de correlação das cinco variáveis mostrou divergências entre as abordagens de Amplicon e Shotgun (Figura 2). A maioria das correlações das variáveis nos conjuntos de dados de Amplicon foi positiva, ao contrário do que foi observado em Shotgun. Em Shotgun, a correlação mais alta foi entre *Rarefaction* e *Failed* ( $r = -0,78$ ) e a mais baixa entre *Alfa* e *Unknown* ( $r = -0,12$ ). Em Amplicon, as variáveis *Rarefaction* e *Unknown* ( $r = 0,63$ ) tiveram a maior correlação enquanto que a menor associação foi entre *Alfa* e *Predicted* ( $r = -0,03$ ).

A PCA identificou *cores* de microbiomas com gêneros diferentes entre Amplicon e Shotgun. Os conjuntos de dados de Shotgun mostraram um número maior de gêneros do que o Amplicon. Os 10 principais gêneros mostram que apenas *Prevotella* e *Streptococcus* são os mais representativos nos *cores* de ambas as abordagens. Enquanto *Propionibacterium*, *Lactobacillus* e *Prevotella* foram os gêneros mais representativos nos conjuntos de dados obtidos por Amplicon. *Escherichia*, *Chitinophaga* e *Acinetobacter* (Figura 3 e Figura 4) foram os gêneros mais representativos obtidos por Shotgun. Os gêneros presentes nos *cores* dos microbiomas de Shotgun e Amplicon estão listados em Material Suplementar (S1).

Ao comparar Shotgun e Amplicon e eHOMD foi identificado um *core* comum ou compartilhado contendo 20 gêneros (Tabela 3). Os conjuntos de dados eHOMD e

Shotgun compartilham um *core* com 39 gêneros, entre eHOMD e Amplicon o *core* em comum contém 9 gêneros e entre Shotgun e Amplicon o *core* é de apenas 7 gêneros (Figura 5). Os nomes completos dos gêneros dos diferentes *cores* compartilhados estão disponíveis no Material Suplementar (S2).

<i>Gram</i>	<i>Gênero</i>	<i>Relação com doenças orais</i>
	<i>Acinetobacter</i>	Carcinoma de células escamosas (Zhang et al, 2019b)
	<i>Delftia</i>	Língua geográfica (Dafar et al, 2017)
	<i>Dialister</i>	Síndrome de Sjogren (Sharma et al, 2020)
<i>Gram-negativa</i>	<i>Enterobacter</i>	Estomatite associada ao uso de prótese (Pereira et al, 2013)
	<i>Haemophilus</i>	Carcinoma de células escamosas (Guerrero-Preston et al, 2016)
	<i>Moraxella</i>	Peri-implantite (de Melo et al, 2020)
	<i>Neisseria</i>	Condições periodontais saudáveis (Yamashita and Takeshita, 2017)
	<i>Prevotella</i>	Doença periodontal (Yamashita and Takeshita, 2017)
	<i>Pseudomonas</i>	Câncer oral (Kakabadze et al, 2020)
	<i>Ralstonia</i>	Periodontite (Sun et al, 2020)
	<i>Sphingomonas</i>	Úlcera aftosa recorrente (Yu et al, 2020)
	<i>Actinomyces</i>	Cárie (Gao et al, 2016)
	<i>Bacillus</i>	Cárie (Ratna Sudha et al, 2020)
	<i>Corynebacterium</i>	Biofilme (Esberg et al, 2020)
<i>Gram-positiva</i>	<i>Lactobacillus</i>	Cárie (Gao et al, 2016)
	<i>Micrococcus</i>	Atividade da lisozima (Gennari et al, 2019)
	<i>Mycobacterium</i>	Infecção dentária (Cortela et al, 2015)
	<i>Rothia</i>	Cárie (Vieira et al, 2019)
	<i>Staphylococcus</i>	Sialoadenite aguda (Ogle, 2020)
	<i>Streptococcus</i>	Cárie (Gao et al, 2016)

Tabela 3: Gêneros de bactérias do *core* do microbioma da saliva humana e sua relação com doenças bucais.

## Discussão

Nesta pesquisa, metagenomas de saliva humana foram selecionados para análise do *core* do microbioma oral. A obtenção de amostras salivares é simples, de fácil execução, não invasiva, não causa desconforto ao paciente, é econômica e representativa do meio bucal. A saliva, como outros fluidos biológicos, contém DNA, RNA, proteínas e produtos metabólicos, que são componentes do hospedeiro, de sua microbiota e do produto de suas interações. Apesar da facilidade de coleta, o conhecimento do comportamento da microbiota salivar e de outros constituintes ainda é um desafio. Estudos utilizando análises sofisticadas, como o sequenciamento de última geração, permitem investigar diferenças no perfil bacteriano em pacientes com doenças bucais, como cárie e periodontite, em comparação com indivíduos saudáveis (Suárez Moya, 2017).

A saliva de indivíduos com alta experiência de cárie está associada a uma alta abundância salivar de *Streptococcus* e inúmeras espécies de *Lactobacillus*, além de outras bactérias capazes de degradar açúcares e formar polissacarídeos extracelulares (Tanner et al, 2018). Amostras de indivíduos saudáveis com baixa experiência de cárie foram associadas à maior abundância dos gêneros *Neisseria*, *Haemophilus* e *Fusobacterium*, dos quais a maioria das espécies deste gênero fermenta parcialmente o açúcar (Belstrøm et al, 2017). Segundo Tanner et al (2018), a composição da saliva na cavidade oral é um dos principais fatores de risco associados à cárie. Desequilíbrio no ambiente tende à disbiose do biofilme resultando no aumento de espécies acidogênicas e acidúricas, capazes de modular os componentes centrais do biofilme. Já nos casos de gengivite, o aumento da quantidade de placa ao redor da margem gengival induz a resposta inflamatória no hospedeiro, levando ao aumento dos níveis de bactérias anaeróbias, incluindo espécies proteolíticas Gram-negativas, principalmente as pertencentes aos gêneros *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Tannerella*, *Fusobacterium* e *Treponema* (Willmann et al, 2018).

As variáveis utilizadas neste estudo apresentaram comportamentos distintos, de acordo com a abordagem de sequenciamento. Porém, o resultado mais expressivo foi observado na variável *Predicted*, a única que não apresentou diferença estatisticamente significativa entre as abordagens de sequenciamento, demonstrando que, em termos relativos, as duas abordagens são capazes de inferir a taxonomia de forma semelhante para gêneros de bactérias. Esses resultados são semelhantes aos observados por Laudadio et al (2018), que investigou a composição microbiana do intestino humano. Porém, os resultados obtidos por Shotgun, permitiram a caracterização mais complexa do microbioma, com a identificação de maior diversidade e ao nível taxonômico das espécies, quando comparado ao sequenciamento do rDNA 16S por Amplicon. A maioria dos estudos de rDNA 16S usa regiões do gene com variabilidade para identificar a taxonomia da microbiota até o nível de gênero (Wade, 2013).

Observou-se no conjunto de dados de obtidos por Amplicon que todos os projetos não apresentaram sequências com falhas de qualidade (*Failed* = 0). Este resultado foi inesperado. Mesmo o sequenciamento por Amplicon pode apresentar falhas de qualidade no processo de sequenciamento. Isso pode ter influenciado a análise de correlação que mostrou associações baixas ou nulas entre as variáveis. Apenas *Rarefaction* e *Unknown* apresentaram associação maior que 0,50 ( $r = 0,63$ ). O comportamento esperado para estas variáveis ser a de uma associação inversa. Uma vez que o maior número de sequências não inferidas determina o menor número de organismos potencialmente descobertos.

Shotgun apresentou conjuntos de dados mais confiáveis uma vez que foi observado o comportamento esperado das variáveis, o que pode ser exemplificado pela associação entre *Failed* e *Rarefaction*. É esperado que estas variáveis apresentem associação inversa. O

maior número de sequências com falha de qualidade determina o menor número de sequências a serem inferidas, afetando a curva de rarefação. Esse foi exatamente o comportamento observado em Shotgun para essas variáveis ( $r = -0,78$ ). Por outro lado, *Predicted* e *Rarefaction* devem ter associação direta, o que também foi observado ( $r = 0,62$ ).

Tanto em Amplicon quanto nos *cores* obtidos em Shotgun, foram encontrados gêneros de bactérias já associadas à cárie e a doenças periodontais, como *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Prevotella* (Belstrøm, 2020; Streckfus, 2015).

A presença de gêneros como *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Pseudomonas* e *Shigella* mostra que outros microrganismos patogênicos também podem ser identificados em amostras de saliva.

Além da facilidade de coleta e conforto para o paciente, a saliva tem se mostrado um material biológico capaz de refletir a dinâmica das condições de saúde e doenças metabólicas, imunológicas ou infecciosas, refletindo disbioses de origem local e sistêmica, como cárie, doenças periodontais, diabetes, artrite reumatóide (Zhang et al, 2015), câncer e, mais recentemente, SARS-COV-2 (Fini, 2020; Streckfus, 2015).

Nas amostras estudadas foi identificada a presença do gênero *Chitinophaga*, um táxon recentemente descrito e observado apenas em sequenciamentos realizados por Shotgun. Este gênero foi altamente representativo nas amostras salivares, semelhante a gêneros como *Escherichia*, *Acinetobacter*, *Streptococcus* e *Shigella* (Figura 3). O potencial patogênico desse gênero já foi relatado (Crémet et al, 2009; Tran et al, 2020).

No entanto, seu papel no microbioma oral ainda é desconhecido.

De acordo com a literatura (Jovel et al, 2016; Laudadio et al, 2018), o PCA identificou o maior número de gêneros representativos em sequenciamentos realizados por Shotgun do que por Amplicon (Figura 3). As diferenças entre as abordagens podem explicar os resultados. Em Shotgun o DNA de todos os organismos da amostra é extraído e sequenciado diretamente. Por outro lado, no sequenciamento por Amplicon, apenas os fragmentos de DNA que foram alinhados ao primer serão sequenciados. A escolha do primer parece ser um fator crucial para evitar vieses na análise taxonômica (Rintala et al, 2017).

Os resultados de Tessler et al (2017) foram diferentes dos nossos. O sequenciamento do Amplicon teve um desempenho melhor do que observado por Shotgun para identificação taxonômica em níveis de filo e família em amostras de água doce.

A especificidade dos *primers* pode restringir o conjunto de microrganismos encontrados em estudos de sequenciamento por Amplicon (Clarridge, 2004). Assim, a escolha do método de sequenciamento bem como a seleção dos *primers* são características importantes a serem consideradas na análise de estudos de microbioma (Clarridge, 2004).

Estudos de microbioma comparando os dois métodos de sequenciamento para as mesmas amostras sugerem que seus resultados podem ser comparáveis. Neste estudo, observamos que os dados produzidos por Shotgun, de amostras salivares disponíveis na plataforma MG-RAST, podem fornecer a identificação de um maior número de gêneros, evidenciando a complexidade do microbioma oral, seja pela diversidade de gêneros ou pelo papel que eles podem desempenhar no microbioma salivar (Rintala et al, 2017).

Na comparação entre nossos resultados e os dados do projeto eHOMD, foi possível identificar 20 gêneros (Figura 5) que são compartilhados por todos os projetos armazenados no MG-RAST e eHOMD, podendo ser considerados o *core* principal do microbioma salivar humano, independente da condição de saúde do hospedeiro (Tabela 3). Nessa lista, podemos

encontrar gêneros já descritos na literatura, por exemplo *Lactobacillus*, *Streptococcus* (Yoshizawa et al, 2013) e *Rothia* (Vieira et al, 2019) envolvidos na doença cárie. Bem como, *Prevotella* cujos estudos apontam para uma relação com a doença periodontal (Yamashita e Takeshita, 2017). Estudos mais recentes descrevem o papel desempenhado por bactérias como *Micrococcus* com atividade de lisozima (Gennari et al, 2019), *Ralstonia* associada ao Transtorno do Espectro Autístico (Ragusa et al, 2020) e *Acinetobacter*, relacionada ao carcinoma de células escamosas oral (Zhang et al, 2019a). Outras bactérias listadas neste *core* ainda requerem mais estudos para a melhor compreensão de suas relações no microbioma oral.

Esse resultado deve ser interpretado com cautela, pois apenas a presença dos gêneros não determina a condição do hospedeiro. A abundância e a relação entre os gêneros, pertencentes ou não ao núcleo, têm papel relevante na associação da microbiota salivar com a condição do hospedeiro (Dewhirst et al, 2010).

## **Conclusões**

Este estudo demonstrou que na microbiota representativa da saliva humana foram identificados gêneros de bactérias patogênicas observadas em doenças bucais, mas não se limitam a elas.

O núcleo do microbioma salivar e a diversidade de gêneros dependem das abordagens de sequenciamento. Os dados disponíveis sugerem que Shotgun e Amplicon têm sensibilidades semelhantes para detectar o nível taxonômico investigado, embora Shotgun permita uma análise mais profunda da diversidade de microorganismos.

A escolha das abordagens metagenômicas deve considerar suas características e limitações. Shotgun pode fornecer uma grande contribuição para o conhecimento da composição da microbiota salivar, para a identificação de marcadores para diagnóstico e para a identificação de perfis capazes de definir condições de saúde ou doença. Por outro lado, Amplicon pode ser uma escolha eficiente e de baixo custo em estudos nos quais o microrganismo de interesse já seja conhecido. Também pode ser usado para verificação posterior dos resultados obtidos por Shotgun.

## **Abreviações**

NGS: Sequenciamento de nova geração.

PCR: reação em cadeia da polimerase. PCA: Análise de Componentes Principais.

eHOMD: banco de dados expandido do microbioma oral humano.

## **Aprovação ética e consentimento para participar**

Não aplicável.

## **Consentimento para publicação**

Não aplicável.

**Disponibilidade de dados e materiais**

Os dados foram depositados no Mendeley Data (doi: 10.17632 / 3rjg73wc6f.1).

**Interesses competitivos**

Os autores declaram não ter interesses conflitantes.

**Financiamento**

Não aplicável.

**Contribuições do autor**

SGO: estudo de planejamento, desenho experimental, trabalho experimental, pesquisa de literatura, análise de dados, preparação do manuscrito, edição do manuscrito. RRN: trabalho experimental, análise de dados. CACT: trabalho experimental. ALMG: preparação do manuscrito, revisão do manuscrito. AMRD: preparação do manuscrito, revisão do manuscrito. RJ: estudo de planejamento, desenho experimental, trabalho experimental, pesquisa bibliográfica, análise de dados, preparação do manuscrito, edição do manuscrito. FHBA: preparação do manuscrito, revisão do manuscrito.

**Reconhecimentos**

Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas e Fundação Oswaldo Cruz.

**Detalhes do autor**

1 Departamento de Odontologia Restauradora, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Av. Limeira, 901, Piracicaba, Brasil. 2 Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Boulevard 28 de setembro, 157, Rio de Janeiro, Brasil. 3 Laboratório de Difteria e Corinebactéria de Relevância Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Boulevard 28 de setembro, 77, Rio de Janeiro, Brasil. 4 Laboratório de Biologia Computacional e de Sistemas, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, Rio de Janeiro, Brasil.

## Referências

- Belstrøm D (2020) The salivary microbiota in health and disease. *Journal of Oral Microbiology* 12(1).
- Belstrøm D, Holmstrup P, Fiehn NE, Kirkby N, Kokaras A, Paster BJ, Bardow A (2017) Salivary microbiota in individuals with different levels of caries experience. *Journal of Oral Microbiology* 9(1):1–8.
- Caselli E, Fabbri C, D'Accolti M, Soffritti I, Bassi C, Mazzacane S, Franchi M (2020) Defining the oral microbiome by whole-genome sequencing and resistome analysis: The complexity of the healthy picture. *BMC Microbiology* 20(1):1–19.
- Clarridge JE (2004) Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews* 17(4):840–862.
- Cortela DC, Souza Junior AL, Virmond MC, Ignotti E (2015) Inflammatory mediators of leprosy reactional episodes and dental infections: A systematic review. *Mediators of Inflammation* 2015.
- Crémet L, Bemer P, Zambon O, Reynaud A, Caroff N, Corvec S (2009) Chitinophaga terrae bacteremia in human. *Emerg Infect Dis* 15(7):1134–5
- Dafar A, Bankvall M, Cevik-Aras H, Jontell M, Sjöberg F (2017) Lingual microbiota profiles of patients with geographic tongue. *Journal of Oral Microbiology* 9(1):1355,206.
- Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, Lakshmanan A, Wade WG (2010) The human oral microbiome. *Journal of Bacteriology* 192(19):5002–5017.
- Esberg A, Barone A, Eriksson L, Lif Holgerson P, Teneberg S, Johansson I (2020) Corynebacterium matruchotii Demography and Adhesion Determinants in the Oral Cavity of Healthy Individuals. *Microorganisms* 8(11).
- Escapa IF, Chen T, Huang Y, Gajare P, Dewhirst FE, Lemon KP (2018) New insights into human nostril microbiome from the expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD): A resource for the microbiome of the human aerodigestive tract. *bioRxiv* (December):1–20.
- Fini MB (2020) Oral Saliva and COVID-19. *Oral Oncology* 108:104,821.
- Fróes AM, da Mota FF, Cuadrat RR, D'ávila AM (2016) Distribution and classification of serine βlactamases in Brazilian hospital sewage and other environmental metagenomes deposited in public databases. *Frontiers in Microbiology* 7(NOV):1–15.
- Gao X, Jiang S, Koh D, Hsu CYS (2016) Salivary biomarkers for dental caries. *Periodontol* 2000 70(1):12841.
- Gennari CG, Sperandeo P, Polissi A, Minghetti P, Cilurzo F (2019) Lysozyme Mucoadhesive Tablets Obtained by Freeze-Drying. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 108(11):3667–3674.
- Guerrero-Preston R, Godoy-Vitorino F, Jedlicka A, Rodriguez-Hilario A, Gonzalez H, Bondy J, Lawson F, Folawiyo O, Michailidi C, Dziedzic A, Thangavel R, Hadar T, Noordhuis MG, Westra W, Koch W, Sidransky D (2016) 16s rRNA amplicon sequencing identifies microbiota associated with oral cancer, human papilloma virus infection and surgical treatment. *Oncotarget* 7(32):51,320–51,334.
- Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. *Chemistry and Biology* 5(10).
- Jovel J, Patterson J, Wang W, Hotte N, O'Keefe S, Mitchel T, Perry T, Kao D, Mason AL, Madsen KL, Wong GK (2016) Characterization of the gut microbiome using 16S or shotgun metagenomics. *Frontiers in Microbiology* 7(APR):1–17.
- Kakabadze MZ, Paresishvili T, Karalashvili L, Chakhunashvili D, Kakabadze Z (2020) Oral microbiota and oral cancer: Review. *Oncology Reviews* 14(2).
- Laudadio I, Fulci V, Palone F, Stronati L, Cucchiara S, Carissimi C (2018) Quantitative Assessment of Shotgun Metagenomics and 16S rDNA Amplicon Sequencing in the Study of Human Gut Microbiome. *OMICS A Journal of Integrative Biology* 22(4):248–254.
- Leinonen R, Sugawara H, Shumway M (2011) The sequence read archive. *Nucleic Acids Research* 39(SUPPL. 1):2010–2012.
- Mardis ER (2008) Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 9:387–402.
- de Melo F, Milanesi FC, Angst PDM, Oppermann RV (2020) A systematic review of the microbiota composition in various peri-implant conditions: data from 16S rRNA gene sequencing. *Archives of Oral Biology* 117(January):104,776.
- Meyer F, Paarmann D, D'Souza M, Olson R, Glass EM, Kubal M, Paczian T, Rodriguez A, Stevens R, Wilke A, Wilkening J, Edwards RA (2008) The metagenomics RAST server - A public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* 9:1–8.

- Nibali L, Sousa V, Davrandi M, Spratt D, Alyahya Q, Dopico J, Donos N (2020) Differences in the periodontal microbiome of successfully treated and persistent aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 47(8):980–990.
- Nomura Y, Otsuka R, Hasegawa R, Hanada N (2020) Oral microbiome of children living in an isolated area in myanmar. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17(11):1–12.
- Ogle OE (2020) Salivary Gland Diseases. *Dental Clinics of North America* 64(1):87–104.
- Papapanou PN, Park H, Cheng B, Kokaras A, Paster B, Burkett S, Watson CWM, Annavajhala MK, Uhlemann AC, Noble JM (2020) Subgingival microbiome and clinical periodontal status in an elderly cohort: The WHICAP ancillary study of oral health. *Journal of Periodontology* (March):1–12.
- Pereira CA, Toledo BC, Santos CT, Pereira Costa ACB, Back-Brito GN, Kaminagakura E, Jorge AOC (2013) Opportunistic microorganisms in individuals with lesions of denture stomatitis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 76(4):419–424.
- Ragusa M, Santagati M, Mirabella F, Lauretta G, Cirnigliaro M, Brex D, Barbagallo C, Domini CN, Gulisano M, Barone R, Trovato L, Oliveri S, Mongelli G, Spitale A, Barbagallo D, Di Pietro C, Stefani S, Rizzo R, Purrello M (2020) Potential associations among alteration of salivary mirnas, saliva microbiome structure, and cognitive impairments in autistic children. *International Journal of Molecular Sciences* 21(17):1–24.
- Ratna Sudha M, Neelamraju J, Surendra Reddy M, Kumar M (2020) Evaluation of the Effect of Probiotic *Bacillus coagulans* Unique IS2 on Mutans Streptococci and Lactobacilli Levels in Saliva and Plaque: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study in Children. *International Journal of Dentistry* 2020:8891,708.
- Rintala A, Pietilä S, Munukka E, Eerola E, Pursiheimo JP, Laiho A, Pekkala S, Huovinen P (2017) Gut microbiota analysis results are highly dependent on the 16s rRNA gene target region, whereas the impact of DNA extraction is minor. *Journal of Biomolecular Techniques* 28(1):19–30.
- Shade A, Handelsman J (2012) Beyond the Venn diagram: The hunt for a core microbiome. *Environmental Microbiology* 14(1):4–12.
- Sharma D, Sandhya P, Vellarikkal SK, Surin AK, Jayarajan R, Verma A, Kumar A, Ravi R, Danda D, Sivasubbu S, Scaria V (2020) Saliva microbiome in primary Sjögren's syndrome reveals distinct set of disease-associated microbes. *Oral Diseases* 26(2):295–301.
- Streckfus CF (2015) *Advances in salivary diagnostics*. University of Texas School. USA. Springer Heidelberg New York Dordrecht London. 213pp.
- Suárez Moya A (2017) Microbioma y secuenciación masiva. *Spanish Journal of Chemotherapy* 30(5):305–311.
- Sun X, Li M, Xia L, Fang Z, Yu S, Gao J, Feng Q, Yang P (2020) Alteration of salivary microbiome in periodontitis with or without type-2 diabetes mellitus and metformin treatment. *Scientific Reports* 10(1):1–14.
- Tanner ACR, Kressler CA, Rothmiller S, Johansson I, Chalmers NI (2018) The Caries Microbiome: Implications for Reversing Dysbiosis. *Review Adv Dent Res* 29(1):78–85.
- Tessler M, Neumann JS, Afshinnekoo E, Pineda M, Hersch R, Velho LFM, Segovia BT, Lansac-Toha FA, Lemke M, Desalle R, Mason CE, Brugler MR (2017) Large-scale differences in microbial biodiversity discovery between 16S amplicon and shotgun sequencing. *Scientific Reports* 7(1):1–14.
- Tierney BT, Yang Z, Luber JM, Beaudin M, Wibowo MC, Baek C, Mehlenbacher E, Patel CJ, Kostic AD (2019) The Landscape of Genetic Content in the Gut and Oral Human Microbiome. *Cell Host and Microbe* 26(2):283–295.e8.
- Tran TLQ, Anani H, Trinh HT, Pham TPT, Dang VK, Ho VM, Bui NHL, Nguyen NH, Raoult D, Trinh TT, Fournier PE (2020) *Chitinophaga vietnamensis* sp. Nov., a multi-drug resistant bacterium infecting humans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70(3):1758–1768.
- Ugland KI, Gray JS (1982) Lognormal Distributions and the Concept of Community Equilibrium Author (s): Karl I . Ugland and John S . Gray Published by : Wiley on behalf of Nordic Society Oikos Stable. *Nordic Society Oikos* 39(2):171–178.
- Vieira AR, Hiller NL, Powell E, Kim LHJ, Spirk T, Modesto A, Kreft R (2019) Profiling microorganisms in whole saliva of children with and without dental caries. *Clinical and Experimental Dental Research* 5(4):438–446.
- Wade WG (2013) The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological Research* 69(1):137–143

- Wang S, Yan Z, Wang P, Zheng X, Fan J (2020) Comparative metagenomics reveals the microbial diversity and metabolic potentials in the sediments and surrounding seawaters of Qinhuangdao mariculture area. *PLoS ONE* 15(6):1–16.
- Willmann C, Mata X, Hanghoej K, Tonasso L, Tisseyre L, Jeziorski C, Cabot E, Chevet P, Crubézy E, Orlando L, Esclassan R, Thèves C (2018) Oral health status in historic population: Macroscopic and metagenomic evidence. *PLoS ONE* 13(5):1–18.
- Yamashita Y, Takeshita T (2017) The oral microbiome and human health. *Journal of Oral Science* 59(2):201–206, Yoshizawa JM, Schafer CA, Schafer JJ, Farrell JJ, Paster BJ, Wong DT (2013) Salivary biomarkers: Toward future clinical and diagnostic utilities. *Clinical Microbiology Reviews* 26(4):781–791.
- Yu FY, Wang QQ, Li M, Cheng YH, Cheng YSL, Zhou Y, Yang X, Zhang F, Ge X, Zhao B, Ren XY (2020) Dysbiosis of saliva microbiome in patients with oral lichen planus. *BMC Microbiology* 20(1):75.
- Zhang W, Luo J, Dong X, Zhao S, Hao Y, Peng C, Shi H, Zhou Y, Shan L, Sun Q, Li Y, Zhao X (2019a) Salivary microbial dysbiosis is associated with systemic inflammatory markers and predicted oral metabolites in non-small cell lung cancer patients. *Journal of Cancer* 10(7):1651–1662.
- Zhang X, Zhang D, Jia H, Feng Q, Wang D, Liang D, Wu X, Li J, Tang L, Li Y, Lan Z, Chen B, Li Y, Zhong H, Xie H, Jie Z, Chen W, Tang S, Xu X, Wang X, Cai X, Liu S, Xia Y, Li J, Qiao X, Al-Aama JY, Chen H, Wang L, Wu QJ, Zhang F, Zheng W, Li Y, Zhang M, Luo G, Xue W, Xiao L, Li J, Chen W, Xu X, Yin Y, Yang H, Wang J, Kristiansen K, Liu L, Li T, Huang Q, Li Y, Wang J (2015) The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nature Medicine* 21(8):895–905.
- Zhang Z, Yang J, Feng Q, Chen B, Li M, Liang C, Li M, Li Z, Xu Q, Zhang L, Chen W (2019b) Compositional and functional analysis of the microbiome in tissue and saliva of oral squamous cell carcinoma. *Frontiers in Microbiology* 10(JUN):1–11.

## Tabelas

Arquivos Adicionais

Arquivo adicional 1 - S1 - Core do Microbioma entre Shotgun e Amplicon

Arquivo texto com a lista de gêneros do core do microbioma de Shotgun e de Amplicon.

Arquivo adicional 2 - S2 - Core do Microbioma entre Shotgun, Amplicon e eHOMD

Arquivo texto com a lista de gêneros pertencentes ao core do microbioma entre Shotgun, Amplicon e dados do eHOMD.

## FIGURAS

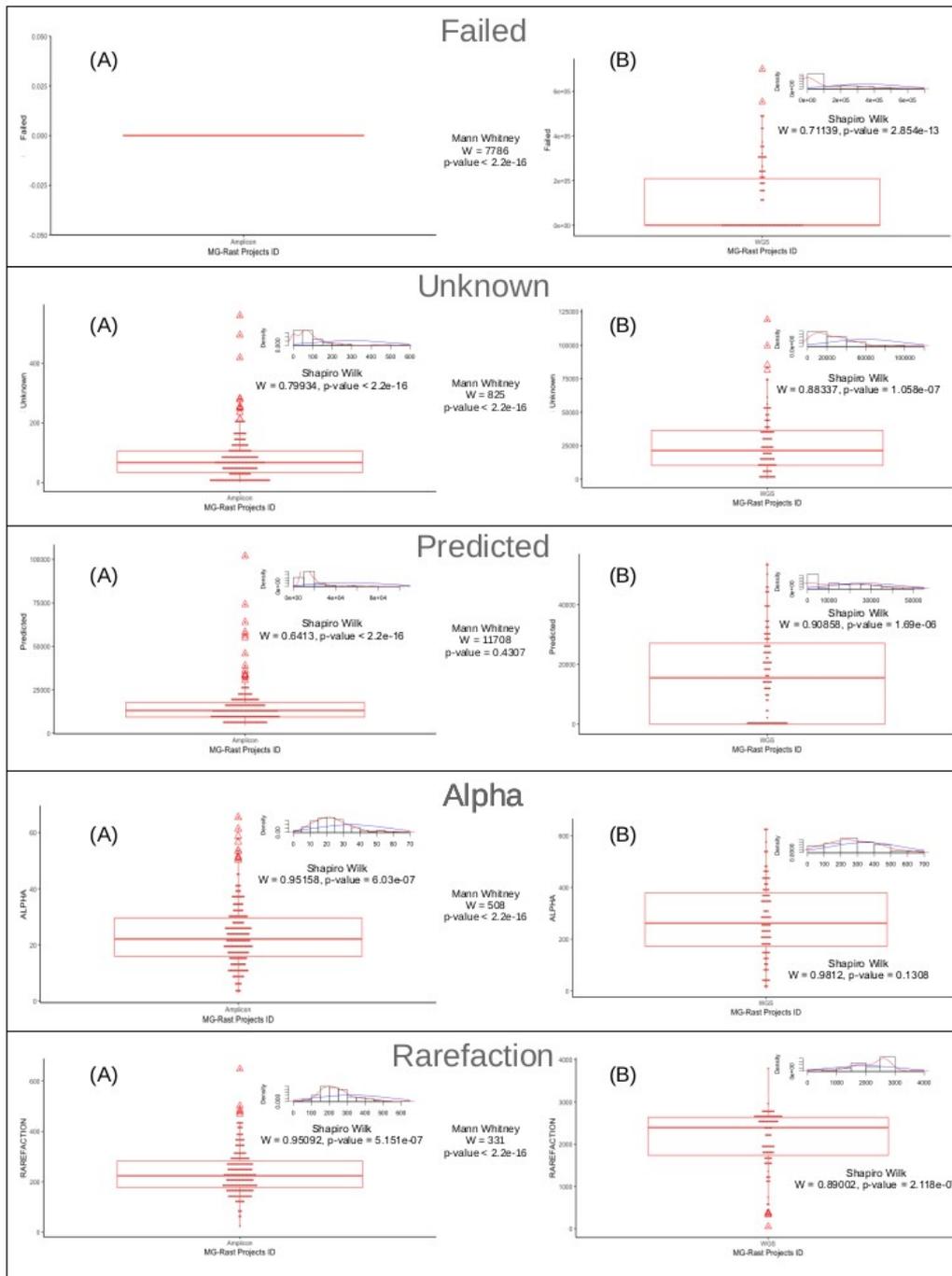


Figura 1: Análise descritiva. O Boxplot mostra a distribuição dos dados das variáveis *Failed*, *Unknown*, *Predicted*, *Alpha* e *Rarefaction*, comparando as abordagens de sequenciamento de (A) Amplicon e (B) Shotgun. A análise de normalidade foi realizada pelo teste Shapiro Wilk. O teste U de Mann-Whitney avaliou as diferenças das variáveis entre as abordagens de sequenciamento. Todas as variáveis apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o Amplicon e Shotgun, exceto *Predicted*. Observe que *Failed* não apresentou nenhum dado em Amplicon.

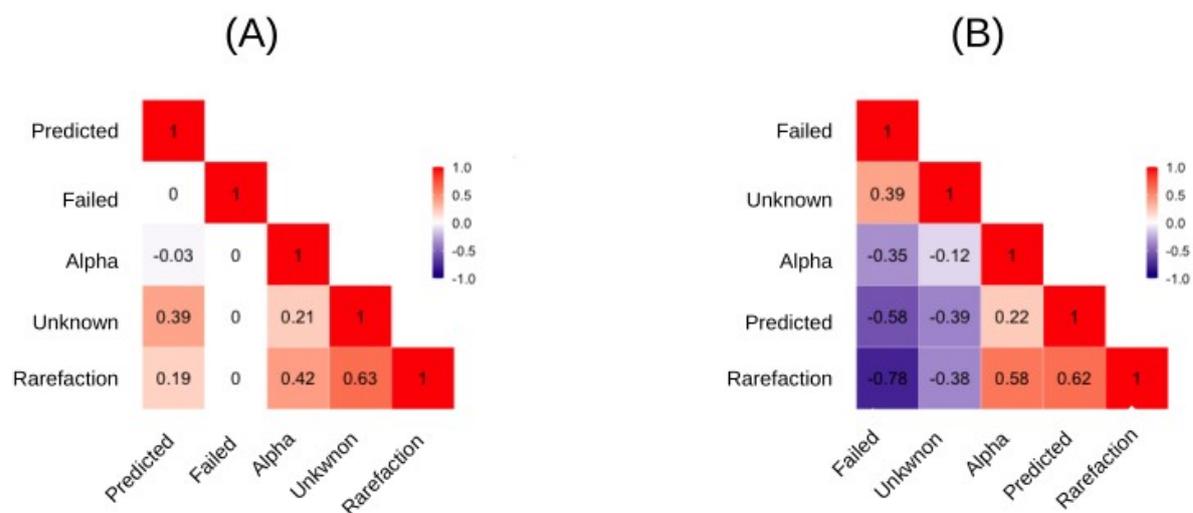


Figura 2: Análise de correlação. O teste de Spearman avaliou as associações entre as variáveis *Failed*, *Unknown*, *Predicted*, *Alpha* e *Rarefaction* de (A) Amplicon e (B) Shotgun. Todas as associações foram positivas em Amplicon. Em Shotgun, *Failed* e *Unknown* tiveram associação negativa com *Predicted*, *Alpha* e *Rarefaction*.



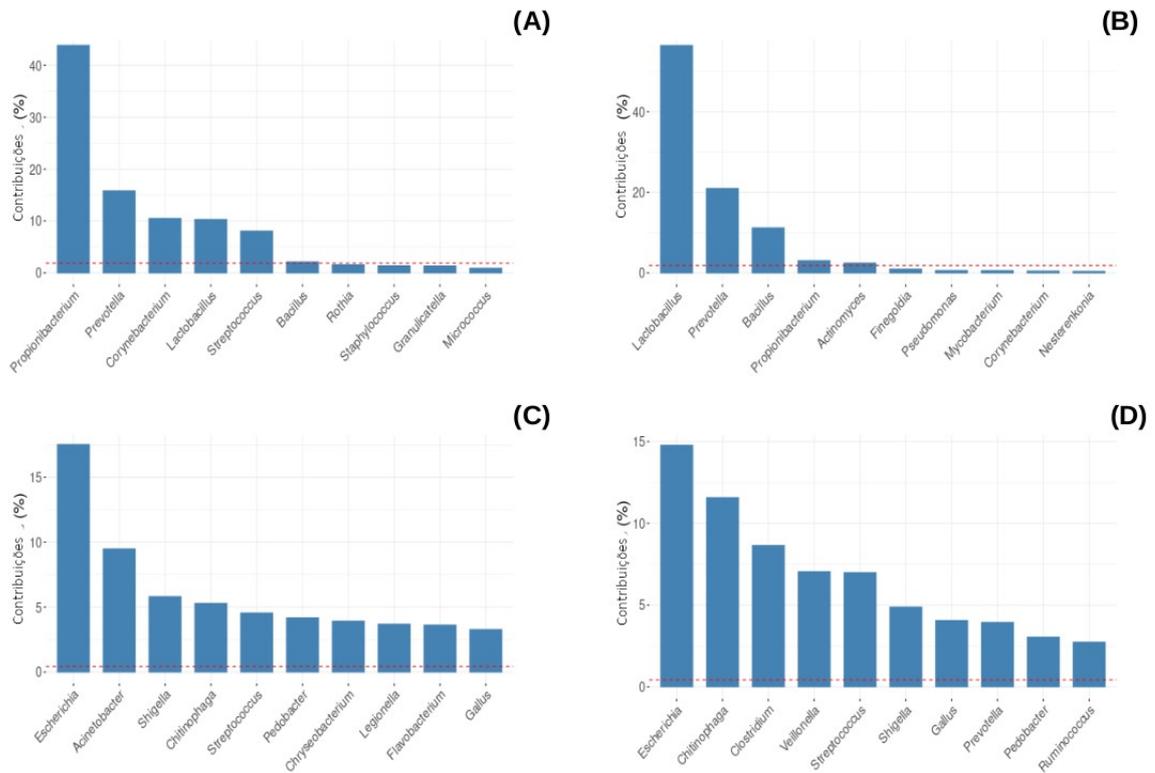


Figura 4: AS 10 principais bactérias o microbioma salivar humano obtido por Amplicon e Shotgun. Contribuição dos principais gêneros nas dimensões 1 e 2 da Análise de Componentes Principais (PCA) de Amplicon e Shotgun. Sequenciamento do Amplicon: (A) dimensão 1 e (B) dimensão 2. Shotgun: (C) dimensão 1 e (D) dimensão 2.

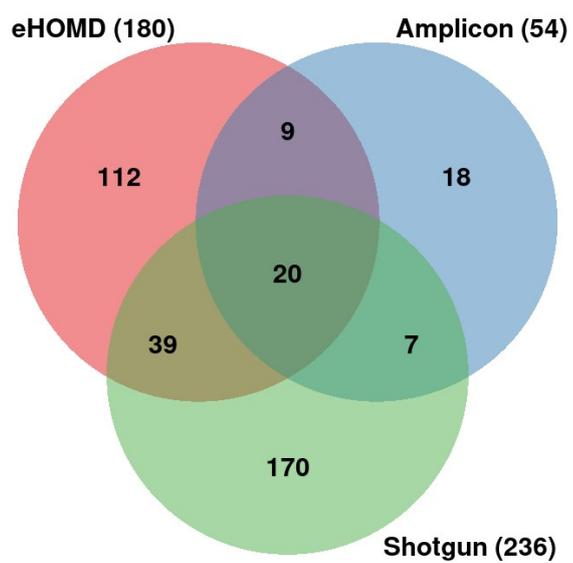


Figura 5: Cores dos microbiomas salivares. Diagrama de Venn mostrando cores de microbiomas compartilhados entre Amplicon, Shotgun e eHOMD.

### 3 CONCLUSÃO

O núcleo do microbioma oral humano é constituído por gêneros de bactérias associados a doenças bucais, como a cárie e a periodontite. Mas também por gêneros com grande representatividade nas amostras estudadas, recentemente descobertos e capazes de desenvolver problemas de saúde. No entanto, pouco se conhece sobre seu papel no ambiente oral. O tipo de abordagem de sequenciamento influenciou a diversidade da microbiota salivar humana identificada. Shotgun apresentou maior diversidade e dados mais confiáveis quando comparado à Amplicon. As duas abordagens apresentaram sensibilidade similares para a detecção de bactérias no nível taxômico de gênero. A escolha da abordagem de sequenciamento deve considerar as características e limitações de cada método. Sequenciamentos por Amplicon são indicados para investigações de microrganismos já conhecidos enquanto, que Shotgun permite uma avaliação mais ampla da composição da microbiota.

**REFERÊNCIAS\***

- Belstrøm D, Holmstrup P, Fiehn NE, Kirkby N, Kokaras A, Paster BJ, et al. Salivary microbiota in individuals with different levels of caries experience. *J Oral Microbiol.* 2017 Jan;9(1):1270614. doi: 10.1080/20002297.2016.1270614.
- Blum HE. The human microbiome. *Adv Med Sci.* 2017 Sep;62(2):414-20. doi: 10.1016/j.advms.2017.04.005.
- Boers SA, Jansen R, Hays JP. Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019 Jun;38(6):1059-70. doi: 10.1007/s10096-019-03520-3.
- Buzalaf MAR, Ortiz AC, Carvalho TS, Fideles SOM, Araújo TT, Moraes SM, et al. Saliva as a diagnostic tool for dental caries, periodontal disease and cancer: is there a need for more biomarkers? *Expert Rev Mol Diagn.* 2020 May;20(5):543-55. doi: 10.1080/14737159.2020.1743686.
- Caselli E, Fabbri C, D'Accolti M, Soffritti I, Bassi C, Mazzacane S, et al. Defining the oral microbiome by whole-genome sequencing and resistome analysis: the complexity of the healthy picture. *BMC Microbiol.* 2020 May;20(1):120. doi: 10.1186/s12866-020-01801-y.
- Chen H, Jiang W. Application of high-throughput sequencing in understanding human oral microbiome related with health and disease. *Front Microbiol.* 2014 Oct;5:508. doi: 10.3389/fmicb.2014.00508.
- David LA, Materna AC, Friedman J, Campos-Baptista MI, Blackburn MC, Perrotta A, et al. Host lifestyle affects human microbiota on daily timescales. *Genome Biol.* 2014;15(7):R89. doi: 10.1186/gb-2014-15-7-r89.
- Dawes C, Wong DTW. Role of Saliva and Salivary Diagnostics in the Advancement of Oral Health. *J Dent Res.* 2019 Feb;98(2):133-41. doi: 10.1177/0022034518816961.
- Fakhruddin KS, Ngo HC, Samaranayake LP. Cariogenic microbiome and microbiota of the early primary dentition: A contemporary overview. *Oral Dis.* 2019 May;25(4):982-95. doi: 10.1111/odi.12932.
- Gupta S, Mortensen MS, Schjørring S, Trivedi U, Vestergaard G, Stokholm J, et al. Amplicon sequencing provides more accurate microbiome information in healthy children compared to culturing. *Commun Biol.* 2019 Aug 5;2:291. doi: 10.1038/s42003-019-0540-1.
- Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012 Jun;486(7402):207-14. doi: 10.1038/nature11234.
- Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T, et al. GBD 2015 Oral Health Collaborators. Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990-2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. *J Dent Res.* 2017 Apr;96(4):380-7. doi: 10.1177/0022034517693566.

---

\* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

- Kilian M, Chapple IL, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AM, et al. The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. *Br Dent J*. 2016 Nov;221(10):657-66. doi: 10.1038/sj.bdj.2016.865.
- Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2018 Dec;16(12):745-59. doi: 10.1038/s41579-018-0089-x.
- Lederberg J. *Of Men and Microbes*. *New Perspect Q*. 2004 Nov;21(4):92-6. doi: 10.1111/j.1540-5842.2004.00705.x.
- Liu G, Wu C, Abrams WR, Li Y. Structural and Functional Characteristics of the Microbiome in Deep-Dentin Caries. *J Dent Res*. 2020 Jun;99(6):713-20. doi: 10.1177/0022034520913248.
- Lundmark A, Hu YOO, Huss M, Johannsen G, Andersson AF, Yucel-Lindberg T. Identification of Salivary Microbiota and Its Association With Host Inflammatory Mediators in Periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019 Jun;9:216. doi: 10.3389/fcimb.2019.00216.
- Meyer F, Paarmann D, D'Souza M, Olson R, Glass EM, Kubal M, et al. The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics*. 2008 Sep;9:386. doi: 10.1186/1471-2105-9-386.
- Nibali L, Sousa V, Davrandi M, Spratt D, Alyahya Q, Dopico J, et al. Differences in the periodontal microbiome of successfully treated and persistent aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2020 Aug;47(8):980-90. doi: 10.1111/jcpe.13330.
- Noguera-Julian M, Guillén Y, Peterson J, Reznik D, Harris EV, Joseph SJ, et al. Oral microbiome in HIV-associated periodontitis. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Mar;96(12):e5821. doi: 10.1097/MD.0000000000005821.
- Nomura Y, Otsuka R, Hasegawa R, Hanada N. Oral Microbiome of Children Living in an Isolated Area in Myanmar. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Jun;17(11):4033. doi: 10.3390/ijerph17114033.
- Paczian T, Trimble WL, Gerlach W, Harrison T, Wilke A, Meyer F. The MG-RAST API explorer: an on-ramp for RESTful query composition. *BMC Bioinformatics*. 2019 Nov;20(1):561. doi: 10.1186/s12859-019-2993-0.
- Papagerakis P, Zheng L, Kim D, Said R, Ehlert AA, Chung KKM, et al. Saliva and Gingival Crevicular Fluid (GCF) Collection for Biomarker Screening. *Methods Mol Biol*. 2019;1922:549-62. doi: 10.1007/978-1-4939-9012-2\_41.
- Peres MA, Macpherson LMD, Weyant RJ, Daly B, Venturelli R, Mathur MR, et al. Oral diseases: a global public health challenge. *Lancet*. 2019 Jul;394(10194):249-60. doi: 10.1016/S0140-6736(19)31146-8.
- Rasiah IA, Wong L, Anderson SA, Sissons CH. Variation in bacterial DGGE patterns from human saliva: over time, between individuals and in corresponding dental plaque microcosms. *Arch Oral Biol*. 2005 Sep;50(9):779-87. doi: 10.1016/j.archoralbio.2005.02.001.
- Roberts FA, Darveau RP. Microbial protection and virulence in periodontal tissue as a function of polymicrobial communities: symbiosis and dysbiosis. *Periodontol 2000*. 2015 Oct;69(1):18-27. doi: 10.1111/prd.12087.

Rosier BT, Marsh PD, Mira A. Resilience of the Oral Microbiota in Health: Mechanisms That Prevent Dysbiosis. *J Dent Res*. 2018 Apr;97(4):371-80. doi: 10.1177/0022034517742139.

Sanz M, Beighton D, Curtis MA, Cury JA, Dige I, Dommisch H, et al. Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2017 Mar;44 Suppl 18:S5-S11. doi: 10.1111/jcpe.12682.

Spielmann N, Wong DT. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Dis*. 2011 May;17(4):345-54. doi: 10.1111/j.1601-0825.2010.01773.x.

Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res*. 2011 Mar;90(3):294-303. doi: 10.1177/0022034510379602.

Tanner ACR, Kressler CA, Rothmiller S, Johansson I, Chalmers NI. The Caries Microbiome: Implications for Reversing Dysbiosis. *Adv Dent Res*. 2018 Feb;29(1):78-85. doi: 10.1177/0022034517736496.

Tonetti MS, Bottenberg P, Conrads G, Eickholz P, Heasman P, Huysmans MC, et al. Dental caries and periodontal diseases in the ageing population: call to action to protect and enhance oral health and well-being as an essential component of healthy ageing - Consensus report of group 4 of the joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 2017 Mar;44 Suppl 18:S135-44. doi: 10.1111/jcpe.12681.

Vincent AT, Derome N, Boyle B, Culley AI, Charette SJ. Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money. *J Microbiol Methods*. 2017 Jul;138:60-71. doi: 10.1016/j.mimet.2016.02.016.

Willmann C, Mata X, Hanghoej K, Tonasso L, Tisseyre L, Jeziorski C, et al. Oral health status in historic population: Macroscopic and metagenomic evidence. *PLoS One*. 2018 May;13(5):e0196482. doi: 10.1371/journal.pone.0196482.

**ANEXOS****Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio**

# TCC RN

de Rafaela Nishiyama

---

**Data de envio:** 14-mai-2021 09:46AM (UTC-0300)

**Identificação do Envio:** 1585950344

**Nome do arquivo:** TCC\_Rafaela\_Rie\_Nishiyama\_2021-05-12\_FINALIZADO\_COM\_FICHA.pdf (1.48M)

**Contagem de palavras:** 9871

**Contagem de caracteres:** 55306

## TCC RN

## RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

**6%**  
ÍNDICE DE  
SEMELHANÇA

**6%**  
FONTES DA INTERNET

**6%**  
PUBLICAÇÕES

**%**  
DOCUMENTOS DOS  
ALUNOS

## FONTES PRIMÁRIAS

<b>1</b>	<b>peerj.com</b> Fonte da Internet	<b>3%</b>
<b>2</b>	<b>www.rj-robbins.com</b> Fonte da Internet	<b>1%</b>
<b>3</b>	<b>www.mdpi.com</b> Fonte da Internet	<b>1%</b>
<b>4</b>	<b>link.springer.com</b> Fonte da Internet	<b>1%</b>
<b>5</b>	<b>Tomás G. Villa, Ángeles Sánchez-Pérez, Carmen Sieiro. "Oral lichen planus: a microbiologist point of view", International Microbiology, 2021</b> Publicação	<b>1%</b>

Excluir citações

Desligado

Excluir

&lt; 1%

Excluir bibliografia

Em

correspondências

## Anexo 2 – Comitê de Ética em Pesquisa



OF. CEP/FOP N.º 03/2021

Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
UNICAMP

Piracicaba, 08 de Abril de 2021.

**Ilma. Rafaela Rie Nishiyama**  
Graduanda no Curso de Odontologia,  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba, FOP/UNICAMP

Prezada Rafaela,

Após analisar a documentação apresentada ao CEP-FOP, com respeito ao Projeto de Pesquisa para o PIBIC-UNICAMP intitulado “**Estudos da diversidade de microbiomas orais e sua associação a problemas de saúde bucal**”, dos pesquisadores **Rafaela Rie Nishiyama** (Graduanda no Curso de Odontologia da FOP/UNICAMP, Orientanda), **Simone Gomes de Oliveira** (Doutoranda do PPG em Clínica Odontológica da FOP/UNICAMP, Co-orientadora) e **Flávio Henrique Baggio Aguiar** (Docente do Departamento de Odontologia Restauradora da FOP/UNICAMP, Orientador), informo que **este projeto não necessita**, em princípio e de acordo com as informações oferecidas no material encaminhado, **ser submetido à apreciação, por meio da Plataforma Brasil, por um Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos no Brasil.**

As informações enviadas em um e-mail de 08/04/2021 e em um arquivo anexo (“PROJETO\_ICFOP\_2019\_Simone\_microbiomas\_orais\_Rafaela\_Rie.pdf”) indicam que a pesquisa será realizada a partir de base de metadados depositados em um banco de dados de domínio público, o MG-RAST (Metagenomic Rapid Annotations using Subsystems Technology).

Esclareço que as informações fornecidas sobre este projeto serão arquivadas pelo CEP-FOP-UNICAMP por cinco anos. Colocamo-nos à disposição para qualquer informação adicional que julgar necessária.

Cordialmente,

**Prof. Jacks Jorge Junior**  
Coordenador

## Anexo 3 – Iniciação Científica

Programa Institucional de Bolsas de  
Iniciação Científica e Tecnológica  
da UNICAMP



IC - Área do Docente [quota: 2019]

Início
Alterar quota
Termo de Compromisso
Relatório <
Alterar Senha
Sair

### Relatório Final

#### Estudo da diversidade de microbiomas orais e sua associação a problemas de saúde bucal

**Versão enviada em 30/09/2020 18:15:16** [ver relatório](#)

- **Parecer do orientador emitido em 30/11/2020 21:30:37**  
Desempenho do aluno no projeto: A aluna Rafaela se mostrou dedicada e comprometida com o projeto, que apresenta alta complexidade. O projeto esteve classificado entre os 30 melhores trabalhos do PIBIC, com apresentação agendada para dia 01/12.  
Desempenho acadêmico do aluno: A aluna apresenta excelente desempenho acadêmico.
- **Parecer do Assessor dado em 29/01/2021 21:32:42**  
Relatório bem estruturado e escrito.

**● Aprovado**

## Anexo 4 – Comprovante de submissão do Artigo

Firefox https://outlook.office.com/mail/inbox

**Your partial submission to BMC Oral Health**

BMC Oral Health <bmcoralhealth@biomedcentral.com>  
Fri 1/29/2021 7:58 PM  
To: Rodrigo Jardim Monteiro da Fonseca <rodrigo.jardim@fiocruz.br>  
Ref: Submission ID 7777fbe7-359e-40a3-a0cd-73599e700a98

Dear Dr Jardim,

Thank you for your recent submission to BMC Oral Health, which you began on 29 January 2021 UTC. Please note that this submission is not yet complete.

To complete your submission, please log into the system using the following link and follow the instructions.

<https://submission.nature.com/submission/7777fbe7-359e-40a3-a0cd-73599e700a98>

IMPORTANT: before completing your submission please check and ensure that your manuscript is formatted according to the submission guidelines (<https://bmcoralhealth.biomedcentral.com/submission-guidelines>), and adheres to relevant editorial and publishing policies.

All manuscripts are subject to an Initial Quality Check. Failure to adhere to our submission policies will result in the manuscript being returned to you before being sent to an Editorial Board Member.

Common reasons for a manuscript to fail the Initial Quality Check include:

- Contributing author details not added to the online submission system
- Papers reporting experiments on live vertebrates and/or higher invertebrates missing statements of approval, accordance and (for human subjects) informed consent
- Lack of appropriate permission and/or credit for reproduced images

Please note a recent change to our competing interests policy: specifically, the definition of 'competing interests' has broadened to include financial AND non-financial interests (details and guidelines at <https://www.biomedcentral.com/getpublished/editorial-policies#competing-interests>). When submitting your revised paper, please can you ensure this statement refers to 'competing interests' and, if applicable, also list any non-financial competing interests as outlined in our editorial policies? Please note that the Competing Interests statement on the system must match the Competing Interests statement provided in the article file.

Please contact us if you have any questions or require any assistance.

Kind regards,

Peer Review Advisors  
BMC Oral Health

**\*\*Our flexible approach during the COVID-19 pandemic\*\***

If you need more time at any stage of the peer-review process, please do let us know. While our systems will continue to remind you of the original timelines, we aim to be

1 of 2 5/5/21, 15:07

## Your submissions

### Track your submissions

**Core of the saliva microbiome: an analysis of the MG-RAST data**

Corresponding Author: Rodrigo Jardim

*BMC Oral Health*

7777f8e7-359e-40a3-a0cd-73599e700a98 | v1.2

**Editor appointed** 15 Apr 21

Don't forget, if you have manuscripts with other systems, such as eJournalPress or Editorial Manager, you will only be able to see those manuscripts there. Still have a question? [Contact us](#)

© 2021 Springer Nature.  
[About Springer Nature](#)

[Springer Nature](#)  
[Help and support](#)

[Cookie Settings](#)

[Give Feedback](#)

**Anexo 5 – Premiação por Mérito Científico no XXVIII Congresso de Iniciação Científica da UNICAMP**

