



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

JOÃO VITOR SAMOGIN

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DO BIOFILME
SUBGENGIVAL DE PACIENTES COM PERIODONTITE COM E
SEM DIABETES MELLITUS**

PIRACICABA

2022

JOÃO VITOR SAMOGIN

**EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DO BIOFILME
SUBGENGIVAL DE PACIENTES COM PERIODONTITE COM E
SEM DIABETES MELLITUS**

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: Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin

Coorientador: Hélvis Enri de Sousa Paz

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DO
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO APRESENTADO
PELO ALUNO JOÃO VITOR SAMOGIN E ORIENTADO PELO
PROF. DR. RENATO CORRÊA VIANA CASARIN.

PIRACICABA

2022

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

Sa46e Samogin, João Vitor, 2000-
Expressão gênica diferencial do biofilme subgengival de pacientes com
periodontite com e sem diabetes mellitus / João Vitor Samogin. – Piracicaba, SP :
[s.n.], 2022.

Orientador: Renato Corrêa Viana Casarin.

Coorientador: Hélvis Enri de Sousa Paz.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Doenças periodontais. 2. Diabetes mellitus. 3. Microbiologia. I. Casarin,
Renato Corrêa Viana, 1982-. II. Paz, Hélvis Enri de Sousa, 1995-. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações adicionais, complementares

Título em outro idioma: Differential gene expression of subgingival biofilm in patients with
periodontitis with and without diabetes mellitus

Palavras-chave em inglês:

Periodontal diseases

Diabetes mellitus

Microbiology

Área de concentração: Periodontia

Titulação: Cirurgião-Dentista

Data de entrega do trabalho definitivo: 30-11-2022

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à toda minha família, em especial aos meus pais Cláudio Aparecido Samogin e Rejane Alves de Souza Samogin, que sempre lutaram para me proporcionar um estudo de qualidade e me ensinaram a importância em contribuir com o mundo através do trabalho e do conhecimento.

Dedico também aos meus amigos Leonardo Bortoloso Fava, Lucas Gonçalves Durão, Samuell Cássio Galdino Rodrigues, Itaiuã Tezoto Ferreira, Matheus Santos de Siqueira, Lucas Dutra Rissato e minha dupla de atendimentos Maria Júlia Charamitara Supino, que me acompanharam durante todos os anos na faculdade, vivenciando ao meu lado os altos e baixos desta fase.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de bolsa PIBIC, processo nº 133713/2021-0.

Agradeço à Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do magnífico reitor Antônio José de Almeida Meirelles. Obrigado UNICAMP por contribuir tanto por um mundo mais justo, com ensino de qualidade a todos.

Agradeço à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do senhor diretor Prof. Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar. Obrigado FOP por todas as experiências, oportunidades, aprendizados e histórias que levarei eternamente comigo.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin e ao meu coorientador Helvis Enri de Sousa Paz pelos seus conhecimentos a mim transmitidos, pelas oportunidades de aprendizado que me foram disponibilizadas, pela dedicação e paciência. Obrigado também por me iniciarem na pesquisa científica e me apresentarem uma visão tão incrível do que é a periodontia.

Agradeço também aos alunos de pós-graduação do Departamento de Prótese e Periodontia, da Área de Periodontia, Bruno Cazotti Pereira, Letícia Sandoli Arroiteia, Camila Schimdt Stolf e Thais Flügel Mathias Paschoal pela forma que contribuíram para o meu desenvolvimento durante a graduação.

Agradeço imensamente minha família, principalmente meus pais Cláudio Aparecido Samogin e Rejane Alves de Souza Samogin e minha irmã Maitê Cristina Samogin. Agradeço também aos meus avós paternos, Laércio e Maria Odete, e maternos, Maria e José, que foram responsáveis por me ensinarem os melhores valores da vida e servirem como exemplo de caráter e respeito. Obrigado por todos os esforços que me permitiram trilhar esse caminho no qual me esforcei e continuarei me esforçando para orgulhá-los cada dia mais.

Agradeço com todo meu coração aos meus amigos de turma e de toda a faculdade que me acompanharam nesse processo de formação, em especial aos outros moradores da minha República 30 e da República Breja Eu. Me sinto uma pessoa de muita sorte por poder dividir esta fase da minha vida com pessoas tão especiais e únicas, tanto nos momentos de alegria, quanto nos de dificuldade. Meus amigos foram grandes responsáveis pelo imenso carinho que desenvolvi por essa fase que estou encerrando e por meu crescimento pessoal e profissional, além de terem se tornado a família que escolhi em Piracicaba. De agora em diante seguimos nossos caminhos, mas carregando sempre no coração as memórias e o amor que criamos um pelo outro. Obrigado por me fazerem tão feliz ao longo desses 5 anos.

RESUMO

A periodontite e o diabetes mellitus (DM) são doenças crônicas prevalentes e inter-relacionadas. A influência da hiperglicemia sobre a periodontite se dá por diferentes vias, como a alteração microbiológica no ambiente subgengival. Estudos sugerem um papel maior dessas bactérias na progressão da doença e baixa resposta ao tratamento periodontal. No entanto, a maioria dos estudos tem focado apenas na constituição da comunidade microbiana, enquanto, no ambiente periodontal, poucos estudos abordaram a expressão de genes no biofilme. O objetivo deste estudo é avaliar, a partir de análise metatranscriptômica, a expressão gênica diferencial do biofilme subgengival de pacientes com periodontite, com e sem diabetes. Somado a isso, identificar a influência e contribuição de determinados periodontopatógenos na expressão desses genes, visando melhor compreender o impacto que a associação com a diabetes mellitus pode promover no biofilme subgengival desses pacientes. Para isso, avaliou-se o RNA extraído do biofilme subgengival de pacientes com periodontite sem diabetes (n=3) e com diabetes (n=3), a partir de análise metatranscriptômica diferencial entre ambos os grupos. Além disso, foi realizada uma análise desse transcriptoma utilizando os genomas das espécies bacterianas: *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* como genomas de referência, buscando identificar a contribuição na expressão de genes característicos dessas bactérias no transcriptoma apresentado em cada condição. Genes relacionados a porinas Ompa-Ompf, endopeptidases, enzimas glutamato desidrogenase e alguns genes de RNA não-codificadores foram identificados como mais expressos em pacientes diabéticos e podem estar relacionados ao aumento da patogenicidade no ambiente subgengival.

Palavras-chave: Doença periodontal. Diabetes mellitus. Microbiologia.

ABSTRACT

Periodontitis and diabetes mellitus (DM) are prevalent and interrelated chronic diseases. The influence of hyperglycemia on periodontitis occurs in different ways, such as microbiological changes in the subgingival environment. Studies suggest a greater role of these bacteria in disease progression and poor response to periodontal treatment. However, most studies have focused only on the constitution of the microbial community while, in periodontal environment, few studies have addressed gene expression in the biofilm. This study has the objective of evaluate, based on metatranscriptomic analysis, the differential gene expression of the subgingival biofilm of patients with periodontitis, with and without diabetes. Besides that, to identify the influence and contribution of certain periodontopathogens in the expression of these genes aiming to better understand the impact that the association with diabetes mellitus can promote on the subgingival biofilm of these patients. For this, we evaluated the RNA extracted from the subgingival biofilm of patients with periodontitis, without diabetes (n=3) and with diabetes (n=3), based on differential metatranscriptomic analysis between both groups. Furthermore, an analysis of this transcriptome was accomplished using the genomes of the bacterial species: *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* as reference genomes, in order to identify the contribution in the expression of these bacteria characteristic genes in the transcriptome presented in each condition. Genes related to Ompa-Ompf porins, endopeptidases, glutamate dehydrogenase enzymes and some non-coding RNA genes were identified as more expressed in diabetic patients and may be related to increased pathogenicity in the subgingival environment.

Key words: Periodontal disease. Diabetes mellitus. Microbiology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DA LITERATURA	11
3 PROPOSIÇÃO	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Seleção de pacientes	16
4.2 Avaliação clínica	16
4.3 Coleta do biofilme subgengival e análise metatranscriptômica	17
5 RESULTADOS	19
5.1 Dados clínicos e demográficos dos sujeitos do estudo	19
5.2 Identificação dos gêneros diferencialmente expressos	19
6 DISCUSSÃO	22
7 CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS	25
ANEXOS	30
Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio	30
Anexo 2 – Comitê de Ética em Pesquisa	31
Anexo 3 – Iniciação Científica	32

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal e o diabetes mellitus (DM) são doenças crônicas altamente prevalentes e inter-relacionadas, tendo uma relação bidirecional (Sanz et al., 2018). De caráter inflamatório e caracterizada pela reabsorção do osso alveolar e perda de inserção conjuntiva, a doença periodontal apresenta etiologia multifatorial, resultante da resposta imuno-inflamatória do hospedeiro aos periodontopatógenos presentes no biofilme, que se alojam nos sítios de inflamação no ambiente subgengival. Sendo a sexta complicação mais frequente da diabetes mellitus e afetando 11% da população global em sua forma mais severa, a periodontite compete, em prevalência, com doenças como diabetes, hipertensão, depressão e asma (Kwon et al., 2021; Qin et al., 2022).

A diabetes mellitus é uma condição sistêmica também muito prevalente que afeta aproximadamente 422 milhões de pessoas no mundo, desencadeada pelos níveis elevados de glicose no sangue, como consequência da deficiência na secreção de insulina ou da resistência desta. A hiperglicemia do diabetes resulta em alterações do sistema imune que podem exacerbar a doença periodontal induzida por bactérias; por outro lado, a inflamação periodontal pode complicar a gravidade do diabetes e o controle metabólico glicêmico. Essa dupla via sugere que o controle da infecção periodontal é essencial para o manejo do diabetes mellitus, assim como o controle glicêmico é importante para a prevenção e controle da doença periodontal (Qin et al., 2022).

A influência da hiperglicemia sobre a doença periodontal, se dá por diferentes vias. Na presença da DM, ocorre um acúmulo dos produtos finais da glicação avançada (AGEs), no plasma e tecidos. Os AGEs têm a capacidade de se ligar aos receptores específicos de membranas das células (RAGE – receptor de produtos finais glicosilados), os quais estão presentes em células endoteliais, monócitos/macrófagos, células do sistema nervoso e também células musculares. A interação entre AGEs e RAGEs aumenta o estresse oxidativo celular, o que resulta em maior produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias associadas à diferenciação e atividade de osteoclastos, causando maior reabsorção óssea e a produção de metaloproteases da matriz (MMPs). Contudo, outra via de relação entre o avanço da periodontite e a presença da DM é a alteração microbiológica no ambiente subgengival.

Kumar et al. (2006) mostraram que ocorre uma mudança da microbiota oral em pacientes periodontais com DM, gerando fatores locais específicos na bolsa periodontal, criando uma constituição microbiana distinta. Esse achado é corroborado por diferentes autores. Contudo, um ponto importante é a mudança de pontos específicos na microbiota. Casarin et al (2013), observaram uma microbiota subgengival diferente entre pacientes com

DM e periodontite. Entretanto, assim como recentemente mostrado por Ganesan et al. (2017), indivíduos diabéticos com periodontite apresentaram um grande número de bactérias Gram-positivas, sugerindo um papel maior dessas bactérias na progressão da doença e ao fracasso dos tratamentos. No entanto, a maioria dos estudos tem focado apenas na constituição da comunidade microbiana e não na expressão de fatores de virulência desta ou de seus principais agentes.

Não apenas a presença, mas fatores, funções ou moléculas liberadas por esses agentes microbianos podem ser decisivos para a patogenicidade. Exemplo disso é um estudo que mostrou que a molécula autoindutora da detecção de quorum 2 (AI-2), que pode ser secretado e detectado por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, demonstrou mediar a virulência e formação de biofilme de patógenos periodontais (Novak et al., 2010). Esse impacto ficou mais claro quando Zargar et al. (2015) analisaram o transcriptoma de células epiteliais intestinais humanas (CEI) após estimular essas células com AI-2 sintético. Seus resultados sugerem que esses são capazes de alterar a transcrição de mediadores imunológicos como a interleucina 8 (IL-8), que recruta neutrófilos. No ambiente periodontal, poucos estudos abordaram ou determinaram a expressão de genes no biofilme. Diversos estudos utilizaram modelos de biofilme para avaliar os transcritos e o impacto de diversas condições. Recentemente, Duran-Pinedo et al. (2018) mostraram que o hormônio relacionado ao stress, cortisol, foi capaz de alterar a expressão do biofilme, aumentando vias relacionadas à destruição dos tecidos periodontais. Do mesmo grupo, Frias-Lopez e Duran-Pinedo (2012) mostraram que a presença de certas espécies no biofilme controla a expressão de genes, alterando a complexidade das relações intermicrobianas, havendo uma maior expressão de genes como chaperonas, e transposases.

Considerando amostras coletadas de sítios periodontais, Jorth et al. (2014), avaliaram os transcritos de 10 indivíduos com periodontite e compararam com 10 indivíduos com saúde periodontal. As análises das vias diferencialmente expressas mostraram, por exemplo, que enquanto o metabolismo celular é conservado nas comunidades, as vias de fermentação do piruvato e degradação da histidina contribuem para as alterações na expressão gênica da comunidade. Os autores mostraram ainda que fatores de virulência já conhecidos podem ser expressos por diversas espécies, mostrando um potencial de indução à expressão em diferentes condições.

Dessa forma, a identificação de vias de expressão diferenciais em indivíduos periodontais com e sem diabetes, bem como a influência de periodontopatógenos nesse perfil de expressão gênica permitirá uma maior compreensão do impacto que a associação com a diabetes mellitus pode promover no biofilme subgingival desses pacientes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A periodontite é uma doença resultante da resposta imuno-inflamatória do indivíduo aos patógenos presentes no biofilme e que afeta as estruturas de suporte dos dentes como tecidos moles, ligamento periodontal e osso, podendo causar a perda dental. A prevalência, incidência e a gravidade da doença podem ser alteradas por fatores sistêmicos que causam modificações na resposta imuno-inflamatória do hospedeiro, como no caso da diabetes (Kinane, 2001; Kinane e Marshall, 2001).

A diabetes mellitus tipo 2 é uma doença sistêmica responsável pelo aumento da probabilidade do indivíduo de desenvolver doenças inflamatórias, como a periodontite (Preshaw et al., 2012). Os produtos finais da glicação avançada (AGEs) se ligam aos seus receptores (RAGEs) e junto da ação de citocinas inflamatórias, como interleucina-1 β e fator de necrose tumoral- α , provocam um aumento da resposta inflamatória e da destruição do periodonto (Mealey e Oates, 2006; Taylor et al., 2013).

Ademais, a diabetes pode estar associada a alteração do microbioma subgengival. A partir de um estudo comparativo entre pacientes com diabetes não controlada e sem diabetes, ambos com periodontite crônica, Casarin et al. (2013) observaram diferenças consideráveis entre a microbiota subgengival de pacientes diabéticos e não diabéticos. O biofilme de doze pacientes diabéticos e onze pacientes não diabéticos, ambos com periodontite, foi coletado nas bolsas periodontais com profundidade de sondagem (PS) maior que 5 mm em cada paciente, e então analisado através da técnica de clonagem e sequenciamento do gene 16S rRNA. Os resultados mostraram que pacientes diabéticos apresentaram uma maior abundância de bactérias dos gêneros *Aggregatibacter*, *Neisseria*, *Gemella*, *Eikenella*, *Selenomonas*, *Actinomyces*, *Capnocytophaga*, *Fusobacterium*, *Veillonella* e *Streptococcus*, enquanto os não diabéticos apresentaram maiores porcentagens dos gêneros *Porphyromonas*, *Filifactor*, *Eubacterium*, *Synergistetes*, *Tannerella* e *Treponema*.

Zhou et al. (2013) realizaram o sequenciamento do gene 16S rDNA de cultura de bactérias periodontais isoladas de pacientes diabéticos e não diabéticos, com e sem periodontite, extraído do biofilme subgengival dos quatro sítios de maior profundidade de sondagem dos molares de cada paciente. Ao compararem pacientes com periodontite com e sem diabetes, observaram maior abundância dos gêneros *Actinomyces* e *Aggregatibacter*, em pacientes diabéticos, assim como das bactérias *Capnocytophaga sputigena*, espécie fermentadora de glicose, o que pode justificar sua predominância nestes pacientes, e *Tannerella forsythia*, espécie pertencente ao “complexo vermelho”. Notou-se também que na

presença da diabetes a espécie *Prevotella loescheii* foi associada à periodontite, enquanto em sua ausência houve maior abundância da espécie em pacientes com saúde periodontal.

Utilizando tecnologia de análise metabolômica, que identifica a assinatura funcional metabólica de diferentes estados de saúde e doença, em amostras de saliva e plasma humano, Barnes et al. (2014) avaliaram o perfil metabólico de 161 indivíduos, com e sem diabetes, com periodonto saudável, gengivite e periodontite e correlacionaram os resultados com a progressão da doença. Em pacientes não diabéticos, as amostras de saliva demonstraram um aumento da abundância de metabólitos associados ao estado gengival proporcional à progressão da doença, enquanto os diabéticos manifestaram uma queda considerável destes metabólitos em pacientes com periodontite, sugerindo um efeito da diabetes sobre a produção de metabólitos neste perfil de paciente. Níveis mais elevados de metabólitos de degradação de purina também foram encontrados em pacientes com periodontite e diabéticos em confronto aos não diabéticos. Parcialmente regulada pelo estresse oxidativo celular, a degradação de purina funciona como indicativo da resposta inflamatória. Também foi observado que o perfil metabólico de pacientes diabéticos com periodontite, além de reproduzir a assinatura metabólica de pacientes com periodontite sem diabetes, também apresentou assinaturas únicas relacionadas à periodontite em diabéticos.

Long et al. (2017) compararam os perfis do microbioma oral de 98 indivíduos diabéticos, 99 obesos sem diabetes e 97 pacientes não obesos sem diabetes através da análise do sequenciamento do gene 16S rRNA e identificaram diferenças na composição da comunidade microbiana. Os gêneros *Actinomyces* e *Atopobium* foram fortemente relacionados a uma redução no risco de diabetes, sendo mais abundantes em pacientes não obesos sem diabetes. No nível de família, *Actinomycetaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Coriobacteriaceae*, *Corynebacteriaceae* e *Micrococcaceae* foram menos abundantes em pacientes diabéticos, comparados aos não obesos sem diabetes. O gênero *Gemella* apresentou maior abundância em pacientes diabéticos, sendo associada a um risco aumentado da doença.

No objetivo de caracterizar o microbioma subgengival de pacientes diabéticos e não diabéticos com e sem periodontite, Farina et al. (2019) coletaram o biofilme subgengival de doze pacientes divididos entre quatro grupos e submeteram as amostras à sequenciamento shotgun metagenômico total de alta resolução. A análise dos dados revelou uma diminuição na riqueza e diversidade do microbioma subgengival em pacientes com diabetes e/ou periodontite. Observou-se também uma maior expressão do táxon 439 da bactéria *Anaerolineaceae* em pacientes com periodontite na presença de diabetes mellitus.

Um outro estudo que utilizou análise metagenômica em amostras do microbioma subgengival de pacientes com e sem diabetes foi realizado por Shi et al. (2020), que coletaram biofilme subgengival de 32 pacientes igualmente divididos entre quatro grupos (diabéticos com e sem periodontite e não diabéticos com e sem periodontite). Pacientes não diabéticos expressaram diferenças significativas na composição do microbioma subgengival quando comparados os dados de pacientes com periodontite antes do tratamento periodontal, depois de receberem o tratamento e pacientes sem periodontite, sendo que estes dois obtiveram resultados semelhantes. Enquanto isso, entre os pacientes diabéticos com saúde periodontal e com periodontite antes e depois de receberem tratamento periodontal, não houveram grandes diferenças. Além disso, pacientes portadores da doença com periodontite apresentaram inflamação do tecido periodontal e sinais clínicos da doença antes mesmo do microbioma subgengival atingir um estado de periodontite “patogênica” de fato. Em pacientes diabéticos, relatou-se um enriquecimento das vias de metabolismo do butanoato, pentose e glucuronato e ascorbato e aldarato. Existe uma associação entre doenças como periodontite e DM e as vias metabólicas do ascorbato e aldarato (Nishida et al., 2000; Iwasaki et al., 2012; Zhou et al., 2016).

Chen et al. (2020) relataram uma composição microbiana oral diferente entre pacientes diabéticos e não diabéticos. O estudo utilizou o método de sequenciamento do gene 16S rRNA das amostras de swab oral que foram coletadas de 162 adultos saudáveis e 280 adultos com diabetes mellitus. As distinções identificadas consistem em um aumento na relação Firmicutes/Bacteroidetes em pacientes diabéticos, que também demonstraram números consideravelmente menores de *Acinetobacteria* e maiores dos gêneros *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Streptococcus* e *Neisseria*, quando comparados com pacientes sem diabetes.

Matsha et al. (2020) analisaram a composição bacteriana do biofilme coletado de 128 sul-africanos com periodontite, com e sem diabetes, que passou por sequenciamento do gene 16S rRNA. Em diabéticos, eles identificaram um aumento na abundância dos gêneros *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Leptotrichia*, *Prevotella*, *Olsenella*, *Selenomonas* e *Tannerella*. Também compararam pacientes diabéticos com periodontite com e sem sangramento gengival e notaram uma relação entre os pacientes com sangramento gengival e o aumento da abundância dos filos Actinobacteria e Fusobacteria, levantando a hipótese de um papel importante dos filos no desenvolvimento da diabetes e progressão da periodontite.

Através da coleta de saliva de 10 pacientes diabéticos com periodontite, 10 pacientes com periodontite crônica e 10 pacientes saudáveis e, da amplificação do DNA genômico bacteriano por meio de PCR na região V4 do gene 16S rRNA, Lu C et al. (2022)

notaram que *P. intermedia* está mais expressa na saliva de pacientes diabéticos, além de *Corynebacterium* , *Leptotrichia* , *Dialister* , *Comamonas* , *Capnocytophaga* , *Catonella* , *Filifactor* , *Campylobacter* , *Treponema* , *Campylobacter concisus* , *Prevotella oralis* e *Porphyromonas gingivalis*, que também foram mais abundantes em pacientes com periodontite crônica.

Lu X et al. (2022) submeteram à sequenciamento metagenômico o biofilme subgengival de 12 indivíduos que foram divididos em quatro grupos: periodontite, DM2 (diabetes mellitus tipo 2), DM2 complicada com periodontite e geralmente saudável. Também analisaram as concentrações de ácidos graxos de cadeia curta presentes nos fluidos crevculares gengivais. Os resultados demonstraram efeitos que podem ser importantes na associação entre a periodontite e a DM2 como o enriquecimento nas vias das pentoses, glucuronato, frutoses, manoses e galactoses em pacientes com periodontite, e outros que podem ser responsáveis por aumentar o risco de pacientes diabéticos a desenvolverem periodontite, como o enriquecimento da biossíntese de peptidoglicano e LPS, sistema de secreção bacteriana e vias de metabolismo do enxofre. Vários genes expressos, positivamente regulados, correspondem à espécies bacterianas do complexo vermelho e laranja e podem estar relacionados à formação de biofilme bacteriano e sua patogenicidade. A análise dos fluidos crevculares gengivais apresentaram concentrações significativamente maiores de ácido propiônico e ácido butírico em pacientes com doença periodontal. O ácido butírico pode ser fator importante na relação entre diabetes e periodontite.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar, a partir de análise metatranscriptômica, a expressão gênica diferencial do biofilme subgengival de pacientes com periodontite, com e sem diabetes mellitus, bem como identificar a influência e contribuição de determinados periodontopatógenos na expressão desses genes, visando obter maior profundidade de informações referentes ao impacto da DM sobre a doença periodontal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção de pacientes

A seleção dos pacientes envolvidos no presente projeto foi realizada dentro das exigências éticas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, no qual este projeto foi submetido. Após aprovação pelo CEP, foram selecionados 6 indivíduos, que procuraram atendimento da Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Os pacientes foram selecionados de forma a compor dois grupos:

- *Grupo Controle (n=3)*: indivíduos classificados como periodontite estágio III/IV e grau A/B de acordo com os critérios definidos pela nova classificação das doenças periodontais¹, sem presença de diabetes mellitus.
- *Grupo Diabetes (n=3)*: indivíduos classificados como periodontite estágio III/IV grau B/C de acordo com os critérios definidos pela nova classificação das doenças periodontais, com diagnóstico de diabetes mellitus.

Ainda foram considerados: 1) pelo menos 20 dentes na cavidade oral; 2) saúde sistêmica (no caso do grupo controle); 3) diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 há pelo menos dois anos (no caso do grupo diabetes).

Como critérios de exclusão, foram consideradas as seguintes condições: hábito tabagista atual ou no passado; gravidez ou lactantes; uso de medicação antibiótica ou anti-inflamatória crônica no período prévio de 6 meses ao estudo; presença de outras doenças sistêmicas (exceto diabetes para os pacientes do segundo grupo).

4.2 Avaliação clínica

Foram avaliados os parâmetros clínicos periodontais: Índice de Placa – IP (Ainamo e Bay, 1975); Sangramento à sondagem - SS (Mühlemann e Son, 1971); Posição da Margem Gingival – PMG: distância da margem gengival à junção cimento esmalte; Nível Clínico de Inserção – NIC: distância da junção cimento esmalte até a base, clinicamente detectável, da bolsa periodontal; Profundidade de Sondagem – PS (NICR - PMG): distância da margem gengival à base, clinicamente detectável, da bolsa periodontal.

¹ Determinada pela Academia Americana de Periodontia e a Federação Europeia de Periodontia.

Todos os parâmetros clínicos foram obtidos utilizando uma sonda periodontal do tipo Carolina do Norte, por um examinador calibrado.

4.3 Coleta do biofilme subgengival e análise metatranscriptômica

Foi coletado biofilme subgengival dos quatro sítios de maior profundidade de sondagem de cada paciente em ambos os grupos (controle e diabetes) com uma cureta de Gracey, armazenado em *pool* em eppendorfs contendo 100 µl de RNA later (Thermo Fisher Scientific, MA) e refrigerado a -20°C para posterior extração. O RNA total foi extraído seguindo o protocolo do kit de extração (RNAeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA), associado a uma adição prévia dos buffers: Lisozima 20mg/ml (Thermo Fisher Scientific, MA) + Mutanolisina 5,000 U/ml (Thermo Fisher Scientific, MA) + Tris -1M HCl, pH 8.0. O RNA extraído foi re-analisado, no aparelho Bioanalyzer, para que fossem avaliados qualidade e pureza, fazendo-se necessário um RIN adequado e concentração mínima, e armazenado em freezer a -80°C até o sequenciamento.

O RNA extraído foi sequenciado através da plataforma IlluminaHiSeq 2,500. As bibliotecas de RNA-seq foram ajustadas e sequenciadas na mesma faixa utilizando 2x100 pares de bases de reads no sequenciador IlluminaHiSeq. Em seguida, as sequências passaram por um controle de qualidade utilizando o software FastQC (Andrews, 2010). As sequências dos microorganismos foram extraídas em dois passos: 1) foram eliminadas as leituras que foram alinhadas com o genoma humano, através do mapeamento com o bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012). 2) em seguida, as leituras de RNA ribossomal foram filtradas e eliminadas dos dados do metatranscriptoma, através do bowtie2 (Kopylova et al., 2012). Essas sequências foram alinhadas com um genoma de referência, onde foi utilizada a base de dados do Microbioma Oral Humano (Human Oral Microbiome Database - HOMD) (Escapa et al., 2020). Além disso, foi realizada uma montagem novamente para identificar leituras bacterianas presentes nas amostras que não foram mapeadas com o microbioma oral humano. A quantificação dos dados no nível de genes e transcritos foi realizada utilizando o software Kallisto v0.49 (Bray et al., 2016). Os genes diferencialmente expressos foram identificados utilizando o pacote Sleuthv0.30.0 package (Pimentel et al., 2017). Os ortólogos funcionais, denominados KO (KEGG Orthology), que engloba um grupo ao invés de um único gene ou proteína, foram identificadas através da base de dados do KEGG (Kanehisa et al., 2016) no intuito de encontrar evidências de genes que podem ser associados com mais de um organismo presentes no microbioma.

A partir da extração do RNA total, foram confeccionados o cDNA e padronizados genes para os alvos escolhidos a partir da análise do metatranscriptoma acima. Foram selecionados ao menos 25 genes, de diferentes vias, que mostraram significância estatística e biológica, para comparar a expressão nos grupos delineados no projeto. A sequência foi a mesma utilizada em estudos prévios do grupo (Taiete et al., 2018), sendo os valores de Cycle threshold (Ct) obtidos de cada reação calculados pelo software do equipamento, sendo que a expressão de cada gene alvo normalizada pela expressão do gene constitutivo (ΔCt), no caso RBPO. Em seguida empregou-se o método de $\Delta\Delta Ct$ para análise da diferença na expressão gênica.

5. RESULTADOS

5.1 Dados clínicos e demográficos dos sujeitos do estudo

A partir da análise dos dados clínicos e demográficos obtidos de cada paciente observou-se que não houveram diferenças estatísticas significantes entre os grupos controle e diabetes, mostrando uma semelhança entre os parâmetros periodontais dos dois grupos de pacientes no momento da coleta.

Tabela 1 - Dados demográficos e clínicos de pacientes com periodontite grau A/B e periodontite grau C (diabéticos)

	Controle (N=3)	Diabetes (N=3)
Idade	38,3±2,08	47,6±5,42
Sexo (F)	1	3
IP (%)	24,8±11,36	51,6±0,14
SS (%)	23,5±13,12	42,0±24,17
PS	2,2±0,04	2,8±0,51
NIC	2,2±0,07	3,3±1,41
PS> 7mm	7,1±0,3	7,5±1,04
HBAc1	-	7,65

5.2 Identificação dos genes diferencialmente expressos

Foram identificados 25 genes diferencialmente expressos entre os grupos, evidenciando diferenças no perfil funcional microbiano do biofilme subgengival em pacientes diabéticos (Tabela 2). Observou-se que em pacientes diabéticos, houveram uma maior expressão de genes relacionados a porinas Ompa-Ompf, endopeptidases, enzimas glutamato desidrogenase e a alguns genes de RNA não-codificadores. Além disso, foi identificado as bactérias associadas a cada KEGG referente aos 10 KEGGs com maiores valores diferencialmente expressos no grupo de pacientes diabéticos (Tabela 3), mostrando que não somente as bactérias Gram-negativas do complexo vermelho estão associadas ao perfil de expressão gênica, como também outras espécies Gram-positivas, como *Capnocytophaga*, *Actinomyces* e *Corynebacterium*. De maneira geral, vários gêneros e espécies estão associadas ao mesmo KEGG, o que evidencia uma mudança orquestrada do perfil funcional do biofilme como um todo em condições de doença.

Tabela 2 - Genes diferencialmente expressos regulados positivamente no grupo de pacientes diabéticos

KEGG	Definição do Gene
K02959	small subunit ribosomal protein S16
K01610	phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)
K00262	glutamate dehydrogenase (NADP+)
K02986	small subunit ribosomal protein S4
K00962	polyribonucleotide nucleotidyltransferase
K09458	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II
K02968	small subunit ribosomal protein S20
K02519	translation initiation factor IF-2
K00024	malate dehydrogenase
K02939	large subunit ribosomal protein L9
K02355	elongation factor G
K19304	murein DD-endopeptidase
K02863	large subunit ribosomal protein L1
K01880	glycyl-tRNA synthetase
K03072	preprotein translocase subunit SecD
K01006	pyruvate, orthophosphate dikinase
K03046	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'
K01835	phosphoglucomutase
K03040	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha
K03076	preprotein translocase subunit SecY
K03286	OmpA-OmpF porin, OOP family
K02933	large subunit ribosomal protein L6
K06158	ATP-binding cassette, subfamily F, member 3
K02867	large subunit ribosomal protein L11
K03733	integrase/recombinase XerC

Tabela 3 - Bactérias associadas ao top 10 de genes positivamente expressos no grupo de diabéticos

KEGG	Definição	Gênero/Espécies
K02959	small subunit ribosomal protein S16	Multiespécies
K01610	phosphoenolpyruvate carboxykinase	<i>Tanerella sp.</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Bacteroidetes sp.</i> , <i>Capnocytophaga sp.</i> , <i>Cardiobacterium hominis</i> , <i>Haemophilus parainfluenzae</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella denticola</i> , <i>Prevotella fusca</i> , <i>Prevotella sp.</i> , <i>Selenomonas sp.</i> , <i>Tannerella forsythia</i> , <i>Tannerella sp.</i>
K00262	glutamate dehydrogenase	<i>Prevotella veroralis</i> , <i>Actinobaculum sp.</i> , <i>Actinomyces dentalis</i> , <i>Actinomyces sp.</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Capnocytophaga</i> , <i>Cardiobacterium valvarum</i> , <i>Eubacterium brachy</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella sp.</i> , <i>Selenomonas sp.</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Tanerella sp.</i>
K02986	small subunit ribosomal protein	Multiespécies
K00962	polyribonucleotide nucleotidyltransferase	<i>Actinomyces sp.</i> , <i>Aggregatibacter sp.</i> , <i>Capnocytophaga sp.</i> , <i>Cardiobacterium valvarum</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Eubacterium nodatum</i> , <i>Fretibacterium</i> , <i>Leptotrichia sp.</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Rothia</i> , <i>Selenomonas</i> , <i>Tannerella sp.</i> , <i>Treponema</i> , <i>Veillonella parvula</i>
K09458	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II	<i>Actinomyces sp.</i> , <i>Aggregatibacter sp.</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Capnocytophaga</i> , <i>Cardiobacterium</i> , <i>Fretibacterium</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Kingella</i> , <i>Leptotrichia</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Selenomonas</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Tannerella</i> , <i>Veillonella</i>
K02968	small subunit ribosomal protein S20	Multiespécies
K02519	translation initiation factor IF-2	Multiespécies
K00024	malate dehydrogenase	<i>Actinobaculum sp.</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Capnocytophaga</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Selenomonas sp.</i> , <i>Tannerella sp.</i>
K02939	large subunit ribosomal protein L9	Multiespécies

6 DISCUSSÃO

O conhecimento do microbioma associado à doença periodontal vem cada vez mais mostrando que a presença ou ausência de determinadas bactérias por si só não explica inteiramente como a doença periodontal surge ou progride. Quando adicionado o fator diabetes, os estudos realizados até os dias de hoje ainda não foram suficientes para que fossem desenvolvidos tratamentos específicos para esse perfil de paciente, reforçando a necessidade de aprofundamento sobre o assunto buscando obter o melhor prognóstico para o tratamento periodontal em pacientes diabéticos. Além disso, relativamente poucos estudos na literatura estão focados no perfil funcional do biofilme em saúde e doença. Para o nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo que compara dois perfis de biofilmes disbióticos: diabéticos com periodontite (grau B/C) versus periodontite grau A/B.

Alguns genes encontrados na Tabela 2, mais expressos no grupo de pacientes diabéticos, estão associados a alguns fatores de virulência adicionais que podem estar relacionados a maior progressão da doença. O gene referente à porina OmpA-OmpF pode ser importante nesse aspecto, visto que são proteínas transmembranares associadas a manutenção da integridade da membrana, principalmente em bactérias Gram-negativas (Pages et al., 2008). Dessa forma, as porinas podem mediar a difusão passiva de agentes antimicrobianos e componentes tóxicos, tornando-as mais resistentes a perturbações exógenas (Choi e Lee, 2019), o que pode facilitar a perpetuação e patogênese de bactérias Gram-negativas no ambiente subgengival. Considerando que o tratamento mais comum para a periodontite em pacientes diabéticos é a raspagem subgengival associada a antibiótico terapia utilizando antibióticos de amplo espectro, a ação da porina OmpA-OmpF pode ser determinante para a baixa resposta ao tratamento.

O gene Murein-DD-Endopeptidase, associado à enzima endopeptidase pode ser outro ponto a ser considerado no insucesso dos tratamentos visto que, mesmo na presença de penicilina G e outros antibiótico β -lactâmicos, estudos relatam que a enzima não demonstrou diminuição da sua atividade (Keck e Schwarz, 1979), o que pode estar associado a uma maior sobrevivência intracelular do biofilme. A enzima glutamato desidrogenase, que está relacionada a um gene positivamente expresso em pacientes diabéticos, já foi relacionada com a adaptação e sobrevivência relacionada ao *Streptococcus pneumoniae*. A exclusão do gene referente à enzima foi relacionada a um menor crescimento da cepa, formação de biofilme, resistência ao pH e biossíntese de proteínas relacionadas à virulência (Gaziloglu et al. 2021). Dessa forma, o perfil de expressão gênica subgengival de pacientes diabéticos parece estar mais associado com um aumento no perfil de virulência e, consequentemente, a maior progressão da doença periodontal.

Além disso, uma grande parte dos KEGGs diferencialmente expressos parecem estar relacionados à genes de RNA não-codificadores, que são elementos bacterianos associados à regulação do seu perfil funcional. Atualmente, essas sequências de RNA vêm sendo cada vez mais estudadas e sabe-se que hoje elas desempenham um papel central no controle da expressão gênica da comunidade. Recentemente, alguns transcritos de sequências não-codificadoras de RNA foram identificados e correlacionados à doença periodontal, na qual sugere-se um papel significativo na modulação gênica da comunidade bacteriana através de alguns mecanismos regulatórios de transcrição e tradução (Ram-Mohan e Meyer, 2020). Dessa forma, nossos achados indicam que no ambiente subgengival de diabéticos, esse mecanismo regulatório é ainda mais evidente e crucial para a manutenção de um ambiente patogênico.

A análise das bactérias associadas aos KEGGs mostra que existe uma participação predominante de bactérias que são encontradas mais abundantemente encontrada no microbioma subgengival de diabéticos com doença periodontal, como: *Neisseriaceae*, *Corynebacterium*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Eikenella* (Qin et al., 2022), bem como bactérias Gram-negativas do complexo vermelho. Além disso, várias bactérias estão associadas a um mesmo ortólogo de genes, o que sustenta a ideia de que não são bactérias específicas, mas sim a comunidade como um todo que atua como responsável pelo perfil de expressão gênica no ambiente subgengival disbiótico.

O estudo possui algumas limitações, como por exemplo, o pequeno número de amostras incluídas e o fato de não incluir análise taxonômica. Entretanto, a identificação desses genes tem um caráter preliminar, permitindo uma futura validação em populações maiores dos genes diferencialmente expressos encontrados.

7 CONCLUSÃO

A diabetes mellitus pode influenciar no perfil de expressão gênica subgengival do biofilme em pacientes com doença periodontal, expondo a necessidade de maiores estudos sobre o tema para melhor entendimento do impacto causado pela doença sobre a periodontite e, através disso, buscar alternativas terapêuticas específicas para pacientes com esse perfil de doença.

REFERÊNCIAS²

1. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* 1975;25:229-35.
2. Andrews, S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Bioinformatics; 2010. Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
3. Barnes VM, Kennedy AD, Panagakos F, Devizio W, Trivedi HM, Jönsson T, Guo L, Cervi S, Scannapieco FA. Global metabolomic analysis of human saliva and plasma from healthy and diabetic subjects, with and without periodontal disease. *PLoS One*. 2014 Aug 18;9(8):e105181. doi: 10.1371/journal.pone.0105181. Erratum in: *PLoS One*. 2014;9(11):e114091. PMID: 25133529; PMCID: PMC4136819.
4. Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol*. 2016;34:525–7. doi: 10.1038/nbt.3519.
5. Casarin RC, Barbagallo A, Meulman T, Santos VR, Sallum EA, Nociti FH, et al. Subgingival biodiversity in subjects with uncontrolled type-2 diabetes and chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2013 Feb;48(1):30-6.
6. Chen, B., Wang, Z., Wang, J. et al. The oral microbiome profile and biomarker in Chinese type 2 diabetes mellitus patients. *Endocrine* 68, 564–572 (2020). <https://doi.org/10.1007/s12020-020-02269-6>
7. Choi U, Lee CR. Distinct Roles of Outer Membrane Porins in Antibiotic Resistance and Membrane Integrity in *Escherichia coli*. *Front Microbiol*. 2019 Apr 30;10:953.
8. Duran-Pinedo AE, Solbiati J, Frias-Lopez J. The effect of the stress hormone cortisol on the metatranscriptome of the oral microbiome. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2018 Oct 18;4:25. doi: 10.1038/s41522-018-0068-z. PMID: 30345066; PMCID: PMC6194028.
9. Escapa IF, Huang Y, Chen T, Lin M, Kokaras A, Dewhirst FE, et al. Construction of habitat-specific training sets to achieve species-level assignment in 16S rRNA gene datasets. *Microbiome* . 2020;8:65. doi: 10.1186/s40168-020-00841-w.
10. Farina R, Severi M, Carrieri A, Miotto E, Sabbioni S, Trombelli L, et al. Whole metagenomic shotgun sequencing of the subgingival microbiome of diabetics and non-

² 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.

diabetics with different periodontal conditions. *Arch Oral Biol.* 2019 Aug;104:13-23. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.05.025.

11. Frias-Lopez J, Duran-Pinedo A. Effect of periodontal pathogens on the metatranscriptome of a healthy multispecies biofilm model. *J Bacteriol.* 2012 April;194(8):2082–95.
12. Ganesan SM, Joshi V, Fellows M, Dabdoub SM, Nagaraja HN, O'Donnell B, et al. A tale of two risks: smoking, diabetes and the subgingival microbiome. *ISME J.* 2017;11(9):2075–89. doi: 10.1038/ismej.2017.73.
13. Gazioglu O, Kareem BO, Afzal M, Shafeeq S, Kuipers OP, Ulijasz AT, et al. Glutamate Dehydrogenase (GdhA) of *Streptococcus pneumoniae* Is Required for High Temperature Adaptation. *Infect Immun.* 2021 Nov 16;89(12):e0040021. doi: 10.1128/IAI.00400-21.
14. Iwasaki M, Manz MC, Taylor GW, Yoshihara A, Miyazaki H. Relations of serum ascorbic acid and α -tocopherol to periodontal disease. *J Dent Res.* 2012 Feb;91(2):167-72. doi: 10.1177/0022034511431702. Epub 2011 Dec 13. PMID: 22166583.
15. Jorth P, Turner KH, Gumus P, Nizam N, Buduneli N, Whiteley M. Metatranscriptomics of the human oral microbiome during health and disease. *MBio.* 2014 Apr 1;5(2):e01012-14. doi: 10.1128/mBio.01012-14.
16. Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *NucleicAcids Res.* 2016;44:D457–62. doi: 10.1093/nar/gkv1070.
17. Keck W, Schwarz U. *Escherichia coli* murein-DD-endopeptidase insensitive to beta-lactam antibiotics. *J Bacteriol.* 1979 Sep;139(3):770-4. doi: 10.1128/jb.139.3.770-774.1979.
18. Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2001;25:8-20. doi: 10.1034/j.1600-0757.2001.22250102.x.
19. Kinane DF, Marshall GJ. Periodontal manifestations of systemic disease. *Aust Dent J.* 2001 Mar;46(1):2-12. doi: 10.1111/j.1834-7819.2001.tb00267.x.
20. Kopylova E, Noé L, Touzet H. SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics.* 2012;28:3211–7. doi: 10.1093/bioinformatics/bts611.

21. Kumar PS, Leys EJ, Bryk JM, Martinez FJ, Moeschberger ML, Griffen AL. Changes in periodontal health status are associated with bacterial community shifts as assessed by quantitative 16S cloning and sequencing. *J Clin Microbiol.* 2006 Oct;44(10):3665–73.
22. Kwon T, Lamster IB, Levin L. Current Concepts in the Management of Periodontitis. *Int Dent J.* 2021 Dec;71(6):462-76. doi: 10.1111/idj.12630.
23. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.* 2012;9:357-9. doi: 10.1038/nmeth.1923.
24. Long J, Cai Q, Steinwandel M, Hargreaves MK, Bordenstein SR, Blot WJ, Zheng W, Shu XO. Association of oral microbiome with type 2 diabetes risk. *J Periodontal Res.* 2017 Jun;52(3):636-643. doi: 10.1111/jre.12432. Epub 2017 Feb 8. PMID: 28177125; PMCID: PMC5403709.
25. Lu C, Zhao Q, Deng J, Chen K, Jiang X, Ma F, Ma S, Li Z. Salivary Microbiome Profile of Diabetes and Periodontitis in a Chinese Population. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Aug 1;12:933833. doi: 10.3389/fcimb.2022.933833. PMID: 35979090; PMCID: PMC9377223.
26. Lu X, Liu T, Zhou J, Liu J, Yuan Z, Guo L. Subgingival microbiome in periodontitis and type 2 diabetes mellitus: an exploratory study using metagenomic sequencing. *J Periodontal Implant Sci.* 2022 Aug;52(4):282-97. doi: 10.5051/jpis.2103460173.
27. Matsha TE, Prince Y, Davids S, et al. Oral Microbiome Signatures in Diabetes Mellitus and Periodontal Disease. *Journal of Dental Research.* 2020;99(6):658-665. doi:10.1177/0022034520913818.
28. Mealey BL, Oates TW; American Academy of Periodontology. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol.* 2006 Aug;77(8):1289-303. doi: 10.1902/jop.2006.050459.
29. Mühlemann HR, Son S. Gingival sulcus bleeding--a leading symptom in initial gingivitis. *Helv Odontol Acta.* 1971 Oct;15(2):107-13. PMID: 5315729.
30. Nishida M, Grossi SG, Dunford RG, Ho AW, Trevisan M, Genco RJ. Dietary vitamin C and the risk for periodontal disease. *J Periodontol.* 2000 Aug;71(8):1215-23. doi: 10.1902/jop.2000.71.8.1215. PMID: 10972636.
31. Novak EA, Shao H, Daep CA, Demuth DR. Autoinducer-2 and QseC control biofilm formation and in vivo virulence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* 2010 Jul;78(7):2919-26. doi: 10.1128/IAI.01376-09.

32. Pages JM, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6:893-903. doi: 10.1038/nrmicro1994.
33. Pimentel H, Bray N, Puente S, Melsted P, Pacher L. Differential analysis of RNA-seq incorporating quantification uncertainty. *Nat Methods* 2017;14:687-90. doi: 10.1038/nmeth.4324.
34. Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, et al. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia.* 2012 Jan;55(1):21-31. doi: 10.1007/s00125-011-2342-y
35. Qin H, Li G, Xu X, Zhang C, Zhong W, Xu S, et al. The role of oral microbiome in periodontitis under diabetes mellitus. *J Oral Microbiol.* 2022 Jun;14(1):2078031.
36. Ram-Mohan N, Meyer MM. Comparative Metatranscriptomics of Periodontitis Supports a Common Polymicrobial Shift in Metabolic Function and Identifies Novel Putative Disease-Associated ncRNAs. *Front Microbiol.* 2020 Apr 9;11:482.
37. Sanz M, Ceriello A, Buysschaert M, Chapple I, Demmer RT, Graziani F, Herrera D, Jepsen S, Lione L, Madianos P, Mathur M, Montanya E, Shapira L, Tonetti M, Vegh D. Scientific evidence on the links between periodontal diseases and diabetes: Consensus report and guidelines of the joint workshop on periodontal diseases and diabetes by the International Diabetes Federation and the European Federation of Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2018 Feb;45(2):138-149. doi: 10.1111/jcpe.12808. Epub 2017 Dec 26. PMID: 29280174.
38. Shi B, Lux R, Klokkevold P, Chang M, Barnard E, Haake S. et al. The subgingival microbiome associated with periodontitis in type 2 diabetes mellitus. *ISME J.* 2020; 14:519-30. doi: 10.1038/s41396-019-0544-3.
39. Taiete T, Casarin RCV, Ruiz KGS, Nociti FH Jr, Sallum EA, Casati MZ. Transcriptome of healthy gingival tissue from edentulous sites in patients with a history of generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol.* 2018 Jan;89(1):93-104. doi: 10.1902/jop.2017.170221. PMID: 30917206.
40. Taylor JJ, Preshaw PM, Lalla E. A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. *J Clin Periodontol.* 2013 Apr;40 Suppl 14:S113-34. doi: 10.1111/jcpe.12059.

41. Yost S, Duran-Pinedo AE, Teles R, Krishnan K, Frias-Lopez J. Functional signatures of oral dysbiosis during periodontitis progression revealed by microbial metatranscriptome analysis. *Genome Med.* 2015 Apr 27;7(1):27. doi: 10.1186/s13073-015-0153-3. Erratum in: *Genome Med.* 2015;7(1):111.
42. Zhou C, Na L, Shan R, Cheng Y, Li Y, Wu X, Sun C. Dietary Vitamin C Intake Reduces the Risk of Type 2 Diabetes in Chinese Adults: HOMA-IR and T-AOC as Potential Mediators. *PLoS One.* 2016 Sep 29;11(9):e0163571. doi: 10.1371/journal.pone.0163571. PMID: 27685994; PMCID: PMC5042374.
43. Zargar A, Quan DN, Carter KK, Guo M, Sintim HO, Payne GF, Bentley WE. Bacterial secretions of nonpathogenic *Escherichia coli* elicit inflammatory pathways: a closer investigation of interkingdom signaling. *mBio.* 2015 Mar 10;6(2):e00025. doi: 10.1128/mBio.00025-15. PMID: 25759496; PMCID: PMC4453519.
44. Zhou M, Rong R, Munro D, Zhu C, Gao X, Zhang Q, et al. Investigation of the effect of type 2 diabetes mellitus on subgingival plaque microbiota by high-throughput 16S rDNA pyrosequencing. *PLoS One.* 2013 Apr 22;8(4):e61516. doi: 10.1371/journal.pone.0061516.

ANEXOS

Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio



Anexo 2 – Comitê de Ética em Pesquisa

	UNICAMP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNIVERSIDADE DE CAMPINAS - FOP/UNICAMP	
---	---	---

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização do perfil transcriptômico do biofilme subgengival de pacientes em diferentes condições periodontais e peri-implantar

Pesquisador: GABRIELA MARTIN BONILHA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 51169721.8.0000.5418

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.010.640

Apresentação do Projeto:

O parecer inicial é elaborado com base na transcrição editada do conteúdo do registro do protocolo na Plataforma Brasil e dos arquivos anexados à Plataforma Brasil. Os pareceres de retorno, emendas e notificações são elaborados a partir do último parecer e dos dados e arquivos da última versão apresentada. A EQUIPE DE PESQUISA citada na capa do projeto de pesquisa inclui GABRIELA MARTIN BONILHA (Cirurgiã Dentista, Mestranda no PPG em Clínica Odontológica da FOP-UNICAMP, Pesquisadora responsável), HÉLVIS ENRI DE SOUSA PAZ (Cirurgião Dentista, Doutorando no PPG em Clínica Odontológica da FOP-UNICAMP), BIANCA CARVALHO MENDES (Cirurgiã Dentista, Mestranda no PPG em Clínica Odontológica da FOP-UNICAMP), RENATO CORRÊA VIANA CASARIN (Cirurgião Dentista, Docente na área de Periodontia da FOP-UNICAMP), MATHEUS PASCHOALETTO LOPES (Graduando no curso de Odontologia da FOP-UNICAMP) e JOÃO VITOR SAMOGIN (Graduando no curso de Odontologia da FOP-UNICAMP), o que é confirmado na declaração dos pesquisadores e na PB.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PIRACICABA, 30 de Setembro de 2021

Assinado por:
jacks jorge junior
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Limeira 901 Caixa Postal 52		CEP: 13.414-903
Bairro: Areião		
UF: SP	Município: PIRACICABA	
Telefone: (19)2106-5349	Fax: (19)2106-5349	E-mail: cep@fop.unicamp.br

Anexo 3 – Iniciação Científica



Universidade Estadual de Campinas
Pró-Reitoria de Pesquisa
Programas de Iniciação Científica e Tecnológica
www.prp.unicamp.br | Tel. 55 19 3521-4891

PARECER SOBRE RELATÓRIO FINAL DE ATIVIDADES

Bolsista: JOÃO VITOR SAMOGIN - RA 218973

Orientador(a): Prof.(a) Dr.(a) RENATO CORREA VIANA CASARIN

Projeto: "Expressão gênica diferencial do biofilme subgingival de pacientes com periodontite portadores de diabetes mellitus"

Bolsa: PIBIC/CNPq

Processo: 133713/2021-0

Vigência: 01/09/2021 a 31/08/2022

PARECER

O aluno apresentou desempenho acadêmico estável. O planejamento de atividades proposto no projeto inicial foi cumprido e seus resultados apresentados na conclusão do relatório. No entanto, as conclusões poderiam ter sido melhor desenvolvidas, visto se tratar de um relatório curto, que utiliza apenas dez das vinte páginas de limite e ao mesmo tempo aproveita muitas partes do relatório parcial e do projeto de forma quase verbatim. Os resultados do levantamento bibliográfico, por exemplo, poderiam ter sido registrados no Relatório, visto que duraram toda a extensão do projeto. Feitas estas considerações, recomendamos a aprovação deste Relatório Final.

Conclusão do Parecer:

 Aprovado

Pró-Reitoria de Pesquisa, 21 de novembro de 2022.

Marcos Yakuwa Mekarú

PR ASS ADMINISTRATIVOS / TÉCNICO EM
ADMINISTRAÇÃO
(Assinatura Digital em anexo)

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica
Informar código D5AE4172 88F241A0 B610B65B 1D8EB012

Documento assinado eletronicamente por **Marcos Yakuwa Mekarú, PR ASS ADMINISTRATIVOS / TÉCNICO EM ADMINISTRAÇÃO**, em 21/11/2022, às 12:25 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
D5AE4172 88F241A0 B610B65B 1D8EB012

