

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Ferdinando Agostinho

Perfil taxonômico e funcional do microbioma subgengival associado ao Diabetes *Mellitus* tipo 2 e a periodontite

Uberaba

2022

Ferdinando Agostinho

Perfil taxonômico e funcional do microbioma subgingival associado ao Diabetes *Mellitus* tipo 2 e a periodontite

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Área de concentração I - Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Siomar Castro Soares.

Coorientador: Prof. Dr. Wellington Francisco Rodrigues.

Uberaba

2022

Catálogo na fonte:
Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

A221p Agostinho, Ferdinando
Perfil taxonômico e funcional do microbioma subgingival associado ao Diabetes *Mellitus* tipo 2 e a periodontite / Ferdinando Agostinho. -- 2022.
102 f. : il., graf., tab.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2022

Orientador: Prof. Dr. Siomar Castro Soares

Corientador: Prof. Dr. Wellington Francisco Rodrigues

1. Periodontite. 2. Microbiota. 3. Diabetes *Mellitus*. 3. Biomarcadores. 4. Líquido do sulco gengival. I. Soares, Siomar Castro. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.314

Ferdinando Agostinho

Perfil taxonômico e funcional do microbioma subgengival associado ao Diabetes *Mellitus* tipo 2 e a periodontite

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Área de concentração I - Bioquímica, Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Uberaba, 29 de Setembro de 2022

Banca Examinadora

DR. SIOMAR DE CASTRO SOARES – Orientador
UFTM

DRA. ADRIANA GONÇALVES DE OLIVEIRA
UFTM

DRA. THAÍS SOARES FARNESI DE ASSUNÇÃO
UFTM

DRA. CAMILA BOTELHO MIGUEL
UNIFIMES

DR. CARLOS ANTÔNIO TRINDADE DA SILVA
SLMANDIC



Documento assinado eletronicamente por **SIOMAR DE CASTRO SOARES, Professor do Magistério Superior**, em 30/09/2022, às 14:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#)



Documento assinado eletronicamente por **ADRIANA GONCALVES DE OLIVEIRA, Professor do Magistério Superior**, em 01/10/2022, às 10:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



Documento assinado eletronicamente por **THAÍS SOARES FARNESI DE ASSUNÇÃO, Usuário Externo**, em 05/10/2022, às 19:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



Documento assinado eletronicamente por **CAMILA BOTELHO MIGUEL, Usuário Externo**, em 06/10/2022, às 10:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



Documento assinado eletronicamente por **CARLOS ANTONIO TRINDADE DA SILVA DA SILVA, Usuário Externo**, em 06/10/2022, às 11:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0834142 e o código CRC C83CA8AB.

Dedico este trabalho a Deus, criador de tudo, o que por ventura nos permite descobrir sobre este maravilhoso mundo que nos presenteou e a família que recebi de presente Dele.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha esposa Karlla Kristinna e meus filhos Maria Luiza e Henrique, desculpas pelas viagens e ausências e obrigado por sempre estarem presentes nas minhas voltas com alegria no olhar.

Ao meu orientador e professor Dr. Siomar Castro Soares, obrigado pela confiança depositada em uma pessoa que havia terminado o seu mestrado há 12 anos, agradeço grandemente pela oportunidade e pela disponibilidade.

Ao meu coorientador e professor Dr. Wellington Francisco Rodrigues por ter confiado em minha vontade e ter aberto os caminhos para que tudo ocorresse. Continue sendo essa pessoa diferenciada com um coração imenso, obrigado meu irmão.

Aos professores da Universidade de Rio Verde, Marlana Barbosa Carrijo de Carvalho, Luiz Fernando Veloso Fávero, Karlla Kristinna Almeida Medeiros e Hindenburg Guimarães Cruvinel da Costa, pela ajuda imprescindível nas fases de coleta de dados bem como na interpretação dos mesmos. Assim também agradeço à coordenação da clínica escola de odontologia, pela autorização e disponibilidade do espaço.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas e seus professores pela oportunidade de aprendizado e desenvolvimento profissional. Especialmente aqueles que estiveram presentes em todas as etapas importantes, desde o processo de seleção até a hoje.

À Elisabete Perez Caramori Ambrósio, secretária do programa, por sua prestatividade, alegria e bom papo.

À Universidade de Rio Verde-UniRV pela dispensa de minhas atividades durante o período inicial do curso, período de dedicação às viagens semanais, que sem a mesma seria impossível a sua realização.

Ao professor Marcelo Henrique Napimoga pela disponibilização do laboratório de microbiologia da Faculdade São Leopoldo Mandic, bem como à profissional técnica Pollyanna Tombini Montaldi Pavini pela prestatividade.

Aos professores Tony de Paiva Paulino e Javier Emilio Lazo-Chica pelos conhecimentos compartilhados e pelo acesso aos seus respectivos laboratórios bem como pelo compartilhamento de materiais necessários para diversas fases da coleta de dados.

“Viver e não ter a vergonha de ser feliz, cantar e cantar a
beleza de ser um eterno aprendiz.”

Luiz Gonzaga do Nascimento Júnior, “Gonzaguinha”, (1982)

RESUMO

O microbioma oral desempenha papel ativo na saúde oral e o mesmo sofre consideráveis mudanças em alterações de condições sistêmicas, bem como é determinante no percurso de várias doenças. Esse trabalho buscou realizar um levantamento do microbioma oral de um ambiente específico, o sulco gengival, de quatro grupos de participantes voluntários a fim de estabelecer uma relação entre condições de saúde específicas e suas respectivas interferências na distribuição e predomínio dos diferentes gêneros e espécies de bactérias presentes, bem como identificar possíveis biomarcadores taxonômicos e funcionais para Diabetes Mellitus tipo 2 e periodontite. O fluido crevicular gengival foi coletado de 42 participantes que foram alocados em 4 grupos “Saudáveis (S)”, “Diabéticos (D)”, “Periodontite (P)”, “Diabéticos/Periodontite (DP)”. O sequenciamento do amplicon 16s rRNA foi realizado e utilizado o pipeline EzBioCloud para determinar o perfil taxonômico do microbioma, para a aferição das diversidades alfa ($D\alpha$) e beta ($D\beta$) e para predição de biomarcadores taxonômicos (BT) e funcionais (BF) utilizando a análise discriminante linear do tamanho do efeito (LEfSe). Espécies bacterianas como *Fusobacterium nucleatum group* (22,09% (S), 19,92% (D) e 10,34% (DP)) e *Porphyromonas gingivalis* (15,82% (P)) apresentaram maiores abundâncias relativas. Para ($D\alpha$) especificamente quanto a riqueza de espécies, resultados estatisticamente significativos foram encontrados entre: (S) *versus* (P) com maior riqueza para o grupo (S) (Jackknife ($p=0,050$)); (D) *versus* (P), com maior riqueza para o grupo (D) (Jackknife ($p=0,050$)); (P) *versus* (DP) com maior riqueza para o grupo (DP) (ACE ($p=0,050$), Chao 1 ($p=0,050$), Jackknife ($p=0,050$)). Quanto a diversidade de espécies, resultados estatisticamente significativos foram encontrados quando comparados os grupos (P) *versus* (DP), com maior diversidade para o grupo (DP) (NPSannon ($p=0,050$), Shannon ($p=0,050$), Simpson ($p=0,050$) e Phylogenetic Diversity ($p=0,050$). Para a ($D\beta$) não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Como (BT) as espécies *Neisseria perflava*, *Porphyromonas gingivalis*, *Veillonella atypica*, dentre outras, foram mais abundantes nos grupos (D), (P) e (DP) respectivamente. As vias KEEG “*ko03010-Ribosome*” “*ko02040-Flagellar assembly*” e “*ko01100-Metabolic pathways*”, dentre outras, foram mais abundantes respectivamente nos grupos (D), (P) e (DP). Para todos os grupos, o perfil taxonômico do microbioma foi alterado e a presença da bactéria *Porphyromonas gingivalis* nas amostras do grupo (D) sugere que a doença é capaz de alterar o microbioma e predispor ao desenvolvimento da periodontite. Pesquisas com amostras maiores, bem como com participantes em vários estágios de evolução das doenças são necessárias.

Palavras-chave: Microbioma humano, microbioma oral, periodontite, diabetes mellitus biomarcador taxonômico, biomarcador funcional, fluído crevicular gengival,

ABSTRACT

The oral microbiome can play an active role in oral health and it suffers considerable changes in systemic conditions, as well as it is not a determinant of diseases. This work sought to carry out a survey of the oral microbiome of a specific environment, the gingival sulcus, of four groups of voluntary participants in order to establish a relationship between specific health conditions and their respective interference in the distribution and predominance of different genera and species of bacteria. present, as well as to identify possible taxonomic and functional biomarkers for type 2 Diabetes Mellitus and periodontitis. Gingival crevicular fluid was collected from 42 participants who were allocated into 4 groups “Healthy (H)”, “Diabetics (D)”, “Periodontitis (P)”, “Diabetics/Periodontitis (PD)”. The sequencing of the 16s rRNA amplicon was performed and the EzBioCloud pipeline was used to determine the taxonomic profile of the microbiome, to measure alpha (α D) and beta (β D) diversities and to predict taxonomic (TB) and functional (FB) biomarkers using linear discriminant effect size analysis (LEfSe). Bacterial species such as *Fusobacterium nucleatum* group (22.09% (H), 19.92% (D) and 10.34% (DP)) and *Porphyromonas gingivalis* (15.82% (P)) showed higher relative abundances. For (α D) specifically regarding species richness, statistically significant results were found between: (H) versus (P) with greater richness for the group (H) (Jackknife ($p=0.050$)); (D) versus (P), with greater richness for group (D) (Jackknife ($p=0.050$)); (P) versus (DP) with greater richness for the (DP) group (ACE ($p=0.050$), Chao 1 ($p=0.050$), Jackknife ($p=0.050$)). As for species diversity, statistically significant results were found when comparing the groups (P) versus (DP), with greater diversity for the group (DP) (NPS Shannon ($p=0.050$), Shannon ($p=0.050$), Simpson ($p=0.050$) and Phylogenetic Diversity ($p=0.050$)). For a (β D) no statistically significant differences were found between the groups. As (TB) the species *Neisseria perflava*, *Porphyromonas gingivalis*, *Veillonella atypica*, among others, were more abundant in groups (D), (P) and (DP) respectively. The KEEG pathways “*ko03010-Ribosome*” “*ko02040-Flagellar assembly*” and “*ko01100-Metabolic pathways*”, among others, were more abundant in groups (D), (P) and (DP) respectively. For all groups, the taxonomic profile of the microbiome was altered and the presence of the bacterium *Porphyromonas gingivalis* in the samples from group (D) suggests that the disease is capable of altering the microbiome and predisposing to the development of periodontitis. Research with larger samples, as well as with participants at various stages of disease evolution, is necessary.

Keywords: Human microbiome, oral microbiome, periodontitis, diabetes mellitus, taxonomic biomarker, functional biomarker, gingival crevicular fluid.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BT – Biomarcadores Taxonômicos
- BF – Biomarcadores Funcionais
- PTM – Perfil taxonômico do microbioma
- D α – Diversidade alfa
- D β – Diversidade beta
- WGS - Whole Genome Sequencing (Sequenciamento completo do genoma)
- LEfSe - Linear discriminant analysis Effect Size (
- AR – Abundância relativa
- DNA – Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
- et al. – do latim “e outros”
- RNA – Ribonucleic acid (ácido ribonucleico)
- Blast - Basic Local Alignment Search Tool (Ferramenta básica de busca de alinhamento local)
- NGS - Next Generation Sequencing (Sequenciamento de próxima geração)
- rRNA – RNA ribossomal
- V1 – Região hipervariável 1
- V9 - Região hipervariável 9
- V3 – Região hipervariável 3
- V4 - Região hipervariável 4
- PCR – Polymerase chain reaction (Reação em cadeia de polimerase)
- DM – diabetes mellitus
- DMT2 – diabetes mellitus tipo 2
- FPG - fasting plasma glucose (Exame de glicemia em jejum)
- EUA – Estados Unidos da América
- U\$ - dólar
- DCNT - doenças crônicas não transmissíveis
- TME - taxa de mortalidade específica
- CID10 – Classificação internacional de doenças (10^a edição)
- AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida
- CAL - perda de inserção clínica
- CEJ - junção cimento-esmalte
- In silico* – do latim “obtido por uma simulação computacional”
- DANTs - Doenças e agravos não transmissíveis

SRP - raspagem e alisamento radicular

IL-1 β – interleucina 1 beta

GLP1 - peptídeo 1 semelhante ao glucagon

PG - Porphyromonas gingivalis

Versus – do latim “contra”

AR - artrite reumatóide

LES - lúpus eritematoso sistêmico

DCA - doença cardiovascular aterosclerótica

DCC - doença cardíaca coronária

DP – doença periodontal

DAP - doença arterial periférica

DVP - doença vascular periférica

PIP - perda de inserção periodontal

DA - doença de Alzheimer

CCL - comprometimento cognitivo leve

DF - declínio cognitivo subjetivo

Kgp -lisina-gengivina

RgpA- arginina-gengivina A

RgpB - arginina-gengivina B

LISTA DE SÍMBOLOS

ml – mililitro

% – por cento, porcentagem

< – menor que

> – maior que

m - metros

Kb – quilobase

nm – nanômetros

bp – pares de bases

h – horas

g – gramas

β – beta

α - alfa

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1.1 INTRODUÇÃO.....	16
1.2 MICROBIOTA E MICROBIOMA DA CAVIDADE ORAL	17
1.3 DIABETES MELLITUS TIPO 2	26
1.4 PERIODONTITE	29
1.5 MICROBIOMA ORAL E DOENÇAS SISTÊMICAS	32
REFERÊNCIAS	40
APÊNDICE A – Artigo Submetido.....	54
APÊNDICE B – Comprovante de submissão	99

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 INTRODUÇÃO

A cavidade oral pode ser considerada um dos locais mais exposto de nosso organismo, com contato quase direto com o ambiente externo. Nesta cavidade estão presentes estruturas relacionadas aos processos mais essenciais a sobrevivência do ser vivo: o ato de se alimentar e sentir o sabor do alimento.

Também implicada com outras funções fisiológicas, a cavidade oral possui um complexo arranjo histológico, bem como abriga diversas estruturas com uma grande heterogeneidade de tipos celulares. Esta complexidade compreende os diversos microambientes (ou nichos ecológicos) que podem ser notados e citados, como a superfície da língua, as gengivas, sulcos gengivais, dentes, dentre outros (GASNER; SCHURE, 2020).

Toda esta complexidade associada a uma grande exposição, disponibilidade de nutrientes e facilidade para fixação faz com que este ambiente seja altamente favorável ao crescimento e diversificação de microrganismos (TORTORA; FUNK; CASE, 2010). Os primeiros, concretizam a sua colonização já no nosso nascimento, passando por diversos arranjos ao longo das várias fases de nossa vida, processo denominado sucessão microbiana (TORTORA; FUNK; CASE, 2010; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2016; LIF HOLGERSON et al., 2011; DEWHIRST et al., 2010; TEUGHELS; QUIRYNEN; JAKUBOVICS, 2011).

A relação entre a diversidade microbiana e a proteção contra processos patológicos locais como doenças do periodonto vem sendo bem solidificada ao longo dos anos com grande produção de conhecimento (BACHTIAR et al., 2021). Neste mesmo sentido, vem sendo demonstrado também a relação entre disbiose com processos patológicos sistêmicos e como via de mão dupla, a influência de doenças sistêmicas na capacidade do indivíduo em manter uma perfeita saúde bucal (KAAN, KAHHAROVA, ZAURA, 2021; SAMPAIO-MAIA et al., 2016; BARUTTA et al., 2022).

Neste sentido, considerando os diversos trabalhos existentes sobre microbioma oral e também os avanços nas tecnologias de levantamento e classificação, como os sequenciamentos de última geração associados as oportunidades proporcionadas pela bioinformática, se faz necessário desvendar o perfil desta microbioma em grupos diferentes de indivíduos, bem como buscar particularidades nas suas relações (SOLDEN; LLOYD; WRIGHTON, 2016; MARCHESI, RAVEL, 2015; QUINCE, et al., 2017).

Considerando também que o microbioma oral desempenha papel ativo na manutenção da saúde do periodonto e o mesmo sofre consideráveis alterações em condições sistêmicas (BACHTIAR et al., 2021; BARUTTA et al., 2022). E que os trabalhos envolvendo o levantamento do microbioma em diversos nichos do corpo humano vem crescendo significativamente, já que este é peça chave em diversos processos patogênicos (URSELL et al., 2012; CHO; BLASER 2012; SHI et al., 2020).

Esse trabalho buscou realizar um levantamento do microbioma oral de um ambiente específico, o sulco gengival, de quatro grupos de participantes voluntários, para buscar estabelecer uma relação entre condições de saúde específicas e suas respectivas interferências na distribuição e predomínio dos diferentes gêneros e espécies de bactérias presentes, bem como identificar possíveis biomarcadores taxonômicos e funcionais para Diabetes *Mellitus* tipo 2 e periodontite.

1.2 MICROBIOTA E MICROBIOMA DA CAVIDADE ORAL

A quantidade de lugares em que possa ser descrita a presença de microrganismos é um tanto surpreendente. Os avanços na capacidade de observação fizeram com que seja unânime o entendimento que em praticamente todos os ambientes sejam encontrados microrganismos adaptados (TORTORA; FUNK; CASE, 2010).

No nosso organismo a colonização por microrganismos começa ao nascimento, portanto, no ambiente uterino, somos livres desta presença (TORTORA; FUNK, CASE; 2010). Situação confirmada por Sterpu et al. (2021) que não encontraram nenhuma evidência para apoiar a existência de um microbioma placentário. Os mesmos autores afirmam que achados acidentais de espécies bacterianas podem ser devidos à contaminação.

Em contraponto a este entendimento, Wu et al. (2021) demonstraram em seus resultados que pode haver correlação entre o microbioma oral materno e neonatal por meio do líquido amniótico e da placenta. Fischer et al. (2019) afirmam que os estudos de sequenciamento demonstram a presença de organismos derivados do microbioma oral na placenta, desta forma os microbiomas placentários e orais podem desempenhar um papel nos resultados adversos da gravidez associados a doença bucal como a periodontite.

Aceitando que a colonização se inicia ao nascimento, com o passar dos anos e o desenvolvimento de mudanças relacionadas a hábitos e habilidades, um quantitativo heterogêneo de microrganismos são introduzidos ao nosso organismo proveniente do meio ambiente, ficando evidente que o conjunto destes é complexo e sofre influências ambientais e

neste sentido, a formação da placa dentária, por exemplo, é afetada pelo tipo de parto (vaginal ou cesariana), pelo aleitamento materno ou artificial e pela proximidade com irmãos e animais de estimação (TORTORA; FUNK; CASE, 2010; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2016; LIF HOLGERSON et al., 2011; DEWHIRST et al., 2010; TEUGHELIS; QUIRYNEN; JAKUBOVICS, 2011).

Vários locais do corpo possuem características particulares que facilitam a sua colonização por microrganismos, dentre estas pode-se citar as nutricionais, físicas e químicas, e os locais onde estes fatores são mais benéficos são o tubo gastrointestinal, as vias aéreas ou respiratórias, vias urinárias, órgãos de reprodução, olhos e pele (TORTORA; FUNK; CASE, 2010; ZHANG et al., 2018).

Possuímos bactérias em nosso organismo na mesma ordem do número de células (SENDER; FUCHS; MILO, 2016). Por definição, microbiota ou comunidade microbiana é o conjunto de microrganismos que juntos, ocupam um determinado nicho em nosso organismo (MARCHESI; RAVEL, 2015; BERG et al., 2020). De acordo com Tortora, Funk e Case (2010, p.18) podemos definir como microbiota normal, “o conjunto destes microrganismos que estabelecem uma colonização permanente com a particularidade de que em condição normais, não são causadores de doenças”.

O termo microbiota propriamente dito foi introduzido pelo médico e ganhador do prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1958, Joshua Lederberg (1925-2008). O importante pesquisador definiu como “comunidade ecológica de microrganismos comensal, simbiótica e patogênica que, literalmente, partilha o nosso corpo e que funciona como um determinante da saúde e da doença” (HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM, 2012, p. 1).

Embora muitas vezes entendidos e utilizados como sinônimos, o termo “microbioma” deve ser entendido em um sentido mais amplo, complexo e ecológico, tratando-se do conjunto de microrganismo (bactérias, vírus, fungos e arqueas) que habitam diferentes locais do organismo, sua relação entre si e com o hospedeiro, buscando enfatizar as relações normais e a disbiose neste microambiente e suas implicações para a saúde humana, ou seja, devemos incluir todos os elementos estruturais, genomas, metabólitos e condições físico-químicas ambientais (BAQUERO; NOMBELA, 2012; BERG et al., 2020; MARCHESI; RAVEL, 2015; HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM, 2012). Portanto, não se tratando de sinônimos, a microbiota deve ser entendida como o conjunto inteiro de microrganismos em um nicho específico, como o intestino humano ou o solo, já o microbioma seria todo o material genético de uma microbiota (MARCHESI; RAVEL, 2015).

O termo “Human Microbiota” lançado na Pubmed/National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information, reporta um total de 22 publicações em 1991, 37 em 1999, em contraste com as 9.578 publicações do ano de 2020, 9.795 publicações do ano de 2021 e nos sete primeiros meses de 2022 um total de 5.072 publicações, e destas a maioria relacionadas a microbiota intestinal (PUBMED, 2022).

Ainda em um contexto recente, e surgindo com as possibilidades advindas dos sequenciamentos de nova geração e da bioinformática, outros termos vêm ganhando destaque na literatura. Dentre estes podem ser citados, a metagenômica que é “o estudo do material genético recuperado diretamente de amostras de um determinado ambiente” (DUDHAGARA et al., 2015, p. 297), e metatranscriptoma definida como “o estudo da composição taxonômica e funções ativas de uma comunidade microbiana complexa” (DUDHAGARA et al., 2015, p. 297).

O levantamento da microbiota de qualquer nicho corporal cresceu significativamente em número de pesquisas sobre o tema e qualitativamente graças ao desenvolvimento de métodos independentes de cultivo e plataformas de sequenciamento de última geração, o que determinou o desenvolvimento de milhares de projetos de metagenômica assistida por gene marcador e shotgun, compreendendo milhões de amostras disponíveis no domínio público (DUDHAGAR et al., 2015; KAAAN; KAHHAROVA; ZAURA, 2021).

Visando aprofundar o entendimento sobre o impacto do microbioma na saúde e nas doenças humanas, o Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (U.S. Department of Health & Human Services) coordenou duas etapas de um projeto denominado Projeto Microbioma Humano 1 e 2 (Human Microbiome Project - HMP₁ e HMP₂). Em 2008, no HMP₁ foram documentadas, por sequenciamento do gene 16S rRNA, as comunidades microbianas de 300 indivíduos saudáveis de 5 nichos corporais (vias nasais, cavidade oral, pele, trato gastrointestinal e trato urogenital), além da realização do sequenciamento do genoma inteiro shotgun (WGS) para determinação de vias metabólicas (TURNBAUGH et al., 2007).

A maioria dos trabalhos científicos envolvendo o tema “Microbiota Humana” estão relacionados com pesquisas envolvendo a microbiota intestinal (TURNBAUGH et al., 2007). Levantamento realizado em apenas uma base de dados, como a Pubmed, revela que a quantidade de artigos publicados nos últimos 10 anos, envolvendo microbiota intestinal é 70 vezes maior quando se compara as chaves de busca “oral microbiota and oral microbiome” com a chave “gut microbiota and gut microbiome”. Outra constatação importante é que nos últimos 6 anos o termo “microbioma” encontra-se em maior utilização quando comparado com o termo “microbiota”.

Dentre os ambientes corporais a cavidade oral e sua microbiota normal são de interesse do conhecimento científico. Os diferentes nichos da cavidade oral (língua, bochechas, dentes, gengivas e sulco gengival) possuem características físicas e químicas favoráveis ao desenvolvimento de comunidades bacterianas como: umidade abundante, calor e a presença constante de alimentos, embora, haja mecanismos fisiológicos de controle destas comunidades, como, por exemplo, a produção constante de saliva com propriedades antibióticas (TORTORA; FUNK; CASE, 2010).

Já descrito pelo inventor do microscópio, Anton van Leeuwenhoek em 1683, o microbioma oral de cada pessoa é bastante distinto (MOSADDAD, 2019). O conjunto de condições favoráveis determina que a microbiota oral seja uma parte importante de nossa microbiota corporal, sendo que mais de 700 espécies de bactérias compõe este conjunto e desenvolvem relações e meios de sobrevivência apenas encontrados no ambiente oral, como é o caso de biofilmes (ARWEILER, 2016). Especificamente na placa subgengival cerca de 500 espécies de bactérias são encontradas (PASTER et al., 2001).

Este microbioma sofre alterações relacionadas a gênero, raça, idade e localização geográfica do hospedeiro (DURAN-PINEDO, 2020). Numerosos fatores biológicos e culturais influenciam as comunidades microbianas (microbiota) deste nicho, incluindo dieta, meio ambiente, higiene, fisiologia, estado de saúde, genética e estilo de vida (WEYRICH, 2021).

A aquisição e o estabelecimento da microbiota oral ocorrem em um processo dinâmico ao longo de vários estágios e envolvem interações próximas e contínuas com o hospedeiro e seu ambiente (KAAN; KAHHAROVA; ZAURA, 2021). A influência ambiental também é um importante fator de variabilidade entre espécies bacterianas do ambiente oral. Estudo realizado por Du et al. (2014) analisaram as diferenças entre a microbiota oral de gêmeos monozigóticos e dizigóticos, e demonstrou que fatores ambientais podem ter um efeito mais forte na constituição da microbiota oral em comparação com os fatores genéticos.

Vários fatores ambientais e comportamentais podem alterar o microbioma da cavidade oral. Hao et al. (2021) demonstraram que tanto a genética quanto o meio ambiente influenciam significativamente a composição do microbioma oral, propondo novos estudos para explorar a relação entre diferentes grupos étnicos e de fatores ambientais.

Dentre estes fatores pode ser citada a altitude. Pesquisa conduzida por Liu et al. (2021), demonstrou que a diversidade alfa da microbiota oral diminui com a altitude, ocorrendo exatamente o contrário com a diversidade beta. Uma análise LEfSe revelou que o biomarcador microbiano oral do grupo de alta altitude (<3650m) foi *Streptococcus*, e o biomarcador do grupo de ultra-alta altitude (>4000m) foi *Prevotella* (LIU et al., 2021).

O hospedeiro é claramente ativo na formação da composição do microbioma oral, apenas algumas das muitas espécies bacterianas do ambiente são capazes de colonizar a cavidade oral humana (MUKHERJEE et al., 2021). Um exemplo disso, vem do tipo de nutrição e alimentação utilizada e a constatação de que a mesma pode modular a microbiota dos biofilmes orais (VACH et al., 2021).

Murtaza et al. (2019) concluíram que atletas de elite, após o consumo de dieta cetogênica com baixo teor de carboidrato e alto teor de gordura, apresentaram alterações na microbiota oral. Os autores afirmaram que as abundâncias relativas de *Haemophilus*, *Neisseria* e *Prevotella spp.* diminuíram, e a abundância relativa (AR) de *Streptococcus spp.* foi aumentada, o que sugere que a dieta pode induzir alterações na microbiota oral.

Hábitos, como fumar, podem alterar a microbiota e o microbioma, pois facilitam a aquisição e colonização precoce de patógenos periodontais, resultando em uma microbiota caracterizada e rica em patógenos (JIANG; ZHOU; CHENG, 2020). Al Kawas et al. (2021) detectaram que o microbioma subgingival de fumantes estava alterado tanto em indivíduos com periodontite leve quanto sem periodontite, provavelmente tornando-os mais propensos as doenças periodontais graves.

Vários filos e gêneros são encontrados na cavidade oral, destes merecem destaque, o filo *Actinobactéria*, com os gêneros *Actinobaculum*, *Atopobium*, *Cryptobacterium*, *Kocuria*, *Olsenella*, *Parascardovia*, *Scardovia*, *Slackia* e *Tropheryma*; o filo *Bacteroidetes*, com os gêneros *Bergeyella*, *Prevotella* e *Tannerella*; o filo *Firmicutes*, com gêneros *Abiotrophia*, *Anaerococcus*, *Aneroglobus*, *Bulleidia*, *Catonella*, *Dialister*, *Filifactor*, *Parvimonas* dentre outros; o filo *Protobacteria*, com os gêneros, *Lautropia* e *Suttonella* e o filo *Synergistetes*, com os gêneros *Jonquetella* e *Pyramidobacter* (ARWEILER; NETUSCHIL, 2016).

A dificuldade na determinação da microbiota oral considerada normal apresenta-se como um grande desafio, devido às diversas condições existentes, como elevado número de espécies, com algumas presentes em pequeno número, mas também pelo grande número de espécies anaeróbicas obrigatórias. Somado a grande sensibilidade deste nicho e as condições ambientais externas e internas (ARWEILER; NETUSCHIL, 2016).

Considerando que o microbioma oral desempenha papel ativo na manutenção da saúde do periodonto e o mesmo sofre consideráveis alterações em condições sistêmicas (BACHTIAR et al., 2021). E ainda, que os trabalhos envolvendo o levantamento da microbiota normal em diversos nichos do corpo humano vem crescendo de forma significativa e que em muitos ambientes entre 0,1 e 1% dos microrganismos são cultiváveis (URSEL et al., 2012; CHO; BLASER, 2012; SOLDEN; LLOYD; WRIGHTON, 2016). Torna-se necessário

compreendermos um pouco mais sobre as técnicas de identificação e levantamento, independente de cultivo, que possibilitam realmente a identificação da microbiota e do microbioma de um nicho escolhido, considerando ainda que tecnologias multiômicas, agora fornecem informações detalhadas sobre as atividades microbianas no ambiente (BERG et al., 2020).

O avanço das ferramentas moleculares, da capacidade de sequenciamento e a evolução das ferramentas de bioinformática potencializaram a identificação de microrganismos até então pertencentes a chamada “matéria escura” e aproximadamente 99% dos microrganismos não-cultiváveis dos diversos ambientes (SOLDEN; LLOYD; WRIGHTON, 2016). Adotamos aqui, o termo “Metagenômica” para o sequenciamento do genoma presente em uma amostra, decorrente do sequenciamento do DNA total através de “Shotgun”, e o termo “Metataxonômica” para o sequenciamento de um gene específico, produto de uma amplificação (amplicons) (MARCHESI, RAVEL, 2015; QUINCE, et al., 2017).

A Genômica, como disciplina científica, tem o sequenciamento de DNA como sua tecnologia central e o sequenciamento maciço paralelo tem se mostrado revolucionário, mudando o paradigma da genômica para abordar questões biológicas em uma escala ampla do genoma (KOBOLDT et al., 2013). Sequenciadores de DNA são equipamentos que leem uma amostra de DNA, determinam a sequência de nucleotídeos e posteriormente geram um arquivo eletrônico com esta sequência (GRIFFITHS, 2012).

Considerado a primeira geração de sequenciadores, o sequenciamento de DNA de Sanger (sequenciamento de DNA com inibidores de terminação de cadeia) foi o pioneiro em 1977; estes sequenciadores eram capazes de produzir leituras com menos de um quilobase (kb) de comprimento (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977; HEATHER; CHAIN. 2016; SHENDURE et al., 2017).

Após melhorias no sequenciamento de Sanger, os primeiros sequenciadores automáticos e por eletroforese capilar foram, respectivamente, o ABI-370 e o ABI-3700, ambos produzidos pela Applied Biosystems. Esses sequenciadores permitiam o sequenciamento simultâneo de centenas de amostras, sendo usados no projeto “Genoma Humano” (HEATHER; CHAIN. 2016).

Em conjunto com os avanços e incrementos das capacidades de leituras, na década de 80, foi necessário a criação de bancos de dados para armazenamento de todas as informações produzidas, e neste contexto, repositório de dados como GenBank, assim como ferramentas de pesquisa como o BLAST foram desenvolvidas (SHENDURE et al., 2017).

A nova geração de sequenciamento “Next Generation Sequencing -NGS” ou segunda geração de sequenciadores veio com o objetivo principal de reduzir custos, aumentar o rendimento e a velocidade do processo (MCGINN; GUT, 2013). Os mesmos autores afirmam que “as principais características do sequenciamento de 2ª geração são o uso de muitos modelos clonais em paralelo e um processo de determinação de sequência usando replicação enzimática” (MCGINN; GUT, 2013, p. 2).

Ainda neste contexto, as plataformas de sequenciamento de 2ª geração são iguais entre si, pois realizam o processamento paralelo massivo de fragmentos de DNA e se diferenciam pelas diferentes formas de adições de bases e leituras dos dados produzidos. Estas adições de bases podem ser feitas usando polimerização de DNA ou ligação e a visualização é por quimioluminescência (química de pirosequenciamento usada no instrumento Roche FLX), por fluorescência (Illumina e LifeTechnologies 5500) ou através de alterações de pH (no instrumento IonTorrent) (MCGINN; GUT, 2013).

De acordo com Mcginn e Gut (2013), o sequenciamento sem nenhum tipo de sistema enzimático utilizado para replicação e com a leitura da sequência de DNA ou RNA sendo realizada diretamente sob moléculas individuais e em tempo real caracteriza a 3ª geração de sequenciadores. Um exemplo desta tecnologia é o Nanopore, um sequenciador de molécula única e de leitura longa que pode sequenciar diretamente RNA e DNA (XU; SEKI, 2020; SUN et al., 2020). Neste contexto, existem dispositivos portáteis como o MinION[®], dispositivos de bancada como o GridION[®] e dispositivos modulares como PromethION[®] (OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES, 2022).

Em procariotos, o gene rRNA 16S é a base para estudos filogenéticos moleculares, sendo a sequência de seus nucleotídeos muito conservada para alinhamento preciso e mantida constante nas diversas linhas filogenéticas, o que torna possível a detecção de mudanças evolutivas, além de variação suficiente para análises filogenéticas e mais recentemente a classificação taxonômica de espécies por meio do sequenciamento do seu gene “rRNA 16S” utilizado em uma quantidade significativa de estudos (JUNQUEIRA; SILVA FILHO, 2012; TURNBAUGH et al., 2007; MIZRAHI-MAN; DAVENPORT; GILAD, 2013; JOHNSON et al., 2019; GAO et al., 2021).

Os ribossomos são estruturas com cerca de 20 a 30 nm de diâmetro, portanto, são organelas celulares pequenas presentes tanto em eucariotos quanto em procariotos, constituído principalmente de RNA ribossomal (rRNA) e proteínas (cerca de 2/3) (DE ROBERTIS; HIB, 2017; ALBERT et al., 2017). Formado sempre por duas subunidades, uma menor (30S procariotos e 50S eucariotos) e outra maior (50S procariotos e 60S eucariotos) (ALBERT et al.,

2017). Especificamente em procariotos, a subunidade menor é formada pelo rRNA denominado 16s com um número aproximado de 1542 nucleotídeos. (JUNQUEIRA; SILVA FILHO, 2012).

Com a utilização por meio de sequenciamento do gene “rRNA 16S” torna-se possível determinar posições filogenéticas de comunidades bacterianas. (LUDWIG, et al., 1997; KUSKE et al., 1999; HENTSCHEL, et al., 2002). Mizrahi-Man, Davenport e Gilad, (2013) afirmam que “os primeiros estudos que sequenciaram todo o gene 16S rRNA e hoje com tecnologias de sequenciamento massivamente paralelas, produtoras de leituras curtas, o foco mudou para o sequenciamento de sub-regiões mais curtas do gene em grande profundidade”. Embora, com a viabilidade financeira das tecnologias de terceira geração, o sequenciamento de alto rendimento do gene 16S completo está se tornando comum (JOHNSON et al., 2019).

Para a diversidade bacteriana são utilizados iniciadores para diferentes regiões do gene rRNA 16S, que permitem a classificação taxonômica a nível de espécie (LUNDBERG et al., 2013). O gene rRNA 16S (com aproximadamente 1500bp) é universalmente distribuído e subdividido em 9 regiões diferentes, V1 a V9 (com hipervariabilidade genética). A presença de regiões variáveis permite diversificação suficiente para fornecer uma ferramenta para a classificação, as quais estão diretamente relacionadas à taxonomia microbiana. Análises mais recentes de diversidade, apontam que as regiões V3 e V4 são mais representativas para amostras ambientais (WALTERS et al., 2016; VĚTROVSKÝ; BALDRIAN, 2013; GAO et al. 2021).

Diferentemente de outros genes, o gene rRNA 16S pode estar presente em um único genoma, com várias cópias, sendo que este número pode chegar até 15 e se correlaciona diretamente com o tamanho do genoma (KLAPPENBACH et al., 2001). Esta relação não foi confirmada pelo trabalho de Větrovský e Baldrian (2013), porém os autores descrevem que a variabilidade no número de cópias entre as espécies é alta, porém naquelas com altos números de cópias de rRNA 16S, eles parecem ser conservados no nível de espécie.

Na análise de bioinformática para fins de montagens de perfis taxonômicos do microbioma, os algoritmos utilizados devem ser capazes de prever e corrigir o número de cópias do gene rRNA 16S, a fim de evitar que este dado influencie na distribuição relativa dos táxons detectados e em análises de alfa e beta diversidade (LANGILLE et al., 2013). As sequências 16S amplificadas por PCR têm sido tipicamente agrupadas com base na similaridade para gerar unidades taxonômicas operacionais (OTUs) e sequências OTU representativas em comparação com bancos de dados de referência para inferir a taxonomia provável (JOHNSON et al., 2019).

O sequenciamento de amplicons de marcadores filogenéticos 16s, como já citado, possui um baixo custo e banco de dados onde a maioria das espécies conhecidas já foram amostradas,

sendo que a principal desvantagem é que apenas perfis taxonômicos podem ser obtidos, diferentemente do sequenciamento por “Shotgun” ou “Shotgun sequencing” “whole genome sequencing (WGS), que permitem uma caracterização mais robusta do microbioma, e além do perfil taxonômico, também o perfil funcional pode ser alcançado (SANSCHAGRIN, YERGEAU, 2014; TESSLER et al., 2017; LAUDADIO et al., 2018; RANJAN et al., 2015).

Mesmo com rendimentos relacionados a resultados abaixo daqueles obtidos por sequenciamento WGS, o sequenciamento do amplicon 16S vem sendo amplamente utilizado, seus bancos de dados aprimorados, os custos reduzidos e as aplicações clínicas comprovadas (GANTUYA et al., 2021; MOON et al., 2019).

Com relação à caracterização do perfil funcional do microbioma é possível realizar uma predição deste perfil a partir do perfil taxonômico levantado. Esta predição é possível relacionando dados de genes marcadores e um banco de dados de genomas de referência (LANGILLE et al., 2013).

Após o levantamento do perfil taxonômico de uma microbiota, outras mensurações ou medições são possíveis visando aferir a sua ecologia e diversidade de espécies. Com esse fim podem ser aferidas a diversidade de espécies de unidades definidas “diversidade alfa” e as diferenças nas diversidades de composição entre áreas de diversidade alfa “diversidade beta” (MAGURRAN, 2019; FEDOR; ZVARÍKOVÁ, 2019).

A análise da diversidade alfa é o passo inicial, nesta são aferidas tanto riqueza quanto a diversidade de espécies. A riqueza de espécies é a contagem do número de espécies ou unidades taxonômicas operacionais (OTUs) presentes em uma área, sendo fortemente sensível ao esforço amostral e requer sempre padronização da amostra ou estimadores que corrijam e extrapolem a riqueza observada e buscam estimar a riqueza total por meio de uma amostra incompleta de uma comunidade biológica (WALTHER; MOORE, 2005).

Dentre estes estimadores de riqueza de espécies, existem aqueles baseados na abundância de espécies (CHAO 1 e ACE) e os baseados na incidência de espécies (CHAO 2, JACKKNIFE 1 E 2) (MAGURRAN, 2019; WALTHER; MOORE, 2005).

Para aferição da diversidade de espécies são utilizadas medidas de heterogeneidade e uniformidade, e estas são agrupadas em duas categorias, paramétricas (alfa da série logarítmica) e não-paramétricas (medida de uniformidade de Shannon e medida de dominância e uniformidade de Simpson) (MAGURRAN, 2019). A mesma autora afirma que o Índice de Simpson fornece uma boa estimativa da diversidade em tamanhos populacionais razoavelmente pequenos.

A beta diversidade é uma medida da diferença na composição de espécies entre duas ou mais amostras locais, ou entre amostras locais e regionais (KOLEFF; GASTON; LENNON, 2003). É uma medida de extensão com que duas ou mais unidades espaciais diferem entre si em composição de espécies e consiste, portanto, na determinação da diferença da diversidade entre dois ou mais locais, ou amostras (MAGURRAN, 2019). A mesma autora afirma que é necessário verificar o grau de similaridade ou dissimilaridade tanto em termos quantitativos quanto qualitativos.

Para fins de aferição da beta diversidade, alguns índices são comumente utilizados como: Jaccard distance (medida qualitativa de dissimilaridade da comunidade); Bray-Curtis distance (medida quantitativa de dissimilaridade da comunidade); Unweighted UniFracdistance (medida qualitativa de dissimilaridade da comunidade que incorpora relações filogenéticas entre as sequências) e weighted UniFracdistance (medida quantitativa de dissimilaridade da comunidade que incorpora relações filogenéticas entre as sequências) (KOLEFF, GASTON, LENNON, 2003; MAGURRAN, 2019).

1.3 DIABETES MELLITUS TIPO 2

Dentre os grandes problemas de saúde que afetam a humanidade, as doenças que possuem uma relação de causalidade direta com as mudanças de estilo de vida ganham uma importância substancial.

O diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) é um importante e crescente problema de saúde e a cada ano vem adquirindo novas proporções e aumentando significativamente a sua prevalência, que cresce com as mudanças impostas por uma transição demográfica exemplificada aqui pelo envelhecimento populacional mundial, por mudanças nos hábitos de vida, como o sedentarismo e uma transição epidemiológica significativa, com aumento da prevalência de obesidade e sobrepeso. Também é notória a existência de uma complexa interação entre fatores sociais, econômicos, demográficos, ambientais e genéticos (SBD, 2019; IDF, 2019; SAEED et al., 2019; WILLIAMS et al., 2020).

Diabetes mellitus é o termo coletivo para distúrbios metabólicos heterogêneos cujo principal achado é a hiperglicemia crônica, sendo a causa um distúrbio da secreção de insulina ou um distúrbio do efeito da insulina, ou geralmente ambos (PETERSMANN et al., 2019). Na atualidade, a classificação é realizada de acordo com sua etiologia, neste sentido, a Sociedade Brasileira de Diabetes através de suas diretrizes classifica em Diabetes tipo 1, tipo 2, gestacional

e outro tipos (SBD, 2019), sendo que o diabetes mellitus do tipo 2 (DMT2) representa mais de 90% dos casos (HOLMAN; YOUNG; GADSBY, 2019).

O DMT2 ocorre tanto pela resistência periférica à insulina quanto pela deficiência relativa da secreção de insulina pelas células beta, sendo a resistência a anormalidade fundamental (BARUTTA et al., 2022). O desenvolvimento da doença acontece quando a resposta natural do organismo se dá pelo aumento da secreção da insulina e não consegue compensar a resistência periférica gerando hiperglicemia (FORBES; COOPER, 2013).

Dados a Organização Mundial de Saúde mostram que mais de 420 milhões de pessoas no mundo são diabéticas, ou seja, quase 6% da população mundial, sendo esperado um aumento para 570 milhões em 2030 e 700 milhões em 2045 (HUNT et al., 2021). Em 2019, 1 em cada 11 pessoas na faixa etária entre 20 e 79 anos tinha diabetes, representando um total de 463 milhões de pessoas no mundo e ainda existe uma perspectiva de 51% no aumento de diagnósticos até 2045 (IDF, 2019). Dados atuais apontam que 537 milhões de adultos vivem com a doença hoje no mundo (IDF, 2021).

Dados dos EUA apontam, que em 2018, 34,2 milhões de pessoas de todas as idades, ou 10,5% da população dos EUA tinham diabetes, 34,1 milhões de adultos com 18 anos ou mais, ou 13,0% de todos os adultos nos EUA tinham diabetes (CDC, 2020).

Na América Latina, a prevalência de DMT2 varia de 8 a 13%, cerca de 40% desconhecem sua condição e em torno de 80% das pessoas com diabetes vivem em países de renda média e baixa, com quase nenhum acesso a tratamentos adequados (MOHAN et al., 2020; MANNE-GOEHLER et al., 2019).

Em relação a impactos econômicos em decorrência do aumento de diagnósticos e nova tendências de terapias, dados americanos apontam que os EUA passarão a gastar em torno de US\$622 bilhões com a doença (ROWLEY et al., 2017) e que US\$760 bilhões em gastos serão associados ao diabetes no planeta (WILLIAMS et al., 2020). Com o aumento da prevalência da doença ocorrendo em todos os países, independentemente de seu desenvolvimento econômico e social, preocupa o impacto econômico causado, pois este aumento é acompanhado do aumento da ocorrência de doenças associadas, refletindo em custos econômicos (HARDING et al., 2019).

O Brasil ocupa o 5º país no mundo com mais diabéticos em sua população. Considerando a faixa etária de 20 a 79 anos, estima-se 16,8 milhões de pessoas com diabetes. (IDF, 2019). No país, o monitoramento da doença é realizado pelo “Vigitel”, que pertence ao sistema de Vigilância de Fatores de Risco para doenças crônicas não transmissíveis (DCNT)

do Ministério da Saúde, e fornece estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica para doenças crônicas (BRASIL, 2020).

Dados de 2011 apontaram uma prevalência de diabetes autorreferidas de 5,6% entre pessoas maiores de 18 anos, 9,4% na faixa etária de 35 a 64 anos e de 18,6% para a faixa etária maior de 64 anos. Em 2018, o levantamento apontou uma prevalência de 24% na faixa etária maior de 64 anos. Dados referentes ao ano de 2019, quanto a indivíduos que referiram diagnóstico médico de diabetes, apontam que a frequência do diagnóstico médico de diabetes foi de 7,4%, sendo maior entre as mulheres (7,8%) do que entre os homens (7,1%), e que para a faixa etária de 65 anos ou mais esse número alcança 24% (BRASIL, 2020).

A taxa de mortalidade específica (TME) por DMT2 no Brasil, para o período de 2014 a 2019, vem apresentado uma tendência de elevação. Para o ano de 2019 a TME foi de 31,74 óbitos por 100 mil habitantes, sendo significativamente maior para o sexo feminino com 36,14 óbitos para 100 mil habitantes. TME significativamente maiores foram encontradas nas faixas etárias acima de 60 anos. O volume exagerado de declarações de óbitos para a categoria E14 do CID10 é um problema que merece atenção e deve ser corrigido (BRASIL, 2022).

A classificação mais atual da doença, adotada aqui pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), baseia-se em critérios adotados e publicados pela American Diabetes Association (2019). De acordo com estes critérios o diabetes pode ser classificado em: Diabetes tipo 1 (devido à destruição de células autoimunes, geralmente levando a deficiência de insulina); Diabetes tipo 2 (devido a uma perda progressiva da secreção adequada de insulina das células beta pancreáticas frequentemente no contexto da resistência à insulina); Diabetes mellitus gestacional (diabetes diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre de gravidez que não era claramente diabetes evidente antes da gestação) e tipos específicos de diabetes devido a outras causas, por exemplo, síndromes de diabetes monogênicas (como diabetes neonatal e diabetes de início na maturidade dos jovens - MODY), doenças do pâncreas exócrino (como fibrose cística e pancreatite) e medicamentos ou diabetes induzido por produtos químicos (como o uso de glicocorticoides, no tratamento de HIV/AIDS ou após o transplante de órgãos) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2019).

O diagnóstico da doença merece algumas atenções especiais devido ao grande número de diabéticos ou pré-diabéticos sem nenhum sintoma significativo. Segundo a SBD (2020 p. 18), “na maioria dos casos de pré-diabetes ou diabetes, a condição é assintomática e o diagnóstico é feito com base em exames laboratoriais”, sendo que dois exames são considerados padrão-ouro para o diagnóstico, a glicose plasmática, em jejum (FPG - fasting plasma glucose)

ou o valor de glicose plasmática de 2h (2h PG) durante um teste de tolerância à glicose oral de 75g (OGTT), ou critérios A1C.

1.4 PERIODONTITE

A cavidade oral é formada por diversas estruturas anatômica e tecidos com característica específicas e em conjunto, uma variedade de locais e nichos distintos que possuem características fisiológicas diferentes (temperatura, disponibilidade de nutrientes, exposição ao sistema imune e concentrações de oxigênio). Distinguem-se na cavidade oral, estruturas e locais como a mucosa alveolar, a gengiva, o sulco gengival, as papilas gengivais, os lábios, as bochechas, os palatos duro e mole, o assoalho da boca, a fossa tonsilar, as tonsilas palatinas, as superfícies da língua, além é claro dos dentes (MADANI, BERARDI, STOOPLER, 2014; ROSSI, 2017).

O sulco gengival é o espaço livre entre a gengiva e o dente (superfícies duras dos dentes e superfícies moles do epitélio do sulco gengival), sendo revestido por um epitélio sulcular que difere do epitélio oral pela ausência de queratina, portanto, é semipermeável, permitindo a passagem de líquidos e produtos metabólicos nos dois sentidos (ROSSI, 2017; FIORELLINI, KIM, CHANG, 2019; MADANI, BERARDI, STOOPLER, 2014).

Todos os locais distintos da cavidade oral são banhados pela saliva e mais especificamente no sulco gengival é encontrado o fluído crevicular gengival, sendo este um exsudato dos líquidos teciduais/plasma que atinge este espaço pela característica da não queratinização o epitélio oral que o reveste. Esta característica torna o sulco gengival, juntamente com o fluído crevicular gengival, um ambiente com múltiplas características para o desenvolvimento de um microbioma específico, bem como de doenças específicas (FIORELLINI, KIM, CHANG, 2019).

O periodonto inclui a gengiva livre, inserida e interdental (periodonto de proteção) e o osso alveolar, o cemento e ligamento periodontal (periodonto de sustentação). Estes tecidos podem sofrer processos patológicos caracterizando uma doença periodontal, que pode se apresentar na sua forma mais branda denominada gengivite ou progredir para uma periodontite, e neste caso, para uma inflamação crônica em resposta aos microrganismos (GASNER; SCHURE, 2020).

A periodontite é definida como “doença inflamatória crônica multifatorial associada com biofilme disbiótico e caracterizada pela destruição progressiva do aparato de inserção dental” (PAPAPANOU et al., 2018, p. S176). Há uma inflamação mediada pelo hospedeiro

associada a microrganismos que resulta na perda da inserção periodontal, sendo isso detectado como perda de inserção clínica (CAL), pela avaliação circunferencial da dentição erupcionada com uma sonda periodontal padronizada com referência à junção cimento-esmalte (CEJ) (TONETTI; GRENWELL; KORNMAN, 2018; FRAGKIOUDAKIS; RIGGIO; APATZIDOU, 2020).

Dados apontam que a periodontite é considerada a segunda doença bucal mais prevalente no mundo (MARCENES, 2013) e a quarta doença mais frequente na lista das doenças globais (VOS, 2012). Na América Latina, a prevalência da periodontite crônica é alta e pode variar entre 40% e 80%. (OPPERMANN, 2007). Estima-se que pelo menos 35% dos adultos americanos com idade entre 30 e 90 anos têm periodontite, 21,8% apresenta uma forma leve e 12,6% uma forma moderada ou grave (ALBANDAR; BRUNELLE; KINGMAN, 1999).

A prevalência de periodontite aumenta significativamente com a idade e permanece constante após os 50-59 anos, sendo mais prevalente em homens (ALBANDAR; BRUNELLE; KINGMAN, 1999; HOLTFRETER et al., 2009). Dados americanos, que reportam o período de 2009 a 2012, apontam que 46% dos adultos tiveram periodontite, sendo a prevalência associada positivamente com o aumento da idade, com o sexo masculino e com a baixa condição social e econômica (EKE et al., 2015).

Estudos apontam que 42% dos adultos dentados nos EUA, com 30 anos ou mais, tiveram periodontite, destes, 7,8% apresentaram periodontite grave, com maior prevalência entre os adultos de 65 anos ou mais, mexicanos, americanos, negros não hispânicos e fumantes (EKE et al., 2018). Em 2020, a prevalência de periodontite é de 42,2% da população, com 7,8% das pessoas com periodontite severa, o maior risco de ter periodontite de qualquer tipo foi observado em pessoas mais velhas, no sexo masculino, em minorias raciais/étnicas, em grupos mais pobres e com menor escolaridade e, principalmente, em fumantes (EKE; BORGNACKE; GENCO, 2020).

A prevalência da doença periodontal moderada a grave em brasileiros adultos foi de 15,3% e 5,8%, respectivamente, com variações consideráveis entre os municípios do país, sendo a desigualdade de renda fator determinante na ocorrência da doença periodontal grave (VETTORE; MARQUES; PERES, 2013).

A prevalência, a extensão e a gravidade da doença no país variam com a faixa etária. Cerca de um quarto dos adolescentes de 12 anos, um terço dos adolescentes de 15 a 19 anos, cerca de metade dos adultos de 35 a 44 anos e menos de um quinto dos idosos apresentaram sangramento gengival. A presença de cálculo dentário aumenta com a idade, atingindo a maior prevalência entre adultos, com aproximadamente 64%, declinando nos idosos. Bolsas

periodontais rasas acometem 10% dos jovens entre 15 a 19 anos, um quarto dos adultos entre 35 a 44 anos e 14% dos idosos. Bolsas profundas são ainda mais raras, pois atingem menos de 1% dos jovens de 15 a 19 anos, menos de 7% dos adultos e 3% dos idosos (PESQUISA NACIONAL DE SAÚDE BUCAL, 2010).

Conforme a classificação atual e os avanços do conhecimento a respeito da fisiopatologia da doença, a periodontite é separada em três formas: a periodontite necrosante (doenças periodontais necrosantes), a periodontite como uma manifestação de doença sistêmica e as formas da doença anteriormente reconhecidas como "crônica" ou "agressiva", agora agrupados em uma única categoria denominada "periodontite" (PAPAPANOU et al., 2018; CATON et al., 2018).

A severidade da doença determina o seu estágio, definidos de forma primária pela perda de inserção clínica (STEFFENS; MARCANTONIO, 2018). Na classificação mais atual, a periodontite, pode ser classificada em 4 estágios: estágio I (periodontite inicial); estágio II (periodontite moderada); estágio III (periodontite grave com potencial para perda dental) e estágio IV (periodontite grave com extensiva perda dental e potencial para perda de dentição). (PAPAPANOU et al., 2018).

Os estágios de I a IV são determinados pela perda de inserção clínica, quantidade e porcentagem de perda óssea, profundidade de sondagem, presença e extensão de defeitos ósseos angulares e envolvimento de furca, mobilidade dentária e perda dentária devido à periodontite. (TONETTI, GRENEWELL, KORNMAN, 2018). Ainda segundo os mesmos autores, a classificação inclui três graus, A, B e C, onde, A corresponde a baixo risco, B a risco moderado, C a alto risco de progressão, além de abranger aspectos relacionados à progressão da periodontite, estado geral de saúde e outras exposições, como tabagismo ou nível de controle metabólico em diabetes.

Alterações progressivas destrutivas conduzem a perda de osso e ligamento periodontal em torno dos dentes, o que pode eventualmente levar a sua perda. O início da infecção está associado com vários fatores, mas um dos mais importantes é a alteração no equilíbrio da rede de citocinas e outros mediadores solúveis que ligam o sistema imune para o osso, o que leva a danos encontrados em doenças (LISTGARTEN, 1986; KAYAL, 2013; BAKER, 2000; ZHANG et al., 2003).

Essa inflamação descontrolada leva a uma migração apical do epitélio juncional gengival, resultando na formação de uma 'bolsa' periodontal, onde o espaço anatômico entre a margem gengival e o ponto de fixação da gengiva ao dente afetado é aumentado (MANRESA et al., 2018). Quando não tratada pode causar inflamação evidente e mobilidade progressiva

dos dentes afetados, resultando em dor, dificuldade para comer, preocupações estéticas e perda do dente (MANRESA et al., 2018).

Como já citado, a disbiose entre as mais de 700 espécies de bactérias, associada a presença de microrganismos específicos, responde tanto pelo início da periodontite quanto pela sua progressão. Bactérias como *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia* possuem relação estrita com a doença e compõe o chamado complexo vermelho (1 e 2) (PASTER et al., 2006; COLOMBO et al., 2009)

1.5 MICROBIOMA ORAL E DOENÇAS SISTÊMICAS

Os trabalhos envolvendo o levantamento da microbiota normal e disbiose em diversos nichos do corpo humano vem crescendo de forma significativa, principalmente devido à redução de custos para realização de sequenciamentos e a possibilidade de análises *in silico* com ajuda de bioinformática, com a realização de metagenômica e metataxonômica (URSEL et al., 2012; CHO; BLASER, 2012; KAAAN, KAHHAROVA, ZAURA, 2021).

Diante deste crescimento, iniciaram-se pesquisas que buscam esclarecer a relação do microbioma oral com doenças sistêmicas e como o equilíbrio entre saúde e doença pode ser afetado, resultando em efeitos adversos na gestação, doenças cardiovasculares e diabetes, que estão entre as patologias mais prevalentes relacionadas aos microrganismos deste ambiente (SAMPAIO-MAIA et al., 2016).

A cavidade oral possui uma microbiota complexa e diversa, importante tanto na saúde quanto na doença (THOMAS et al., 2021). Os microrganismos que constituem a microbiota oral e suas relações, atribuem a este ambiente uma complexidade de relações entre os mesmos, e esta, influencia e é influenciada, tanto pela saúde oral quanto pela saúde sistêmica (ZHANG et al., 2018). Já existem evidências crescentes de que muitas doenças sistêmicas estão associadas a distúrbios no ecossistema oral, destas, podem ser citadas a obesidade, o diabetes, doenças cardiovasculares e cânceres (ZHANG et al., 2018; LI et al., 2021).

Thomas et al. (2021, p. 1376) afirmam que “as principais infecções orais são responsáveis e induzidas pela disbiose da microbiota oral e esta tem impacto sobre outras doenças sistêmicas crônicas”. Diante disto, a microbiota oral torna-se um novo alvo no diagnóstico, acompanhamento e tratamento de doenças sistêmicas.

O microbioma oral desempenha papel ativo na manutenção da saúde do periodonto e o mesmo sofre consideráveis alterações em condições sistêmicas (BACHTIAR et al., 2021). A relação de via dupla entre agravos e doenças sistêmicas, principalmente as crônicas não-

transmissíveis (DANTs), vem sendo estudada nos últimos anos com ênfase em pesquisas voltadas à microbiota e microbioma intestinal e suas conexões com o sistema imunológico (DUNCAN et al., 2008; HARO et al., 2016; KHOR et al., 2021; BARUTTA et al., 2022).

A busca de elucidações sobre uma relação bidirecional entre doenças periodontais e doenças sistêmicas ainda é foco atual (BARUTTA et al., 2022). Diversos estudos apontam para uma relação sólida e bidirecional entre a periodontite e o diabetes mellitus tipo 2 (CASARIN et al., 2013; ARTESE et al., 2015; NAZIR et al., 2018; MINTY et al., 2019; GRAVES; CORRÊA; SILVA, 2019; JEPSEN; SUVAN; DESCHNER, 2020; CHARUPINIJKUL et al., 2022; WU et al., 2020; SANZ et al., 2020; STÖHR et al., 2021).

Ohlrich, Cullinan e Leichter (2010) afirmam que a associação epidemiológica entre periodontite e diabetes está clara, mais os mecanismos biológicos dessa associação ainda não foram totalmente elucidados. Para Shi et al. (2020) os pacientes com DMT2 são mais suscetíveis a mudanças no microbioma subgengival em direção à disbiose, com predisposição ao desenvolvimento de periodontite.

Dados recentes relacionados a alterações na microbiota salivar, apontam que a periodontite complicada pelo DMT2 altera significativamente a microbiota oral e o tratamento da doença (diabetes) amenizam estas alterações (GU et al., 2021). Nazir et al. (2018) afirmam que mais de 90% dos pacientes diabéticos apresentaram manifestações orais, e há evidências crescentes sobre uma forte relação bidirecional com a doença periodontal.

O diabetes aumenta as chances e o risco de uma pessoa desenvolver periodontite (aumento de 34%), portanto é um fator de risco importante (PRESHAW et al., 2012; WU et al., 2020). Também favorece o desenvolvimento de periodontites mais graves (HINTAO et al., 2007). Doenças sistêmicas ou aquelas associadas com aumento da inflamação, aumentam a suscetibilidade a doenças periodontais (TAYLOR; BORGNACK, 2008; OHLRICH; CULLINAN; LEICHTER, 2010; ZHANG et al., 2022; JEPSEN; SUVAN; DESCHNER, 2020) (GRAVES; CORREA; SILVA, 2019). Em grupos de pacientes com periodontite grave, a incidência de DMT2 pode ser aumentada em 53% (WU et al., 2020).

Desde a década de 1990, o aumento do risco de desenvolver periodontite foi constatado em pacientes diabéticos e a periodontite como complicação do diabetes já haviam sido relatados (LÖE, 1993). Zheng et al. (2021) confirmaram por meio de uma meta-análise de estudos epidemiológicos que tanto a prevalência quanto a gravidade da periodontite são maiores em pacientes com diabetes quando comparadas com não-diabéticos.

Vários estudos confirmam que a periodontite influencia no controle da glicemia, acarretando aumento de complicações relacionadas ao diabetes (BORGNACKKE et al., 2013)

(GRAZIANI et al., 2018). Até mesmo indivíduos não diabéticos com periodontite apresentam mau controle da glicemia (GRAZIANE et al., 2018).

Em trabalho recente, Wu et al. (2020) afirmam que a relação bidirecional entre DMT2 e periodontite é evidente e que o tratamento adequado das duas doenças pode interferir nos dados epidemiológicos de ambas. Os mesmos autores afirmam que o DMT2 pode ter sua incidência aumentada em 53% em grupos de pacientes com periodontite grave. Neste mesmo sentido, por meio de uma revisão sistemática com estudos prospectivos, Stöhr et al. (2021) concluem que seus resultados identificaram uma associação bidirecional positiva entre doença periodontal e diabetes mellitus.

A terapia periodontal reduz a inflamação sistêmica característica de diabéticos, a saúde do periodonto é ponto-chave na tomada de decisões sobre o protocolo de tratamento a ser realizado por indivíduos com DMT2, sendo isto importante para reduzir o risco de complicações a longo prazo (ARTESE et al., 2015).

Ainda no sentido de confirmar esta relação bidirecional para ambas as doenças, já é evidente que o tratamento efetivo de uma doença reduz parâmetros biomédicos da outra. Teshome e Yitayeh (2016) por meio de revisão sistemática e metanálise concluíram que ocorre uma significativa redução da hemoglobina glicada e da glicemia de jejum em pacientes diabéticos tipo 2 com periodontite após terapia periodontal não cirúrgica. Em outra revisão sistemática conduzida por Cao et al. (2019) conclui-se que o tratamento periodontal com raspagem e alisamento radicular associado com tratamentos adjuvantes com antibioticoterapia, melhorou os parâmetros laboratoriais dos pacientes diabéticos.

O tratamento adequado do diabetes resulta em efeitos benéficos nos parâmetros clínicos da periodontite. Gu et al. (2021) analisaram a microbiota salivar de pacientes com periodontite moderada e grave, diabéticos, com e sem tratamento por meio de metformina, e os autores concluíram que houve uma diferença significativa na microbiota salivar de pacientes com periodontite crônica complicada por DMT2.

Como já descrito, a periodontite é caracterizada pela destruição progressiva do aparato de inserção dental (PAPAPANOU et al., 2018). Bak et al. (2010), em estudo clínico experimental, concluíram que o tratamento com metformina induziu uma redução significativa na perda óssea alveolar e os achados sugeriram que a droga possa exercer um efeito benéfico sobre o osso alveolar na periodontite.

Pradeep et al. (2013) ao avaliarem a eficácia do gel de metformina aplicado localmente em conjunto com raspagem e alisamento radicular para o tratamento de defeitos intraósseos em

pacientes com periodontite crônica, concluíram que ocorreu uma melhora significativa em parâmetros da periodontite, como profundidade de sondagem e nível clínico de inserção.

Akram, Vohra e Javed (2018), por meio de uma revisão sistemática com meta-análise avaliaram a eficácia da metformina (administrada localmente) como adjuvante à raspagem e alisamento radicular no tratamento da periodontite crônica e concluíram que o uso parece ser eficaz no preenchimento defeitos ósseos, na redução da profundidade de sondagem e no ganho no nível de inserção clínica.

Em meta-análise realizada por Brignardello-Petersen (2018) o uso da metformina (1%) resultou em melhoras dos parâmetros clínicos da periodontite, com um ganho clínico de nível de inserção, preenchimento de defeito ósseo e sondagem, redução de profundidade quando comparado com um placebo ou nenhum tratamento. Zhou et al. (2019) afirmam que o tratamento com metformina pode melhorar de forma robusta a infecção periodontal e a destruição tecidual, além de reduzir os níveis séricos de glicose e IL-1 β em camundongos com periodontite diabética.

Araújo et al. (2019), em um modelo experimental de doença periodontal, testou os efeitos da gliclazida no estresse oxidativo, inflamação e perda óssea e constatou que o tratamento diminuiu a migração de neutrófilos e macrófagos, diminuiu a resposta inflamatória bem como a perda óssea.

Sawada et al. (2020), também por meio de um modelo experimental, testou os resultados da utilização do agonista do receptor do peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1) “Liraglutida” na melhora da periodontite, concluindo que a infiltração de células inflamatórias, acúmulo de macrófagos e expressões gênicas do fator de necrose tumoral- α e óxido nítrico sintase induzível na gengiva, todos aumentados na periodontite, sofreram melhoras com o tratamento, além disso, a reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura foi melhorada.

Em nosso trabalho (em anexo), destacamos a detecção do principal patógeno responsável pelo desenvolvimento da periodontite (*Porphyromonas gingivalis*) (HOLT, EBERSOLE, 2005; AISHWARYA et al., 2018) no grupo de participantes diabéticos em abundância relativa maior quando comparada com o grupo de pacientes saudáveis (1,77% versus 0,02%). Além disso, a PG foi identificada, pela análise LEFse, como um biomarcador taxonômico deste grupo. Neste sentido, ousamos em sugerir que o DMT2 pode influenciar uma mudança no perfil taxonômico do microbioma subgengival, o que abriria caminhos para uma disbiose e conseqüente desenvolvimento da periodontite, como já relatado em outro estudo conduzido por Shi et al. (2020), a ponto de poder ser esta, uma das explicações para uma maior prevalência de periodontite nestes pacientes como já constatado também por outros autores

(PRESHAW et al., 2012; HINTAO et al., 2007; TAYLOR; BORGNAKKE, 2008; OHLRICH; CULLINAN; LEICHTER, 2010; FIELD et al., 2012; ZHANG et al., 2022; JEPSEN; SUVAN; DESCHNER, 2020; GRAVES; CORREA; SILVA, 2019).

Os fatores específicos que levam às alterações nas bactérias, que causam doenças periodontais, são desconhecidos, embora seja reconhecido que doenças sistêmicas, como diabetes, síndrome metabólica e artrite reumatóide (AR), predisõem a periodontite (KINANE et al., 2017; WATANABE et al., 2020).

A detecção de *Porphyromonas gingivalis* em nosso estudo difere de resultados publicados. Estudo conduzido por Field et al. (2012) não detectou a presença da bactéria em amostras provenientes do fluido crevicular gengival de pacientes diabéticos sem periodontite. Zhou et al. (2013) mostraram que o DMT2 pode alterar a composição bacteriana da placa subgengival, que é um importante fator de risco para a periodontite, porém, os mesmos autores também não detectaram a bactéria no grupo de pacientes com a doença.

Em contrapartida, Castrillon et al. (2013) afirmam que microrganismos pertencentes ao complexo vermelho (dentre estes a *Porphyromonas gingivalis*) foram detectados em frequências mais baixas em pacientes com diabetes. Altos níveis de glicose em pacientes com DMT2 levam ao desenvolvimento da microbiota periodontogênica devido à redução da produção de oxigênio e células de defesa, deste modo, os pacientes diabéticos têm uma suscetibilidade aumentada para doença periodontal mais grave devido ao aumento da prevalência de *Porphyromonas gingivalis* (PADMALATHA et al., 2016). A disbiose diabética oral é caracterizada por uma bactéria específica, *Porphyromonas gingivalis*, a qual é altamente expressa em doenças periodontais e que pode exacerbar a resistência à insulina (MINTY et al., 2019).

Em estudo conduzido por Casarin et al. (2012), diabéticos tipo 2 não controlados e com periodontite apresentaram diferenças significativas na biodiversidade subgengival em comparação com indivíduos não diabéticos. Os mesmos autores afirmam que alguns filotipos, como *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella parvula*, *Veillonella dispar* e *Eikenella corrodens*, foram detectados com frequência significativamente maior em indivíduos diabéticos do que em indivíduos não diabéticos.

Trabalho recente publicado por Bachtiar et al. (2021) demonstrou que a bactéria *Tannerella forsythia*, pertencente complexo vermelho, foi a espécie mais abundante em biofilmes subgengivais do grupo de pacientes diabéticos com periodontite, e que neste grupo a diversidade dos periodontopatógenos clássicos aumentou no nicho subgengival.

A relação bidirecional entre as características do microbioma oral com doenças sistêmicas vai além da demonstrada e vários trabalhos tiveram como objetivo demonstrar esta relação com outras doenças e condições de saúde importantes.

Doenças relacionadas com autoimunidade, como a artrite reumatóide (AR), possuem uma possível relação com o microbioma oral. Cheng et al. (2021), afirmam que a bactéria *Porphyromonas gingivalis*, comumente presente na periodontite, pode desencadear a produção de anticorpos anti-proteína citrulinada e que pacientes diabéticos têm microbiomas subgingivais disbióticos e maior abundância da bactéria em comparação com os controles. Os autores ainda afirmam que o microbioma oral e, especificamente a *Porphyromonas gingivalis* são importantes no início da doença.

No caminho inverso, a AR e lúpus eritematoso sistêmico (LES) aumentam a suscetibilidade às doenças periodontais destrutivas, pois aumentam a inflamação no periodonto alterando o risco ou a gravidade da periodontite, assim sendo, o tratamento bem-sucedido da AR com anti-inflamatórios reverte parcialmente a disbiose microbiana oral (GRAVES; CORRÊA; SILVA, 2019). Pacientes com AR são mais suscetíveis a periodontite, que pode causar a perda dentária precoce, sendo exames regulares e tratamento precoce são altamente recomendados (ALMASI et al., 2021).

Salientando a importância do tema, estudos atuais também buscam relações entre neoplasias e o microbioma oral e algumas condições como carcinomas de células escamosas orais, doença pré-maligna, fibrose submucosa oral, carcinoma epidermóide oral, neoplasias de pulmão, esôfago, pâncreas e próstata vem sendo apresentadas (CHATTOPADHYAY; VERMA; PANDA, 2019; ZHONG et al., 2021; SU et al., 2021; RAI et al., 2021; ZHANG et al., 2020; MENDOZA et al., 2020; HOSGOOD et al., 2021; PETERS et al., 2017; KAWASAKI et al., 2021; CHUNG et al., 2021; OHADIAN MOGHADAM; MOMENI, 2021).

Outro foco de estudo, com mais tempo de análises, implica a microbiota e o microbioma oral com o desenvolvimento de agravos ou doenças relacionadas ao sistema cardiovascular. Em revisão sistemática conduzida por Dietrich et al. (2013) buscou-se evidências epidemiológicas de uma associação entre periodontite (DP) e doença cardiovascular aterosclerótica (DCA), incluindo doença cardíaca coronária (DCC). Os autores afirmam que a associação foi mais forte em adultos mais jovens e que há evidências de um risco aumentado em pacientes com DP em comparação com pacientes sem, no entanto, isso pode não se aplicar a todos os grupos da população

Estudo recente conduzido por Kato-kogoe et al. (2021), utilizando-se da análise metagenômica do gene 16S rRNA, demonstrou que em pacientes com doença cardiovascular

aterosclerótica (DCA), a microbiota salivar diferiu de pacientes saudáveis, indicando que esta microbiota pode estar relacionada a doença. Outro estudo conduzido por Paju et al. (2021) afirma que seus resultados enfatizam ainda mais o papel das infecções orais na calcificação arterial, principalmente da artéria carótida.

Estudos indicam que os efeitos cardiovasculares adversos da doença periodontal são devidos a algumas bactérias como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Fusobacterium nucleatum*, e que diagnosticar este tipo de condição (periodontite) oferece uma oportunidade significativa para reduzir a aterosclerose (BALE; DONEEN; VIGERUST, 2017). Yang et al. (2018) buscou por meio de uma meta-análise avaliar a associação entre periodontite e doença arterial periférica (DAP) e revelou uma relação significativa onde demonstraram que pacientes com DAP tinham mais dentes perdidos do que os controles.

Chen et al. (2016) investigaram o risco de fibrilação atrial ou flutter atrial em pacientes com periodontite em comparação com indivíduos sem a doença, encontrando um risco aumentado de fibrilação atrial ou flutter no grupo com periodontite.

Lu, Parker e Eaton (2008) afirmam que a doença periodontal é um fator de risco para a doença vascular periférica (DVP), e a perda de inserção periodontal foi significativamente associado com DVP e que marcadores sistêmicos de inflamação (proteína C reativa, contagem de leucócitos, fibrinogênio) também foram associados com DVP. Os autores afirmam que parece haver uma relação transversal entre a perda de inserção periodontal e PVD e que a inflamação pode ser uma via possível para ligar PVD com doença periodontal.

Barbadoro et al. (2020) ao comparar a microbiota salivar de normotensos com hipertensos, afirmam que seus resultados apoiam a associação entre hipertensão, microbioma oral e óxido nítrico salivar. Os mesmos autores afirmam que na placa supragengival, espécies bacterianas, geralmente associadas a um bom estado de saúde bucal, como *Neisseria subflava*, estiveram significativamente mais presentes em indivíduos normotensos do que em hipertensos

Em estudo conduzido por Sen et al. (2013) foi demonstrado que a doença periodontal está associada ao acidente vascular cerebral. Os mesmos autores afirmam que pacientes com periodontite tem mais do que o dobro do risco de desenvolver um acidente vascular cerebral cardioembólico e trombótico em comparação com indivíduos periodontalmente saudáveis. Ahn et al. (2019) avaliaram a associação da periodontite com o desenvolvimento de doença vascular aterosclerótica precoce em adultos e concluíram que a periodontite é um fator de risco substancialmente importante para doença.

Estudos atuais também buscam relacionar o microbioma oral com doenças degenerativas do sistema nervoso central. Fleury et al. (2021) mostraram que o microbioma oral está alterado no estágio inicial e intermediário de Doença de Parkinson, e que a relação entre disbiose oral, inflamação e a patogênese da doença requer mais estudos.

Ainda neste caminho, Holmer et al. (2021) ao comparar a microbiota oral de indivíduos com doença de Alzheimer (DA), comprometimento cognitivo leve (CCL), declínio cognitivo subjetivo (DF) e indivíduos cognitivamente saudáveis, encontrou que a riqueza e uniformidade microbiana foi diferente sendo maiores nos casos do que nos controles, os autores concluíram que em indivíduos com CCL ou DA, a microbiota subgingival exibe deslocamentos típicos da doença periodontal.

Trabalho publicado por Dominy et al. (2019) relatou a identificação da bactéria *Porphyromonas gingivalis*, principal patógeno da periodontite, no cérebro de pacientes com a doença de Alzheimer e destacou o possível envolvimento deste patógeno na fisiopatologia da doença. Os autores destacam que as gengivinas ((lisina-gengivina (Kgp), arginina-gengivina A (RgpA) e arginina-gengivina B (RgpB)), foram identificadas no cérebro dos pacientes com Alzheimer, e os níveis correlacionados com a fisiopatologia da doença. Os mesmo autores também constataram que a infecção oral pela bactéria em camundongos, resultou em colonização do cérebro e aumento da produção de um dos componentes das placas amilóides, e confirmaram que as gengivinas exerciam efeitos nocivos e prejudiciais sobre a proteína tau.

Diante de todas as considerações elencadas, nota-se o impacto psicossocial e econômico decorrente destas duas condições de saúde (diabetes mellitus tipo 2 e periodontite) na população em geral, mais principalmente nas faixas etárias mais avançadas, altamente dependente de políticas públicas e com pouco acesso a serviços especializados de saúde.

Torna-se premente, o aumento do número de pesquisas que buscam estabelecer uma relação entre condições de saúde específicas e suas respectivas interferências na distribuição e predomínio dos diferentes gêneros e espécies de bactérias presente, bem como identificar perfis específicos de microbiomas, com perspectivas de evolução nas condições tanto de diagnóstico quanto de tratamento específicos.

REFERÊNCIAS

- AHN, Y. B.; SHIN, M. S.; HAN, D. H.; SUKHBAATAR, M.; KIM, M.S.; SHIN, H.S.; KIM, H.D. Periodontitis is associated with the risk of subclinical atherosclerosis and peripheral arterial disease in Korean adults. **Atherosclerosis**, v. 251, p. 311-318, May. 2016. DOI: [10.1016/j.atherosclerosis.2016.07.898](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.07.898)
- AISHWARYA, A. B.; PAVITHRA, N.; CHANDRASEKARAN, S.C.; ANN, V. G.; GNANAMANI, A. A. molecular technique to explore the relationship between Porphyromonas gingivalis and severity of chronic periodontitis: A clinical approach. **Anaerobe**, v. 49, p. 1-4, Feb. 2018. DOI: [10.1016/j.anaerobe.2017.10.011](https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.10.011)
- AKRAM, Z.; VOHRA, F.; JAVED, F. Locally delivered metformin as adjunct to scaling and root planing in the treatment of periodontal defects: A systematic review and meta-analysis. **J. Periodontol Res.**, v. 53, n. 6, p. 941-949, Dec. 2018. DOI: [10.1111/jre.12573](https://doi.org/10.1111/jre.12573)
- AL KAWAS, S.; AL-MARZOOQ, F.; RAHMAN, B.; SHEARSTON, J.A.; SAAD, H.; BENZINA, D.; WEITZMAN, M. The impact of smoking different tobacco types on the subgingival microbiome and periodontal health: a pilot study. **Sci. Rep.**, v. 11, n. 1, p. 1113, Jan. 2021. DOI: [10.1038/s41598-020-80937-3](https://doi.org/10.1038/s41598-020-80937-3). Errata em: **Sci. Rep.** v. 11, n. 1, p. 9762. May 2021.
- ALBANDAR, J.M.; BRUNELLE, J.A.; KINGMAN, A. Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. **J. Periodontol.**, v. 70, n. 1, p.13-29, Jan. 1999. DOI: [10.1902/jop.1999.70.1.13](https://doi.org/10.1902/jop.1999.70.1.13). Errata em: **J. Periodontol**; v. 70, n. 3, p. 351. Mar. 1999.
- ALBERTS, et al. **Biologia Celular e Molecular**, 2ª Edição. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2017.
- ALMASI, S.; KARBALAEI SABBAGH, M.; BARZI, D.; TAHOONI, A; ATYABI, H.; BASIR SHABESTARI, S. Relationship between clinical and laboratory findings of rheumatoid arthritis patients with their oral status and disease activity. **Caspian J. Intern. Med.** v.12, n. 1, p. 22-28, 2021. DOI: [10.22088/cjim.12.1.22](https://doi.org/10.22088/cjim.12.1.22)
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and diagnosis of diabetes. **Diabetes Care**, v. 42, Suplemento 1, p. S13-28, 2019. DOI: [10.2337/dc19-S002](https://doi.org/10.2337/dc19-S002)
- ARAÚJO, A. A.; MORAIS, H.B.; MEDEIROS, C. A. C. X.; BRITO, G. A. C.; GUEDES, P. M. M.; HIYARI, S.; PIRIH, F. Q.; ARAÚJO JÚNIOR, R.F. Gliclazide reduced oxidative stress, inflammation, and bone loss in an experimental periodontal disease model. **J. Appl. Oral Sci.** v. 21, n. 27, p. e20180211, Feb. 2019. DOI: [10.1590/1678-7757-2018-0211](https://doi.org/10.1590/1678-7757-2018-0211)
- ARTESE, H. P.; FOZ, A. M.; RABELO, M. D. E. S; GOMES, G. H.; ORLANDI, M.; SUVAN, J.; D'AIUTO, F.; ROMITO, G.A. Periodontal therapy and systemic inflammation in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. **PLoS One**. v. 10, n. 5, p. e0128344, May. 2015. DOI: [10.1371/journal.pone.0128344](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128344)
- ARWEILER, N. B.; NETUSCHIL, L. The Oral Microbiota. **Adv Exp Med Biol.**, v. 902, p. 45-60, 2016. DOI: [10.1007/978-3-319-31248-4_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-31248-4_4)
- BACHTIAR, B. M.; THEODOREA, C. F.; TAHAPARY, D.L.; ASTRELLA, C.; N/A, N., BACHTIAR, E. W. A pilot study of red complex and three genera subgingival microbiome in periodontitis subjects with and without diabetes, evaluated by MinION platform. **F1000Res.** v. 10, n. 79, p. 1-23, Feb. 2021. DOI: [10.12688/f1000research.28216.4](https://doi.org/10.12688/f1000research.28216.4)

- BAK, E.J.; PARK, H.G.; KIM, M.; KIM, S.W.; KIM, S.; CHOI, S.H., CHA, J.H.; YOO, Y.J. The effect of metformin on alveolar bone in ligature-induced periodontitis in rats: a pilot study. **J. Periodontol.**, v. 81, n. 3, p. 412-419, Mar. 2010. DOI: [10.1902/jop.2009.090414](https://doi.org/10.1902/jop.2009.090414)
- BAKER, P. J. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 10, p. 1181-1192, 2000. ISSN 1286-4579. DOI: [10.1016/s1286-4579\(00\)01272-7](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)01272-7)
- BALE, B. F.; DONEEN, A. L.; VIGERUST, D. J. High-risk periodontal pathogens contribute to the pathogenesis of atherosclerosis. **Postgrad Med J.** v. 93, n. 1098, p. 215-220, Apr. 2017. DOI: [10.1136/postgradmedj-2016-134279](https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2016-134279)
- BAQUERO, F.; NOMBELA, C.; The microbiome as a human organ. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.18, Suplemento 4, p. 2-4. Jul. 2012. DOI: [10.1111/j.1469-0691.2012.03916.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03916.x)
- BARBADORO, P.; PONZIO, E.; COCCIA, E.; PROSPERO, E.; SANTARELLI, A.; RAPPELLI, G. G. L.; D'ERRICO, M. M. Association between hypertension, oral microbiome and salivar nitric oxide: A case-control study. **Nitric Oxide.** v. 106, p. 66-71, Jan 2021. DOI: [10.1016/j.niox.2020.11.002](https://doi.org/10.1016/j.niox.2020.11.002)
- BARUTTA, F.; BELLINI, S.; DURAZZO, M.; GRUDEN, G. Novel Insight into the Mechanisms of the Bidirectional Relationship between Diabetes and Periodontitis. **Biomedicines.** v. 10, n. 1, p. 178, Jan. 2022. DOI: [10.3390/biomedicines10010178](https://doi.org/10.3390/biomedicines10010178)
- BERG, G.; RYBAKOVA, D.; FISCHER, D.; CERNAVA, T. VERGÈS, M. C.; CHARLES, T. *et al.* Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. **Microbiome.** v. 8, n. 1, p. 103, Jun. 2020. doi: [10.1186/s40168-020-00875-0](https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0). Errata em: **Microbiome.** v. 8, n. 1, p. 119, Aug. 2020. DOI: [10.1186/s40168-020-00875-0](https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0)
- BORGNACKE, W. S.; YLÖSTALO, P. V.; TAYLOR, G. W.; GENCO, R. J. Effect of periodontal disease on diabetes: systematic review of epidemiologic observational evidence. **J. Clin. Periodontol.**; v. 40, Supplement 14, p. S135-52, Apr. 2013. DOI: [10.1111/jcpe.12080](https://doi.org/10.1111/jcpe.12080)
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais.** Brasília: Ministério da Saúde; 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças Não Transmissíveis. **Vigitel Brasil 2019 : vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico : estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2019.** Brasília: Ministério da Saúde, 2020.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Banco de dados do Sistema Único de Saúde-DATASUS. Disponível em <http://www.datasus.gov.br> [Acessado em 10 de agosto de 2022].
- BRIGNARDELLO-PETERSEN, R. There seem to be benefits from using local metformin as an adjuvant to scaling and root planing, but there is uncertainty about the magnitude. **The Journal of the American Dental Association**, v. 150, n. 1, p. e4, 2019. DOI: [10.1016/j.adaj.2018.06.022](https://doi.org/10.1016/j.adaj.2018.06.022)
- CAO, R.; LI, Q.; WU, Q.; YAO, M.; CHEN, Y.; ZHOU, H. Effect of non-surgical periodontal therapy on glycemic control of type 2 diabetes mellitus: a systematic review and Bayesian network meta-analysis. **BMC Oral Health.** v. 19, n. 1, p. 176, Aug. 2019. DOI: [10.1186/s12903-019-0829-y](https://doi.org/10.1186/s12903-019-0829-y)

- CASARIN, R. C.; BARBAGALLO, A.; MEULMAN, T.; SANTOS, V. R.; SALLUM, E. A.; NOCITI, F. H.; DUARTE, P. M.; CASATI, M. Z.; GONÇALVES, R. B. Subgingival biodiversity in subjects with uncontrolled type-2 diabetes and chronic periodontitis. **J Periodontol Res.** v. 48, n. 1, p. 30-36, Feb 2013. DOI: [10.1111/j.1600-0765.2012.01498.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2012.01498.x)
- CASTRILLON, C.A.; HINCAPIE, J.P.; YEPES, F. L.; ROLDAN, N.; MORENO, S. M.; CONTRERAS, A.; BOTERO, J. E. Occurrence of red complex microorganisms and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in patients with diabetes. **J. Investig. Clin. Dent.**, v. 6, n. 1, p. 25-31, Feb. 2015. DOI: [10.1111/jicd.12051](https://doi.org/10.1111/jicd.12051)
- CATON, J. G.; ARMITAGE, G.; BERGLUNDH, T.; CHAPPLE, I. L. C.; JEPSEN, S.; KORNMAN, K. S.; MEALEY, B. L.; PAPAPANOU, P. N.; SANZ, M.; TONETTI, M. S. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. **J Clin Periodontol.**; v. 45, Suplemento 20, p. S1-S8, Jun. 2018. DOI: [10.1111/jcpe.12935](https://doi.org/10.1111/jcpe.12935)
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention. National Diabetes Statistics Report, 2020. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, U.S. Dept of Health and Human Services; 2020. Acesso em 14/03/2021. Disponível em <https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/national-diabetes-statistics-report.pdf>
- CHARUPINIJKUL, A.; ARUNYANAK, S.; RATTANASIRI, S.; VATHESATOGKIT, P.; THIENPRAMUK, L.; LERTPIMONCHAI, A. The effect of obesity on periodontitis progression: the 10-year retrospective cohort study. **Clin. Oral Investig.** v. 26, n. 1, p. 535-542, Jan. 2022. DOI: [10.1007/s00784-021-04031-2](https://doi.org/10.1007/s00784-021-04031-2)
- CHATTOPADHYAY, I.; VERMA, M.; PANDA, M. Role of Oral Microbiome Signatures in Diagnosis and Prognosis of Oral Cancer. **Technol. Cancer Res. Treat.** v. 18, Jan. 2019. DOI: [10.1177/1533033819867354](https://doi.org/10.1177/1533033819867354)
- CHEN, D.Y.; LIN, C.H.; CHEN, Y. M.; CHEN, H. H. Risk of Atrial Fibrillation or Flutter Associated with Periodontitis: A Nationwide, Population-Based, Cohort Study. **PLoS One**, v. 11, n. 10, p. e0165601, Oct. 2016. DOI: [10.1371/journal.pone.0165601](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165601)
- CHENG Z, DO T, MANKIA K, MEADE J, HUNT L, CLEREHUGH V, SPEIRS A, TUGNAIT A, EMERY P, DEVINE D. Dysbiosis in the oral microbiomes of anti-CCP positive individuals at risk of developing rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 80, n. 2, p. 162-168, Feb. 2021. DOI: [10.1136/annrheumdis-2020-216972](https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-216972)
- CHO, I.; BLASER, M. J. The human microbiome: at the interface of health and disease. **Nat. Rev. Genet.** v.13, n. 4, p. 260-270, Mar. 2012. DOI: [10.1038/nrg3182](https://doi.org/10.1038/nrg3182)
- CHUNG, M.; ZHAO, N.; MEIER, R.; KOESTLER, D. C.; WU, G.; DE CASTILLO, E.; PASTER, B. J.; CHARPENTIER, K.; IZARD, J.; KELSEY, K. T.; MICHAUD, D. S. Comparisons of oral, intestinal, and pancreatic bacterial microbiomes in patients with pancreatic cancer and other gastrointestinal diseases. **J. Oral Microbiol.** v.13, n.1, p. 1887680. Feb. 2021. DOI: [10.1080/20002297.2021.1887680](https://doi.org/10.1080/20002297.2021.1887680)
- COLOMBO, A. P.; BOCHES, S. K.; COTTON, S. L.; GOODSON, J. M.; KENT, R.; HAFFAJEE, A. D. *et al.* Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. **J. Periodontol.**, v. 80, n. 9, p. 1421-1432, Sep. 2009. DOI: [10.1902/jop.2009.090185](https://doi.org/10.1902/jop.2009.090185)

- DEWHIRST, F. E.; CHEN, T.; IZARD, J.; PASTER, B.J.; TANNER, A. C.; YU, W. H.; LAKSHMANAN, A.; WADE, W. G. The human oral microbiome. **J. Bacteriol.**, v. 192, n. 19, p. 5002-5017, Oct. 2010. DOI: [10.1128/JB.00542-10](https://doi.org/10.1128/JB.00542-10)
- DE ROBERTIS, E. M. F.; HIB, J. *Biologia celular e molecular*. 16. ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017 v, 363. p. ISBN: 978-85-277-2363-3
- DOMINY, S.S.; LYNCH, C.; ERMINI, F.; BENEDYK, M.; MARCZYK, A.; KONRADI, A. *et al.* *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. **Sci Adv.** v. 5, n. 1, p. 1-21, Jan. 2019. DOI: [10.1126/sciadv.aau3333](https://doi.org/10.1126/sciadv.aau3333)
- DIETRICH, T.; SHARMA, P.; WALTER, C.; WESTON, P.; BECK, J. The epidemiological evidence behind the association between periodontitis and incident atherosclerotic cardiovascular disease. **J. Clin. Periodontol.**, v. 40 Suppl 14, p. S70-84, 2013. DOI: [10.1111/jcpe.12062](https://doi.org/10.1111/jcpe.12062). Errata em: *J. Clin. Periodontol.*; v. 40, Suppl 14, p. S210-5. Apr 2013.
- DU, Q.; WANG, Y.; XU, X.; LI, Y.; LI, M.; ZOU, J.; ZHOU, X. Analysis of the oral microbiota in twin children. **Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.**, v. 32, n. 2, p. 182-185, Apr. 2014. DOI: [10.7518/hxkq.2014.02.017](https://doi.org/10.7518/hxkq.2014.02.017)
- DUDHAGARA, P.; BHAVSAR, S.; BHAGAT, C.; GHELANI, A.; BHATT, S., PATEL, R. Web Resources for Metagenomics Studies. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* v. 13, n. 5, p. 296-303, Oct. 2015. DOI: [10.1016/j.gpb.2015.10.003](https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.10.003)
- DUNCAN, S. H.; LOBLEY, G. E.; HOLTROP, G., *et al.* Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. **Int. J. Obes.**, v. 32, n. 11, p. 1720-1724, Nov. 2008. DOI: [10.1038/ijo.2008.155](https://doi.org/10.1038/ijo.2008.155)
- DURAN-PINEDO, A. E. Metatranscriptomic analyses of the oral microbiome. **Periodontol.** **2000.** v. 85, n. 1, p. 28-45, Feb. 2021. DOI: [10.1111/prd.12350](https://doi.org/10.1111/prd.12350)
- EKE, P. I.; BORGNACKE, W. S.; GENCO, R. J. Recent epidemiologic trends in periodontitis in the USA. **Periodontol.** **2000.** v. 82, n. 1, p. 257-267, Feb. 2020. DOI: [10.1111/prd.12323](https://doi.org/10.1111/prd.12323)
- EKE, P. I.; DYE, B. A.; WEI, L.; SLADE, G.D.; THORNTON-EVANS, G.O.; BORGNACKE, W. S. *et al.* Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. **J. Periodontol.**, v. 86, n. 5, p. 611-22, May. 2015. DOI: [10.1902/jop.2015.140520](https://doi.org/10.1902/jop.2015.140520)
- EKE, P. I.; THORNTON-EVANS, G. O.; WEI, L.; BORGNACKE, W. S.; DYE, B.A.; GENCO, R. J. Periodontitis in US Adults: National Health and Nutrition Examination Survey 2009-2014. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 149, n. 7, p. 576-588, Jul. 2018. DOI: [10.1016/j.adaj.2018.04.023](https://doi.org/10.1016/j.adaj.2018.04.023)
- FEDOR, P. ZVARÍKOVÁ, M. Biodiversity Indices. **Encyclopedia of Ecology**, v. 1, p. 337–346, 2019.
- FIELD, C. A.; GIDLEY, M. D.; PRESHAW, P. M.; JAKUBOVICS, N. Investigation and quantification of key periodontal pathogens in patients with type 2 diabetes. **J. Periodontal Res.**, v. 47, n. 4, p. 470-478, Aug. 2012. DOI: [10.1111/j.1600-0765.2011.01455.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2011.01455.x)
- FIORELLINI, J. P.; KIM, D.M.; CHANG, Y. C. **Anatomy, Structure, and Function of the Periodontium.** In NEWMAN, M. G.; TAKEI, H. H.; KLOKKEVOLD, P. R. CARRANZA FA. *Carranza's Clinical Periodontology* 13th Ed, Elsevier Saunders; 2019; 19-49.

- FISCHER, L. A.; DEMERATH, E.; BITTNER-EDDY, P.; COSTALONGA, M. Placental colonization with periodontal pathogens: the potential missing link. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 221, n. 5, p. 383-392, Nov. 2019. DOI: [10.1016/j.ajog.2019.04.029](https://doi.org/10.1016/j.ajog.2019.04.029)
- FLEURY, V.; ZEKERIDOU, A.; LAZAREVIC, V.; GAÏA, N.; GIANNOPOULOU, C.; GENTON, L. *et al.* Oral Dysbiosis and Inflammation in Parkinson's Disease. **J. Parkinsons Dis.** v. 11, n. 2, p. 619-631, Feb. 2021. DOI: [10.3233/JPD-202459](https://doi.org/10.3233/JPD-202459)
- FORBES, J. M.; COOPER, M. E. Mechanisms of diabetic complications. **Physiol. Rev.** v. 93, n. 1, p. 137-88, Jan. 2013. DOI: [10.1152/physrev.00045.2011](https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2011)
- FRAGKIOUDAKIS, I.; RIGGIO, M. P.; APATZIDOU, D. A. Understanding the microbial components of periodontal diseases and periodontal treatment-induced microbiological shifts. **J Med Microbiol.**, v. 70, n. 1, Jan 2021. DOI: [10.1099/jmm.0.001247](https://doi.org/10.1099/jmm.0.001247)
- GANTUYA, B.; EL SERAG, H. B.; SARUULJAVKHLAN, B.; AZZAYA, D.; MATSUMOTO, T.; UCHIDA, T. *et al.* Advantage of 16S rRNA amplicon sequencing in *Helicobacter pylori* diagnosis. **Helicobacter.**,v. 26, n. 3, p. e12790, Jun. 2021. DOI: [10.1111/hel.12790](https://doi.org/10.1111/hel.12790)
- GAO, B.; CHI, L.; ZHU, Y.; SHI, X.; TU, P.; LI, B. *et al.* An Introduction to Next Generation Sequencing Bioinformatic Analysis in Gut Microbiome. **Studies Biomolecules**, v. 11, n. 4, p. 530. Apr. 2021. DOI: [10.3390/biom11040530](https://doi.org/10.3390/biom11040530)
- GASNER NS, SCHURE RS. Periodontal Disease. In: STATPEARLS. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Jan .2022.
- GRAVES, D. T.; CORRÊA, J.D.; SILVA, T. A. The Oral Microbiota Is Modified by Systemic Diseases. **J. Dent. Res.**, v. 98, n. 2, p. 148-156. Feb. 2019. DOI: [10.1177/0022034518805739](https://doi.org/10.1177/0022034518805739)
- GRAZIANI, F.; GENNAI, S.; SOLINI, A.; PETRINI, M. A systematic review and meta-analysis of epidemiologic observational evidence on the effect of periodontitis on diabetes An update of the EFP-AAP review. **J. Clin. Periodontol.**, v. 45, n. 2, p. 167-187. Feb. 2018. DOI: [10.1111/jcpe.12837](https://doi.org/10.1111/jcpe.12837)
- GRIFFITHS, A. J. F. "Sequenciamento de DNA". **Encyclopedia Britannica** , 5 de julho de 2012, <https://www.britannica.com/science/DNA-sequencing>. Acessado em 29 de outubro de 2021.
- GU, M.; WANG, P.; XIANG, S.; XU, D.; JIN, C.; JIANG, Z.; HU, N. Effects of type 2 diabetes and metformin on salivary microbiota in patients with chronic periodontitis. **Microb. Pathog.**, v. 161(Pt B):105277. Dec. 2021. DOI: [10.1016/j.micpath.2021.105277](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105277)
- HAO, Y.; TANG, C.; DU, Q.; ZHOU, X.; PENG, X.; CHENG, L. Comparative analysis of oral microbiome from Zang and Han populations living at different altitudes. **Arch. Oral Biol.**, v. 121, p. 104986. Jan. 2021. DOI: [10.1016/j.archoralbio.2020.104986](https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104986)
- HARDING, J. L.; PAVKOV, M. E.; MAGLIANO, D. J.; SHAW, J. E.; GREGG, E. W. Global trends in diabetes complications: a review of current evidence. **Diabetologia**, v. 62, n. 1, p. 3-16. Jan. 2019. DOI: [10.1007/s00125-018-4711-2](https://doi.org/10.1007/s00125-018-4711-2)
- HARO, C.; GARCIA-CARPINTERO, S.; ALCALA-DIAZ, J. F. *et al.* The gut microbial community in metabolic syndrome patients is modified by diet. **J. Nutr. Biochem.**, v. 27, p. 27–31, 2016. DOI: [10.1016/j.jnutbio.2015.08.011](https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.08.011)

- HEATHER, J. M.; CHAIN, B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. **Genomics**, v. 107, n. 1, p. 1-8. Jan. 2016. DOI: [10.1016/j.ygeno.2015.11.003](https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003)
- HENTSCHER, U.; HOPKE, J.; HORN, M.; FRIEDRICH, A. B.; WAGNER, M.; HACKER, J.; MOORE, B. S. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 9, p. 4431-4440, Sep. 2002. DOI: [10.1128/AEM.68.9.4431-4440.2002](https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4431-4440.2002)
- HINTAO, J.; TEANPAISAN, R.; CHONGSUWIVATWONG, V.; RATARASAN, C.; DAHLEN, G. The microbiological profiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 22, n. 3, p. 175-181, Jun. 2007. DOI: [10.1111/j.1399-302X.2007.00341.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00341.x)
- HOLMAN, N.; YOUNG, B.; GADSBY, R. Current prevalence of Type 1 and Type 2 diabetes in adults and children in the UK. **Diabet. Med.** v. 32, n. 9, p. 1119–1120, Sep. 2015. DOI: [10.1111/dme.12791](https://doi.org/10.1111/dme.12791)
- HOLMER, J.; AHO, V.; ERIKSDOTTER, M.; PAULIN, L.; PIETIÄINEN, M.; AUVINEN, P.; SCHULTZBERG, M.; PUSSINEN, P. J.; BUHLIN, K. Subgingival microbiota in a population with and without cognitive dysfunction. **J. Oral Microbiol.**, v. 13, n. 1, p. 1854552. Jan. 2021. DOI: [10.1080/20002297.2020.1854552](https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1854552)
- HOLT, S. C.; EBERSOLE, J. L. Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. **Periodontol. 2000.**, v.38, p. 72-122, 2005. DOI: [10.1111/j.1600-0757.2005.00113.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00113.x)
- HOLTFRETER, B.; SCHWAHN, C.; BIFFAR, R.; KOCHER, T. Epidemiology of periodontal diseases in the Study of Health in Pomerania. **J. Clin. Periodontol.**, v. 36, n. 2, p. 114-123. Feb. 2009. DOI: [10.1111/j.1600-051X.2008.01361.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01361.x)
- HOSGOOD, H.D.; CAI, Q.; HUA, X.; LONG, J.; SHI, J.; WAN, Y.; *et al.* Variation in oral microbiome is associated with future risk of lung cancer among never-smokers. **Thorax**, v. 76, n. 3, p. 256-263. Mar. 2021. DOI: [10.1136/thoraxjnl-2020-215542](https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2020-215542)
- HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM. A framework for human microbiome research. **Nature**. v. 13, n. 486(7402), p. 215-221. Jun. 2012. DOI: [10.1038/nature11209](https://doi.org/10.1038/nature11209)
- HUNT, D.; HEMMINGSEN, B.; MATZKE, A.; VARGHESE, C. HAMMERICH, A.; LUCIANI, S., *et al.* The WHO Global Diabetes Compact: a new initiative to support people living with diabetes. **Lancet Diabetes Endocrinol.**, v. 9, n. 6, p. 325-327. Jun. 2021. DOI: [10.1016/S2213-8587\(21\)00111-X](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(21)00111-X)
- IDF - International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas [Internet]. 8. ed. Bruxelles: International Diabetes Federation; 2019 [acesso em 14/03/2021]. Disponível em: <https://diabetesatlas.org/en/sections/worldwide-toll-of-diabetes.html> ISBN 9780444641304, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.10558-5>.
- IDF - International Diabetes Federation – IDF. Diabetes Atlas/2021. Disponível em <https://diabetesatlas.org/>, acesso em 23/02/2022
- JEPSEN, S.; SUVAN, J.; DESCHNER, J. The association of periodontal diseases with metabolic syndrome and obesity. **Periodontol 2000.**, v. 83, n. 1, p. 125-153. Jun. 2020. DOI: [10.1111/prd.12326](https://doi.org/10.1111/prd.12326)
- JIANG, Y.; ZHOU, X.; CHENG, L.; LI, M. The Impact of Smoking on Subgingival Microflora: From Periodontal Health to Disease. **Front Microbiol.** v. 29, n.11, p. 66. Jan. 2020. DOI: [10.3389/fmicb.2020.00066](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00066)

- JOHNSON, J. S.; SPAKOWICZ, D. J.; HONG, B. Y.; PETERSEN, L. M.; DEMKOWICZ, P.; CHEN, L., *et al.* Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. **Nat. Commun.** v. 10, n. 1, p. 5029, Nov. 2019. DOI: [10.1038/s41467-019-13036-1](https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1)
- JUNQUEIRA, L. C. U.; SILVA FILHO, J. C. *Biologia Celular e Molecular*. [S.l.: s.n.], 2012
- KAAN, A. M. M.; KAHHAROVA, D.; ZAURA, E. Acquisition and establishment of the oral microbiota. **Periodontol 2000.**, v. 86, n. 1, p. 123-141. Jun. 2021. DOI: [10.1111/prd.12366](https://doi.org/10.1111/prd.12366)
- KATO-KOGOE, N.; SAKAGUCHI, S.; KAMIYA, K.; OMORI, M.; GU, Y. H.; ITO, Y. *et al.* Characterization of Salivary Microbiota in Patients with Atherosclerotic Cardiovascular Disease: A Case-Control Study. **J Atheroscler. Thromb.** v. 29, n. 3, p. 403-421, Feb. 2021. DOI: [10.5551/jat.60608](https://doi.org/10.5551/jat.60608)
- KAWASAKI, M.; IKEDA, Y.; IKEDA, E.; TAKAHASHI, M.; TANAKA, D.; NAKAJIMA, Y. *et al.* Oral infectious bacteria in dental plaque and saliva as risk factors in patients with esophageal cancer. **Cancer**, v. 127, n. 4, p.512-519. Feb. 2021. DOI: [10.1002/cncr.33316](https://doi.org/10.1002/cncr.33316)
- KAYAL, R. A. The role of osteoimmunology in periodontal disease. **BioMed research international**, v. 2013, 2013. DOI: [10.1155/2013/639368](https://doi.org/10.1155/2013/639368)
- KHOR, B.; SNOW, M.; HERRMAN, E.; RAY, N.; MANSUKHANI, K.; PATEL, K. A. Interconnections Between the Oral and Gut Microbiomes: Reversal of Microbial Dysbiosis and the Balance Between Systemic Health and Disease. **Microorganisms**, v. 9, n. 3, p. 496. Feb. 2021. DOI: [10.3390/microorganisms9030496](https://doi.org/10.3390/microorganisms9030496)
- KINANE, D. F.; STATHOPOULOU, P. G.; PAPAPANOU, P. N. Periodontal diseases. **Nat. Rev. Dis. Primers.** v. 22, n. 3, p. 17038. Jun. 2017. DOI: [10.1038/nrdp.2017.38](https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.38)
- KLAPPENBACH, J. A.; SAXMAN, P. R.; COLE, J. R.; SCHMIDT, T. M. RRNDB: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. **Nucleic Acids Res.** v. 29, n. 1, p. 181-184, Jan. 2001. DOI: [10.1093/nar/29.1.181](https://doi.org/10.1093/nar/29.1.181)
- KOBOLDT, D. C.; STEINBERG, K. M.; LARSON, D. E.; WILSON, R. K.; MARDIS, E. R. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. **Cell.** v. 155, n. 1, p. 27-38. Sep. 2013. DOI: [10.1016/j.cell.2013.09.006](https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.006)
- KOLEFF, P.; GASTON, K. J.; LENNON, J. J. Measuring beta diversity for presence-absence data. **Journal of Animal Ecology**, v. 72: 367-382, 2003. DOI: [10.1046/j.1365-2656.2003.00710.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.2003.00710.x)
- KUSKE, C. R.; BUSCH, J. D.; ADORADA, D. L.; DUNBAR, J. M.; BARNS, S. M. Phylogeny, ribosomal RNA gene typing and relative abundance of new *Pseudomonas* species (*sensu stricto*) isolated from two pinyon-juniper woodland soils of the arid southwest U.S. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 22, n. 2, p. 300-311. May, 1999. DOI: [10.1016/S0723-2020\(99\)80077-0](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(99)80077-0)
- LANGILLE, M. G.; ZANEVELD, J.; CAPORASO, J. G.; MCDONALD, D.; KNIGHTS, D.; REYES, J. A., *et al.* Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. **Nat. Biotechnol.** v. 31, n. 9, p. 814-21, Sep. 2013. DOI: [10.1038/nbt.2676](https://doi.org/10.1038/nbt.2676)
- LAUDADIO, I.; FULCI, V.; PALONE, F.; STRONATI, L.; CUCCHIARA, S.; CARISSIMI, C. Quantitative Assessment of Shotgun Metagenomics and 16S rDNA Amplicon Sequencing in the Study of Human Gut Microbiome. **Omic.** v. 22, n. 4, p. 248-254, Apr. 2018. DOI: [10.1089/omi.2018.0013](https://doi.org/10.1089/omi.2018.0013)

- LI, Y.; CUI, J.; LIU, Y.; CHEN, K.; HUANG, L.; LIU, Y. Oral, Tongue-Coating Microbiota, and Metabolic Disorders: A Novel Area of Interactive Research. **Front Cardiovasc Med.** v. 20, n. 8, p. 730203, Aug. 2021. DOI: [10.3389/fcvm.2021.730203](https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.730203)
- LIF HOLGERSON, P.; HARNEVIK, L.; HERNELL, O.; TANNER, A. C.; JOHANSSON, I. Mode of birth delivery affects oral microbiota in infants. **J. Dent. Res.**, v. 90, n. 10, p. 1183-1188. Oct. 2011. DOI: [10.1177/0022034511418973](https://doi.org/10.1177/0022034511418973)
- LISTGARTEN, M. A. Pathogenesis of periodontitis. *Journal of clinical periodontology*, v. 13, n. 5, p. 418-425, 1986. ISSN 1600-051X. DOI: [10.1111/j.1600-051x.1986.tb01485.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1986.tb01485.x)
- LIU, F.; LIANG, T.; ZHANG, Z.; LIU, L.; LI, J.; DONG, W. *et al.* Effects of altitude on human oral microbes. **AMB Express.** v. 11, n. 1, p. 41, Mar. 2021. DOI: [10.1186/s13568-021-01200-0](https://doi.org/10.1186/s13568-021-01200-0)
- LÖE, H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. **Diabetes Care.**, v. 16, n. 1, p. 329-334. Jan. 1993. DOI: <http://dx.doi.org/10.2337/diacare.16.1.329>
- LU, B.; PARKER, D.; EATON, C. B. Relationship of periodontal attachment loss to peripheral vascular disease: an analysis of NHANES 1999-2002 data. **Atherosclerosis.**, v. 200, n. 1, p. 199-205. Sep. 2008. DOI: [10.1016/j.atherosclerosis.2007.12.037](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.12.037)
- LUDWIG, W.; BAUER, S. H; BAUER, M.; HELD, I; KIRCHHOF, G.; SCHULZE, R. *et al.* Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 153, n. 1, p. 181-190. Aug. 1997. DOI: [10.1111/j.1574-6968.1997.tb10480.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10480.x)
- LUNDBERG, D. S.; YOURSTONE, S.; MIECZKOWSKI, P.; JONES, C. D.; DANGL, J. L. Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing. **Nat. Methods.**, v. 10, n. 10, p. 999-1002. Oct. 2013. DOI: [10.1038/nmeth.2634](https://doi.org/10.1038/nmeth.2634)
- MADANI, M.; BERARDI, T.; STOOPLER, E. T. Anatomic and examination considerations of the oral cavity. **Med Clin North Am.**, v. 98, n. 6, p. 1225-1238. Nov. 2014. DOI: [10.1016/j.mcna.2014.08.001](https://doi.org/10.1016/j.mcna.2014.08.001)
- MAGURRAN, Anne E. *Medindo a diversidade biológica*. Londrina; Editora UFPR, 2019
- MANNE-GOEHLER, J.; GELDSETZER, P.; AGOUDAVI, K.; ANDALL-BRERETON, G.; ARYAL, K. K.; BICABA, B. W. *et al.* Health system performance for people with diabetes in 28 low- and middle-income countries: A cross-sectional study of nationally representative surveys. **PLoS Med.** v. 16, n. 3, p. e1002751. Mar. 2019. DOI: [10.1371/journal.pmed.1002751](https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002751)
- MANRESA, C.; SANZ-MIRALLES, E. C.; TWIGG, J.; BRAVO, M. Supportive periodontal therapy (SPT) for maintaining the dentition in adults treated for periodontitis. **Cochrane Database Syst. Rev.** v. 1, n. 1, p. CD009376, Jan. 2018. DOI: [10.1002/14651858.CD009376.pub2](https://doi.org/10.1002/14651858.CD009376.pub2)
- MARCENES, W.; KASSEBAUM, N. J.; BERNABÉ, E.; FLAXMAN, A.; NAGHAVI, M.; LOPEZ, A.; MURRAY, C. J. Global burden of oral conditions in 1990-2010: a systematic analysis. **J. Dent. Res.**, v. 92, n. 7, p. 592-597. Jul. 2013. DOI: [10.1177/0022034513490168](https://doi.org/10.1177/0022034513490168)
- MARCHESE, J. R, RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome.** v. 30, n. 3, p. 31, Jul. 2015. DOI: [10.1186/s40168-015-0094-5](https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5)
- MCGINN, S.; GUT, I. G. DNA sequencing – spanning the generations, **New Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 366-372, 2013. DOI: [10.1016/j.nbt.2012.11.012](https://doi.org/10.1016/j.nbt.2012.11.012)

MENDOZA, I. L. I; MENDIA, X. M. M.; DE LA FUENTE A. M. G.; ANDRÉS G. Q.; URIZAR, J. M. A. Role of Porphyromonas gingivalis in oral squamous cell carcinoma development: A systematic review. **J. Periodontal Res.**, v. 55, n. 1, p. 13-22. Jan. 2020. DOI: [10.1111/jre.12691](https://doi.org/10.1111/jre.12691)

MINTY, M.; CANCEIL, T.; SERINO, M.; BURCELIN, R.; TERCÉ, F.; BLASCO-BAQUE V. Oral microbiota-induced periodontitis: a new risk factor of metabolic diseases. **Rev. Endocr. Metab. Disord.** v. 20, n. 4, p. 449-459. Dec. 2019. DOI: [10.1007/s11154-019-09526-8](https://doi.org/10.1007/s11154-019-09526-8)

MIZRAHI-MAN, O.; DAVENPORT, E. R.; GILAD, Y. Taxonomic classification of bacterial 16S rRNA genes using short sequencing reads: evaluation of effective study designs. **PLoS One.** v. 8, n. 1, p. e53608, 2013. DOI: [10.1371/journal.pone.0053608](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053608)

MOHAN, V.; KHUNTI, K.; CHAN, S. P.; FILHO, F. F.; TRAN, N. Q.; RAMAIYA, K. *et al.* Management of Type 2 Diabetes in Developing Countries: Balancing Optimal Glycaemic Control and Outcomes with Affordability and Accessibility to Treatment. **Diabetes Ther.** v. 11, n. 1, p. 15-35. Jan. 2020. DOI: [10.1007/s13300-019-00733-9](https://doi.org/10.1007/s13300-019-00733-9)

MOON, J.; KIM, N.; KIM, T.J.; JUN, J. S.; LEE, H. S.; SHIN, H. R. *et al.* Rapid diagnosis of bacterial meningitis by nanopore 16S amplicon sequencing: A pilot study. **Int. J. Med. Microbiol.** v. 309, n. 6, p. 151338. Sep. 2019. DOI: [10.1016/j.ijmm.2019.151338](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.151338)

MOSADDAD, S. A.; TAHMASEBI, E., YAZDANIAN, A.; REZVANI, M. B., SEIFALIAN, A., YAZDANIAN, M.; TEBYANIAN, H. Oral microbial biofilms: an update. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v. 38, n.11, p. 2005-2019. Nov. 2019. DOI: [10.1007/s10096-019-03641-9](https://doi.org/10.1007/s10096-019-03641-9)

MUKHERJEE, C.; MOYER, C. O.; STEINKAMP, H. M.; HASHMI, S. B.; BEALL, C. J.; GUO, X. *et al.* Acquisition of oral microbiota is driven by environment, not host genetics. **Microbiome.** v. 9, n. 1, p. 54. Feb. 2021. DOI: [10.1186/s40168-020-00986-8](https://doi.org/10.1186/s40168-020-00986-8)

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**, 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

MURTAZA, N.; BURKE, L. M.; VLAHOVICH, N.; CHARLESSON, B.; O'NEILL, H. M.; ROSS, M. L. *et al.* Analysis of the Effects of Dietary Pattern on the Oral Microbiome of Elite Endurance Athletes. **Nutrients**, v. 11, n. 3, p. 614. Mar.2019. DOI: [10.3390/nu11030614](https://doi.org/10.3390/nu11030614)

NAZIR, M. A.; ALGHAMDI, L.; ALKADI, M.; ALBEAJAN, N.; ALRASHOUDI, L.; ALHUSSAN, M. The burden of Diabetes, Its Oral Complications and Their Prevention and Management. **Maced. J. Med. Sci.** v. 6, n. 8, p. 1545-1553. Aug. 2018. DOI: [10.3889/oamjms.2018.294](https://doi.org/10.3889/oamjms.2018.294)

OHADIAN MOGHADAM, S.; MOMENI, S. A. Human microbiome and prostate cancer development: current insights into the prevention and treatment. **Front. Med.**, v.15, n. 1, p. 11-32, Feb. 2021. DOI: [10.1007/s11684-019-0731-7](https://doi.org/10.1007/s11684-019-0731-7)

OHLRICH, E. J.; CULLINAN, M.P.; LEICHTER, J. W. Diabetes, periodontitis, and the subgingival microbiota. **J. Oral Microbiol.**, v. 21, p. 2, Dec. 2010. DOI: [10.3402/jom.v2i0.5818](https://doi.org/10.3402/jom.v2i0.5818)

OPPERMANN, R. V. An overview of the epidemiology of periodontal diseases in Latin America. **Braz. oral res.**, São Paulo, v. 21, n. spe, p. 8-15, 2007. DOI: 10.1590/S1806-83242007000500003.

OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES. Products. Disponível em: <https://nanoporetech.com/products>. Acesso no dia 10/08/2022

- PADMALATHA, G. V.; BAVLE, R.M.; SATYAKIRAN, G. V.; PAREMALA, K.; SUDHAKARA, M.; MAKARLA, S. Quantification of Porphyromonas gingivalis in chronic periodontitis patients associated with diabetes mellitus using real-time polymerase chain reaction. **J. Oral Maxillofac. Pathol.**, v. 20, n. 3, p. 413-418, Sep-Dec. 2016. DOI: [10.4103/0973-029X.190933](https://doi.org/10.4103/0973-029X.190933)
- PAJU, S.; PIETIÄINEN, M.; LILJESTRAND, J. M.; LAHDENTAUSTA, L.; SALMINEN, A.; KOPRA, E. *et al.* Carotid artery calcification in panoramic radiographs associates with oral infections and mortality. **Int Endod. J.** v. 54, n. 1, p. 15-25, Jan. 2021. DOI: [10.1111/iej.13394](https://doi.org/10.1111/iej.13394)
- PAPAPANOU, P. N.; SANZ, M.; BUDUNELI, N.; DIETRICH, T.; FERES, M.; FINE, D. H. *et al.* Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **J. Periodontol.**, v. 89 Suppl 1, p. S173-S182, Jun. 2018. DOI: [10.1002/JPER.17-0721](https://doi.org/10.1002/JPER.17-0721)
- PASTER, B. J.; BOCHES, S. K.; GALVIN, J. L.; ERICSON, R. E.; LAU, C. N.; LEVANOS, V. A. *et al.* Bacterial diversity in human subgingival plaque. **J. Bacteriol.**, v. 183, n. 12, p. 3770-3783, Jun. 2001. DOI: [10.1128/JB.183.12.3770-3783.2001](https://doi.org/10.1128/JB.183.12.3770-3783.2001)
- PASTER, B. J.; OLSEN, I.; AAS, J. A.; DEWHIRST, F. E. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. **Periodontol.** 2000, v. 42, n. 80, p. 7. 2006. DOI: [10.1111/j.1600-0757.2006.00174.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00174.x)
- PETERS, B. A.; WU, J.; PEI, Z.; YANG, L.; PURDUE, M. P.; FREEDMAN, N. D. *et al.* Oral Microbiome Composition Reflects Prospective Risk for Esophageal Cancers. **Cancer Res.**, v. 77, n. 23, p. 6777-6787, Dec. 2017. DOI: [10.1158/0008-5472.CAN-17-1296](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1296)
- PETERSMANN, A.; MÜLLER-WIELAND, D.; MÜLLER, U. A.; LANDGRAF, R.; NAUCK, M.; FRECKMANN, G. *et al.* Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes**, v. 12, n. S 01, p. S1-S7. Dec. 2019. DOI: [10.1055/a-1018-9078](https://doi.org/10.1055/a-1018-9078)
- PRADEEP, A. R.; RAO, N. S.; NAIK, S. B.; KUMARI, M. Efficacy of varying concentrations of subgingivally delivered metformin in the treatment of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. **J. Periodontol.**, v. 84, n. 2, p. 212-20. Feb 2013. DOI: [10.1902/jop.2012.120025](https://doi.org/10.1902/jop.2012.120025)
- PRESHAW, P. M.; ALBA, A. L.; HERRERA, D.; JEPSEN, S.; KONSTANTINIDIS, A. MAKRILAKIS, K.; TAYLOR, R. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. **Diabetologia**, v. 55, n. 1, p. 21-31, Jan. 2012. DOI: [10.1007/s00125-011-2342-y](https://doi.org/10.1007/s00125-011-2342-y)
- QUINCE, C.; WALKER, A. W.; SIMPSON, J. T.; LOMAN, N. J., SEGATA, N. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. **Nat. Biotechnol.** v. 35, n. 9, p. 833-844. Sep 2017 doi: [10.1038/nbt.3935](https://doi.org/10.1038/nbt.3935). Errata em: **Nat Biotechnol.** v. 35, n. 12, p. 1211. Dec. 2017. DOI: [10.1038/nbt.3935](https://doi.org/10.1038/nbt.3935)
- RAI, A. K.; PANDA, M., DAS, A.K.; RAHMAN, T.; DAS, R.; DAS, K. *et al.* Dysbiosis of salivary microbiome and cytokines influence oral squamous cell carcinoma through inflammation. **Arch. Microbiol.**, v. 203, n. 1 p. 137-152, Jan. 2021. DOI: [10.1007/s00203-020-02011-w](https://doi.org/10.1007/s00203-020-02011-w)
- RANJAN, R.; RANI, A.; METWALLY, A.; MCGEE, H. S.; PERKINS, D. L. Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 469, n. 4, p. 967-977, Jan. 2016. DOI: [10.1016/j.bbrc.2015.12.083](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.083)

- ROSSI, M. A. **Anatomia craniofacial aplicada à odontologia: abordagem fundamental e clínica**. 2. Rio de Janeiro: Ed. Santos, 2017
- ROWLEY, W. R.; BEZOLD, C.; ARIKAN, Y.; BYRNE, E.; KROHE, S. Diabetes 2030: Insights from Yesterday, Today, and Future Trends. **Popul. Health Manag.** v. 20, n. 1, p. 6-12, Feb. 2017. DOI: [10.1089/pop.2015.0181](https://doi.org/10.1089/pop.2015.0181)
- SAEEDI, P.; PETERSOHN, I.; SALPEA, P.; MALANDA, B.; KARURANGA, S.; UNWIN, N. *et al.* IDF Diabetes 22 Atlas Committee. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. **Diabetes Res Clin Pract.**, v. 157, p. 107843, Nov. 2019. DOI: [10.1016/j.diabres.2019.107843](https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107843)
- SAMPAIO-MAIA, B.; CALDAS, I. M.; PEREIRA, M. L.; PÉREZ-MONGIOVI, D.; ARAUJO, R. The Oral Microbiome in Health and Its Implication in Oral and Systemic Diseases. **Adv Appl Microbiol.**, v. 97, p. 171-210, 2016. DOI: [10.1016/bs.aambs.2016.08.002](https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2016.08.002)
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci., U S A**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, Dec. 1977. DOI: [10.1073/pnas.74.12.5463](https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463)
- SANSCHAGRIN, S., YERGEAU, E. Next-generation sequencing of 16S ribosomal RNA gene amplicons. **J. Vis. Exp.** v. 29, n. 90, p. 51709. Aug 2014. DOI: [10.3791/51709](https://doi.org/10.3791/51709)
- SANZ, M.; MARCO DEL CASTILLO, A.; JEPSEN, S.; GONZALEZ-JUANATEY JR, D'AIUTO F, BOUCHARD P. *et al.* Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. **J. Clin. Periodontol.**, v. 47, n. 3, p. 268-288, Mar. 2020. DOI: [10.1111/jcpe.13189](https://doi.org/10.1111/jcpe.13189)
- SAWADA, N.; ADACHI, K.; NAKAMURA, N.; MIYABE, M.; ITO, M., KOBAYASHI, S. *et al.* Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonist Liraglutide Ameliorates the Development of Periodontitis. **J. Diabetes Res.**, v. 19, p. 2020:8843310. Nov. 2020. DOI: [10.1155/2020/8843310](https://doi.org/10.1155/2020/8843310)
- SBD – Sociedade Brasileira de Diabetes. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020**. Clannad, 2019. 419p. Disponível em: <http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2020/02/Diretrizes-Sociedade-Brasileira-de-Diabetes-2019-2020.pdf>
- SEN, S.; SUMNER, R.; HARDIN, J.; BARROS, S.; MOSS, K. BECK, J; OFFENBACHER, S. Periodontal disease and recurrent vascular events in stroke/transient ischemic attack patients. **J. Stroke Cerebrovasc. Dis.**; v. 22, n. 8, p. 1420-1427. Nov. 2013. DOI: [10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2013.06.024](https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2013.06.024)
- SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. **PLoS Biol.** v. 14, n. 8, p. e1002533. Aug 2016. DOI: [10.1371/journal.pbio.1002533](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533)
- SHENDURE, J.; BALASUBRAMANIAN, S.; CHURCH, G. M.; GILBERT, W.; ROGERS, J., SCHLOSS, J. A.; WATERSTON, R. H. DNA sequencing at 40: past, present and future. **Nature.** v. 19, n. 550(7676), p. 345-353, Oct. 2017. DOI: [10.1038/nature24286](https://doi.org/10.1038/nature24286)
- SHI, B.; LUX, R.; KLOKKEVOLD, P.; CHANG, M.; BARNARD, E.; HAAKE, S.; LI, H. The subgingival microbiome associated with periodontitis in type 2 diabetes mellitus. **ISME J.**, v. 14, n. 2, p. 519-530, Feb. 2020. DOI: [10.1038/s41396-019-0544-3](https://doi.org/10.1038/s41396-019-0544-3)
- SOLDEN, L.; LLOYD, K.; WRIGHTON, K. The bright side of microbial dark matter: lessons learned from the uncultivated majority. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 31, p. 217-226. Jun. 2016. DOI: [10.1016/j.mib.2016.04.020](https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.04.020)

- STEFFENS, J. P.; MARCANTONIO, R. A. C. Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares 2018: guia Prático e Pontos-Chave. **Revista de Odontologia da UNESP**. v. 47, n. 4, p. 189-197, 2018. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/158176>
- STERPU, I.; FRANSSON, E.; HUGERTH, L. W., DU J, PEREIRA M, CHENG L, *et al.* No evidence for a placental microbiome in human pregnancies at term. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 224, n. 3, p. 296.e1-296.e23, Mar. 2021. DOI: [10.1016/j.ajog.2020.08.103](https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.08.103)
- STÖHR, J.; BARBARESKO, J.; NEUENSCHWANDER, M., SCHLESINGER, S. Bidirectional association between periodontal disease and diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. **Sci. Rep.** v. 11, n. 1, p. 13686, Jul. 2021. DOI: [10.1038/s41598-021-93062-6](https://doi.org/10.1038/s41598-021-93062-6)
- SU, S. C.; CHANG, L. C; HUANG, H. D.; PENG, C. Y.; CHUANG, C. Y.; CHEN, Y. T.; LU, M. Y.; CHIU, Y. W.; CHEN, P. Y.; YANG, S. F. Oral microbial dysbiosis and its performance in predicting oral cancer. **Carcinogenesis**, v. 42, n. 1, p. 127-135, Feb. 2021. DOI: [10.1093/carcin/bgaa062](https://doi.org/10.1093/carcin/bgaa062)
- SUN, X.; SONG, L.; YANG, W.; ZHANG, L.; LIU, M.; LI, X.; TIAN, G.; WANG, W. Nanopore Sequencing and Its Clinical Applications. **Methods Mol Biol.**, v. 2204, p. 13-32, 2020. DOI: [10.1007/978-1-0716-0904-0_2](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0904-0_2)
- TAYLOR, G. W.; BORGNACKE, W. S. Periodontal disease: associations with diabetes, glycemic control and complications. **Oral Dis.**, v. 14, n. 3, p. 191-203, Apr. 2008. DOI: [10.1111/j.1601-0825.2008.01442.x](https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2008.01442.x)
- TESHOME, A.; YITAYEH, A. The effect of periodontal therapy on glycemic control and fasting plasma glucose level in type 2 diabetic patients: systematic review and meta-analysis. **BMC Oral Health**. v. 17, n. 1, p. 31. Jul. 2016. DOI: [10.1186/s12903-016-0249-1](https://doi.org/10.1186/s12903-016-0249-1)
- TESSLER, M.; NEUMANN, J. S.; AFSHINNEKOO, E.; PINEDA, M.; HERSCH, R., VELHO, L. F. M. *et al.* Large-scale differences in microbial biodiversity discovery between 16S amplicon and shotgun sequencing. **Sci. Rep.** v. 7, n. 1, p. 6589, Jul. 2017. DOI: [10.1038/s41598-017-06665-3](https://doi.org/10.1038/s41598-017-06665-3)
- TEUGHEL, W.; QUIRYNEN, M.; JAKUBOVICS, N. **Microbiologia periodontal**. In: NEWMAN, M. G, TAKEI, H.; KLOKKEVOLD, P. R. CARRANZA, F. A. Carranza, periodontia clínica. 11ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p.251-294.
- THOMAS, C.; MINTY, M.; VINEL, A.; CANCEILL, T.; LOUBIÈRES, P.; BURCELIN, R, *et al.* Oral Microbiota: A Major Player in the Diagnosis of Systemic Diseases. **Diagnostics (Basel)**, v. 11, n. 8, p. 1376, Jul. 2021. DOI: [10.3390/diagnostics11081376](https://doi.org/10.3390/diagnostics11081376)
- TONETTI, M. S.; GREENWELL, H.; KORNMAN, K. S. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. **J. Periodontol.**, v. 89, Suppl 1, p. S159-S172, Jun. 2018. Errata em: **J. Periodontol.**, v. 89, n. 12, p. 1475, Dec. 2018. DOI: [10.1002/JPER.18-0006](https://doi.org/10.1002/JPER.18-0006)
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo (SP): Atheneu, 2008. 760p.
- TURNBAUGH, P. J.; LEY, R. E.; HAMADY, M.; FRASER-LIGGETT, C. M.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. The human microbiome project. **Nature**. v. 449, n. 7164, p. 804-810, Oct. 2007. DOI: [10.1038/nature06244](https://doi.org/10.1038/nature06244)

- URSELL, L. K.; METCALF, J. L.; PARFREY, L. W.; KNIGHT, R. Defining the human microbiome. **Nutr. Rev.**, v. 70, Suppl 1, p. S38-44, Aug. 2012. DOI: [10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x](https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x)
- VACH, K.; AL-AHMAD, A.; ANDERSON, A.; WOELBER, J. P.; KARYGIANNI, L.; WITTMER, A.; HELLOWIG, E. A log Ratio-Based Analysis of Individual Changes in the Composition of the Oral Microbiota in Different Dietary Phases. **Nutrients**. v.13, n. 3, p. 793, Feb. 2021. DOI: [10.3390/nu13030793](https://doi.org/10.3390/nu13030793)
- VĚTROVSKÝ, T.; BALDRIAN, P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. **PLoS One**. v. 8, n. 2, p. e57923, 2013. DOI: [10.1371/journal.pone.0057923](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057923)
- VETTORE, M. V.; MARQUES, R. A.; PERES, M. A. Social inequalities and periodontal disease: multilevel approach in Brasil 2010 survey. **Ver. Saude Publica.**, v. 47, Suppl 3, p. 29-39, Dec. 2013. DOI: [10.1590/s0034-8910.2013047004422](https://doi.org/10.1590/s0034-8910.2013047004422)
- VOS, T.; FLAXMAN, A. D.; NAGHAVI, M.; LOZANO, R.; MICHAUD, C.; EZZATI, M. *et al.* Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**. v. 380, n. 9859, p. 2163-2196, 2013. DOI: [10.1016/S0140-6736\(12\)61729-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61729-2)
- WALTHER, B. A.; MOORE, J. L. The concepts of bias, precision and accuracy, and their use in testing the performance of species richness estimators, with a literature review of estimator performance. **Ecography**, v. 28, p. 815-829, 2005. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.2005.0906-7590.04112.x>
- WALTERS, W.; HYDE, E. R.; BERG-LYONS, D.; ACKERMANN, G.; HUMPHREY, G.; PARADA, A. *et al.* Improved Bacterial 16S rRNA Gene (V4 and V4-5) and Fungal Internal Transcribed Spacer Marker Gene Primers for Microbial Community Surveys. **mSystems**, v. 1, n. 1, p. e00009-15, Dec 2015. DOI: [10.1128/mSystems.00009-15](https://doi.org/10.1128/mSystems.00009-15)
- WATANABE, K.; KATAGIRI, S.; TAKAHASHI, H.; SASAKI, N.; MAEKAWA, S.; KOMAZAKI, R. *et al.* Porphyromonas gingivalis impairs glucose uptake in skeletal muscle associated with altering gut microbiota. **FASEB J.** v. 35, n. 2, p. e21171, Feb. 2021. DOI: [10.1096/fj.202001158R](https://doi.org/10.1096/fj.202001158R)
- WEYRICH, L. S. The evolutionary history of the human oral microbiota and its implications for modern health. **Periodontol.** **2000.**, v. 85, n. 1, p. 90-100. Feb. 2021. DOI: [10.1111/prd.12353](https://doi.org/10.1111/prd.12353)
- WILLIAMS, R.; KARURANGA, S.; MALANDA, B.; SAEEDI, P. BASIT, A.; BESANÇON, S. *et al.* Global and regional estimates and projections of diabetes-related health expenditure: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 162, p. 108072. Apr. 2020. DOI: [10.1016/j.diabres.2020.108072](https://doi.org/10.1016/j.diabres.2020.108072)
- WU, C. Z.; YUAN, Y. H.; LIU, H. H.; LI, S. S.; ZHANG, B. W.; CHEN, W. *et al.* Epidemiologic relationship between periodontitis and type 2 diabetes mellitus. **BMC Oral Health**. v. 20, n. 1, p. 204. Jul. 2020. DOI: [10.1186/s12903-020-01180-w](https://doi.org/10.1186/s12903-020-01180-w)
- WU, S.; YU, F.; MA, L.; ZHAO, Y.; ZHENG, X.; LI, X. *et al.* Do Maternal Microbes Shape Newborn Oral Microbes? **Indian. J. Microbiol.**, v. 61, n. 1, p. 16-23, Mar. 2021. DOI: [10.1007/s12088-020-00901-7](https://doi.org/10.1007/s12088-020-00901-7)

- XU, L.; SEKI, M. Recent advances in the detection of base modifications using the Nanopore sequencer. **J. Hum. Genet.**, v. 65, n. 1, p. 25-33, Jan. 2020. DOI: [10.1038/s10038-019-0679-0](https://doi.org/10.1038/s10038-019-0679-0)
- YANG, S.; ZHAO, L. S.; CAI, C.; SHI, Q.; WEN, N.; XU, J. Association between periodontitis and peripheral artery disease: a systematic review and meta-analysis. **BMC Cardiovasc. Disord.**, v. 18, n. 1, p. 141, Jul. 2018. DOI: [10.1186/s12872-018-0879-0](https://doi.org/10.1186/s12872-018-0879-0)
- ZHANG, D.; LIU, W.; PENG, L.; WANG, H.; LIN, M.; LI, Y.; WANG, Z. Difference in oral microbial composition between chronic periodontitis patients with and without diabetic nephropathy. **BMC Oral Health**, v. 22, n. 1, p. 12, Jan. 2022. DOI: [10.1186/s12903-021-01985-3](https://doi.org/10.1186/s12903-021-01985-3)
- ZHANG, L.; LIU, Y.; ZHENG, H. J.; ZHANG, C. P. The Oral Microbiota May Have Influence on Oral Cancer. **Front Cell Infect. Microbiol.**, v. 15, n. 9, p. 476, Jan. 2020. DOI: [10.3389/fcimb.2019.00476](https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00476)
- ZHANG, Y.; WANG, X.; LI, H.; NI, C.; DU, Z.; YAN, F. Human oral microbiota and its modulation for oral health. **Biomed. Pharmacother.**, v. 99, p. 883-893, Mar. 2018. DOI: [10.1016/j.biopha.2018.01.146](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.146)
- ZHANG, D.; GOETZ, W.; BRAUMANN, B.; BOURAUUEL, C.; JAEGER, A. Effect of soluble receptors to interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha on experimentally induced root resorption in rats. **J. Periodontal Res.**, v. 38, n. 3, p. 324-332, Jun. 2003. DOI: [10.1034/j.1600-0765.2003.00410.x](https://doi.org/10.1034/j.1600-0765.2003.00410.x)
- ZHONG, X.; LU, Q.; ZHANG, Q.; HE, Y.; WEI, W.; WANG, Y. Oral microbiota alteration associated with oral cancer and areca chewing. **Oral Dis.**, v. 27, n. 2, p. 226-239, Mar. 2021. DOI: [10.1111/odi.13545](https://doi.org/10.1111/odi.13545)
- ZHOU, M.; RONG, R.; MUNRO, D.; ZHU, C.; GAO, X.; ZHANG, Q.; DONG, Q. Investigation of the effect of type 2 diabetes mellitus on subgingival plaque microbiota by high-throughput 16S rDNA pyrosequencing. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61516, Apr. 2013. DOI: [10.1371/journal.pone.0061516](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061516)
- ZHOU, X.; ZHANG, P.; WANG, Q.; JI, N.; XIA, S.; DING, Y.; WANG, Q. Metformin ameliorates experimental diabetic periodontitis independently of mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition by reducing NIMA-related kinase 7 (Nek7) expression. **J. Periodontol.**, v. 90, n. 9, p. 1032-1042, Sep. 2019. DOI: [10.1002/JPER.18-0528](https://doi.org/10.1002/JPER.18-0528)

APÊNDICE A – Artigo Submetido

TAXONOMIC AND FUNCTIONAL PROFILE OF THE SUBGINGIVAL MICROBIOMA ASSOCIATED WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS AND PERIODONTITIS

Ferdinando Agostinho^{1,2*+}, Wellington Francisco Rodrigues⁴⁺, Marlana Barbosa Carrijo de Carvalho², Luiz Fernando Veloso Fávero², Karlla Kristinna Almeida Medeiros⁵, Hindenburg Guimarães Cruvinel da Costa², Siomar de Castro Soares^{1,6}.

¹Postgraduate Course in Physiological Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro, 38015-050, Uberaba, MG, Brazil,

²Adjunct Professor at University of Rio Verde, 75901-470, Rio Verde, GO, Brazil,

³Adjunct Professor at the University Center of Mineiros, 75830-000, Mineiros, Brazil,

⁴Postgraduate Course in Health Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro, 38015-050, Uberaba, MG, Brazil.

⁵Nutritionist, Master in Gerontology from the Catholic University of Brasília/Brazil.

⁶Cell Biology Laboratory, Institute of Biological and Natural Sciences of the Federal University of Triângulo Mineiro, 38015-050, Uberaba, MG, Brazil

*Correspondence should be addressed to Ferdinando Agostinho, ferdinando@unirv.edu.br

+these authors contributed equally to this work

ABSTRACT

Oral microbiota plays an active role in the health-disease relationship and can undergo considerable changes linked to systemic disorders, including diabetes mellitus and chronic periodontal disease. The implications or associations of diabetes mellitus, periodontal disease and the microbiota present in the crevicular fluid were evaluated in this study. Gingival crevicular fluid was collected from 42 participants after signing the consent form. Participants were allocated into 4 groups “Healthy (H)”, “Diabetics (D)”, “Periodontitis (P)”, “Diabetics/Periodontitis (DP)”. The sequencing of the 16s rRNA amplicon with subsequent determination of the taxonomic profile of the microbiome (PTM) was performed. Linear discriminant effect size analysis (LEfSe) was used to measure alpha and beta diversities and predict taxonomic (BT) and functional (BF) biomarkers. Bacterial species such as *Fusobacterium nucleatum* group (22.09% “H”, 19.92% “D” and 10.34% “DP”) and *Porphyromonas gingivalis* (15.82% “P”) showed higher relative abundances. Differences in species richness and diversity indices were found between groups while Beta diversity did not show significant

differences. As BT the species *Neisseria perflava*, *Porphyromonas gingivalis*, *Veillonella atypica*, among others, were more abundant in groups “D”, “P” and “DP” respectively. The KEEG pathways “ko03010-Ribosome” “ko02040-Flagellar assembly” and “ko01100-Metabolic pathways” were more abundant in groups “D”, “P” and “DP” respectively. For all groups, the PTM was altered and the presence of the bacterium *Porphyromonas gingivalis* in the samples of group “D” suggested that the disease is capable of altering the microbiome and predisposing to the development of periodontitis. Research with larger samples, as well as with participants at various stages of disease evolution, is necessary.

Keywords: Human microbiome, taxonomic biomarker, functional biomarker, gingival crevicular fluid.

Introduction

The set of favorable conditions determines that the oral microbiota is an important part of our body microbiota. More than 700 species of bacteria make up this set and they develop relationships and means of survival only found in the oral environment, such as biofilms^[1].

The host is clearly active in shaping the composition of the oral microbiome, as only a few of the many bacterial species are able to colonize the human oral cavity^[2]. The acquisition and establishment of the oral microbiota occurs in a dynamic process over several stages and involves close and ongoing interactions with the host and its environment^[3], this acquisition can be modulated by nutritional factors^[4], as well as gender, race, age and geographic location of the host, biological and cultural factors, hygiene, physiology, health status, genetics and lifestyle^[5,6].

The microorganisms and their relationships that constitute the oral microbiome give this environment a high degree of complexity, this relationship influences and is influenced both by oral health and systemic health^[7]. There is already robust evidence that the balance between health and disease can be affected by the oral microbiome^[8], and that many systemic diseases are associated with disturbances of this ecosystem, such as obesity, diabetes mellitus, cardiovascular diseases and cancers^[7,9,10,11,12].

Diabetes mellitus is the collective term for heterogeneous metabolic disorders whose main finding is chronic hyperglycemia, the cause being a disorder of insulin

secretion or a disorder of the effect of insulin, or generally both^[13]. More than 90% of diabetes mellitus cases are type 2 (DMT2)^[13].

Data from the World Health Organization show that more than 420 million people in the world are diabetic, that is, around 6% of the world population, an increase to 570 million in 2030 and 700 million in 2045 is expected^[14]. In 2019, 1 in 11 people aged between 20 and 79 years old had diabetes, representing a total of 463 million people worldwide and there is still a 51% increase in diagnoses by 2045^[15]. About 80% of people with diabetes live in low- and middle-income countries, with almost no access to adequate treatment, in Latin America, the prevalence of type 2 diabetes mellitus varies from 8 to 13% and about 40% are unaware of their condition^[16,17].

Periodontitis is considered a multimicrobial inflammatory disease in which the various bacterial species within the dental biofilm are in a dysbiotic state and this imbalance favors the establishment of chronic inflammatory conditions and, ultimately, the destruction of the supporting tissues of the teeth^[18,19,20].

It is considered the second most prevalent oral disease in the world, affecting more than 750 million people (10% of the population)^[21,22], with age-adjusted prevalence of 11.2%^[22], is the fourth most common disease in the list of global diseases^[23]. In Latin America, the prevalence of chronic periodontitis is high and can vary between 40% and 80%^[24].

The oral microbiome plays an active role in maintaining the health of the periodontium and it undergoes considerable changes under systemic conditions²⁵. The two-way relationship between diseases and systemic diseases, especially chronic non-communicable diseases (NCDs) has been studied in recent years with emphasis on research focused on the intestinal microbiota and microbiome and their relationship with the immune system^[26,27, 28, 29].

Several studies point to a solid and bidirectional relationship between periodontitis and type 2 diabetes mellitus^[30,31,32,33,34,10,11,35,12,36]. The search for elucidations about a bidirectional relationship between periodontal diseases and systemic diseases is still a current focus^[29].

Diabetes increases a person's chances and risk of developing periodontitis (↑34%), so it is an important risk factor^[37, 35], in addition to favoring the development of more severe periodontitis^[38]. Systemic diseases, or those associated with increased inflammation, increase susceptibility to periodontal disease^[39,40,41,10,34]. On the other

hand, in groups of patients with severe periodontitis, the incidence of type 2 diabetes mellitus can be increased by 53%^[35].

As branches of scientific production in microbiology, the work involving the survey of the normal microbiota and dysbiosis in several niches of the human body has been growing significantly, mainly due to the reduction of costs for carrying out sequencing and the possibility of analysis in silico with the help of bioinformatics with the accomplishment of metagenomics and metataxomics ^[42,43,3].

The 16S rRNA amplicon sequencing compared to the “Shotgun” sequencing is significantly more economical, has reference databases with samples of practically all known species, but delivers results referring only to the taxonomic profile and not to the functional profile^[44].

Accompanying the significant increase in possibilities arising from greater access to sequencing, Pipelines (a series of software tools) have also recently emerged, which have made it possible to analyze raw data from the most varied sequencing platforms quickly and with possibilities of analysis with a high degree of complexity.

Among these Pipelines is the Microbiome Taxonomic Profile (MTP) available on EzBioCloud 16S (www.ezbiocloud.net), with a cloud service focused on taxonomy, ecology, genomics, metagenomics and bacterial microbiome. This Pipeline made it possible to predict taxonomic and functional biomarkers through information from 16S rRNA sequencing and prediction of genes present in the microbiome as well as their significantly more abundant pathways and orthologs^[45,46].

Given the technological innovation of the last decade applied to sequencing as well as the important role of the oral microbiota in maintaining the health of the periodontium and its recent relationships with pathogenic processes and systemic diseases ^[25,29,42,43,47] including diabetes mellitus and periodontal disease, the search for understanding between the relationship or possible associations of the gingival crevicular fluid microbiota and these diseases has become important, as it may generate indicators for diagnosis and pathogenicity.

This study aimed to describe the oral microbiome of a specific environment, gingival sulcus and/or gingival crevicular fluid in healthy individuals or with periodontal disease, diabetes or both diseases, aiming to establish a relationship between health conditions and disease and their respective interferences in the distribution and

predominance of genera and species of bacteria, as well as to identify potential taxonomic and functional biomarkers for diabetes mellitus and periodontitis.

This study aimed to: a) describe the oral microbiome of a specific environment, gingival sulcus and/or gingival crevicular fluid in healthy individuals or those with periodontal disease, diabetes or both; b) establish a relationship between health and disease conditions and their respective interference in the distribution and predominance of genera and species of bacteria; c) identify potential taxonomic and functional biomarkers for diabetes mellitus and periodontitis.

Results

General characterization of study participants

Gingival crevicular fluid samples from 42 participants were collected and manipulated, with their pools subjected to 16s rRNA amplicon sequencing. Some characteristics related to the general health status and socioeconomic conditions of the study participants are presented in the Supplementary Table 1.

Taxonomic profile of the microbiome, alpha diversity (species richness and diversity) and beta diversity

The number of reads obtained by sequencing bacterial 16S rRNA gene amplicons, as well as other sequencing information and the number of species found for each group is presented in Table 1.

The phyla with the highest relative abundances were: in the “Health” group: Firmicutes (29.54%), Fusobacteria (23.90%), Bacteroidetes (21.96%) and Proteobacteria (16.40%); in the “Diabetics” group: Bacteroidetes (32.68%), Fusobacteria (23.87%), Firmicutes (23%) and Proteobacteria (15%); in the “Periodontitis” group: Bacteroidetes (40.77%), Fusobacteria (17.49%), Firmicutes (15.17%) and Spirochaetes (14.33%); and in the “Diabetics/Periodontitis” group: the phyla, Bacteroidetes (43.40%), Firmicutes (26.89%), Fusobacteria (13.28%) and Proteobacteria (8.20%) (Supplementary Figure 1 and Table 2). Full results are available in Supplementary Files 1, 2, 3 and 4.

The bacterial species with the highest relative abundances were: in the “Health” group: *Fusobacterium nucleatum* (22.09%), *Veillonella dispar* (5.99%), *Haemophilus parainfluenzae* (5.54%), *Streptococcus pneumoniae* (4, 97%) and *Paludibacter ADCM_s* (4.49%); in the “Diabetics” group: *Fusobacterium nucleatum* (19.92%), *Alloprevotella tanneriae* (7.47%), *Neisseria perflava* (6.59%), *Streptococcus pneumoniae* (5.31%), *Paludibacter ADCM_s* (4.32%); in the “Periodontitis” group: *Porphyromonas gingivalis* (15.82%), *Fusobacterium nucleatum* (15.67%), *Prevotella intermedia* (6.13%), *Treponema KE332528_s* (3.94%) and *Fretibacterium GU430992_s* (3.51%); and finally in the “Diabetics/Periodontitis” group: *Fusobacterium nucleatum* (10.34%), *Prevotella melaninogenica* (7.23%), *Veillonella atypica* (5.39%), *Porphyromonas gingivalis* (3.91%) and *Prevotella nigrescens* (3.76%) (Figure 2A, 2B, 2C and 2D and Table 2). Full results are available in Supplementary Files 1, 2, 3 and 4.

Regarding alpha diversity, when comparing species richness between groups, statistically significant results were found between “Healthy” versus “Periodontitis”, with greater richness for the “Healthy” group (Jackknife, $p=0.05$). “Diabetics” versus “Periodontitis”, with greater richness for the “Diabetics” group (Jackknife, $p=0.05$). “Periodontitis” versus “Diabetics/Periodontitis” with greater richness for the “Diabetics/Periodontitis” group (ACE, $p=0.05$; Chao 1, $p=0.05$ and Jackknife, $p=0.05$) (Figures 3A, 3B, 3C, 3D, 3E and 3F). Complete results in Supplementary Table 2 and Supplementary Figure 2.

About species diversity, statistically significant results were found when comparing the “Periodontitis” versus “Diabetics/Periodontitis” groups, with greater diversity for the “Diabetics/Periodontitis” group (NPS Shannon, $p=0.05$; Shannon, $p=0.05$; Simpson, $p=0.05$ and Phylogenetic Diversity, $p=0.05$) (Figure 3G, 3H, 3I and 3J). Comparisons with statistically non-significant results are presented in Supplementary Table 2 and Supplementary Figure 2.

Regarding Beta diversity, Figure 4 and Supplementary Figure 3 present the results with the Bray-Curtis, Jensen Shannon, Generalized UNIFRAC and UNIFRAC distances based on the taxonomic abundance profiles. Multivariate permutational analysis of variance (PERMANOVA) was applied and no statistically significant differences were found between the groups.

Identification of taxonomic biomarkers among groups

Using linear discriminant analysis effect size (LEfSe) (minimum LDA score: 2.0), the differential abundance between all groups was compared. When comparing the “Healthy” versus “Diabetics” groups, 224 taxa were found, including 5 phyla, 9 classes, 14 orders, 27 families, 48 genera and 121 species, all of which were significantly abundant and discriminatory between groups. The bacterial species *Neisseria perflava*, *Alloprevotella tanneriae*, *Capnocytophaga leadbetteri*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella oris*, were significantly more abundant in the “Diabetics” group, along with other (Figure 5A).

In the same way, when comparing the “Healthy” versus “Periodontitis” groups, 201 taxa were found, including 6 phyla, 10 classes, 17 orders, 29 families, 48 genera and 91 species, all of which were significantly abundant and discriminated between groups. The bacterial species *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *KE332528_s*, *Filifactor alocis*, *Treponema_uc*, among others, were significantly more abundant in the “Periodontitis” group (Figure 5B).

When comparing the “Healthy” versus “Diabetics and Periodontitis” groups, 242 taxa were found, including 5 phyla, 11 classes, 18 orders, 30 families, 51 genera and 127 species, all of which were significantly abundant and discriminative between groups. The bacterial species *Veillonella atypica*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella pallens*, *Prevotella oris*, *KI259256_s*, among others, were significantly more abundant in the group “Diabetics and Periodontitis” (Figure 5C).

Also, when comparing the groups “Diabetics” versus “Periodontitis”, 268 taxa were found, including 9 phyla, 16 classes, 23 orders, 32 families, 55 genera and 132 species, all of which were significantly abundant and discriminative between groups. The bacterial species *Alloprevotella tanneriae*, *Neisseria perflava*, *Streptococcus pneumoniae group*, *ADCM_s*, *Capnocytophaga leadbetteri*, *Parvimonas micra*, *Prevotella oris*, among others were significantly more abundant in the “Diabetics” group. The species *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas endodontalis*, *KE332528_s*, *Filifactor alocis*, among others, were significantly more abundant in the “Periodontitis” group (Figure 5D).

Comparing the “Diabetics” versus “Diabetics and Periodontitis” groups, 217 taxa were found, including 8 phyla, 12 classes, 15 orders, 24 families, 42 genera and 116 species, all of which were significantly abundant and discriminative between groups.

The bacterial species *Fusobacterium nucleatum* group, *Neisseria perflava*, *Alloprevotella tanneriae*, *Streptococcus pneumoniae* group, ADCM_s, among others, were significantly more abundant in the “Diabetics” group. The species *Prevotella melaninogenica*, *Veillonella atypica*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella pallens*, *Porphyromonas endodontalis*, among others, were significantly more abundant in the “Diabetics and Periodontitis” group (Figure 5E).

Finally, when comparing the “Periodontitis” versus “Diabetics/Periodontitis” groups, 244 taxa were found, including 8 phyla, 15 classes, 16 orders, 23 families, 44 genera and 138 species, all of which were significantly abundant and discriminatory among the groups. The bacterial species *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, KE332528_s, GU430992_s, *Filifactor alocis*, among others, were significantly more abundant in the “Periodontitis” group. The bacterial species *Prevotella melaninogenica*, *Veillonella atypica*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella pallens*, *Prevotella oris*, among others, were significantly more abundant in the group “Diabetics/Periodontitis” (Figure 5F).

Identification of functional metabolic pathways between groups

In order to identify relevant differences between the groups, regarding the profiles of functional metabolic pathways for cellular processes and orthology for cellular processes, a LEfSe analysis was performed using the 224 pathways and the 2860 orthologs from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) with logarithmic LDA score > 2.0 ; alpha value < 0.05 .

When comparing the “Healthy” versus “Diabetics” groups, two metabolic pathways were significantly more abundant in the “Diabetics” group, ko03010-Ribosom (LDA=2.982, $p=0.049$) and ko00190-Oxidative phosphorylation (LDA=2.526, $p=0.049$). A total of 237 KEEG orthologs showed significant differences between groups, of these, 160 in the Diabetics group (13 orthologs with LDA > 2.0) and 77 in the Healthy group (14 orthologs with LDA > 2.0) (Table 3).

Comparing the Healthy and Periodontitis groups, three pathways were significantly more abundant in the Periodontitis group: ko02040-Flagellar assembly (LDA=3.182, $p=0.049$), ko03010-Ribosome (LDA=3.173, $p=0.049$) and ko02030-Bacterial chemotaxis (LDA=3.136, $p=0.049$). A total of 330 KEEG orthologs showed

significant differences between groups, of which 186 in the Periodontitis group (96 with LDA>2.0) and 144 in the “Healthy” group (86 with LDA>2.0) (Table 3).

When comparing the “Healthy” and “Diabetics/Periodontitis” groups, six pathways were significantly more abundant in the “Diabetic/Periodontitis” group; ko01100-Metabolic pathways (LDA=3.513, p=0.049), ko03010-Ribosome (LDA=3.233, p=0.049), ko00240-Pyrimidine metabolism (LDA=2.914, p=0.049), ko00970-Aminoacyl-tRNA biosynthesis (LDA=2.875, p= 0.049), ko03440-Homologous recombination (LDA=2.874, p=0.049), ko00230-Purine metabolism (LDA=2.688, p=0.049). A total of 304 KEEG orthologs showed significant differences between groups, of which 212 in the “Diabetics/Periodontitis” group (87 with LDA>2.0) and 92 in the “Healthy” group (36 with LDA>2.0) (Table 3).

When comparing the “Diabetics” and “Periodontitis” groups, three pathways were significantly more abundant in the “Diabetics” group: ko02040-Flagellar assembly (LDA=3.237, p=0.049), ko02030-Bacterial chemotaxis (LDA=3.215, p=0.049), ko02020-Two-component system (LDA=2.921, p=0.049). Six pathways were significantly more abundant in the “Periodontitis” group: ko01100-Metabolic pathways (LDA=3.602, p=0.049), ko01110-Biosynthesis of secondary metabolites (LDA=3.064, p=0.049), ko01120-Microbial metabolism in diverse environments (LDA= 2.972, p=0.049), ko02060-Phosphotransferase system (PTS) (LDA=2.843, p=0.049), ko00190-Oxidative phosphorylation (LDA=2.773, p=0.049), ko00500-Starch and sucrose metabolism (LDA=2.698, p=0.049). A total of 312 KEEG orthologs showed significant differences between groups, of which 109 in the “Diabetics” group (55 with LDA>2.0) and 203 in the “Periodontitis” group (127 with LDA>2.0) (Table 3).

When comparing the “Diabetics” and “Diabetics/Periodontitis” groups, two pathways were significantly more abundant in the “Diabetics” group: ko02020-Two-component system (LDA=2.818, p=0.049), ko02060-Phosphotransferase system (PTS) (LDA=2.703, p=0.049). Fourteen pathways were significantly more abundant in the “Diabetics/Periodontitis” group: the two with the highest LDAs were ko01100-Metabolic pathways (LDA=3.434 and p=0.0495), ko01130-Biosynthesis of antibiotics (LDA=3.243 and p=0.0495) the others are found in Table 3. A total of 241 KEEG orthologs showed significant differences between groups, of which 80 in the “Diabetics” group (27 with LDA>2.0) and 161 in the “Diabetics/Periodontitis” group (68 with LDA>2.0) (Table 3).

When comparing the “Periodontitis” and “Diabetics/Periodontitis” groups, four pathways were significantly more abundant in the “Periodontitis” group: ko02020-Two-component system (LDA= 3.264, p=0.049), ko02040-Flagellar assembly (LDA= 3.092, p =0.049), ko02030-Bacterial chemotaxis (LDA=3.081, p=0.050), ko02024-Quorum sensing (LDA=2.965, p=0.049). Six pathways were significantly more abundant in the “Diabetics/Periodontitis” group: ko01100-Metabolic pathways (LDA=3.622 p=0.049), ko01110-Biosynthesis of secondary metabolites (LDA=3.216, p=0.049), ko01230-Biosynthesis of amino acids (LDA =3.266, p=0.049), ko01130- Biosynthesis of antibiotics (LDA=3.252, p=0.049), ko00270-Cysteine and methionine metabolism (LDA=2.901, p=0.049), ko00790-Folate biosynthesis (LDA=2.825, p=0.049). A total of 255 KEEG orthologs showed significant differences between groups, of these, 126 in the “Periodontitis” group (82 with LDA>2.0) and 129 in the “Diabetics/Periodontitis” group (68 with LDA>2.0) (Table 3).

Discussion

Initially, the taxonomic profiles of microbiomes were raised by sequencing amplicons of phylogenetic markers. To demonstrate these profiles and facilitate comparisons between taxa, the relative abundance (RA) was adopted, that is, the abundance of a species (for example) in relation to the total^[48].

Data regarding the biomass of the samples can be obtained through the number of “Valid reads” presented in Table 1. In our results, in relation to the “Healthy” group, there was a 16.8% increase in biomass for the “Diabetics” group”, 76.2% for the “Periodontitis” group and 143.7% of the biomass for the “Diabetics/Periodontitis” group. Similar results were reported by Abusleme *et al.*, (2013)^[49] in relation to periodontitis when compared to healthy individuals. Schincaglia *et al.*, (2017)^[50] reinforced this trend by studying patients with gingivitis.

Regarding the taxonomic profile, regarding the phyla, the “Healthy” group presented higher relative abundances (RA) for the phyla: Firmicutes (29.54%), Fusobacteria (23.90%), Bacteroidetes (21.96%), Proteobacteria (16,40%) and Actinobacteria (2.69%). These results, almost in their entirety, are within the expected range. Segata *et al.* (2012)^[51] when analyzing data from the Human Microbiome Project (HMP) related to the bacterial community composition of 200 normal adults, he found that for the niche in question “Subgingival plaque”, the same phyla, Firmicutes

(22.74%), Bacteroidetes (22.70 %), Actinobacteria (20.20%), Fusobacteria (15.51%) and Proteobacteria (15.17%) were more abundant.

Still regarding the phyla, important alterations occur in the relative abundances when the groups with some type of disease are analyzed. For both the “Diabetics” and “Periodontitis” groups, the phylum Fusobacteria occupies the second position in relative abundance, with the phylum Bacteroidetes being the most abundant (32.68%) and (40.77%) respectively. These changes in the taxonomic profile are expected, although the studies do not provide conclusive evidence regarding the impact of type 2 diabetes mellitus on the oral microbiome profile^[34].

Study conducted by Matsha *et al.*, (2020)^[52] indicates that the phylum Firmicutes prevails in samples of gingival crevicular fluid from diabetics (with 30.73% of RA) followed by the phylum Bacteroidetes (with 18.03% of RA) and that for adults with periodontitis, there is also a prevalence of the phylum Firmicutes (with 32.7% of RA) followed now by the phylum Proteobacteria (20.84% RA). In this same study^[52], in patients with the two associated diseases (Diabetes + Periodontitis), the phylum Firmicutes was the most abundant (31.99% of RA) followed by the phylum Bacteroidetes with (17.91% of RA).

Recent data related to alterations in the salivary microbiota indicate that periodontitis complicated by type 2 Diabetes Mellitus significantly alters the microbiota and that the treatment of the disease alleviates these alterations^[53]. In the search for taxonomic biomarkers, when comparing the “Healthy” with “Diabetics” groups, and the “Healthy” with “Periodontitis” groups, the phylum Bacteroidetes appears as a candidate in both comparisons (LDA=4.77/p=0.049 and LDA=5.003/p=0.049 respectively).

As for the taxonomic profiles related to the species, particular characteristics of the place of collection of the samples submitted to the sequencing was determinant for the metabolic profile of the bacteria identified in the microbiome of all groups. The gingival sulcus is the space between the free gingiva, lined by a sulcular epithelium which, unlike the oral epithelium due to the absence of keratin, and therefore is semipermeable, allowing the passage of liquids and metabolic products in both directions, the fluid at this site is called gingival fluid, being an exudate (transudate) of tissue fluids, plasma and serum, leukocytes, structural cells of the periodontium and microorganisms, and cellular and molecular biomarkers ^[54,55,56,57]. These characteristics together determined that practically all species of bacteria found in the

samples had characteristics related to anaerobic disease, an expected result since the subgingival biofilm is typically more anaerobic^[58].

The results robustly demonstrate a different taxonomic profile of the microbiota when viewing the groups studied (“Diabetics”, “Periodontitis”, “Diabetics/Periodontitis” and compared to our control group (healthy participants “Healthy”) and corroborate with published works previously^[25,59,60,61,62,63,64,65], and even when comparing diabetic and non-diabetic groups^[30].

It is important to highlight that the bacterium “*Fusobacterium nucleatum group*” was the species with the highest relative abundance in all groups studied, including the group of healthy patients. The exception was the “Periodontitis” group, where this place was occupied by the bacterium “*Porphyromonas gingivalis*”. Differences between the studied groups are reserved, in the work of CASARIN *et al.* (2013)^[30], similar results were found.

Ohlrich, Cullinan and Leichter (2010)^[40] state that the epidemiological association between periodontitis and diabetes is clear, but the biological mechanisms of the association have not yet been fully elucidated. For Shi *et al.* (2020)^[18] patients with diabetes mellitus are more susceptible to changes in the subgingival microbiome towards dysbiosis, with a predisposition to the development of periodontitis. Recent data related to changes in the salivary microbiota indicate that periodontitis complicated by type 2 diabetes mellitus significantly alters the microbiota and that the treatment of the disease (diabetes) alleviates these changes^[53].

As an important finding, we highlight the detection of the main pathogen responsible for the development of Periodontitis (*Porphyromonas gingivalis*)^[66] in the “Diabetics” group of diabetic participants, in higher relative abundance when compared to the “Healthy” group (1.77% versus 0.02%). Furthermore, the bacterium was identified by LEFse analysis as a taxonomic biomarker of this group.

In this sense, we dare to suggest that Type 2 Diabetes Mellitus may influence a change in the taxonomic profile of the subgingival microbiome, which would open the way for dysbiosis and consequent development of periodontitis, as already reported in another study by Shi *et al.* (2020)^[18], to the point that this could be one of the explanations for a higher prevalence of periodontitis in these patients^[10,34,37,38,39,40,67,68], as the specific factors that lead to changes in the bacteria that cause periodontal disease are unknown, although it is recognized that systemic diseases such as

diabetes, metabolic syndrome, and rheumatoid arthritis (RA) predispose to periodontitis^[69,70].

The detection of *Porphyromonas gingivalis* in our study differs from published results. Study conducted by Field *et al.*(2012)^[67] did not detect the presence of the bacteria in samples from the gingival crevicular fluid of diabetic patients without periodontitis. Zhou *et al.*, (2013)^[71] showed that type 2 diabetes mellitus can alter the bacterial composition of the subgingival plaque and is an important risk factor for periodontitis; however, the same authors also did not detect *Porphyromonas gingivalis* in the group of patients with the disease.

In contrast, Castrillon *et al.* (2013)^[63] state that microorganisms belonging to the red complex (among them *Porphyromonas gingivalis*) were detected at lower frequencies in patients with diabetes. High glucose levels in patients with diabetes mellitus lead to the development of periodontogenic flora due to reduced production of oxygen and defense cells, thus, diabetic patients have an increased susceptibility to more severe periodontal disease due to the increased prevalence of periodontal disease *Porphyromonas gingivalis*^[72].

Porphyromonas gingivalis (after *Bacteroidetes gingivalis*) is a pathogen highly adapted to the oral microbiome^[73]. Several studies have already proven its relationship with periodontal diseases, especially with the pathophysiology^[74,75,76] and direct relationship with the clinical course of the disease^[74]. This bacterium has the ability to produce several virulence factors, including proteases^[77].

The presence of this bacterium, specifically in this group of diabetics (Diabetics) is worrisome since it can increase the difficulty of glycemic control through its lipopolysaccharide influencing insulin activity^[78]. Inflammatory mediators can negatively affect glycemic control, and elevated glucose levels and the resulting glycation end products can alter the host response against bacterial infection^[30,39]. Insulin resistance is increased by pathogen-induced periodontitis due to an adaptive immune response specifically directed against pathogens and associated with periodontal dysbiosis^[79].

In our results, the *Porphyromonas gingivalis* was the bacterium with the highest relative abundance in the "Periodontitis" group, with a drop of 3 (three) positions in the "Diabetics/Periodontitis" group. This result was already expected and reported in another study^[71] and as already discussed, the role of this bacterium in the pathophysiology of periodontitis is well established.

Another attribute measured was the biodiversity of the taxonomic profile of the groups studied. One of the factors in this attribute is the richness of species that, is defined as “the variety of species based simply on counting the number of species in a given sample”^[80].

In this sense, it is noticed that all the groups whose participants had the diagnosis of some disease, “Diabetics”, “Periodontitis” or “Diabetics/Periodontitis” had all the species richness indexes used lower than the “Healthy” group, a result to a certain extent. expected point, because with regard to the oral microbiome, microbial richness can be considered an indicator of health status^[81]. Statistically significant results were found only when comparing the “Healthy” versus “Periodontitis”, “Diabetics” versus “Periodontitis” or “Periodontitis” versus “Diabetics/Periodontitis” groups, always with a lower richness being observed for the “Periodontitis” group. Farina *et al.* (2019)^[82] state that periodontitis and/or type 2 diabetes mellitus are associated with a tendency to decrease both the richness and the diversity of the subgingival microbiome.

Previous study conducted by Abusleme *et al.* (2013)^[49] reported different results, with lower alpha diversity indices (species richness and diversity) detected for the healthy participants group when compared to the “periodontitis” group. Still in this sense, Ai *et al.* (2017)^[83], reported that healthy individuals have greater alpha diversity when compared with patients with periodontitis.

As for species diversity, the results did not follow a detectable pattern, although, significantly, the “Periodontitis” group showed lower rates when compared to the “Diabetics/Periodontitis” group, demonstrating that periodontitis alone is responsible for a significant drop in diversity of bacterial species in this niche in question. This data corroborates a study conducted by Zhang *et al.* (2022)^[68] in which periodontitis significantly reduced the oral microbial diversity measured by the Shannon index.

Regarding the Beta diversity, although without statistical significance, the distances between the groups calculated from the taxonomic profiles of abundance and whose statistical significance were measured by means of multivariate permutation variance (PERMANOVA) were visually separated when plotted in the analysis graphs coordinate system (PCoA) or by UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages). We attribute to the small number of samples (pools) sequenced for each group the non-significance of the comparisons, new works with a greater number of samples sequenced are necessary.

The LEFse analysis used to identify taxonomic biomarkers indicated the bacteria *Neisseria perflava*, *Alloprevotella tannerae*, *Capnocytophaga leadbetteri*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella oris* as significant biomarkers in the “Diabetics” group. From these findings, we reinforce that of the bacteria mentioned as belonging to the “red complex” for periodontitis^[58], the *Porphyromonas gingivalis* was detected as a possible biomarker.

In the “periodontitis” group, two bacteria belonging to the red complex, *Porphyromonas gingivalis* and the other to the orange complex, *Prevotella intermedia* were significantly assigned as taxonomic biomarkers for periodontitis. This result is not surprising because the involvement of these microorganisms in the pathophysiology of the disease is well established. Consolidado^[58,66,72,84,85] including their uses as markers for the diagnosis of the disease^[18,71,86].

Veillonella atypica, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella pallens*, *Prevotella oris*, *KI259256_s*, 1.628 / 5.000 among others were detected as significant biomarkers in the “Diabetics/Periodontitis” group. Although with a different objective, in the study by Bachtiar et al (2021)^[25] the bacterium *Veillonella* Sp was more abundant in the group of patients with periodontitis and type 2 diabetes mellitus. It is important to note that no bacteria belonging to the red complex for periodontitis were detected as taxonomic biomarker in this group.

In the search for functional biomarkers, each specific group can be compared with two other groups, although three comparisons are possible. For the proposed purposes, all the most relevant pathways discovered through the LEfSe analysis were considered when performing all possible comparisons made with the “Healthy” group.

A total of 16 functional pathways were significantly relevant in the “Healthy” group. One of these pathways was present in all possible comparisons, as was the case with the “ko011200-Microbial metabolism in diverse environments” pathway, and two others, out of three possible comparisons, such as ko02010-ABC Transport, ko02020-Two-component system, ko02024-Quorum sensing and will be discussed later.

Also for the mentioned group, the ko00220 pathway, linked to the biosynthesis of the amino acid Arginine, the “ko00260-Glycine, serine and threonine metabolism” pathway and the “ko00290-Valine, leucine and isoleucine biosynthesis” pathway were relevant. Branched-chain amino acids (BCAAs) such as isoleucine, leucine and valine

are reported as predictive biomarkers in several studies and their levels can be increased long before the onset of diabetes^[87].

In this sense, two pathways related to degradation and metabolism of fatty acids were significantly highlighted in this group, the pathways “ko00071-Fatty acid degradation” and “ko01212-Fatty acid metabolism”. As a biomarker, free fatty acids, monounsaturated fatty acids, saturated fatty acids, and n-7 and n-9 fatty acids correlate with an increased risk of developing hyperglycemia and type 2 diabetes^[88].

The ko02024-Quorum sensing pathway with 262 genes acts as a regulatory system for communication between bacteria through signaling molecules responsible for virulence, competence, conjugation, antibiotic production, motility, sporulation and biofilm formation, all dependent on population density^[89,90,91].

The enrichment of these pathways in a group of healthy and non-diabetic patients can be fully explained by the mean age or age group of the group in question, as well as by the presence of other diseases, overweight and obesity, although these results require further studies.

As for the study groups “Diabetics”, “Periodontitis” and “Diabetics/Periodontitis”. The most relevant pathways were considered through the LEfSe analysis when comparisons were made with the “Healthy” control group.

For the “Diabetics” group, a total of 2 (two) functional pathways differed significantly and were therefore considered relevant: The “Ko00190- Oxidative phosphorylation” pathway is related to cellular metabolism, more specifically to energy metabolism, thus participating in one of the processes most important in the cells because it guarantees the accomplishment of almost all other vital processes⁹², and also the “ko03010-Ribosome” pathway, with 143 orthologs, which is related to the processing of genetic information, more specifically to the messenger RNA translation process. Mariappan *et al.* (2011)^[93] tested the hypothesis that high glucose induces ribosomal biogenesis, as indicated by an increase in rRNA synthesis in the scenario of increased protein synthesis, and concluded that high glucose increased overall protein synthesis, matrix protein expression.

For the “Periodontitis” group, a total of 3 (three) functional pathways differed significantly and, therefore, were considered relevant: the ko03010-Ribosome pathway whose function has already been mentioned above, and two pathways related to cell mobility, ko02040-Flagellar assembly (55 orthologs) and ko02030-Bacterial chemotaxis (26 orthologs). The flagellum is one of the main responsible for bacterial

motility^[94,95]. Through chemotaxis, bacteria move towards more favorable conditions^[96], It is also an important mechanism of pathogenicity and plays an important role in infection and disease, as many pathogenic bacteria have chemotaxis signals^[97].

In the group composed of diabetic participants with periodontitis, a total of 6 (six) different functional pathways were reported by the analysis. The pathways related to the nucleotide metabolism “ko00230-Purine metabolism” and “ko00240-Pyrimidine metabolism”, the ko00970-Aminoacyl-tRNA biosynthesis pathway, related to the process of genetic information, more specifically with the m-RNA translation and also the pathway “ko03440-Homologous recombination”, in this case related to the DNA repair process.

After all the stages of the research, it was possible to establish that the microbiome of the gingival sulcus/gingival crevicular fluid is directly influenced by the health conditions studied, this being true both in the distribution and in the predominance of specific bacterial genera and species, this condition being well established by the alpha diversity analyzes performed.

The identification of taxonomic and functional biomarkers for all groups studied, as well as the possible role of diabetes mellitus as a cause of dysbiosis that resulted in the detection, in this group, of bacteria involved in the pathophysiology of periodontitis, opens the way for new designs for future studies.

Material and Methods

Ethical aspects

The research protocol and all its stages were approved by the Ethics Committee in Research with Human Beings of the University of Rio Verde (CEP/UniRv - opinion nº 2.304.394/2017), and conducted according to principles of the Declaration of Helsinki and the Resolution 466/2012 of the National Health Council/Ministry of Health/Brazil. Free and informed consent was obtained from all study participants by signing a specific term.

Study design

A stratified block case-control study was performed for 2 diseases (periodontal disease and diabetes). To determine the sampling (a priori), the expected effect size of the differences between the healthy (negative control) and diseased (periodontitis or diabetes) subgroups of 50%^[98] was considered, with a power of 75% and degree of freedom equal to 3 (the study was stratified into 4 subgroups). It was possible to identify a sample size of 40 participants. Considering the possibility of losses for the samples after the collections of 5%, 42 samples were obtained. Participants were allocated according to eligibility criteria into the following subgroups: negative control (Healthy group, n = 9), Diabetics (n = 12), Periodontitis (n = 10), “Diabetics/Periodontitis (n = 11). The sample imbalance for the subgroups was present due to two factors: 1st, greater homogeneity found in the control subgroup allowed a smaller number of participants. 2nd higher or lower frequency of patients between the subgroups who met the eligibility criteria during the selection period (July to October/2021).

Eligibility Criteria

In the subgroup “Healthy” were allocated individuals with proven clinical absence of Periodontitis and Diabetes Mellitus type 2. In the subgroup “Diabetics” were allocated patients diagnosed with Diabetes Mellitus type 2 (compensated) and confirmed the absence of Periodontitis. Participants diagnosed with Periodontitis and without Type 2 Diabetes Mellitus were allocated to the “Periodontitis” subgroup. Participants diagnosed with Type 2 Diabetes Mellitus (compensated) and Periodontitis were allocated to the “Diabetics/Periodontitis” group.

All diseases were diagnosed and/or confirmed by qualified professionals following clinical criteria and specific criteria for each disease. For Type 2 Diabetes Mellitus, all the recommendations of the American Diabetes Association^[99] Guidelines were used, and for Periodontitis, the recommendations of the American Academy of Periodontology and the European Federation of Periodontology^[100]. As inclusion criteria, age over 45 years, both sexes, were adopted for all participants; nonsmokers; non-alcoholic and not having used antibiotic therapy in the last 30 days.

All the teeth in the mouth were probed. The periodontal disease outcome measures included clinical attachment loss and periodontal pocket depth. The

periodontal pocket was defined as the measurement starting at 5 mm from the gingival margin to the bottom of the pocket. The gingival margin was measured from the cemento-enamel junction to the gingival margin. The examiners measured probing depth and gingival margin at six sites per tooth for each fully erupted tooth, except the third molars, in each patient. Two skilled examiners were calibrated for periodontal assessments, so that the measurements were comparable. The clinical attachment levels were calculated, a periodontal diagnosis was provided, and the patients were classified [98,100].

For diabetics, the diagnosis of the disease as well as the disease state was obtained through the fasting glucose test and the glycated glucose test.

16S rRNA gene collection, extraction and sequencing

A total of 2 (two) samples of gingival crevicular fluid were collected from each participant. The collection was performed in an outpatient setting. Absorbent paper cones (number 35), Meta Biomedic® brand. The cone was inserted into the subgingival space, held for 4 seconds, removed and placed in a cryopreservation medium (prepared with Glycerol + BHI Broth “medium for fastidious microorganisms - New Prov®/Diassay) and placed in 2 mL cryogenic tubes with screw cap (DNase-free, RNase-free, DNA-free and Pyrogen-free brand Cryovial/Simport®) and immediately stored in liquid nitrogen (temperature of -80° C or -112° F.).

After storage, the samples underwent a DNA extraction protocol, and were subjected to quantification by spectrophotometry (Thermo Scientific NanoDrop®) and fluorimetry (Qubit®). Before sequencing, 3 pools were assembled with samples for each group (the definition of the samples that composed each pool was carried out by means of electronic drawing), these pools were then submitted to a new quantification by fluorimetry (Qubit®) and quality analysis and integrity by Agilent 2100 Bioanalyzer system® and then subjected to library construction and sequencing using the MiSeq Illumina® platform with generation of paired-end reads (Figure 1).

Bioinformatics, determination of functional taxonomic profiles

The raw data (in FASTQ format) with paired end reads resulting from the sequencing were loaded into the EzBioCloud 16S based MTP application (ChunLab,

Inc., Seoul, Republic of Korea), selecting the 16S prokaryotic database named PKSSU4.0, along with version V3-V4 of the 16S reference database. The VSEARCH program (Rognes *et al.* 2016)^[101] was used to merge (merging) each end of the same amplicon. The MTP application based on Ezbiocloud detected and filtered low quality sequences in terms of read length (<80 bp or > 2,000 bp) and average Q values less than 25. To correct the copy number of the 16s rRNA gene, the pipeline used the PICRUSt algorithm^[45]. Correction of sequencing errors and extraction of non-redundant reads were performed using DADA2 software. The UCHIME program was used to verify and remove chimeras.

The dereplicated sequences were submitted to taxonomic assignment where for this step the pipeline uses the VSEARCH program^[101] to detect and calculate the sequence similarities in relation to the EzBioCloud 16S database. The 97% similarity was used as a cut-off point for species-level identification, other cut-off points are used for genus (97 > x ≥ 94.5%), family (94.5 > x ≥ 86.5%) order (86.5 > x ≥ 82%), class (82 > x ≥ 78.5%) and phylum (78.5 > x ≥ 75%)^[102]. Sequences that are not matched at 97% are then grouped using the UCLUST tool with a 97% similarity threshold, and in this, an OTU is defined as a group of clusters.

For prediction and discovery of taxonomic and functional biomarkers, the pipeline based on EzBioCloud, used the PICRUSt algorithm. Raw sequencing reads were calculated using the EzBioCloud 16S microbiome pipeline with default parameters and discriminant reads that were found in the reference database. The microbiome functional abundance profiles of each group were recorded based on bioinformatics analyses, specifically by multiplying the vector of gene counts for each OTU by the abundance of that OTU in each sample, using the orthology database and via KEGG (Encyclopedia of Kyoto Genes and Genomes). Predicted metagenome profiles were categorized into KEGG orthology groups and KEGG pathways and compared between groups. The precision of each of the functional profiles was determined according to the closest sequenced taxon index.

As for alpha diversity, species richness was measured using four indices (ACE, Chao 1, Jackknife and Number of OTUs), while species diversity was measured using five indices (NPS Shannon, Shannon, Simpson, Phylogenetic Diversity and Good's coverage of library(%)). Beta diversity was verified with Bray-Curtis, Jensen-Shannon, Generalized UniFrac and Unifrac distances based on taxonomic abundance profiles.

Statistical analysis

The GPower version 3.1.7 program was used for sampling the estimates and power of inferences. The EzBioCloud platform was used for microbiome assessments. In the measurement of alpha diversity, in order to test whether the independent samples were selected from populations that have the same distribution, the Wilcoxon rank sum test was used. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) was applied to measure the statistical significance of β diversity. LEfSe was performed to determine enrichment in the assigned taxonomic and functional profiles of the two groups. Taxonomic levels with LEfSe values greater than 2 at a p-value <0.05 were considered statistically significant.

Declaration of data availability

Raw data were generated in Excel. Derived data supporting the findings of this study are available to the corresponding author upon request.

References

- 1 Arweiler, N.B. & Netuschil, L. The Oral Microbiota. *Advances in experimental medicine and biology*, **v.902**, 45-60 (2016). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27161350>.
- 2 Mukherjee, C. *et al.* Acquisition of oral microbiota is driven by environment, not host genetics. *Microbiome*, **v.9**, 1-13 (2021). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33622378>.
- 3 Kaan, A.M.M., Kahharova, D. & Zaura, E. Acquisition and establishment of the oral microbiota. *Periodontology 2000*, **v.86**, 123-141 (2021). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33690935>.
- 4 Vach, k. *et al.* A Log Ratio-Based Analysis of Individual Changes in the Composition of the Oral Microbiota in Different Dietary Phases. *Nutrients*, **v. 13**, 1-18 (2021). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33670849>.
- 5 Duran-Pinedo, A.E. Metatranscriptomic analyses of the oral microbiome. *Periodontology 2000*, **v.85**, 28-45 (2021). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33226688>.
- 6 Weyrich, L.S. The evolutionary history of the human oral microbiota and its implications for modern health. *Periodontology 2000*, **v.85**, 90-100 (2021). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33226710>
- 7 Zhang, Y. *et al.* Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, **v.99**, 883-893 (2018). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29710488>.

- 8 Sampaio-Maia, B. *et al.* The Oral Microbiome in Health and Its Implication in Oral and Systemic Diseases. *Advances in applied microbiology*, **v.97**, 171-210 (2016), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27926431>.
- 9 Li, Y. *et al.* Oral, Tongue-Coating Microbiota, and Metabolic Disorders: A Novel Area of Interactive Research. *Frontiers in cardiovascular medicine*, **v.8**, 1-9 (2021) [.https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34490384](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34490384) >.
- 10 Jepsen, S., Suvan, J. & Deschner, J. The association of periodontal diseases with metabolic syndrome and obesity. *Periodontology 2000*, **v.83**, 125-153 (2020). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32385882>.
- 11 Charupinijkul, A. *et al.* The effect of obesity on periodontitis progression: the 10-year retrospective cohort study. *Clinical oral investigations*, **v.26**, 535-542 (2022), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34180000>.
- 12 Sanz, M. *et al.* Periodontitis and cardiovascular diseases: *Consensus report*. *Journal of clinical periodontology*, **v.47**, 268-288 (2020), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32011025>.
- 13 Holman, N., Young, B. & Gadsby, R. Current prevalence of Type 1 and Type 2 diabetes in adults and children in the UK. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, **v.32**, 1119-1120 (2015). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25962518>.
- 14 Hunt, D. *et al.* The WHO Global Diabetes Compact: a new initiative to support people living with diabetes. *The lancet. Diabetes & endocrinology*, **v.9**, 325-327 (2021). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33862005> >.
- 15 IDF - **International Diabetes Federation**. Diabetes Atlas | Tenth Edition. (2022). <https://diabetesatlas.org/> >.
- 16 Mohan, V. *et al.* Management of Type 2 Diabetes in Developing Countries: Balancing Optimal Glycaemic Control and Outcomes with Affordability and Accessibility to Treatment. *Diabetes therapy : research, treatment and education of diabetes and related disorders*, **v.11**, 15-35 (2020). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31773420>.
- 17 Manne-Goehler, J. *et al.* Health system performance for people with diabetes in 28 low- and middle-income countries: A cross-sectional study of nationally representative surveys. *PLoS medicine*, **v.16**, 1-21 (2019). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30822339>.
- 18 Shi, B. *et al.* The subgingival microbiome associated with periodontitis in type 2 diabetes mellitus. *The ISME journal*, **v.14**, 519-530 (2020). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31673077>.
- 19 Fragkioudakis, I., Riggio, M.P. & Apatzidou, D.A. Understanding the microbial components of periodontal diseases and periodontal treatment-induced microbiological shifts. *Journal of medical microbiology*, **v.70**, 1-11 (2021). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33295858>.
- 20 Tonetti, M.S., Greenwell, H. & Kornman, K.S. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of periodontology*, **v.89**(Suppl1), S159-S172, (2018). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29926952> >.

- 21 Marcenes, W. *et al.* Global burden of oral conditions in 1990-2010: a systematic analysis. *Journal of dental research*, **v.92**, 592-597 (2013).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23720570>
- 22 Kassebaum, N.J, *et al.* Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *Journal of dental research*, **v.93**, 1045-1053 (2014).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25261053>.
- 23 Vos, T. *et al.* Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, **v.380**, 2163-2196 (2012). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23245607> >.
- 24 Oppermann, R.V., Haas, A.N., Rösing, C.K. & Susin, C. Epidemiology of periodontal diseases in adults from Latin America. *Periodontology 2000*, **v.67**, 13-33 (2015).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25494596>
- 25 Bachtiar, B.M. *et al.* A pilot study of red complex and three genera subgingival microbiome in periodontitis subjects with and without diabetes, evaluated by MinION platform. *F1000Research*, **v.10**, 1-23, (2021),
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34249333>
- 26 Duncan, S.H. *et al.* Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *International journal of obesity*, **v.32**, 1720-1724 (2008).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18779823>.
- 27 Haro, C. *et al.* Intestinal Microbiota Is Influenced by Gender and Body Mass Index. *PloS one*, **v.11**,1-16 (2016). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27228093>.
- 28 Khor, B. *et al.* Interconnections Between the Oral and Gut Microbiomes: Reversal of Microbial Dysbiosis and the Balance Between Systemic Health and Disease. *Microorganisms*, **v.9**, 496 (2021). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33652903>.
- 29 Barutta, F., Bellini, S., Durazzo, M., & Gruden, G. Novel Insight into the Mechanisms of the Bidirectional Relationship between Diabetes and Periodontitis. *Biomedicines*, **v. 10**, 178, (2022). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8774037/>.
- 30 Casarin, R.C. *et al.* Subgingival biodiversity in subjects with uncontrolled type-2 diabetes and chronic periodontitis. *Journal of periodontal research*, **v.48**, 30-36, (2013),
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22762355>.
- 31 Artese, H.P. *et al.* Periodontal therapy and systemic inflammation in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *PloS one*, **v.10**, 1-14 (2015).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26010492> >.
- 32 Nazir, M.A. *et al.* The burden of Diabetes, Its Oral Complications and Their Prevention and Management. *Macedonian journal of medical sciences*, **v.6**, 1545-1553 (2018). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30159091> >.
- 33 Minty, M. *et al.* Oral microbiota-induced periodontitis: a new risk factor of metabolic diseases. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, **v.20**, 449-459 (2019),
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31741266> >.
- 34 Graves, D.T., Corrêa, J.D. & Silva, T.A. The Oral Microbiota Is Modified by Systemic Diseases. *Journal of dental research*, **v.98**, 148-156 (2019).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30359170>.

- 35 Wu, C.Z. *et al.* Epidemiologic relationship between periodontitis and type 2 diabetes mellitus. *BMC oral health*, **v.20**, 2-15 (2020). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32652980> >.
- 36 Stöhr, J., Barbaresco, J., Neuenschwander, M. & Schlesinger, S. Bidirectional association between periodontal disease and diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Scientific reports*, **v.11**, 13686 (2021). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34211029> >.
- 37 Preshaw, P.M. *et al.* Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia*, **v. 55**, 21-31 (2012). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22057194> >.
- 38 Hintao, J., Teanpaisan, R., Chongsuvivatwong, V., Ratarasan, C. & Dahlen, G. . The microbiological profiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus. *Oral microbiology and immunology*, **v. 22**, n. 3, 175-181 (2007). ISSN 0902-0055. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17488443> >.
- 39 Taylor, G.W., & Borgnakke, W.S. Periodontal disease: associations with diabetes, glycemic control and complications. *Oral diseases*, **v.14**, 191-203 (2008). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18336370>.
- 40 Ohlrich, E.J., Cullinan, M.P. & Leichter, J.W. Diabetes, periodontitis, and the subgingival microbiota. *Journal of oral microbiology*, **v. 2**, 1-19 (2010). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21523215>.
- 41 Zhang, D., Goetz, W., Braumann, B., Bourauel, C. & Jaeger, A. Effect of soluble receptors to interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha on experimentally induced root resorption in rats. *Journal of periodontal research*, **v.38**, 324-332 (2003). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12753372>.
- 42 Ursell, L.K., Metcalf, J.L., Parfrey, L.W. & Knight, R. Defining the human microbiome. *Nutrition reviews*, **v.70** Suppl 1, S38-S44 (2012) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22861806>.
- 43 Cho, I. & Blaser, M.J. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature reviews. Genetics*, **v.13**, 260-270 (2012). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22411464>.
- 44 Ranjan, R., Rani, A., Metwally, A., McGee, H.S. & Perkins, D.L. Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochemical and biophysical research communications*, **v.469**, 967-977 (2016). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26718401> >.
- 45 Langille, M.G. *et al.* Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature biotechnology*, **v.31**, 814-821 (2013). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23975157>.
- 46 Yoon, S.H. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **v.67**, 1613-1617 (2017). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28005526>
- 47 Liu, S., Gao, J., Zhu, M., Liu, K., & Zhang, H.L. Gut Microbiota and Dysbiosis in Alzheimer's Disease: Implications for Pathogenesis and Treatment. *Molecular neurobiology*, **v.57**, 5026-5043 (2020). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32829453>.
- 48 Magurran, A. E. Measuring biological diversity. (Editora UFPR, Brasil, 2011). ISSN 9788573352788.

- 49 Abusleme, L. *et al.* The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *The ISME journal*, **v.7**, 1016-25, (2013). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23303375>.
- 50 Schincaglia, G.P. *et al.* Clinical, Immune, and Microbiome Traits of Gingivitis and Peri-implant Mucositis. *Journal of dental research*, **v.96**, 47-55 (2017). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28033066> >.
- 51 Segata, N. *et al.* Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome biology*, **v.13**, R42 (2012). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22698087>.
- 52 Matsha, T.E. *et al.* Oral Microbiome Signatures in Diabetes Mellitus and Periodontal Disease. *Journal of dental research*, **v.99**, 658-665 (2020), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32298191> >.
- 53 Gu, M. *et al.* Effects of type 2 diabetes and metformin on salivary microbiota in patients with chronic periodontitis. *Microbial pathogenesis*, **v.161**, part B, (2021) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34740808> >.
- 54 Gasner, N.S. & Schure, R.S. Periodontal Disease. 2022 May 8. In: **StatPearls** [Internet]. Treasure Island (FL): (StatPearls Publishing; 2022). PMID: 32119477. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32119477> >.
- 55 de Faria Amormino, S.A. *et al.* Hypermethylation and low transcription of TLR2 gene in chronic periodontitis. *Human immunology*, **v.74**, 1231-1236 (2013). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23747679> >.
- 56 Bostanci, N. & Belibasakis, G.N. Gingival crevicular fluid and its immune mediators in the proteomic era. *Periodontology 2000*, **v.76**, 68-84 (2018). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29193353> >.
- 57 Segata, N. *et al.* Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. *Nature methods*, **v.9**, 811-814 (2012). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22688413> >.
- 58 Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Cugini, M.A., Smith, C., & Kent Jr, R.L. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of clinical periodontology*, **v. 25**, 134-144 (1998). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9495612>.
- 59 Jünemann, S. *et al.* Bacterial community shift in treated periodontitis patients revealed by ion torrent 16S rRNA gene amplicon sequencing. *PloS one*, **v.7**, 1-8 (2012). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22870235>.
- 60 Campus, G., Salem, A., Uzzau, S., Baldoni, E., & Tonolo, G. Diabetes and periodontal disease: a case-control study. *Journal of periodontology*, **v.76**, 418-425 (2005). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15857077>.
- 61 da Cruz GA. *et al.* Clinical and laboratory evaluations of non-surgical periodontal treatment in subjects with diabetes mellitus. *Journal of periodontology*, **v.79**, 1150-1157 (2008). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18597596> >.
- 62 Griffen, A.L. *et al.* Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *The ISME journal*, **v.6**, 1176-1185 (2012). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22170420>

- 63 Castrillon, C.A. *et al.* Occurrence of red complex microorganisms and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in patients with diabetes. *Journal of investigative and clinical dentistry*, **v.6**, 25-31 (2015). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23857867>;
- 64 Ganesan, S.M. *et al.* A tale of two risks: smoking, diabetes and the subgingival microbiome. *The ISME journal*, **v.11**, 2075-2089 (2017). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28534880>
- 65 Xiao, E. *et al.* Diabetes Enhances IL-17 Expression and Alters the Oral Microbiome to Increase Its Pathogenicity. *Cell host & microbe*, **v. 22**, n. 1, 120-128 (2017), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28704648>.
- 66 Holt, S.C. & Ebersole, J.L. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontology 2000*, **v.38**, 72-122 (2005). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15853938>
- 67 Field, C.A., Gidley, M.D., Preshaw, P.M. & Jakubovics, N. Investigation and quantification of key periodontal pathogens in patients with type 2 diabetes. *Journal of periodontal research*, **v.47**, 470-478 (2012). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22220967>.
- 68 Zhang, D. *et al.* Difference in oral microbial composition between chronic periodontitis patients with and without diabetic nephropathy. *BMC oral health*, **v. 22**, 1-11 (2022). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35034610>.
- 69 Kinane, D.F., Stathopoulou, P.G., & Papapanou, P.N. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*. **v.3** (2017). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28805207>.
- 70 Watanabe, K. *et al.* *Porphyromonas gingivalis* impairs glucose uptake in skeletal muscle associated with altering gut microbiota. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **v.35**, 1-16 (2021). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33197074>.
- 71 Zhou, M. *et al.* Investigation of the effect of type 2 diabetes mellitus on subgingival plaque microbiota by high-throughput 16S rDNA pyrosequencing. *PloS one*, **v.8**, 1-8, (2013). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23613868>.
- 72 Padmalatha, G.V. *et al.* Quantification of *Porphyromonas gingivalis* in chronic periodontitis patients associated with diabetes mellitus using real-time polymerase chain reaction. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*, **v. 20**, 413-418 (2016). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27721606> .
- 73 Mysak, J. *et al.* *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. *Journal of immunology research*, **v.2014**, (2014). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24741603> >.
- 74 Kulkarni, P.G. *et al.* Molecular Detection of *Porphyromonas gingivalis* in Chronic Periodontitis Patients. *The journal of contemporary dental practice*, **v.19**, 992-996 (2018). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30150503>.
- 75 Andrian, E., Grenier, D., & Rouabhia, M. *Porphyromonas gingivalis*-epithelial cell interactions in periodontitis. *Journal of dental research*, **v.85**, 392-403 (2006). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16632751> >.
- 76 Bagavad Gita, J. *et al.* A molecular technique to explore the relationship between *Porphyromonas gingivalis* and severity of chronic periodontitis. *A clinical approach. Anaerobe*, **v.49**, 1-4 (2018). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29097270>.

- 77 How, K.Y., Song, K.P., & Chan, K.G. Porphyromonas gingivalis: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Frontiers in microbiology*, **v.7**, 1-14 (2016). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26903954>.
- 78 Kuo, L.C., Polson, A.M., & Kang, T. Associations between periodontal diseases and systemic diseases: a review of the inter-relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis. *Public health*, **v. 122**, 417-433 (2008). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18028967> .
- 79 Blasco-Baque, V. *et al.* Periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis drives periodontal microbiota dysbiosis and insulin resistance via an impaired adaptive immune response. *Gut*, **v.66**, 872-885 (2017). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26838600> >.
- 80 Peter, F. Biodiversity Indices In: FATH, B. (Ed.). **Encyclopedia of Ecology (Second Edition)**: (Elsevier B.V., 2019). ISBN 978-0-444-64130-4.
- 81 D'Argenio, V. & Salvatore, F. The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, **v.451**, 97-102, (2015). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25584460> .
- 82 Farina, R. *et al.* Whole metagenomic shotgun sequencing of the subgingival microbiome of diabetics and non-diabetics with different periodontal conditions. *Archives of oral biology*, **v.104**, 13-23, (2019). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31153098>.
- 83 Ai, D. *et al.* Integrated metagenomic data analysis demonstrates that a loss of diversity in oral microbiota is associated with periodontitis. *BMC genomics*, **v.18**, Suppl 1, 1-15, (2017). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28198672> .
- 84 Takeuchi, Y., *et al.* Treponema socranskii, Treponema denticola, and Porphyromonas gingivalis are associated with severity of periodontal tissue destruction. *Journal of periodontology*, **v.72**, 1354-1363 (2001). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11699477> .
- 85 Mineoka, T. *et al.* Site-specific development of periodontal disease is associated with increased levels of Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia in subgingival plaque. *Journal of periodontology*, **v.79**, 670-676 (2008). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18380560> .
- 86 Dahlén, G. & Leonhardt, A. A new checkerboard panel for testing bacterial markers in periodontal disease. *Oral microbiology and immunology*, **v.21**, 6-11, (2006). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16390335> .
- 87 Jin, Q. & Ma, R.C.W. Metabolomics in Diabetes and Diabetic Complications: Insights from Epidemiological Studies. *Cells*, **v.10**, 1-38 (2021). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34831057> .
- 88 Mahendran, Y. *et al.* Glycerol and fatty acids in serum predict the development of hyperglycemia and type 2 diabetes in Finnish men. *Diabetes care*, **v. 36**, 3732-3832 (2013). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24026559> .
- 89 Abisado, R.G., Benomar, S., Klaus, J.R., Dandekar, A.A. & Chandler J.R. Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions. *mBio*, **v.9**, 1-13, (2018). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29789364> .
- 90 Mukherjee, S. & Bassler, B.L. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nature reviews: Microbiology*, **v.17**, 371-382 (2019). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30944413> .

- 91 Defoirdt, T. Quorum-Sensing Systems as Targets for Antivirulence Therapy. *Trends in microbiology*, **v.26**, 313-328 (2018). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29132819> .
- 92 Drews, G., Gel'man, N. S. L., Marina, A., Ostrovskii, A. & Dmitrii, N. Respiration and Phosphorylation of Bacteria. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, **v.9**, 167-168, (1967). <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jobm.19690090211> .
- 93 Mariappan, M. *et al.* The mechanism of membrane-associated steps in tail-anchored protein insertion. *Nature*, **v.477**, 61-66 (2011). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21866104> .
- 94 Morimoto, Y.V. & Minamino, T. Architecture and Assembly of the Bacterial Flagellar Motor Complex. *Sub-cellular biochemistry*, **v.96**, 297-321 (2021). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33252734> .
- 95 Long, H., Wang, Q. & Huang, K. Ciliary/Flagellar Protein Ubiquitination. *Cells*, **v.4**, n.3, 74-82, (2015). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26404382> .
- 96 Jeong, H. H. Recent Developments in Bacterial Chemotaxis Analysis Based on the Microfluidic System. *SLAS technology*, **v.26**, 159-164, (2021). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33143544> .
- 97 Matilla, M.A. & Krell, T. The effect of bacterial chemotaxis on host infection and pathogenicity. *FEMS microbiology reviews*, **v.42**, 40-67, (2018). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29069367> >.
- 98 Rodrigues, W.F. *et al.* Metabolomic Evaluation of Chronic Periodontal Disease in Older Adults. *Mediators of inflammation*, **v.2021**, 1-8 (2021). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34840526> .
- 99 American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. *Diabetes care*, **v.42**, n. Suppl 1, (2019). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30559228> .
- 100 Caton, J.G. *et al.* A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of clinical periodontology*, **v.45** Suppl 20, (2018). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29926489> >.
- 101 Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C. & Mahé, F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, **v.4**, (2016). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27781170>
- 102 Yarza, P, *et al.* Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature reviews. Microbiology*, **v.12**, (2014). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25118885> .

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the FAPEMIG “Research Support Foundation of the State of Minas Gerais”, CAPES “Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel/Ministry of Education/Brazil” and University of Rio Verde for its financial support”.

Author contributions

F.A, W.R.S, S.C.S. conceived and designed the experiments; developed the methodology; analyzed and interpreted the data; wrote, reviewed, and/or revised the manuscript; supervised the study; M.B.C.C, L.F.V.F, Data collect, analyzed and interpreted the data; K.K.A.M, H.G.C, analyzed and interpreted the data. All of the authors read and approved the final version of manuscript.

Declaration of data availability

Raw data were generated in Excel. Derived data supporting the findings of this study are available to the corresponding author upon request.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this article in an attached ZIP file.

Legends of the figures and tables.

Figure 1. Chart Data collection and analysis

Table 1. Quantitative results of sequencing 16S rRNA amplicons*

Table 2. Taxonomic Profile of the Microbiome with relative abundance(%)

Figure 2. Taxonomic profile of the microbiome with relative abundance (%) of species. Species with relative abundance of less than 1% were grouped into ETC.

Figure 3. Alpha Diversity results (statistically significant), A) Healthy versus Periodontitis (Jackknife), B) Diabetics versus Periodontitis (Jackknife), C) D) E) and F) Periodontitis versus Diabetics/Periodontitis (ACE, CHAO1, Jackknife and The number of OTUs found in MTP). G) H) I) and J) Periodontitis versus Diabetics/Periodontitis (NPS Shannon, Shannon, Simpson and Phylogenetic Diversity).

Figure 4. Results of Beta Diversity. PCoA – Analysis of Principal Coordinates of the Variable Distance Matrix through A) Jensen-Shannon, B) Bray-Curtis, C) Generalized UniFrac and D) UniFrac).

Figure 5. Discovery of taxonomic biomarkers, results of LEfSe Analysis (Logarithmic LDA Score >2.0 ; alpha value <0.05) between groups. (the 10 species with the highest LDA scores are presented). A) (Healthy versus Diabetics), B) (Healthy versus Periodontitis), C) (Healthy versus Diabetics/Periodontitis), D) (Diabetics versus Periodontitis), E) (Diabetics versus Diabetics/Periodontitis), F) (Periodontitis versus Diabetics/Periodontitis)

Table 3. Discovery of functional biomarkers, results of LEfSe Analysis (Logarithmic LDA Score >2.0 ; alpha value <0.05) between groups.

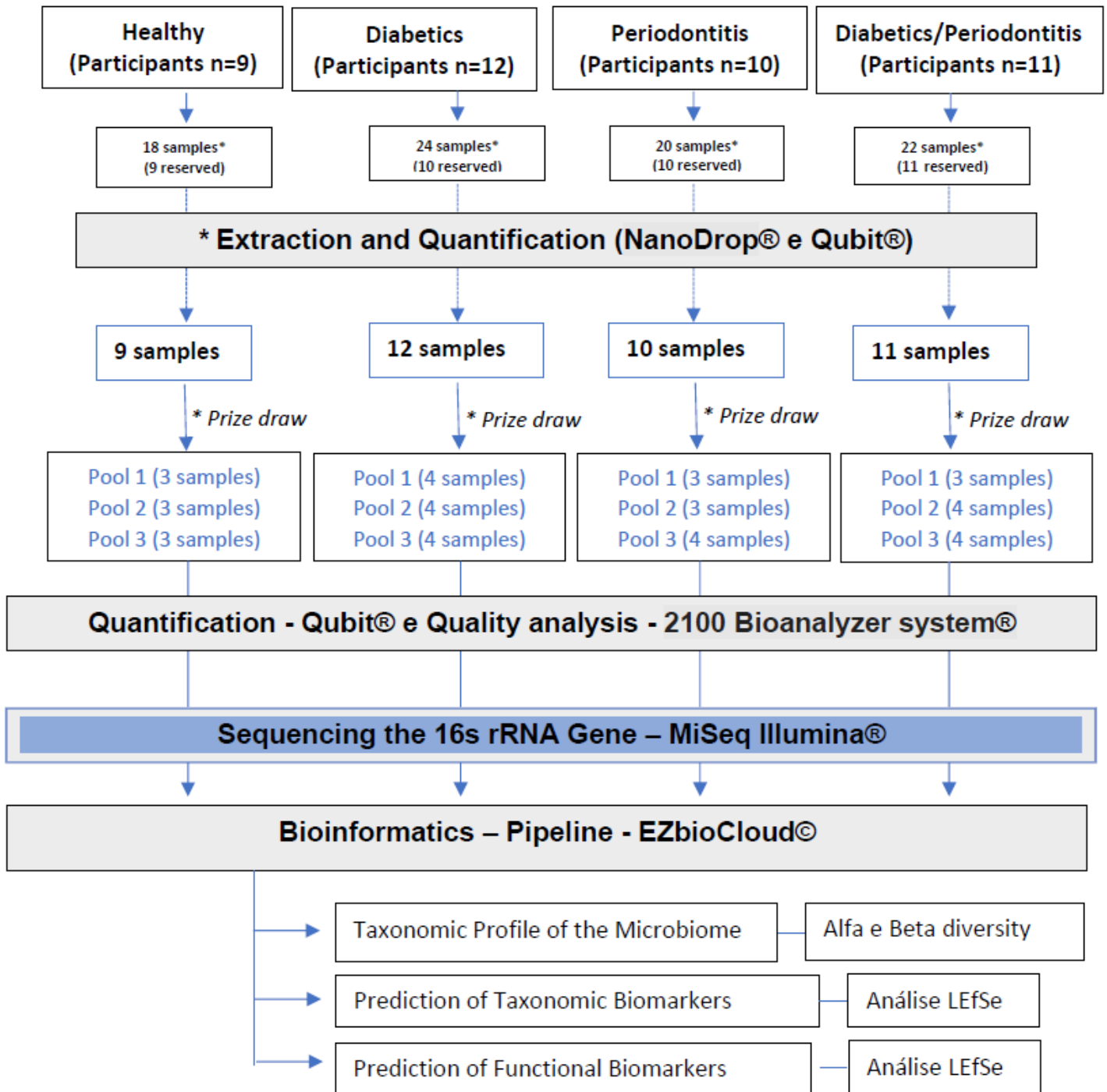


Figure 1. Chart Data collection and analysis

Table 1. Quantitative results of sequencing 16S rRNA amplicons*

	HEALTHY			DIABETICS			PERIODONTITIS			D/P**		
	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 1	Pool 2	Pool 3
a)	36987	13996	3158	27783	16125	20652	22915	19053	55117	39310	21068	75231
b)	36592	13802	3100	26851	15649	19988	22419	17929	53939	37578	20173	72603
c)	98,9	98,6	98,2	96,6	97	96,8	97,8	94,1	97,9	95,6	95,8	96,5
d)	161	100	43	123	105	361	147	181	533	202	164	667
e)	7	9	0	93	56	11	33	2	0	3	1	0
f)	227	85	15	716	315	292	316	941	645	1527	730	1961
g)	36266	13591	3069	26275	15325	19799	21094	15981	50566	37051	19910	72121
h)	99,1	98,5	99	97,9	97,9	99,1	94,1	89,1	93,7	98,6	98,7	99,3
i)	393	383	139	271	364	200	188	219	187	342	330	250

*By MiSeq Illumina® DP (Diabetics/Periodontitis); a) Total reads after pre-filter; b) Total valid reads ; c) Total valid reads (%);

d) Removed Low quality amplicons; e) Removed Non-target amplicons; f) Removed Chimeric amplicons;

g) Number of reads identified at the species level; h) Number of reads identified at the species level (%); i) Number of species found.

Table 2. Taxonomic Profile of the Microbiome with relative abundance(%)

	HEALTH	DIABETICS	PERIODONTITIS	DIABETICS/ PERIODONTITIS				
Phylum	Firmicutes	29,54%	Bacteroidetes	32,68%	Bacteroidetes	40,77%	Bacteroidetes	43,40%
	Fusobacteria	23,90%	Fusobacteria	23,87%	Fusobacteria	17,49%	Firmicutes	26,89%
	Bacteroidetes	21,96%	Firmicutes	23,00%	Firmicutes	15,17%	Fusobacteria	13,28%
	Proteobacteria	16,40%	Proteobacteria	15,00%	Spirochaetes	14,33%	Proteobacteria	8,20%
	Actinobacteria	2,69%	Saccharibacteria_TM7	1,78%	Synergistetes	5,76%	Spirochaetes	4,07%
	Synergistetes	2,31%	Synergistetes	1,12%	Proteobacteria	4,32%	Saccharibacteria_TM7	1,46%
	Saccharibacteria_TM7	1,58%	°	°	°	°	°	°
	Spirochaetes	1,48%	°	°	°	°	°	°
	ETC	0,14%	ETC	2,56%	ETC	2,16%	ETC	2,71%
	Genus	Fusobacterium	23,13%	Fusobacterium	19,99%	Porphyromonas	21,21%	Prevotella
Veillonella		8,48%	Prevotella	8,00%	Fusobacterium	15,72%	Fusobacterium	10,45%
Streptococcus		8,32%	Neisseria	7,99%	Treponema	13,00%	Veillonella	9,00%
Prevotella		6,60%	Alloprevotella	7,94%	Prevotella	11,63%	Porphyromonas	8,87%
Haemophilus		6,31%	Streptococcus	7,75%	Fretibacterium	5,76%	Alloprevotella	6,26%
Paludibacter		4,49%	Porphyromonas	4,97%	Filifactor	3,11%	Streptococcus	4,75%
Bacillus		3,99%	Capnocytophaga	4,84%	Tannerella	2,92%	Treponema	4,07%
Tannerella		3,84%	Paludibacter	4,32%	Campylobacter	2,82%	Selenomonas	3,80%
Porphyromonas		3,65%	Leptotrichia	3,88%	AM420159_g	2,30%	Campylobacter	3,09%
Fretibacterium		2,31%	Parvimonas	2,81%	Selenomonas	1,78%	Leptotrichia	2,82%
Campylobacter		2,17%	Veillonella	2,69%	Catonella	1,40%	Aggregatibacter	2,27%
Capnocytophaga		2,09%	Selenomonas	2,11%	Spirochaetaceae_uc	1,33%	Neisseria	1,79%
Enterobacter		1,82%	Campylobacter	2,05%	Sneathia	1,19%	Capnocytophaga	1,75%
Parvimonas		1,61%	Tannerella	1,83%	Parvimonas	1,11%	Tannerella	1,67%
Saccharimonas		1,58%	Saccharimonas	1,77%	°	°	Parvimonas	1,51%
Treponema		1,48%	Aggregatibacter	1,35%	°	°	Lachnoanaerobaculum	1,39%
Actinomyces		1,39%	Gemella	1,31%	°	°	Saccharimonas	1,25%
Gemella		1,13%	Eubacterium_g11	1,30%	°	°	°	°
Clostridium		1,07%	Haemophilus	1,15%	°	°	°	°
°		°	Fretibacterium	1,12%	°	°	°	°
Unclassified*		0,00%	Unclassified*	0,00%	Unclassified*	0,12%	Unclassified*	0,02%
ETC**		14,54%	ETC**	10,81%	ETC**	14,59%	ETC**	11,82%
Species		Fusobacterium nucleatum group	22,09%	Fusobacterium nucleatum group	19,92%	Porphyromonas gingivalis	15,82%	Fusobacterium nucleatum group
	Veillonella dispar	5,99%	Alloprevotella tannerae	7,47%	Fusobacterium nucleatum group	15,67%	Prevotella melaninogenica	7,23%
	Haemophilus parainfluenzae group	5,54%	Neisseria perflava	6,59%	Prevotella intermedia	6,13%	Veillonella atypica	5,39%
	Streptococcus pneumoniae group	4,97%	Streptococcus pneumoniae group	5,31%	Treponema KE332528_s	3,94%	Porphyromonas gingivalis	3,91%
	Paludibacter ADCM_s	4,49%	Paludibacter ADCM_s	4,32%	Fretibacterium GU430992_s	3,51%	Prevotella nigrescens	3,76%
	Prevotella melaninogenica	3,86%	Capnocytophaga leadbetteri	2,89%	Porphyromonas endodontalis	3,41%	Prevotella pallens	2,95%
	Tannerella forsythia	3,79%	Parvimonas micra	2,54%	Filifactor alocis	3,11%	Alloprevotella tannerae	2,80%
	Bacillus licheniformis group	3,67%	Veillonella dispar	1,82%	Tannerella forsythia	2,89%	Prevotella oris	2,78%
	Streptococcus sanguinis group	2,60%	Porphyromonas gingivalis	1,77%	Treponema_uc	2,76%	Veillonella dispar	2,65%
	Veillonella parvula group	2,40%	Prevotella oris	1,74%	Campylobacter showae group	1,81%	Porphyromonas endodontalis	2,52%
	Porphyromonas endodontalis	1,82%	Prevotella HE999470_s	1,46%	AM420159_g_uc	1,81%	Prevotella jejuni	2,32%
	Parvimonas micra	1,60%	Tannerella forsythia	1,38%	Fretibacterium fastidiosum	1,64%	Porphyromonas KI259256_s	2,06%
	Campylobacter showae group	1,53%	Leptotrichia buccalis group	1,37%	Prevotella AM419982_s	1,58%	Selenomonas sputigena	1,76%
	Saccharimonas EU104122_s	1,46%	Eubacterium brachy	1,30%	Treponema medium group	1,47%	Streptococcus sinensis group	1,75%
	Prevotella pleuritidis	1,43%	Campylobacter gracilis	1,25%	Prevotella loescheii	1,33%	Campylobacter concisus group	1,73%
	Enterobacter JYMH_s	1,43%	Porphyromonas KI259256_s	1,21%	Sneathia AJ289183_s	1,19%	Streptococcus pneumoniae group	1,50%
	Fretibacterium fastidiosum	1,16%	Gemella morbillorum	1,14%	Treponema socranskii group	1,15%	Tannerella forsythia	1,30%
	Gemella morbillorum	1,08%	Porphyromonas pasteri	1,11%	Prevotella dentalis group	1,13%	Aggregatibacter segnis	1,26%
	Clostridium thermopalmarium	1,07%	Haemophilus parainfluenzae group	1,05%	Porphyromonas_uc	1,04%	Parvimonas micra	1,26%
	Fusobacterium periodonticum group	1,03%	°	°	Parvimonas micra	1,02%	Alloprevotella PAC001345_s	1,22%
	Porphyromonas catoniae	1,03%	°	°	°	°	Treponema medium group	1,12%
	°	°	°	°	°	°	Lachnoanaerobaculum saburreum group	1,09%
	°	°	°	°	°	°	Alloprevotella FJ976422_s	1,02%
	Unclassified*	0,03%	Unclassified*	0,11%	Unclassified*	1,45%	Unclassified*	0,07%
	ETC**	25,94%	ETC**	34,23%	ETC**	26,16%	ETC**	36,21%

**ETC -Species with a relative abundance of less than 1% were grouped under "ETC". *Unclassified in higher taxonomic rank

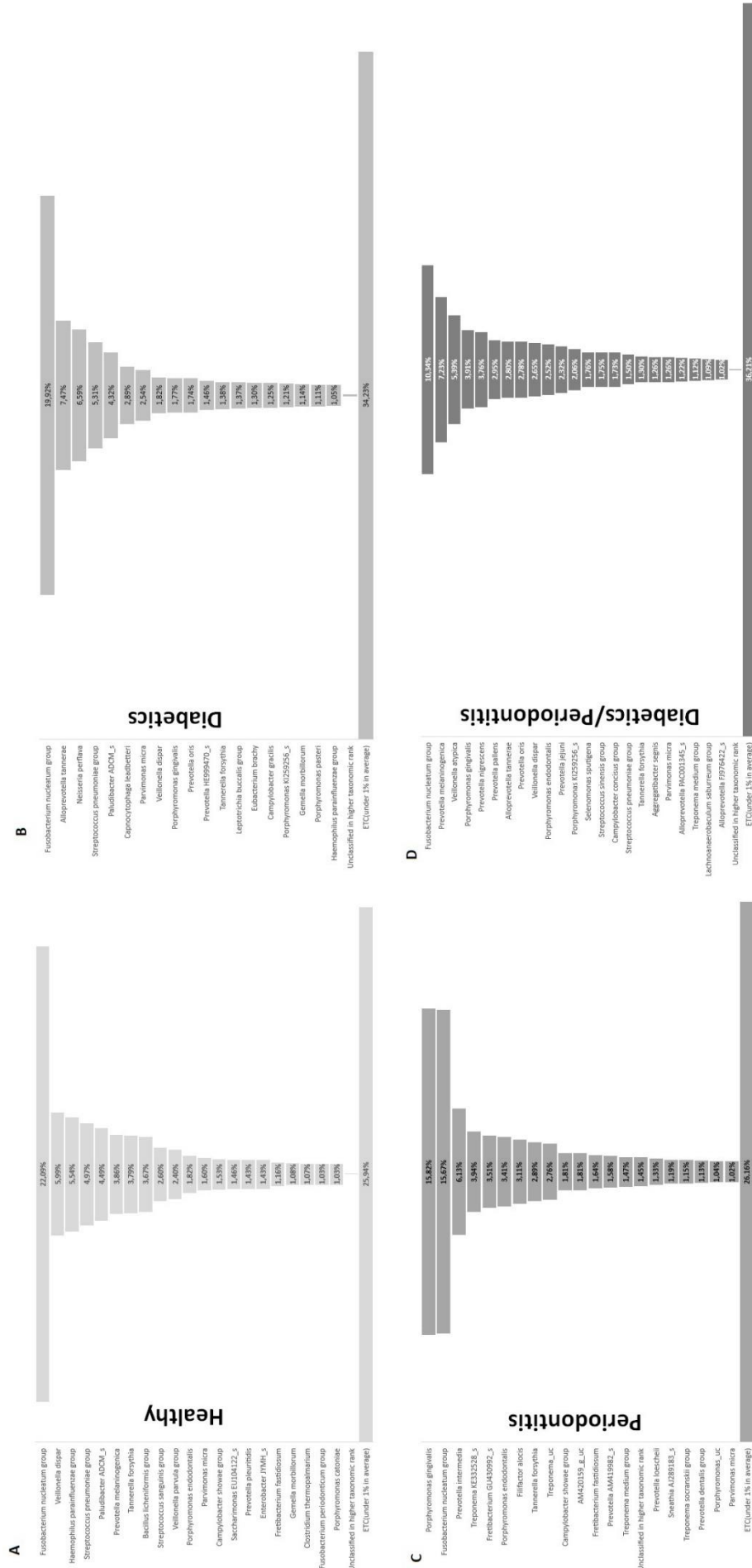


Figure 2. Taxonomic profile of the microbiome with relative frequency (%) of species. Species with a relative frequency of less than 1% were grouped into ETC.

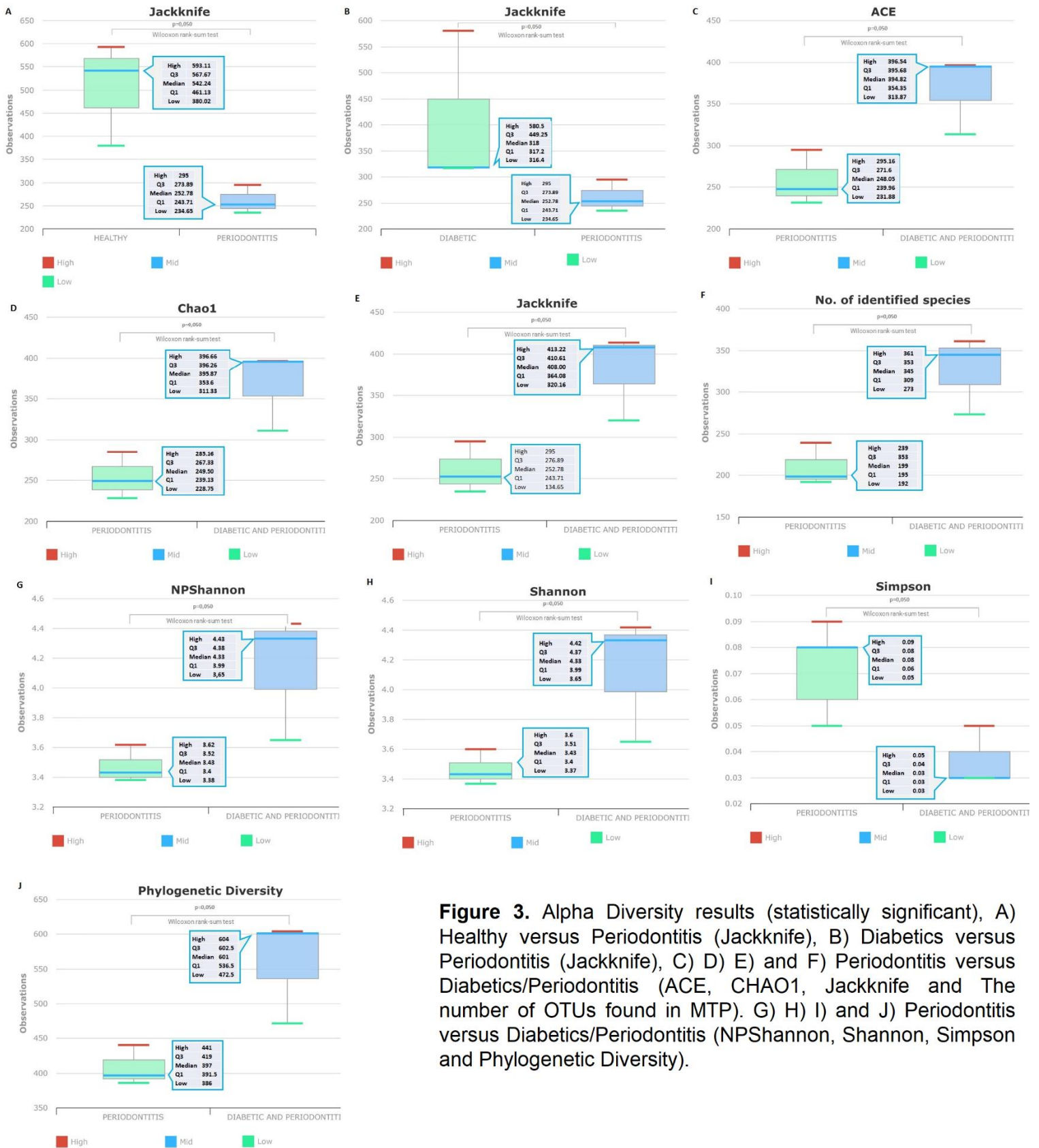


Figure 3. Alpha Diversity results (statistically significant), A) Healthy versus Periodontitis (Jackknife), B) Diabetics versus Periodontitis (Jackknife), C) D) E) and F) Periodontitis versus Diabetics/Periodontitis (ACE, CHAO1, Jackknife and The number of OTUs found in MTP). G) H) I) and J) Periodontitis versus Diabetics/Periodontitis (NPSannon, Shannon, Simpson and Phylogenetic Diversity).

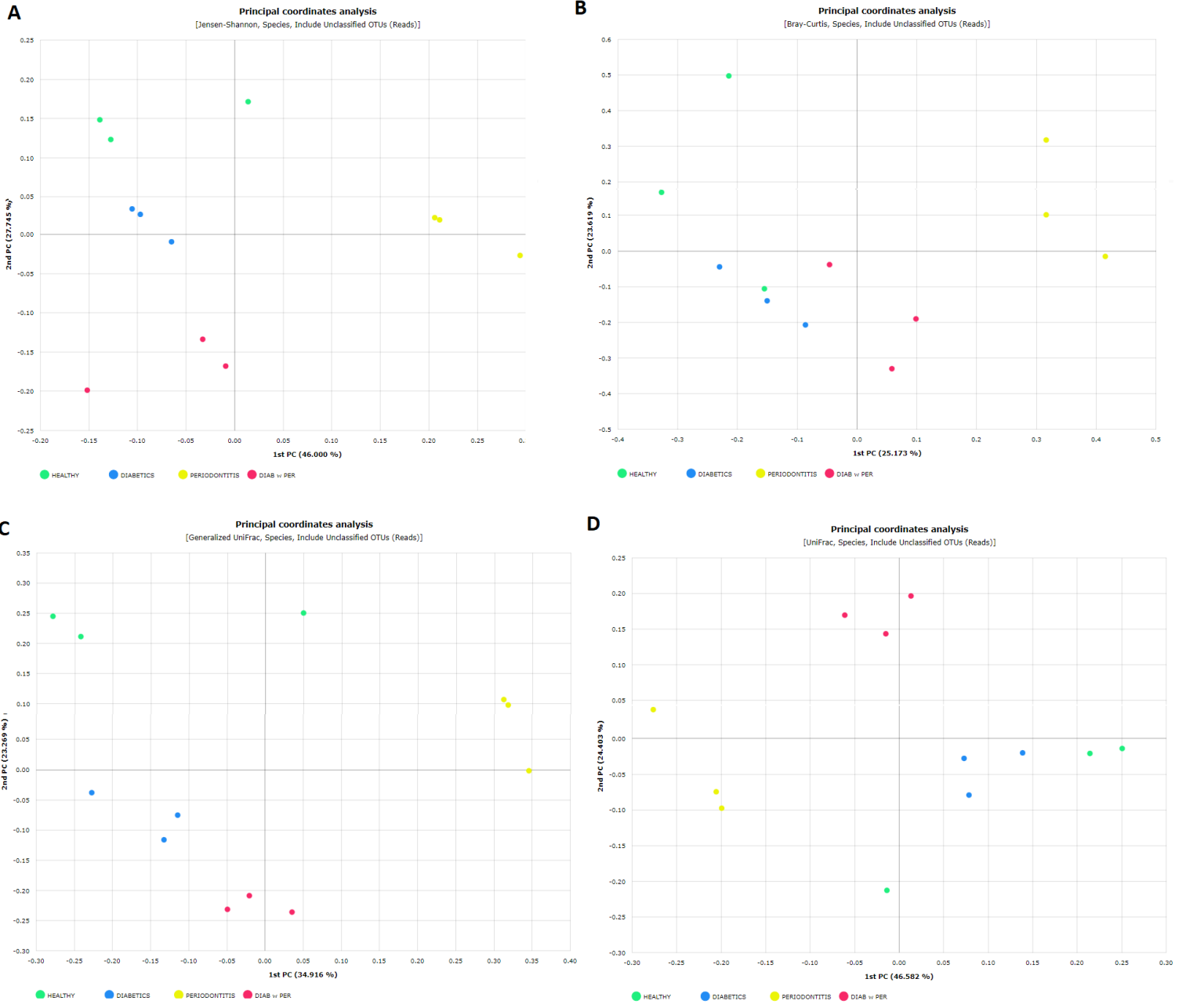


Figure 4. Results of Beta Diversity. PCoA – Analysis of Principal Coordinates of the Variable Distance Matrix through A(Jensen-Shannon), B (Bray-Curtis), C (Generalized UniFrac) and D (UniFrac).

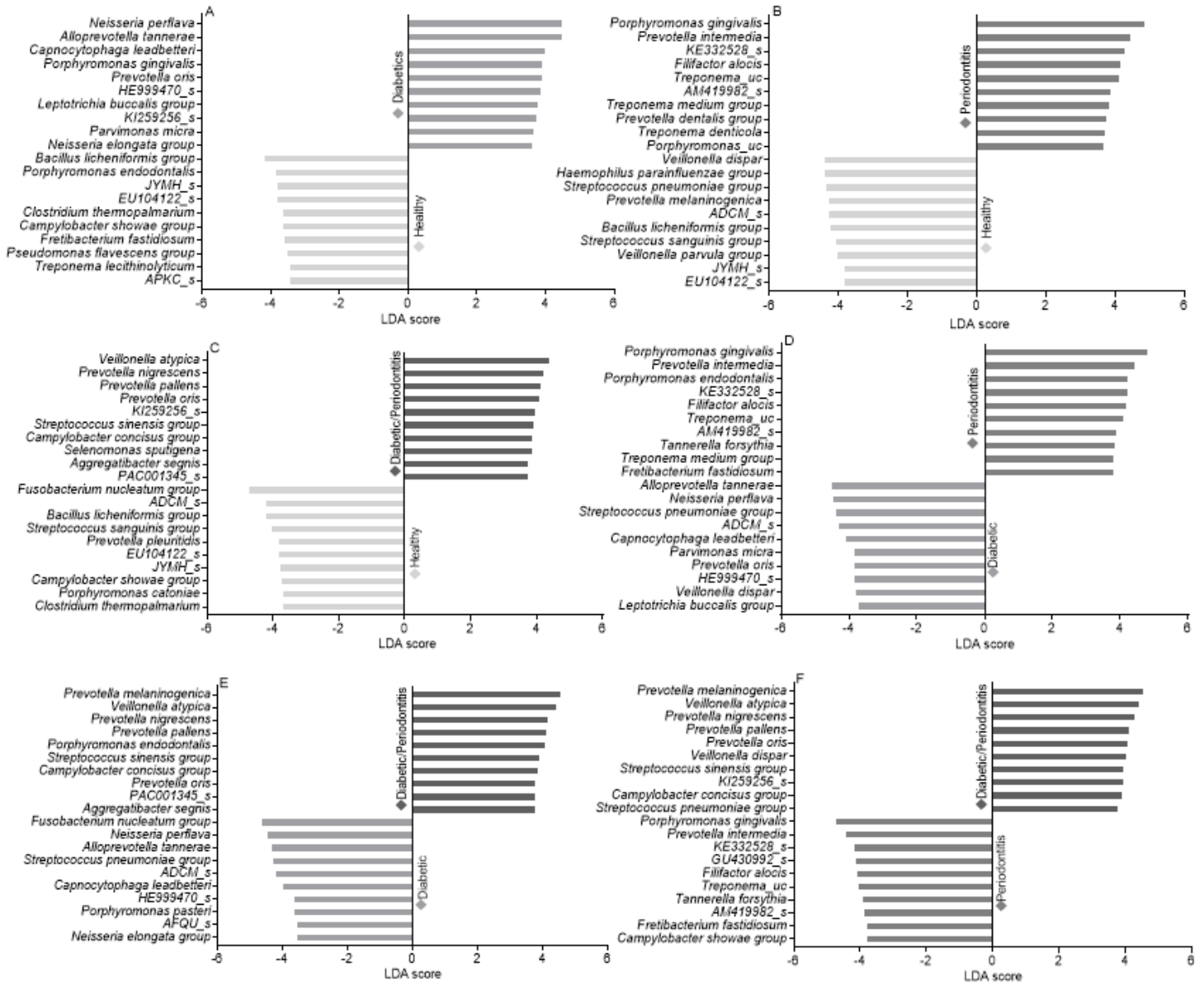


Figure 5. Discovery of taxonomic biomarkers, results of LEfSe Analysis (Logarithmic LDA Score >2.0 ; alpha value <0.05) between groups. (the 10 species with the highest LDA scores are presented). A (Healthy versus Diabetics), B (Healthy versus Periodontitis), C (Healthy versus Diabetics/Periodontitis), D (Diabetics versus Periodontitis), E (Diabetics versus Diabetics/Periodontitis), F (Periodontitis versus Diabetics/Periodontitis)

Table 3. Discovery of functional biomarkers, results of LefSe Analysis (Logarithmic LDA Score >2.0; alpha value <0.05) between groups.

Pathway	Definition	LDA (effect size)	p-value	Groups	
				HEALTHY	DIABETICS
ko03010	Ribosome	2,982	0,049	2,035	2,228
ko00190	Oxidative phosphorylation	2,526	0,049	0,924	1,005
ko02010	ABC transporters	3,316	0,049	2,700	2,304
ko02020	Two-component system	3,304	0,049	1,940	1,714
ko02024	Quorum sensing	3,031	0,049	1,660	1,493
ko01200	Carbon metabolism	3,000	0,049	2,293	2,217
ko01120	Microbial metabolism in diverse environments	2,787	0,049	4,343	4,108
ko00260	Glycine, serine and threonine metabolism	2,640	0,049	0,726	0,692
ko00640	Propanoate metabolism	2,635	0,049	0,598	0,521
ko01212	Fatty acid metabolism	2,605	0,049	0,608	0,534
ko00220	Arginine biosynthesis	2,568	0,049	0,363	0,316
ko00071	Fatty acid degradation	2,479	0,049	0,269	0,212
				HEALTHY	PERIODONTITIS
ko02040	Flagellar assembly	3,182	0,049	0,238	0,516
ko03010	Ribosome	3,174	0,049	2,035	2,282
ko02030	Bacterial chemotaxis	3,136	0,049	0,257	0,528
ko01130	Biosynthesis of antibiotics	3,389	0,049	4,686	4,377
ko01120	Microbial metabolism in diverse environments	3,231	0,049	4,343	4,029
ko01110	Biosynthesis of secondary metabolites	3,225	0,049	6,390	5,901
ko02060	Phosphotransferase system (PTS)	3,024	0,049	0,426	0,218
ko01230	Biosynthesis of amino acids	2,971	0,049	2,594	2,270
ko01210	2-Oxocarboxylic acid metabolism	2,837	0,049	0,471	0,346
ko00290	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	2,742	0,049	0,261	0,155
				HEALTHY	DIAB/PER
ko01100	Metabolic pathways	3,513	0,049	15,905	16,233
ko03010	Ribosome	3,233	0,049	2,035	2,360
ko00240	Pyrimidine metabolism	2,914	0,049	1,554	1,742
ko00230	Purine metabolism	2,688	0,049	1,969	2,116
ko00970	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	2,875	0,049	0,927	1,049
ko03440	Homologous recombination	2,874	0,049	0,801	0,890
ko02020	Two-component system	3,290	0,049	1,940	1,605
ko02010	ABC transporters	3,271	0,049	2,700	2,236
ko02024	Quorum sensing	3,131	0,049	1,660	1,433
ko01120	Microbial metabolism in diverse environments	2,826	0,049	4,343	4,053
				DIABETICS	PERIODONTITIS
ko02040	Flagellar assembly	3,237	0,049	0,172	0,516
ko02030	Bacterial chemotaxis	3,215	0,049	0,201	0,528
ko02020	Two-component system	2,921	0,049	1,714	2,014
ko01100	Metabolic pathways	3,602	0,049	15,806	15,574
ko01110	Biosynthesis of secondary metabolites	3,064	0,049	6,192	5,901
ko01120	Microbial metabolism in diverse environments	2,972	0,049	4,108	4,029
ko02060	Phosphotransferase system (PTS)	2,843	0,049	0,374	0,218
ko00190	Oxidative phosphorylation	2,773	0,049	1,005	0,856
ko00500	Starch and sucrose metabolism	2,698	0,049	0,768	0,672
				DIABETICS	DIAB/PER*
ko01100	Metabolic pathways	3,434	0,049	15,806	16,233
ko01110	Biosynthesis of secondary metabolites	3,128	0,049	6,192	6,452
ko01230	Biosynthesis of amino acids	2,754	0,049	2,391	2,565
ko01130	Biosynthesis of antibiotics	3,243	0,049	4,527	4,662
ko00240	Pyrimidine metabolism	2,784	0,049	1,609	1,742
ko03010	Ribosome	2,868	0,049	2,228	2,360
ko00230	Purine metabolism	2,753	0,049	2,000	2,116
ko01501	beta-Lactam resistance	2,731	0,049	0,400	0,480
ko00720	Carbon fixation pathways in prokaryotes	2,799	0,049	0,733	0,812
ko01200	Carbon metabolism	2,973	0,049	2,217	2,295
ko00270	Cysteine and methionine metabolism	2,643	0,049	0,777	0,850
ko00970	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	2,604	0,049	0,995	1,049
ko00760	Nicotinate and nicotinamide metabolism	2,551	0,049	0,468	0,519
ko00730	Thiamine metabolism	2,598	0,049	0,380	0,427
ko02020	Two-component system	2,818	0,049	1,714	1,605
ko02060	Phosphotransferase system (PTS)	2,703	0,049	0,374	0,295

Continues on the next page

Table 3. Discovery of functional biomarkers, results of LEfSe Analysis (Logarithmic LDA Score >2.0; alpha value <0.05) between groups. (Continuation)

Pathway	Definition	LDA (effect size)	p-value	Groups	
				PERIODONTITIS	DIAB/PER*
ko01100	Metabolic pathways	3,622	0,049	15,574	16,233
ko01110	Biosynthesis of secondary metabolites	3,216	0,049	5,901	6,452
ko01230	Biosynthesis of amino acids	3,266	0,049	2,270	2,565
ko01130	Biosynthesis of antibiotics	3,252	0,049	4,377	4,662
ko00270	Cysteine and methionine metabolism	2,901	0,049	0,730	0,850
ko00790	Folate biosynthesis	2,825	0,049	0,495	0,610
ko02020	Two-component system	3,264	0,049	2,014	1,605
ko02040	Flagellar assembly	3,092	0,049	0,516	0,268
ko02030	Bacterial chemotaxis	3,081	0,049	0,528	0,276
ko02024	Quorum sensing	2,965	0,049	1,616	1,433

*DIAB/PER (DIABETICS WITH PERIODONTITIS)

Legends of the figures.

Supplementary Table 1. General characteristics of the study groups

Supplementary Figure 1. Taxonomic composition of all groups (Phylum)

Supplementary Table 2. Alpha diversity results (with richness and diversity indexes)

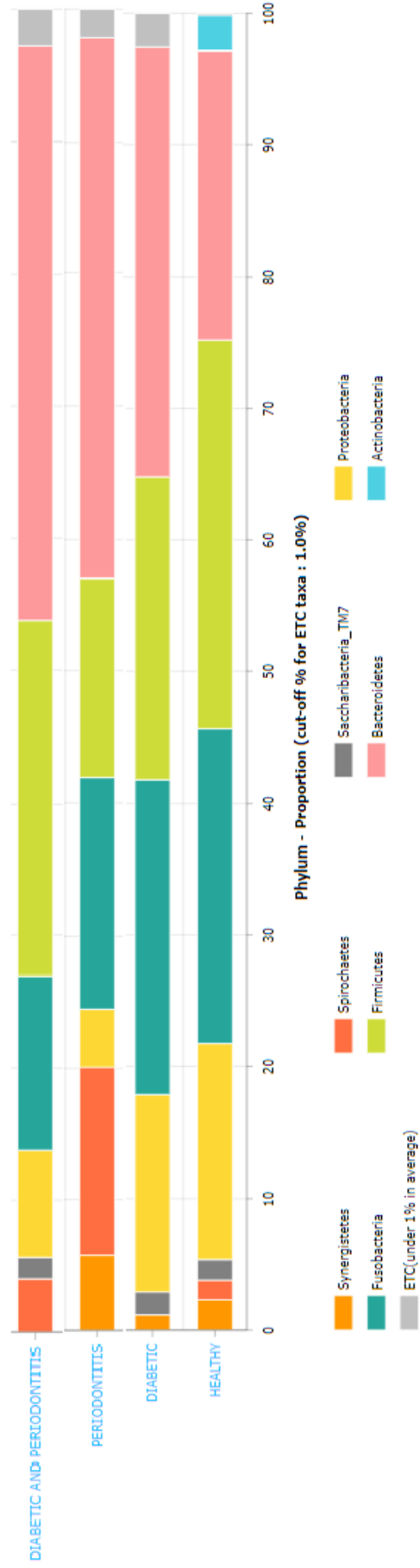
Supplementary Figure 2. Results from Alpha Diversity (All). Species richness (A, B, C and D). Species Diversity (E, F, G and H). Statistical analysis performed using the “Wilcoxon rank-sum test”.

Supplementary Figure 3. UPGMA (Uneighted Pair-group Method using Arithmetic Averages. Beta diversity distances: A(Jensen-Shannon), B (Bray-Curtis), C (Generalized UniFrac) and D (Unifrac).

Supplementary Table 1. General characteristics of the study groups

	Healthy	Diabetics*	Periodontitis	Diabetics*/Periodontitis
Number of participants	9	12	10	11
Age ⁽¹⁾ (Years)	52,3 ± 4,2	53,4 ± 4,2	50,1 ± 1,2	50,9 ± 4,4
Gender				
•Male	5	5	5	5
•Feme	4	4	4	4
Body mass index^{(1) (2)}	30,5±3,3	30±1,2	32,5±2,3	31,5±31.3
Marital status				
• Married	4	7	6	7
• Single	1	2	3	3
• Divorced	4	3	1	1
Education⁽¹⁾ (Years)	6±4	6±2	6±4	8±4
Family income ⁽¹⁾	U\$ 452,00 (±1601,00)	U\$ 420,00 (±60,00)	U\$.492,00 (±120,00)	U\$ 510,00 (±110,00)
Time of illness ^{*(1)} (Years)	•	6,5 ± 2,1	•	7,1 ± 1,8

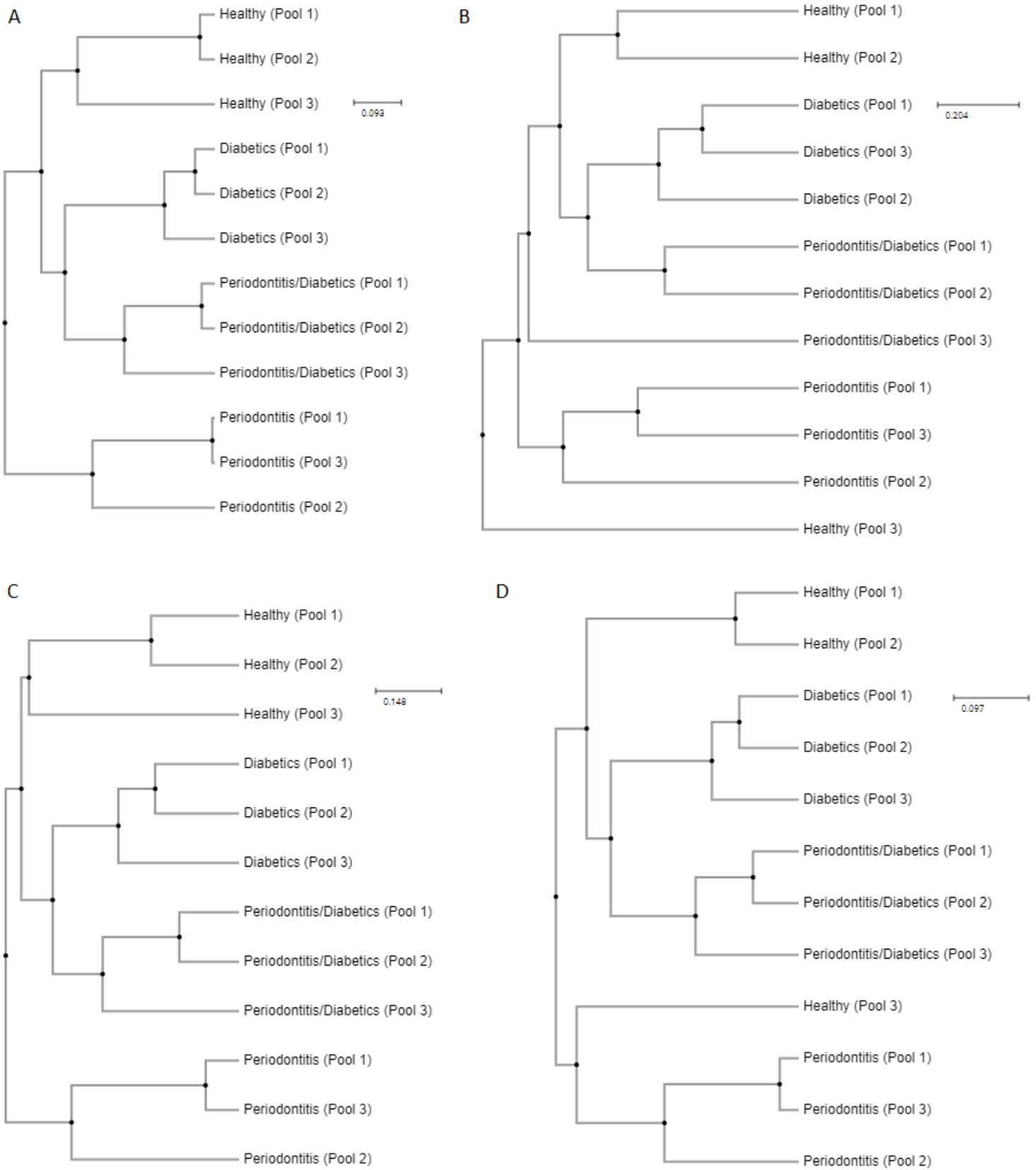
¹Range ²Kg/m², *Type 2 Diabetes Mellitus



Supplementary Figure 1. Taxonomic composition of all groups (Phylum)



Supplementary Figure 2. Results for Alpha Diversity (All). Species richness (A, B, C and D). Species diversity (E, F, G and H). Statistical analysis performed using the “Wilcoxon rank-sum test”.



Supplementary Figure 3. UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages. Beta diversity distances: A (Jensen-Shannon), B (Bray-Curtis), C (Generalized UniFrac) and D (UniFrac).

APÊNDICE B – Comprovante de submissão

Ferdinando Agostinho <ferdinando@unirv.edu.br>

Scientific Reports - Receipt of Manuscript 'TAXONOMIC AND FUNCTIONAL...'

1 mensagem

Scientific Reports <srep@nature.com>
Para: ferdinando@unirv.edu.br

21 de setembro de 2022 00:49

Ref: Submission ID 78b511f6-00eb-4404-bde1-890a0db23b56

Dear Dr Agostinho,

Thank you for submitting your manuscript to Scientific Reports.

Your manuscript is now at our initial Quality Check stage, where we look for adherence to the journal's submission guidelines, including any relevant editorial and publishing policies. If there are any points that need to be addressed prior to progressing we will send you a detailed email. Otherwise, your manuscript will proceed into peer review.

You can check on the status of your submission at any time by using the link below and logging in with the account you created for this submission:

https://researcher.nature.com/your-submissions?utm_source=submissions&utm_medium=email&utm_campaign=confirmation-email&journal_id=41598

Kind regards,

Peer Review Advisors
Scientific Reports

Springer Nature offers an open access support service to make it easier for our authors to discover and apply for APC funding. For further information please visit <http://www.springernature.com/gp/open-research/funding>