



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

**Centro Biomédico**

**Faculdade de Odontologia**

**Heloisa Fernandes Queiroz Curcio**

**Análise comparativa do metaboloma salivar em pacientes com  
periodontite e doença inflamatória intestinal**

**Rio de Janeiro**

**2022**

Heloisa Fernandes Queiroz Curcio

**Análise comparativa do metaboloma salivar em pacientes com periodontite e  
doença inflamatória intestinal**



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Periodontia.

Orientadoras: Prof.<sup>a</sup> Dra. Fernanda de Brito Silva

Prof.<sup>a</sup> Dra. Tatiana Kelly da Silva Fidalgo

Rio de Janeiro

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/CBB

C975 Curcio, Heloisa Fernandes Queiroz.  
Análise comparativa do metaboloma salivar em pacientes com periodontite e doença inflamatória intestinal/ Heloisa Fernandes Queiroz Curcio. – 2022.  
58 f.

Orientadoras: Fernanda de Brito Silva, Tatiana Kelly da Silva Fidalgo.  
Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia.

1. Periodontite. 2. Doenças inflamatórias intestinais. 3. Metaboloma. I. Silva, Fernanda de Brito. II. Fidalgo, Tatiana Kelly da Silva. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

CDU  
616.314

Kárin Cardoso CRB/7 6287

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Heloisa Fernandes Queiroz Curcio

**Análise comparativa do metaboloma salivar em pacientes com periodontite e  
doença inflamatória intestinal**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Periodontia.

Aprovada em 30 de junho de 2022.

Orientadores:

Prof.<sup>a</sup> Dra. Fernanda de Brito Silva

Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof.<sup>a</sup> Dra. Tatiana Kelly da Silva Fidalgo

Faculdade de Odontologia - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Ricardo Guimarães Fischer

Faculdade de Odontologia - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Alessandra Areas e Souza

Universidade Federal Fluminense

---

Prof. Dr. Levy Anderson Cesar Alves

Faculdade São Leopoldo Mandic

Rio de Janeiro

2022

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que me ajudaram a chegar até aqui, incluindo todos os meus professores, minha família, as instituições de ensino pelas quais passei, aos pacientes da pesquisa e meus pacientes em geral.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pois Ele sabe o quanto eu sonhava com o mestrado e o quanto pedi para estar aqui hoje realizando este sonho.

Aos meus pais e minha irmã, pela ajuda e pelo apoio incondicional desde sempre.

Ao meu esposo, por sonhar junto comigo e me entender nos meus momentos de estresse e correria.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Fernanda de Brito, pelos ensinamentos, sugestões, correções e pela paciência durante todo esse tempo.

À Millena, que esteve comigo durante todo o período nos atendimentos, processamentos de amostras, perrengues e momentos leves.

À Prof<sup>a</sup>. Tatiana Fidalgo, por ter compartilhado seu conhecimento em metabólica e ter contribuído com o processamento das amostras.

À Dra. Cyrla Zaltman, por permitir que atendêssemos seus pacientes, por ter sido compreensiva e paciente.

Ao Bernardo, pela ajuda imensa durante a triagem dos pacientes no ambulatório do HCFF. Às alunas do projeto de extensão por terem auxiliado nos atendimentos.

À Bárbara Coelho, do laboratório, pelo ensinamento prático sobre o processamento das amostras e pelo suporte todas as vezes que precisamos.

Aos pacientes que participaram, pelo tempo gasto conosco e pela confiança.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela concessão da bolsa, pois sem ela teria sido praticamente impossível cursar o mestrado.

À todos os professores da pós-graduação em Odontologia, especialmente os da área de Periodontia pelos ensinamentos durante esse período, por acreditarem no nosso potencial e pelo incentivo.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram a desenvolver e concluir este trabalho.

Estamos na situação de uma criancinha que entra em uma imensa biblioteca, repleta de livros em muitas línguas. A criança sabe que alguém deve ter escrito aqueles livros, mas não sabe como. Não compreende as línguas em que foram escritos. Tem uma pálida suspeita de que a disposição dos livros obedece a uma ordem misteriosa, mas não sabe qual ela é.

*Albert Einstein*

## RESUMO

CURCIO, Heloisa Fernandes Queiroz. *Análise comparativa do metaboloma salivar em pacientes com periodontite e doença inflamatória intestinal*. 2022. 58 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Doença Inflamatória Intestinal (DII) e a periodontite são caracterizadas pela complexa etiopatogenia, diagnóstico tardio e por acarretarem piora na qualidade de vida dos indivíduos, logo a identificação de biomarcadores confiáveis para um diagnóstico precoce e preciso é um ponto essencial para o correto manejo dessas condições. O objetivo deste estudo foi avaliar o metaboloma salivar em pacientes acometidos por DII com periodontite e pacientes saudáveis sem periodontite. Para cada um dos participantes do estudo um prontuário contendo dados pessoais, anamnese, dados relacionados ao sistema gastrointestinal e dados odontológicos (índice de placa visível, e periograma composto por profundidade de bolsa a sondagem, perda de inserção clínica e sangramento a sondagem) foi preenchido. Foram selecionados 49 pacientes, divididos em quatro grupos, sendo sete com Doença de Crohn (DC) e periodontite, cinco com Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI) e periodontite, vinte e três pacientes sistemicamente saudáveis com periodontite e quatorze pacientes sistemicamente saudáveis sem periodontite. As amostras foram constituídas de 4mL de saliva não estimulada. Para cada paciente, 1mL de saliva foi adicionado a 20µl de inibidor de protease, centrifugado durante 8 minutos, a 8000 rotações por minuto e à temperatura do laboratório. Em seguida, o sobrenadante da saliva foi transferido para um novo Eppendorf e congelado a -80°C até o processamento das amostras. Após, as amostras foram submetidas à análise em um espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker de 500 MHz, os espectros obtidos foram submetidos à análise multivariada usando PLS-DA, sPLS-DA e análise univariada por meio de chi -quadrado e testes t (SPSS 20.0, IL, EUA), com nível de significância de  $p < 0,05$ . Treze metabólitos foram identificados nas amostras de saliva (butirato, caproato, etanol, glicose, sacarose, glutamina, glutamato, hidroxibutirato, treonina, lisina, valina e grupo N-acetil). Pacientes com DC e periodontite apresentaram níveis estatisticamente significantes de butirato, caproato, etanol e hidroxibutirato quando associados aos controles com periodontite. Entre os pacientes com RCUI e periodontite e os controles com periodontite houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de butirato, caproato, região de açúcar, treonina e valina. Entre os controles com e sem periodontite os níveis de isoleucina foram estatisticamente significantes. A análise da saliva por RMN foi capaz de revelar diferenças significativas no perfil metabólico entre os quatro grupos analisados, mostrando que pode haver uma relação, a nível metabólico, entre DII e periodontite. Entretanto, mais estudos são necessários e é importante que haja padronização metodológica nos estudos futuros.

Palavras-chave: Periodontite. Doença inflamatória intestinal. Metaboloma

## ABSTRACT

CURCIO, Heloisa Fernandes Queiroz. *Comparative analysis of salivary metabolome in patients with periodontitis and inflammatory bowel disease*. 2022. 58 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Inflammatory Bowel Disease (IBD) and periodontitis are characterized by a complex etiopathogenesis, late diagnosis and for causing a worsening in the quality of life of individuals, so the identification of reliable biomarkers for an early and accurate diagnosis is an essential point for the correct management of these diseases. conditions. The aim of this study was to evaluate salivary metabolome in IBD patients with periodontitis and healthy patients without periodontitis. For each of the study participants, a medical record containing personal data, anamnesis, data related to the gastrointestinal system and dental data (visible plaque index, and periogram composed of pocket depth on probing, clinical attachment loss and bleeding on probing) was filled out. . Forty-nine patients were selected, divided into four groups, seven with Crohn's Disease (CD) and periodontitis, five with Idiopathic Ulcerative Colitis (IUGR) and periodontitis, twenty-three systemically healthy patients with periodontitis and fourteen systemically healthy patients without periodontitis. The samples consisted of 4mL of unstimulated saliva. For each patient, 1mL of saliva was added to 20µl of protease inhibitor, centrifuged for 8 minutes at 8000 revolutions per minute and at laboratory temperature. Then, the saliva supernatant was transferred to a new Eppendorf and frozen at -80°C until the samples were processed. Afterwards, the samples were submitted to analysis in a 500 MHz Bruker nuclear magnetic resonance spectrometer, the spectra obtained were submitted to multivariate analysis using PLS-DA, sPLS-DA and univariate analysis using chi-square and t tests (SPSS 20.0, IL, USA), with a significance level of  $p < 0.05$ . Thirteen metabolites were identified in the saliva samples (butyrate, caproate, ethanol, glucose, sucrose, glutamine, glutamate, hydroxybutyrate, threonine, lysine, valine and N-acetyl group). Patients with CD and periodontitis had statistically significant levels of butyrate, caproate, ethanol and hydroxybutyrate when associated with controls with periodontitis. Between patients with UC and periodontitis and controls with periodontitis, there was a statistically significant difference in the levels of butyrate, caproate, sugar region, threonine and valine. Among controls with and without periodontitis, isoleucine levels were statistically significant. The analysis of saliva by NMR was able to reveal significant differences in the metabolic profile between the four groups analyzed, showing that there may be a relationship, at the metabolic level, between IBD and periodontitis. However, more studies are needed and it is important that there is methodological standardization in future studies.

Keywords: Periodontitis. Inflammatory bowel disease. Metabolome

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Dados demográficos dos quatro grupos analisados.....	32
Tabela 2 –	Dados clínicos periodontais dos participantes de cada grupo (DC, RCUI, controles com e sem periodontite).....	33
Tabela 3 –	Associação do diagnóstico periodontal entre os quatro grupos.....	34
Tabela 4 –	Dados clínicos da Doença de Crohn e RCUI.....	35
Tabela 5 –	Dados sobre atividade da DC e RCUI e sua relação com o estágio da periodontite.....	35
Tabela 6 –	Análise univariada do metaboloma salivar.....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAG	Associação Americana de Gastroenterologia
DC	Doença de Crohn
DII	Doença inflamatória intestinal
DP	Doença periodontal
HCFF	Hospital Clementino Fraga Filho
<sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-TOCSY	Espectroscopia de correlação total
Hz	Hertz
IPV	Índice de placa visível
ISS	Índice de sangramento a sondagem
JCE	Junção cimento-esmalte
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MHz	Megahertz
NIC	Nível de inserção clínica
PIC	Perda de inserção clínica
PBS	Profundidade de bolsa a sondagem
RCUI	Retocolite Ulcerativa Idiopática
RMN	Ressonância magnética nuclear
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{l}$	Microlitro
=	Igual
mM	Milimol
$\geq$	Maior ou igual
$\leq$	Menor ou igual

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	15
1.1	<b>Doença Periodontal</b> .....	15
1.2	<b>Doença inflamatória intestinal</b> .....	17
1.3	<b>Doença periodontal e Doença inflamatória intestinal</b> .....	18
1.4	<b>Metabolômica</b> .....	19
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
3.1	<b>Desenho do estudo</b> .....	24
3.2	<b>Seleção dos pacientes</b> .....	24
3.3	<b>Critérios de inclusão e exclusão</b> .....	25
3.4	<b>Prontuário de paciente</b> .....	25
3.5	<b>Exames odontológicos</b> .....	26
3.6	<b>Coleta de saliva</b> .....	27
3.7	<b>Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</b> .....	28
3.8	<b>Análise estatística</b> .....	28
3.8.1	<b><u>Análise metabolômica</u></b> .....	28
3.8.2	<b><u>Análise dos dados clínicos</u></b> .....	30
4	<b>RESULTADOS</b> .....	31
4.1	<b>Dados clínicos e demográficos</b> .....	31
4.2	<b>Análise do perfil metabólico</b> .....	36
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	40
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	44
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	45
	<b>APÊNDICE A – Ficha clínica</b> .....	55
	<b>APÊNDICE B – Ficha clínica para pacientes com DII</b> .....	57
	<b>APÊNDICE C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</b> .....	58

## INTRODUÇÃO

Entre as patologias complexas e multifatoriais, que são relacionadas à ocorrência de disbiose e à resposta imune do hospedeiro podemos citar a doença inflamatória intestinal (DII) constituída pela Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI) e a Doença de Crohn (DC). A DC tem característica progressiva e geralmente o íleo terminal e o cólon são as áreas mais afetadas, os sintomas mais comuns são dor abdominal, diarreia crônica, perda de peso e fadiga (TORRES; MEHANDRU; COLOMBEL; PEYRIN-BIROULET, 2017). A RCUI é caracterizada por inflamação contínua da mucosa do cólon, afetando uma extensão de sua continuidade e o reto e, assim como a DC, tem curso recorrente e remitente (STANGE; TRAVIS; VERMEIRE; REINISCH *et al.*, 2008). A etiopatogenia da DII ainda não está totalmente esclarecida, porém estudos recentes mostraram que não apenas a imunidade (inata e adaptativa), mas também as interações entre fatores microbianos, ambientais e genéticos estão envolvidos na DII (JACOBS; GOUDARZI; SINGH; TONG *et al.*, 2016).

Além da DII, podemos citar as doenças periodontais, entre as quais destacam-se a periodontite e gengivite como as mais prevalentes. A gengivite é caracterizada por sangramento gengival, edema, vermelhidão e inflamação restrita ao periodonto de proteção, já na periodontite, a inflamação se entende ao periodonto de sustentação e envolve sinais e sintomas como halitose, presença de bolsas ( $\geq 4\text{mm}$ ), perda de inserção clínica, sangramento a sondagem e perda óssea. Ambas as condições podem afetar adultos e crianças, mas a periodontite é mais prevalente em adultos (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017).

Atualmente para a realização do diagnóstico dessas condições, contamos com exames clínicos e radiográficos, investigação do histórico médico/odontológico pessoal e familiar, doenças passadas, histórico de perdas dentárias, entre outros, porém o conjunto dessas informações não é capaz de mostrar a predisposição de um paciente a essa doença, se há maior chance de apresentar formas graves ou mesmo como responderá às opções de tratamento de acordo com seu caso (YAMAMOTO-FURUSHO, 2017)(KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017). É preciso compreender melhor a patogênese das doenças crônico-inflamatórias e os mecanismos biológicos envolvidos, para desenvolver métodos de

diagnóstico capazes de detectá-las precocemente, fazendo com que os pacientes recebam tratamento o quanto antes e avaliar quais as melhores abordagens para tratamento de maneira individual e personalizada (NGUYEN; SEDGHI; GANTHER; MALONE *et al.*, 2020).

A metabolômica trata-se do estudo dos metabólitos produzidos em um organismo vivo, permitindo avaliar o perfil metabólico de uma célula, tecido e/ou fluido numa condição ou estado distinto, tornando possível estudar as mudanças que ocorrem nas vias metabólicas através da análise de componentes metabólicos nas situações de saúde e doença (NGUYEN; SEDGHI; GANTHER; MALONE *et al.*, 2020). É possível, através de técnicas metabolômicas, fazer com que moléculas derivadas tanto da comunidade disbiótica como dos tecidos atingidos do hospedeiro sejam capazes de refletir o fenótipo molecular da doença em tempo real (BARROS; WILLIAMS; OFFENBACHER; MORELLI, 2016) podendo trazer novas informações sobre a complexidade relacionada ao início, progressão e resolução tanto da DP (ZHANG; GAO; ZHOU; CHEN *et al.*, 2020) quanto da DII (LAI; XUE; LIU; GAO *et al.*, 2019).

A metabolômica já foi utilizada para analisar os vários estágios e progressão da doença periodontal, diferenças no perfil metabólico entre as formas de periodontite (ROMANO; MEONI; MANAVELLA; BAIMA *et al.*, 2018), o efeito do tratamento periodontal não cirúrgico no metaboloma salivar (ROMANO; MEONI; MANAVELLA; BAIMA *et al.*, 2019), para comparação entre indivíduos saudáveis e com periodontite agressiva (CHEN; ZHOU; LIAO; HU *et al.*, 2018; SAKANAKA; KUBONIWA; HASHINO; BAMBAMBA *et al.*, 2017) ou periodontite crônica (RZEZNIK; TRIBA; LEVY; JUNGO *et al.*, 2017) para compreender melhor o metabolismo bacteriano e sua contribuição no perfil metabólico na doença periodontal (GAWRON; WOJTOWICZ; ŁAZARZ-BARTYZEL; ŁAMASZ *et al.*, 2019; KUBONIWA; SAKANAKA; HASHINO; BAMBAMBA *et al.*, 2016; PEI; LI; XIE; LIU *et al.*, 2020; RZEZNIK; TRIBA; LEVY; JUNGO *et al.*, 2017; SAKANAKA; KUBONIWA; HASHINO; BAMBAMBA *et al.*, 2017). No campo de pesquisa das DII, a metabolômica já foi utilizada em vários estudos, por exemplo, para investigar a fadiga (BORREN; PLICHTA; JOSHI; BONILLA *et al.*, 2020), busca por novos biomarcadores metabólicos que poderiam ser usados no diagnóstico e investigação da atividade da doença (ALONSO; JULIÀ; VINAIXA; DOMÈNECH *et al.*, 2016; LAI; XUE; LIU; GAO *et al.*,

2019) e explorar as diferenças entre os indivíduos com DII e saudáveis (SANTORU; PIRAS; MURGIA; PALMAS *et al.*, 2017).

Os estudos com metabolômica para investigação das doenças periodontais até agora utilizaram diversas fontes de material biológico para análise, como fluido gengival (FCG) (BARNES; TELES; TRIVEDI; DEVIZIO *et al.*, 2010; BARNES; TELES; TRIVEDI; DEVIZIO *et al.*, 2009; CHEN; ZHOU; LIAO; HU *et al.*, 2018; OZEKI; NOZAKI; AOKI; BAMBA *et al.*, 2016; PEI; LI; XIE; LIU *et al.*, 2020; SHI; WEI; NIE; WANG *et al.*, 2020), soro (CHEN; ZHOU; LIAO; HU *et al.*, 2018), biofilme subgengival (SHI; WEI; NIE; WANG *et al.*, 2020), *swab* de língua e bochecho (GAWRON; WOJTOWICZ; ŁAZARZ-BARTYZEL; ŁAMASZ *et al.*, 2019). Revisão sistemática recente mostrou haver uma assinatura metabólica da DP no FCG (BAIMA; CORANA; IADEROSA; ROMANO *et al.*, 2021), entretanto o uso da saliva como amostra é atraente devido ao fato dessa ser de fácil coleta, diferente de outros fluidos como FCG, soro e sangue, cuja coleta e preparo demandam maiores detalhes, tempo e custos.

Tanto a DII quanto a periodontite afetam a qualidade de vida dos pacientes acometidos (ABEGUNDE; MUHAMMAD; BHATTI; ALI, 2016; PAPAPANOU; SUSIN, 2017), tornando cada vez mais necessário fazer seu reconhecimento precoce e estabelecer tratamentos nas fases iniciais. Estudos prévios demonstraram piores condições de saúde bucal e maior prevalência de periodontite em pacientes com DC e RCUI (BRITO; DE BARROS; ZALTMAN; CARVALHO *et al.*, 2008; FRANCIS, 2018; KOUTSOCHRISTOU; ZELLOS; DIMAKOU; PANAYOTOU *et al.*, 2015; LAURITANO; BOCCALARI; DI STASIO; DELLA VELLA *et al.*, 2019; ZHANG; GAO; ZHOU; CHEN *et al.*, 2020). Entretanto, a relação entre DII e DP continua com muitas questões não respondidas, como por exemplo, se compartilham vias metabólicas alteradas e/ou possuem biomarcadores em comum. Sendo assim, este estudo se propõe a avaliar o metaboloma salivar em pacientes acometidos por DII com periodontite e pacientes saudáveis sem periodontite.

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. Doença periodontal

A doença periodontal (DP) refere-se a um grupo de condições caracterizadas por alterações nos tecidos periodontais. A DP é caracterizada por um processo inflamatório cujo início está relacionado à presença de biofilme primariamente, mas que evolui com a disbiose (desequilíbrio na relação entre a microbiota e os tecidos do hospedeiro) e sua relação com a resposta imune (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017). Entre elas destacam-se a gengivite e a periodontite, sendo a primeira reversível e limitada aos tecidos gengivais, enquanto a periodontite é irreversível e está relacionada à perda de inserção, perda óssea, mobilidade dentária e pode causar até a perda dos dentes afetados, em casos mais severos (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017).

O acúmulo de biofilme é necessário para o início da DP, entretanto vários fatores estão relacionados e podem influenciar o desenvolvimento e evolução da inflamação, como por exemplo fatores genéticos, anatômicos, ambientais, doenças sistêmicas e a resposta imune do hospedeiro (EKE; WEI; THORNTON-EVANS; BORRELL *et al.*, 2016; KINANE; PETERSON; STATHOPOULOU, 2006). Acredita-se que em indivíduos suscetíveis, uma resposta inflamatória exacerbada e inadequada pode estar relacionada a uma disbiose verdadeira, que resulta em produção excessiva de citocinas, espécies reativas de oxigênio e metaloproteinases da matriz, causando danos colaterais aos tecidos periodontais (MEYLE; CHAPPLE, 2015).

Para ser ideal, um biomarcador para DP deve ter a capacidade de diagnosticar a presença da doença, refletir sua gravidade, monitorar a resposta ao tratamento e prever seu prognóstico (JI; CHOI, 2015). Através do estudo do metaboloma salivar alguns estudos já demonstraram que pacientes saudáveis e com DP apresentam diferenças no perfil metabólico, entre as quais podemos citar: alterações nos níveis de valina, lactato, prolina, piruvato, tirosina e formato (ROMANO; MEONI; MANAVELLA; BAIMA *et al.*, 2019), metabolismo do ácido araquidônico (HUANG; ZHU; LI; SA *et al.*, 2014), dipeptídeos, metabólitos de

aminoácidos, carboidratos, metabólitos de energia, uridina, alantoína,  $\omega$ -6-ácidos graxos, ácidos graxos, acetilcarnitina, carnitina, 3-desidrocarnitina (BARNES; KENNEDY; PANAGAKOS; DEVIZIO *et al.*, 2014), piruvato, grupos N-acetil, acetato, c-aminobutirato, n-butirato, succinato, trimetilamina, propionato, (AIMETTI; CACCIATORE; GRAZIANO; TENORI, 2012), peptídeos, aminoácidos, carboidratos, lipídeos, nucleotídeos (BARNES; CIANCIO; SHIBLY; XU *et al.*, 2011), ciclo (-leupro); ciclo (-phe-pro); glicerol-3-fosfato (MARCHESAN; MORELLI; MOSS; BARROS *et al.*, 2015), ácido butírico (RZEZNIK; TRIBA; LEVY; JUNGO *et al.*, 2017), metabolismo de poliamina, metabolismo de arginina e prolina, metabolismo de ácido butírico e degradação de lisina (SAKANAKA; KUBONIWA; HASHINO; BAMBA *et al.*, 2017), degradação de proteínas (SINGH; SAXENA; SAIMBI; SIDDIQUI *et al.*, 2019), cadaverina, ornitina, espermidina, 5-oxoprolina, hidrocinamato, histidina (KUBONIWA; SAKANAKA; HASHINO; BAMBA *et al.*, 2016). Alguns estudos relacionam esses achados à resposta do hospedeiro (AIMETTI; CACCIATORE; GRAZIANO; TENORI, 2012; BARNES; CIANCIO; SHIBLY; XU *et al.*, 2011; BARNES; KENNEDY; PANAGAKOS; DEVIZIO *et al.*, 2014; BARNES; TELES; TRIVEDI; DEVIZIO *et al.*, 2010; BARNES; TELES; TRIVEDI; DEVIZIO *et al.*, 2009; ELABDEEN; MUSTAFA; SZKLENAR; RÜHL *et al.*, 2013; HUANG; ZHU; LI; SA *et al.*, 2014; OZEKI; NOZAKI; AOKI; BAMBA *et al.*, 2016; ROMANO; MEONI; MANAVELLA; BAIMA *et al.*, 2019; ROMANO; MEONI; MANAVELLA; BAIMA *et al.*, 2018), ao metabolismo da microbiota (GAWRON; WOJTOWICZ; ŁAZARZ-BARTYZEL; ŁAMASZ *et al.*, 2019; KUBONIWA; SAKANAKA; HASHINO; BAMBA *et al.*, 2016; RZEZNIK; TRIBA; LEVY; JUNGO *et al.*, 2017; SAKANAKA; KUBONIWA; HASHINO; BAMBA *et al.*, 2017; SINGH; SAXENA; SAIMBI; SIDDIQUI *et al.*, 2019) e alguns à resposta tanto do hospedeiro quanto dos microorganismos (CHEN; ZHOU; LIAO; HU *et al.*, 2018; LIEBSCH; PITCHIKA; PINK; SAMIETZ *et al.*, 2019b; MARCHESAN; MORELLI; MOSS; BARROS *et al.*, 2015; PEI; LI; XIE; LIU *et al.*, 2020). Não há uma definição sobre qual metabólito(s) ou vias metabólicas podem ser classificados como biomarcadores para diagnóstico precoce de DP.

## 1.2. Doença inflamatória intestinal

Doença inflamatória intestinal (DII) é o nome dado a um grupo de doenças crônicas caracterizadas por inflamação do trato digestivo, constituída pela Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI) e a Doença de Crohn (DC). Ambas apresentam sinais e sintomas como diarreia, dor abdominal, sangramento retal e desnutrição (CHO, 2008). A etiopatogenia dessas doenças ainda não foi totalmente esclarecida, mas acredita-se que esteja relacionada a uma resposta imune exacerbada do hospedeiro e à disbiose (desequilíbrio na relação entre a microbiota e o hospedeiro) decorrente de uma combinação de fatores ambientais e genéticos que controlam a composição microbiana (JACOBS; GOUDARZI; SINGH; TONG *et al.*, 2016).

Atualmente o diagnóstico de DII é feito através de exames laboratoriais e físicos, avaliação do histórico familiar e acompanhamento, mas em muitos casos há uma demora até chegar a um diagnóstico definitivo devido ao fato de que seus sintomas são parecidos com os de diversas outras patologias, fazendo com que o paciente não receba os cuidados específicos logo no início das manifestações da doença. A busca por biomarcadores que permitam um diagnóstico precoce é crucial e já existem alguns atualmente, como a taxa de sedimentação de eritrócitos, proteína C-reativa, calprotectina fecal ou lactoferrina fecal, porém com falta de especificidade (CHANG; MALTER; HUDESMAN, 2015).

Estudos prévios já utilizaram metabolômica em pacientes com DII para avaliar a fadiga nesses indivíduos (BORREN; PLICHTA; JOSHI; BONILLA *et al.*, 2020), o perfil metabólico da urina (ALONSO; JULIÀ; VINAIXA; DOMÈNECH *et al.*, 2016), a presença de possíveis biomarcadores (LAI; XUE; LIU; GAO *et al.*, 2019), a atividade da microbiota intestinal (LE GALL; NOOR; RIDGWAY; SCOVELL *et al.*, 2011) e até para tentar distinguir as duas formas da doença (Colite ulcerativa e Doença de Crohn) (SANTORU; PIRAS; MURGIA; PALMAS *et al.*, 2017) (OPEKUN; DING; GRAHAM; KELLERMAYER, 2019). Alguns estudos também encontraram associação com o perfil metabólico das espécies microbianas, sugerindo que as mudanças nas vias metabólicas dos microorganismos podem estar relacionadas à patogênese da DII (SANTORU; PIRAS; MURGIA; PALMAS *et al.*, 2017; VANCAMELBEKE; SABINO; DEROOVER; VANDERMEULEN *et al.*, 2017).

Estudos avaliando o metaboloma na DII, já utilizaram amostras de fezes (ADEN; REHMAN; WASCHINA; PAN *et al.*, 2019; BJERRUM; WANG; HAO; COSKUN *et al.*, 2015; JACOBS; GOUDARZI; SINGH; TONG *et al.*, 2016; LE GALL; NOOR; RIDGWAY; SCOVELL *et al.*, 2011; MACKNER; HATZAKIS; ALLEN; DAVIES *et al.*, 2020; SANTORU; PIRAS; MURGIA; PALMAS *et al.*, 2017; SUN; DU; SHI; LU *et al.*, 2019; VANDEN BUSSCHE; MARZORATI; LAUKENS; VANHAECKE, 2015; WENG; GAN; LI; HUANG *et al.*, 2019), sangue (KRZYTEK-KORPACKA; FLESZAR; BEDNARZ-MISA; LEWANDOWSKI *et al.*, 2020), urina (ALONSO; JULIÀ; VINAIXA; DOMÈNECH *et al.*, 2016; KESHTELI; MADSEN; MANDAL; BOECKXSTAENS *et al.*, 2019), plasma (SUN; DU; SHI; LU *et al.*, 2019), tecido intestinal (KRZYTEK-KORPACKA; FLESZAR; BEDNARZ-MISA; LEWANDOWSKI *et al.*, 2020; WENG; GAN; LI; HUANG *et al.*, 2019) e soro (BJERRUM; STEENHOLDT; AINSWORTH; NIELSEN *et al.*, 2017; BORREN; PLICHTA; JOSHI; BONILLA *et al.*, 2020; DANILUK; DANILUK; KUCHARSKI; KOWALCZYK *et al.*, 2019; LAI; XUE; LIU; GAO *et al.*, 2019; SCOVILLE; ALLAMAN; BROWN; MOTLEY *et al.*, 2018; TEFAS; CIOBANU; TANȚĂU; MORARU *et al.*, 2020), mas nenhum até o presente momento utilizou amostras de saliva.

### **1.3 Doença periodontal e Doença inflamatória intestinal**

Estudos prévios demonstraram piores condições de saúde bucal e maior prevalência de periodontite em pacientes com Doença de Crohn e Colite Ulcerativa (BRITO; DE BARROS; ZALTMAN; CARVALHO *et al.*, 2008; BRITO; ZALTMAN; CARVALHO; FISCHER *et al.*, 2013; FRANCIS, 2018; KOUTSOCHRISTOU; ZELLOS; DIMAKOU; PANAYOTOU *et al.*, 2015; LAURITANO; BOCCALARI; DI STASIO; DELLA VELLA *et al.*, 2019).

No estudo de Vavricka (2013) pacientes com DII apresentaram pronunciados níveis de gengivite e periodontite quando comparados aos controles saudáveis e, manifestações extraintestinais perianais e proctite nos pacientes com RCUI foram fatores de risco para periodontite (VAVRICKA; MANSER; HEDIGER; VÖGELIN *et al.*, 2013).

Ambas as doenças apresentam semelhanças na etiologia, como fatores ambientais associados e disbiose da microbiota associada à resposta imune exacerbada do hospedeiro (BRANDTZAEG, 2001; INDRIOLO; GRECO; RAVELLI; FAGIUOLI, 2011), além disso a relação entre DII e DP pode estar relacionada a fatores predisponentes comuns como idade, predisposição genética ou estilo de vida (INDRIOLO; GRECO; RAVELLI; FAGIUOLI, 2011).

Várias hipóteses já foram levantadas e estudadas, como o potencial do impacto microbiológico (SHE; KONG; GE; LIU *et al.*, 2020), a alta taxa de bactérias periodontopatogênicas em pacientes com DII (BRITO; ZALTMAN; CARVALHO; FISCHER *et al.*, 2013; STEIN; LAMMERT; ZIMMER; GRANZOW *et al.*, 2010), o papel do receptor 30 acoplado à proteína G e o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (KAWALEC; MIKRUT; WIŚNIEWSKA; PILC, 2013; WŁODARCZYK; SOBOLEWSKA-WŁODARCZYK; CYGANKIEWICZ; JACENIK *et al.*, 2017), a entrada de citocinas pró-inflamatórias na corrente sanguínea desencadeada pelo início do processo inflamatório (NGUYEN; KIM; QUAN; NGUYEN *et al.*, 2015), anormalidades na quimiotaxia de neutrófilos, observadas tanto na DII quanto na DP (AGOSSA; DENDOOVEN; DUBUQUOY; GOWER-ROUSSEAU *et al.*, 2017).

Em uma revisão sistemática recente, pacientes com DII apresentaram maior risco para periodontite, com maiores porcentagens de locais com perda de inserção e média de profundidade de bolsa. De fato, baseando-se em estudos prévios, há uma relação entre DII e DP, porém essa relação parece superestimada na literatura (LORENZO-POUSO; CASTELO-BAZ; RODRIGUEZ-ZORRILLA; PÉREZ-SAYÁNS *et al.*, 2021) e ainda não está claro como ambas se relacionam, sendo necessária a realização de estudos em diferentes áreas como, por exemplo, a metabolômica para avaliar como essas doenças se relacionam.

#### 1.4 Metabolômica

Em busca do entendimento do funcionamento celular nos organismos e suas alterações, foram desenvolvidas as ciências ômicas. Através delas é possível coletar diversos dados e informações a nível molecular e integrá-los ao desenvolvimento de

novas ferramentas. Entre elas, há a genômica, proteômica, transcriptômica e metabolômica (SANCESARIO; BERNARDINI, 2018).

A metabolômica é o estudo do conjunto de metabólitos de baixo peso molecular que são produtos finais celulares produzidos dentro de um organismo vivo. Existem duas abordagens para se estudar o metaboloma: a primeira é através da metabolômica direcionada, onde se pesquisa por metabólitos pré-selecionados de interesse, associados a vias metabólicas específicas; a segunda é chamada de metabolômica global e é caracterizada pela análise qualitativa do maior número de metabólitos no organismo em estudo e é geralmente utilizada quando o perfil metabólico não é bem conhecido, funcionando como uma triagem inicial da doença (CANUTO; COSTA; DA CRUZ; SOUZA *et al.*, 2018).

É possível obter perfis metabólicos em ampla escala de uma célula, tecido ou fluido em uma condição ou estado distinto e, quando se trata do estudo das doenças, esta técnica desempenha um papel importante, pois fornece dados sobre as alterações que ocorrem nas vias metabólicas através da análise dos componentes metabólicos que diferem em condições de saúde e doença (CANUTO; COSTA; DA CRUZ; SOUZA *et al.*, 2018). Uma dificuldade relacionada ao estudo do metaboloma é o fato de que existem muitos metabólitos intra e extracelulares que ainda precisam ser identificados e quantificados (OHASHI; HIRAYAMA; ISHIKAWA; NAKAMURA *et al.*, 2008; VILLAS-BÔAS; MAS; AKESSON; SMEDSGAARD *et al.*, 2005) e observou-se que os metabólitos não identificados aumentam gradualmente de maneira consistente com a gravidade da doença periodontal (OZEKI; NOZAKI; AOKI; BAMBA *et al.*, 2016).

A maior parte da literatura em metabolômica de doenças periodontais é voltada para a estratégia global ou não direcionada, possivelmente pelo fato de que por ser uma ciência nova, ainda não há metabólitos ou vias específicas definidas para utilizar a metabolômica alvo. Diversos estudos utilizaram a metabolômica não-direcionada para analisar os vários estágios e progressão da doença periodontal, assim como possíveis diferenças no perfil metabólico entre as formas de periodontite (agressiva ou crônica) (ROMANO; MEONI; MANAVELLA; BAIMA *et al.*, 2018), o efeito do tratamento periodontal não cirúrgico no metaboloma salivar (ROMANO; MEONI; MANAVELLA; BAIMA *et al.*, 2019), comparação entre indivíduos saudáveis e com periodontite agressiva (CHEN; ZHOU; LIAO; HU *et al.*, 2018; SAKANAKA;

KUBONIWA; HASHINO; BAMBA *et al.*, 2017) ou periodontite crônica (RZEZNIK; TRIBA; LEVY; JUNGO *et al.*, 2017).

Entre as abordagens mais usadas no estudo do metaboloma estão a análise de amostras, geralmente de fluidos corporais, por cromatografia gasosa/líquida associada a espectrometria de massa e espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) (CHEN; ZHOU; LIAO; HU *et al.*, 2018). Além de ser uma técnica não destrutiva, a RMN agrega diversos benefícios ao campo da metabolômica, como a possibilidade de ver mais de 200 metabólitos simultaneamente (SILWOOD; LYNCH; CLAXSON; GROOTVELD, 2002), a detecção de metabólitos através de um ou mais tipos de núcleos atômicos e, é uma técnica altamente reprodutível e quantitativa (NAGANA GOWDA; RAFTERY, 2021). Entre os biofluidos que podem ser analisados podemos citar a saliva (estimulada ou não), soro e FCG, mas entre estes vale destacar a praticidade com relação à saliva, pois já se mostrou eficaz para análise do metaboloma e sua coleta não demanda altos custos, nem muito tempo ou preparo técnico.

Em revisão sistemática recente estudando o metaboloma salivar para diagnóstico de periodontite, foi possível perceber que houve diferença em 114 metabólitos (BAIMA; IADEROSA; CITTERIO; GROSSI *et al.*, 2021), entre os quais alanina, cisteína, leucina, serina e treonina foram consistentemente encontradas em concentrações significativamente mais altas na periodontite crônica. Foi possível verificar que há uma assinatura metabólica na DP, caracterizada por diferenças no perfil metabólico, tais como alterações na via de degradação de purinas (BARNES; KENNEDY; PANAGAKOS; DEVIZIO *et al.*, 2014; BARNES; TELES; TRIVEDI; DEVIZIO *et al.*, 2009; CHEN; ZHOU; LIAO; HU *et al.*, 2018; SINGH; SAXENA; SAIMBI; SIDDIQUI *et al.*, 2019), metabolismo de pirimidinas (PEI; LI; XIE; LIU *et al.*, 2020), degradação de proteínas (SINGH; SAXENA; SAIMBI; SIDDIQUI *et al.*, 2019), via da fenilalanina, tirosina e triptofano, juntamente com o metabolismo do piruvato, entre outros, quando comparados a indivíduos saudáveis (BAIMA; IADEROSA; CITTERIO; GROSSI *et al.*, 2021).

A metabolômica também tem sido empregada na tentativa de compreender melhor o metabolismo bacteriano e seu papel na doença periodontal (GAWRON; WOJTOWICZ; ŁAZARZ-BARTYZEL; ŁAMASZ *et al.*, 2019; KUBONIWA; SAKANAKA; HASHINO; BAMBA *et al.*, 2016; PEI; LI; XIE; LIU *et al.*, 2020; RZEZNIK; TRIBA; LEVY; JUNGO *et al.*, 2017; SAKANAKA; KUBONIWA; HASHINO;

BAMBA *et al.*, 2017). Várias alterações foram associadas à atividade microbiana, como alteração no metabolismo de ácido butírico, degradação de lisina, estresse oxidativo, metabolismo de arginina, prolina, aminoácidos, tirosina e pirimidina (CHEN; ZHOU; LIAO; HU *et al.*, 2018; LETIERI; FREITAS-FERNANDES; SOUZA; VALENTE *et al.*, 2022; LIEBSCH; PITCHIKA; PINK; SAMIETZ *et al.*, 2019a; PEI; LI; XIE; LIU *et al.*, 2020; SAKANAKA; KUBONIWA; HASHINO; BAMBA *et al.*, 2017; SINGH; SAXENA; SAIMBI; ARIF *et al.*, 2017; SINGH; SAXENA; SAIMBI; SIDDIQUI *et al.*, 2019), indicando que o metabolismo microbiano e seus produtos estão envolvidos na transição de saúde para doença, mas são necessárias mais pesquisas para avaliar se essas alterações ocorrem como consequência da evolução do processo inflamatório ou se estão associadas ao seu início e, quais dessas alterações podem ser utilizadas como possíveis marcadores diagnósticos.

Na periodontia a metabolômica já foi utilizada, também, em estudos para avaliar associação de doenças periodontais à doenças sistêmicas crônicas, como diabetes (BARNES; CIANCIO; SHIBLY; XU *et al.*, 2011) e glioblastoma (GARCÍA-VILLAESCUSA; MORALES-TATAY; MONLEÓN-SALVADÓ; GONZÁLEZ-DARDER *et al.*, 2018). No entanto, até o momento, não há estudos avaliando o metaboloma de pacientes com DII e DP.

## 2 OBJETIVO

Avaliar o metaboloma salivar em pacientes acometidos por DII com periodontite e pacientes saudáveis sem periodontite.

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Desenho do estudo**

Estudo observacional transversal.

### **3.2 Seleção dos pacientes**

Os indivíduos que participaram deste estudo foram recrutados dos ambulatórios de Gastroenterologia do Hospital Clementino Fraga Filho (HUCFF) - Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), especializado em atendimento a indivíduos com DII e das clínicas de graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Indivíduos com idades entre 20 e 80 anos foram selecionados a participar do estudo. Os pacientes com DII que atenderam aos critérios de inclusão da pesquisa foram convidados a participar voluntariamente da mesma e em seguida, foram atendidos no HCFE.

O grupo controle foi composto por indivíduos em atendimento na Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), que relataram ser sistemicamente saudáveis e que após exame odontológico foram diagnosticados com periodontite ou saúde periodontal. Foram aceitos, ainda, para compor este grupo, familiares de participantes do grupo teste/ controle que relataram ser sistemicamente saudáveis e de mesma faixa etária.

Todos os pacientes diagnosticados com periodontite neste estudo foram encaminhados posteriormente para tratamento nas clínicas de graduação em Odontologia ou Especialização em periodontia na Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) de acordo com a extensão e severidade da doença.

Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da UERJ e HUCFF (CAAE: 45797721.5.0000.5282). Os pacientes assinaram um Termo de Consentimento antes de serem examinados.

### **3.3 Critérios de Inclusão e exclusão**

Todos os indivíduos deveriam ter pelo menos 10 dentes naturais erupcionados (excluindo os terceiros molares), ser diagnosticados com saúde periodontal ou periodontite de acordo com a classificação de 2018 das doenças e condições periodontais e periimplantares (CATON; ARMITAGE; BERGLUNDH; CHAPPLE *et al.*, 2018).

Os participantes do grupo teste foram diagnosticados com RCUI ou DC de acordo com os critérios adotados pela Associação Americana de Gastroenterologia (AAG) e estar em tratamento no HCUF.

Os critérios de exclusão para ambos os grupos foram: gravidez, lactação, uso de aparelho ortodôntico e/ou tratamento periodontal nos últimos seis meses, pacientes que apresentassem qualquer desordem sistêmica além da DII que pudesse afetar o aparato periodontal de suporte.

### **3.4 Prontuário do paciente**

Para cada um dos participantes do estudo foi preenchido um prontuário contendo dados pessoais, anamnese, dados relacionados ao sistema gastrointestinal e dados odontológicos.

Os dados pessoais coletados incluíram: identificação do paciente, data de nascimento, telefone e e-mail.

Os dados mencionados a seguir fizeram parte das perguntas da anamnese tanto do grupo teste quanto do grupo controle: se havia gravidez em curso ou uso de algum método contraceptivo para as pacientes do gênero feminino, existência de doença sistêmica, medicações utilizadas nos seis meses anteriores. Foi questionado, ainda, se o paciente sofreu de alguma enfermidade ou mal-estar nos

seis meses anteriores e, em caso positivo, a doença e os medicamentos utilizados para tratamento foram ser descritos.

Além desses dados, na anamnese do grupo teste foram coletadas informações sobre a história da RCUI ou DC: idade de início dos sintomas, idade em que foi realizado o diagnóstico, tempo de tratamento e medicações em uso (para os pacientes em atividade da doença) ou histórico dos medicamentos que já foram utilizados anteriormente (para os pacientes que estiverem em remissão e sem uso de medicações), e infecções (incluindo tuberculose e COVID-19). Os dados gastrointestinais dos pacientes com RCUI ou DC foram confirmados com os dados do prontuário médico do HCFF.

### **3.5 Exames odontológicos**

Os exames odontológicos foram realizados por dois examinadores previamente calibrados e incluíram: índice de placa visível (IPV), e periograma composto por profundidade de bolsa à sondagem (PBS), perda inserção clínica (PIC) e índice de sangramento à sondagem (SS) em todos os dentes da boca com exceção dos terceiros molares, nesta ordem. Os parâmetros periodontais foram avaliados em seis sítios por dente (mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiopalatino/ mesiolingual, palatino/lingual e distopalatino/ distolingual).

O IPV utilizado foi dicotômico (presença/ausência) e calculado obtendo-se a porcentagem de sítios com presença de sangramento do total de sítios sondados.

Para a realização do periograma, cada dente a ser avaliado foi mantido sob boa iluminação, com isolamento relativo e seco com jato de ar através da introdução suave de uma sonda periodontal milimetrada (Carolina do Norte Universal 15 Ponta Única - PCPUNC15 – Hu-Friedy®, Chicago, IL, Estados Unidos) dentro do sulco gengival/bolsa periodontal. Com a sonda inserida em sua posição final (ponto de resistência no fundo do sulco/bolsa) foram registradas as medidas de PBS e PIC. A medida de PBS foi tomada a partir da distância da margem gengival até o fundo do sulco/ da bolsa. A PIC foi dada pela distância da junção cimento-esmalte (JCE) até o fundo do sulco/ da bolsa. O índice de sangramento à sondagem utilizado neste

trabalho foi dicotômico (presença/ausência). O SS foi calculado obtendo-se a porcentagem de sítios com presença de sangramento do total de sítios sondados.

Os pacientes dos grupos DC, RCUI e Controles sistemicamente saudáveis com periodontite foram também avaliados quanto ao diagnóstico periodontal de acordo com o estágio da periodontite, segundo o Workshop Mundial para a Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-Implantares de 2018 (PAPAPANOU; SANZ; BUDUNELI; DIETRICH *et al.*, 2018).

### 3.6 Coleta da saliva

A coleta de saliva foi realizada antes da realização dos exames odontológicos para que as amostras não fossem contaminadas por sangue oriundo da manipulação dos tecidos gengivais durante os exames.

Os pacientes foram orientados a abster-se completamente de atividades orais (consumir qualquer alimento ou bebida, escovar os dentes, realizar bochechos, fumar, etc.) por, pelo menos, 30 minutos antes da coleta de saliva.

Foi realizada, então, a coleta não estimulada da saliva total. A saliva foi expectorada da boca diretamente para um pote coletor de plástico estéril por até 5 minutos ou até atingir a quantidade de 4 ml.

Em seguida, para cada paciente, 1 ml de saliva foi transferido para um Eppendorf de pressão contendo 20µl de inibidor de protease (SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Tablets, Sigma Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, Estados Unidos) para que fosse centrifugado (Micro-centrífuga NT800, Novatecnica®) durante 8 minutos, a 8000 rotações por minuto e à temperatura do laboratório. Após a centrifugação, o sobrenadante da saliva foi transferido para um novo Eppendorf (de rosca) e congelado a -80°C até o processamento das amostras.

### 3.7 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Após o armazenamento a  $-80^{\circ}\text{C}$ , as amostras coletadas foram descongeladas a  $25^{\circ}\text{C}$  e, em seguida,  $540\mu\text{L}$  de cada amostra salivar foram misturados a  $60\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio (pH 7,0) contendo água deuterada a uma concentração de 10% ( $\text{D}_2\text{O}$ ; Cambridge Isotope Laboratories Inc., USA) e 5mM de ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-sulfônico (DSS; Sigma-Aldrich, Milwaukee, USA). O  $\text{D}_2\text{O}$  foi utilizado para o reconhecimento do campo magnético na amostra e o DSS foi utilizado para a referência interna de deslocamento químico ( $\delta = 0,00$  ppm).

Os espectros foram obtidos utilizando um espectrômetro de RMN Avance III de 500 MHz (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany), a  $25^{\circ}\text{C}$  no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas (CNRMN). Utilizamos a sequência de pulsos de CPMG (Carr-Purcell-Meibom-Gill) para o espectro de  $^1\text{H}$ , sendo realizada supressão da água. Foram utilizados 1024 scans de varreduras. Os experimentos de correlação total  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY foram utilizados para confirmar os assinalamentos e resolver metabólitos ambíguos, utilizando  $2048 \times 256$  pontos, largura espectral de 12.019 Hz em cada dimensão e um tempo de mistura de 70 ms.

### 3.8 Análise estatística

#### 3.8.1 Análise metabolômica

Após a aquisição dos espectros, os deslocamentos foram analisados a partir da sobreposição de todos os espectros usando Topspin® (Bruker Biospin, Rheinstetten, Alemanha). Cada espectro de RMN foi analisado integrando as regiões de tamanho de 0,03 ppm. A região da água foi excluída das análises (4,50 a 5,15 ppm) bem como as regiões espectrais que não puderam ser corrigidas a fase e a linha de base (2,69 a 2,73 ppm). Os assinalamentos foram realizados a partir dos experimentos  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY e confirmadas usando o banco de dados de Metaboloma Humano (<http://www.hmdb.ca/>).

O conjunto de dados foi armazenado em uma matriz com as amostras de saliva dos indivíduos ocupando as linhas e os deslocamentos químicos dos metabólitos dispostos em colunas. Os dados metabólicos foram extraídos usando o programa estatístico AMIX Statistics (versão 3.9.14, Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany).

Os dados foram normalizados pela soma das intensidades dos picos e usando o Pareto. As análises multivariadas para determinação dos metabólitos mais relevantes para os grupos com e sem RCUI ou DC foram realizadas no Metaboanalyst (versão 4.0), sendo realizada a Partial Least Squared Dyscriminant Analysis (PLS-DA) e o Sparse Partial Least Squares Dyscriminant Analysis (sPLS-DA), um método de classificação supervisionado que usa o rótulo do grupo para maximizar a separação entre diferentes grupos. Os gráficos da pontuação VIP (do inglês *Variable Importance in Projection Scores*) foram analisados a fim de definir os metabólitos distintos nos diferentes grupos analisados. O VIP Score foi obtido para cada comparação, e os metabólitos correspondentes foram analisados usando intensidade de pico e análises estatísticas multivariadas. As VIPs estimam a importância de cada variável na projeção usada em um modelo PLS, sendo frequentemente usada para seleção de variáveis. Uma variável com VIP Score próximo ou superior a 1 (um) pode ser considerada importante em determinado modelo.

O test t foi aplicado para a realização da estatística univariada, a fim de verificar se houve diferença dos metabólitos entre os pacientes com e sem RCUI ou DC. Para definir a performance do modelo, foram utilizados os parâmetros  $Q^2$  (fração de variação y prevista pelo modelo X) e  $R^2$  (fração de variação X modelada), e a acurácia (ACC) para cada conjunto de projeções. O intervalo de confiança de 95% foi utilizado para os modelos.

No software Metaboanalyst 3.0 foi possível obter o desempenho preditivo dos modelos; cada modelo foi avaliado para  $Q^2$ ,  $R^2$  e precisão (ACC), para fins de validação cruzada. Com os dois primeiros componentes principais (CP1 e CP2) foi obtida uma acurácia de 0,42.

### 3.8.2 Análise dos dados clínicos

Uma amostra de conveniência foi utilizada neste estudo. O poder estatístico da pesquisa foi calculado com o auxílio do software G Power considerando um total de 49 indivíduos, erro (alfa) de 5%, área de distribuição bicaudal (ou unicaudal) e tamanho de efeito igual a 0,83. Após o cálculo foi obtido um poder de análise de 99%. O teste de Kolmogorov - Smirnov foi usado para avaliar a distribuição dos dados para cada variável apresentada. Os dados foram coletados no software Microsoft Excel 2019 e exportados para o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 20 para análises estatísticas (SPSS, IL, USA). Os dados foram apresentados por meio da média e desvio padrão (dados demográficos) e mediana e intervalo interquartil (parâmetros clínicos periodontais). Foi realizado o teste qui-quadrado de independência para avaliar associação entre as variáveis qualitativas (diagnóstico periodontal, sexo, localização da DII, cor, hábito de fumar, HAS, diabetes, atividade da DII), teste de Kruskal Wallis e Mann Whitney para avaliar diferenças entre grupos de variáveis quantitativas (Idade, tempo de DII, nº de dentes, PBS, SS, PIC, média de PBS, média de PIC). O teste de Post Hoc de Games Howel foi utilizado para os parâmetros clínicos periodontais. O nível de significância foi estabelecido em 95% ( $p < 0.05$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Dados clínicos e demográficos

Foram selecionados 49 pacientes para este estudo, distribuídos nos seguintes grupos: Pacientes diagnosticados com DII e periodontite, sendo sete (n=7) com DC e 5 (n=5) com RCUI; Pacientes sistemicamente saudáveis, com periodontite (n=23); Pacientes sistemicamente saudáveis e sem periodontite (n=14).

Os dados demográficos detalhados de pacientes com RCUI, DC, controles com periodontite e controles sem periodontite são relatados na Tabela 1. Controles com periodontite apresentaram significativamente mais sangramento à sondagem quando comparados aos controles sem periodontite ( $p < 0,025$ ). Pacientes do grupo DC apresentaram PBS igual a 4mm significativamente maior ( $p < 0,001$ ) do que controles com periodontite e estes, mais ( $p < 0,001$ ) do que os controles sem periodontite. Os controles com periodontite apresentaram PBS  $\geq 5$ mm e PIC de 3-4mm estatisticamente significante ( $p = 0,004$  e  $p = 0,036$ , respectivamente) sobre os controles sem periodontite. Os quatro grupos apresentaram semelhança quanto ao índice de placa, número de dentes e PIC de 0 e 1 a 2mm.

Tabela 1 - Dados demográficos dos quatro grupos analisados

Dados clínicos	Doença de Crohn (n=7)	RCUI (n=5)		Controles com periodontite (n=23)		Controles sem periodontite (n=14)			
		p-valor <sup>1</sup>		p-valor <sup>2</sup>		p-valor <sup>3</sup>	p-valor <sup>4</sup>		
Idade Anos (DesvPad)	48(±14)	0,737	50 (±9)	0,552	50 (±9)	0,933	48 (±13)	0,996	
	N (%)		N (%)		N (%)		N (%)		
Sexo	Feminino	2(28,6%)	<b>0,039</b>	4(80,00%)	0,412	14(60,86%)	0,159	11(78,57%)	0,743
	Masculino	5(71,4%)	<b>0,039</b>	1(20,00%)	0,412	9(39,13%)	0,159	3(21,42%)	0,743
Cor	Branca	2(28,60%)	0,803	3(60,00%)	0,168	5(21,73%)	0,335	6(42,85%)	0,125
	Parda	3(42,90%)	0,447	2(40,00%)	0,63	6(26,08%)	0,844	4(28,57%)	0,517
	Preta	2(28,60%)	0,628	0(0,0%)	0,072	12(52,17%)	0,453	4(28,57%)	<b>0,034</b>
Fumo	Fumante	0(0,0%)	0,555	0(0,0%)	0,626	2(8,69%)	0,361	0(0,0%)	0,124
	Não fumante	7(100%)	0,085	4(80,00%)	0,727	15(65,21%)	0,837	10(71,42%)	0,218
	Ex fumante	0(0,0%)	0,124	1(20,0%)	0,888	6(26,08%)	0,515	4(28,57%)	0,565
HAS	Sim	2(28,60%)	0,451	0(0,0%)	0,263	5(21,73%)	0,64	2(14,28%)	0,566
Diabetes	Sim	2(28,60%)	<b>0,007</b>	0(0,0%)	0,546	1(4,34%)	0,258	0(0,0%)	0,626

Nota: Frequências relativas e absolutas por grupo de indivíduos. A variável idade foi representada por meio de média e desvio padrão e foi realizado o teste de Mann Whitney. Foi realizado o teste qui quadrado para avaliar possíveis associações entre as variáveis qualitativas. P-valor<sup>1</sup> avalia a significância para os grupos "Doença de Crohn" e "RCUI". P-valor<sup>2</sup> significância para "RCUI" e "Controle com periodontite". P-valor<sup>3</sup> significância entre "controle com periodontite" e "controle sem periodontite". P-valor<sup>4</sup> significância entre controle sem periodontite e doença de Crohn. Nível de significância foi estabelecido em 0,05.

Fonte: A autora, 2022.

Tabela 2 - Dados clínicos periodontais dos participantes de cada grupo (DC, RCUI, controles com e sem periodontite)

Parâmetros clínicos	Doença de Crohn (a) (n=7)	RCUI (b) (n=5)	Controle com periodontite (c) (n=14)	Controle sem periodontite (d) (n=23)	P-valor
Nº de dentes	26 (5)	26 (3)	25 (6)	23(8)	0,916
Índice de Placa	39,16 (35,2)	51,38 (18,7)	60 (34)	37 (26)	0,5
SS	9 (30)	33 (19)	35 (25)	5 (6)	0,025 <sup>c,d</sup>
PBS ≤ 3mm	98 (2)	98 (2)	94 (10)	100 (0)	< 0,001 <sup>d,a/ d,c</sup>
PBS = 4mm	2 (1)	1 (0)	3 (4)	0 (0)	< 0,001 <sup>c,d/ c,a</sup>
PBS ≥ 5mm	1(1)	2 (2)	3 (7)	0 (0)	0,004 <sup>c,d</sup>
PIC = 0mm	47 (32)	56 (58)	34 (55)	83 (46)	0,182
PIC= 1-2mm	46 (37)	14 (29)	42 (31)	8 (44)	0,128
PIC= 3-4 mm	5 (4)	2 (5)	15 (17)	1 (2)	0,036 <sup>c,d</sup>
PIC=5mm	0 (5)	0 (3)	1 (11)	0 (0)	0,302
Média PBS	2 (0)	2 (0)	2 (0)	2 (0)	0,122
Média PIC	1 (0)	1 (1)	1 (1)	0 (1)	0,077

Nota: Teste de Kruskal Wallis e Post Hoc de Games Howel. Mediana (intervalo de quartil) para o número de dentes, porcentagem de sítios com placa, porcentagem de sítios com sangramento à sondagem, profundidade da bolsa de sondagem (PBS), perda inserção clínica (PIC), média de PBS e média de PIC.

Fonte: A autora, 2022.

Tabela 3 - Associação do diagnóstico periodontal entre os quatro grupos

Diagnóstico Periodontal	Doença de Crohn (n=7)		RCUI (n=5)		Controles com periodontite (n=23)	
	N(%)	P-valor <sup>1</sup>	N(%)	P-valor <sup>2</sup>	N(%)	P-valor <sup>3</sup>
Periodontite estágio I	1(14,30%)	0,858	1(20,00%)	0,576	4(17,40%)	0,301
Periodontite estágio II	3(42,90%)	0,111	1(20,00%)	0,98	6(26,10%)	0,353
Periodontite estágio III	3(42,90%)	0,447	2(40,00%)	0,63	10(43,50%)	0,066
Periodontite estágio IV	0(0,00%)	0,394	1(20,00%)	0,307	3(13,00%)	0,24

Nota: Frequências relativas (por coluna). Foi realizado o teste qui quadrado para avaliar possíveis associações entre as variáveis qualitativas. P-valor<sup>1</sup> avalia a significância para os grupos “Doença de Crohn” e “RCUI”. P-valor<sup>2</sup> significância para “RCUI” e “Controle com periodontite”. P-valor<sup>3</sup> significância entre “controle com periodontite” e “controle sem periodontite”. P-valor<sup>4</sup> significância entre controle sem periodontite e doença de Crohn. Nível de significância foi estabelecido em 0,05.

Fonte: A autora, 2022.

Houve semelhança quanto ao peso e tempo de doença entre os grupos DC e RCUI. No grupo RCUI a maioria (80%) dos participantes apresentavam Pancolite como localização da doença, enquanto na DC a localização Ileocolônica foi predominante (57,1%). A maioria dos participantes do grupo DC (85,71%) e RCUI (37,50%) estavam em remissão da respectiva doença, porém não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,386$ ). (Tabela 4)

Tabela 4 - Dados clínicos da Doença de Crohn e RCUI

Dados clínicos das DII's		Doença de Crohn (n=7)	RCUI (n=5)	P-valor
		N	N	
Peso (kg)		73,57 (±19,91)	74,40 (± 29,94)	0,935
Tempo de doença Anos (DesvPad)		19,43 (± 8,28)	16,4 (± 7,70)	0,514
Localização	Pancolite	0 (0,00%)	4 (80,00%)	0,386
	Proctossigmoidite	0 (0,00%)	1 (20,00%)	
	Ileocolônica	4 (57,1%)	0 (0,00%)	
	Ileocecal	2 (28,60%)	0 (0,00%)	
	Colônica	1 (14,30%)	0 (0,00%)	
	Proctite	0 (0,00%)	0 (0,00%)	
	Colite esq.	0 (0,00%)	0 (0,00%)	
Atividade da doença	Remissão	6 (85,71%)	3 (60,00%)	0,386
	Atividade	1 (14,28%)	2 (40,00%)	

Nota: O teste U de Mann-Whitney foi usado para comparações entre os pacientes com Doença de Crohn e RCUI quanto ao peso, tempo de doença e atividade da doença.

Fonte: A autora, 2022.

Tabela 5 - Dados sobre atividade da DC e RCUI e sua relação com o estágio da periodontite

Atividade/Remissão das DII's		Diagnóstico periodontal				P-valor	Total
		P1 (n=2)	P2 (n=4)	P3 (n=5)	P4 (n=1)		
DC (n=7)	REMISSÃO	1 (14,28%)	3 (42,85%)	3 (42,85%)		0,54	7
	IHB 2	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)			1
RCUI (n=5)	REMISSÃO	0 (0%)	1 (33,3%)	1 (33,3%)	1	0,35	3
	MAYO 2	1(100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		1
	MAYO 3	0 (0%)	0 (0%)	1	0 (0%)		1

Nota: Teste qui-quadrado para avaliação de possíveis associações entre o diagnóstico periodontal e a atividade da DII, com base no Índice de Harvey Bradshaw (IHB) para DC e a classificação Mayo para RCUI. IHB 2: ausência de sintomas; Mayo 2: doença moderada; Mayo 3: Doença grave.

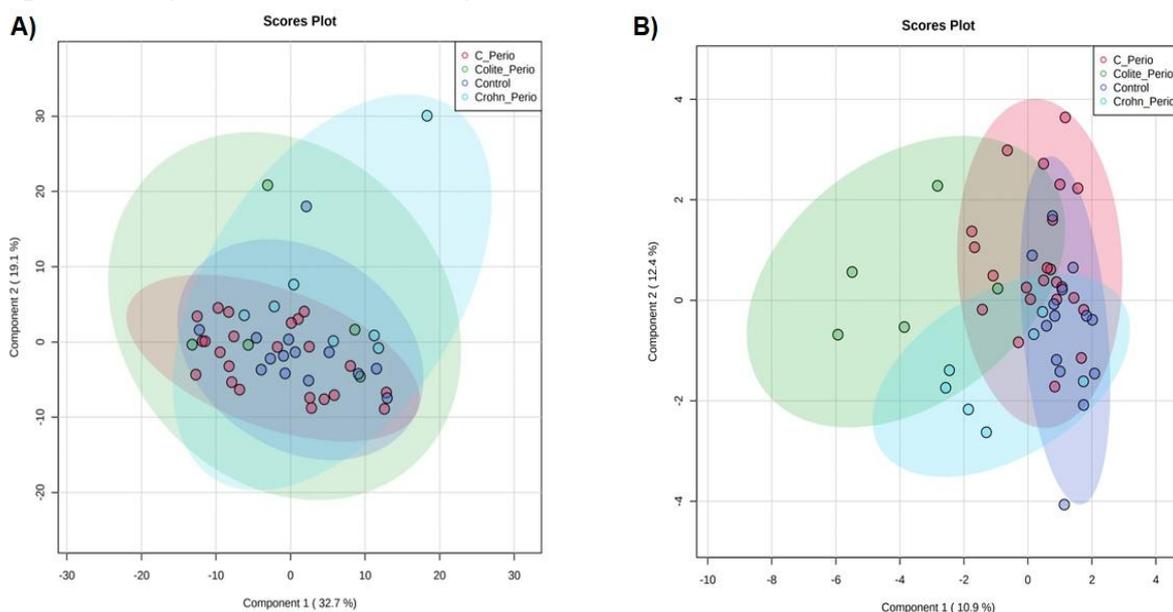
Fonte: A autora, 2022.

Ao avaliar se houve relação entre atividade da DII e o estágio da periodontite entre os participantes dos grupos DC e RCUI pôde-se perceber que não houve diferença significativa entre o diagnóstico periodontal e a atividade da DII.

## 4.2 Análise do perfil metabólico

Análises supervisionadas foram realizadas para avaliar as diferenças de metabólitos em amostras de todos os quatro grupos. Na figura 1 (A, B), o PLS-DA e S-PLS-DA são apresentados, respectivamente, demonstrando diferenças entre os grupos teste e controle. A variação total dos dados em A e B, foram 51,8% e 23,3%, respectivamente.

Figura 1 – Spectro de saliva dos pacientes



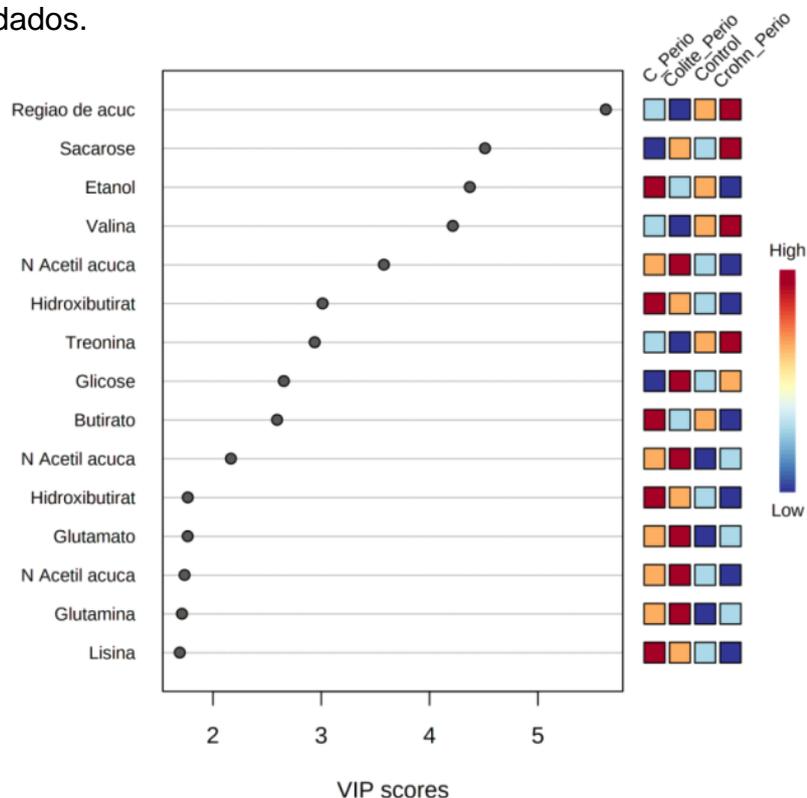
Legenda: A) PLS-DA, B) sPLS-DA; a partir de espectros de RMN de saliva dos pacientes controles com periodontite (C\_Perio) e sem periodontite (Control), pacientes com RCUI (Colite\_Perio) ou DC (Crohn\_Perio) com periodontite. O PLS-DA mostra uma pequena diferença e o S-PLS-DA mostrou uma diferença mais evidente entre os grupos com precisão e predição satisfatórias (ACC = 0.42, R2 = 0.20, Q2 = -0.15).

Fonte: A autora, 2022.

A *Variable Importance in Projections* (VIPs) foi utilizada para determinação das abundâncias relativas dos metabólitos que contribuíram para a separação entre os grupos relacionados ao diagnóstico clínico. Indivíduos diagnosticados com RCUI e controles com periodontite apresentaram perfis metabólicos salivares semelhantes (**Figura 1**), com maior expressão de grupos N-acetil, Hidroxibutirato, Glutamato, Glutamina e Lisina, se diferenciando apenas pela expressão de Etanol, maior no grupo controle com periodontite, sacarose e glicose, maiores no grupo de RCUI e periodontite. Nesses dois grupos a região de açúcar, valina, e treonina estavam sub expressados (**Figura 2**).

Os grupos formados por pacientes controles sem periodontite e portadores de DC com periodontite apresentaram super expressão da região de açúcares, Valina e Treonina. A diferença entre esses dois grupos se deu pela expressão de Sacarose e Glicose (maior nos indivíduos com DC), Etanol e Butirato (maior nos controles saudáveis). Grupos N-acetil, hidroxibutirato, glutamato, glutamina e lisina estavam sub expressados nesses dois grupos (**Figura 2**).

Figura 2 - VIP Score obtido a partir da análise da saliva não estimulada dos quatros grupos estudados.



Fonte: A autora, 2022.

Ao comparar os grupos DC e Controles com periodontite, observamos diferença estatisticamente significativa nos níveis de butirato ( $p = 0,01$ ), etanol ( $p=0,00$ ), hidroxibutirato ( $p=0,00$ ) e caproato ( $p=0,03$ ). Ao comparar a saliva de indivíduos com RCUI e controles com periodontite, observamos uma diferença significativa na concentração de butirato ( $p = 0,03$ ), valina ( $p = 0,02$ ), região de açúcar ( $p = 0,02$ ), treonina ( $p = 0,03$ ), caproato ( $p = 0,05$ ) e etanol ( $p = 0,02$ ). Entre indivíduos sistemicamente saudáveis com e sem periodontite a única diferença estatística se deu pela concentração de isoleucina ( $p=0.03$ ). Entre o grupo DC e controles sem periodontite não houve diferença estatisticamente significativa quanto a nenhum dos metabólitos encontrados, assim como entre o grupo RCUI e controles sem periodontite.

Tabela 6 - Análise univariada do metaboloma salivar

Metabólitos	Doença de Crohn		RCUI		Controles com periodontite		Controles sem periodontite		P <sup>5</sup>
	P <sup>1</sup>	Média (DP)	P <sup>2</sup>	Média (DP)	P <sup>3</sup>	Média (DP)	P <sup>4</sup>	Média (DP)	
Butirato	<b>0.01</b>	8,67 X 10 <sup>5</sup> (4,18 X 10 <sup>9</sup> )	0.11	8,74 X 10 <sup>6</sup> (2,27 X 10 <sup>9</sup> )	0.15	1,58 X 10 <sup>9</sup> (7,01 X 10 <sup>9</sup> )	<b>0.03</b>	1,31 X 10 <sup>9</sup> (6,24 X 10 <sup>9</sup> )	0.24
Caproato	<b>0.03</b>	1,56 X 10 <sup>9</sup> (6,90 X 10 <sup>9</sup> )	0.06	1,40 X 10 <sup>7</sup> (1,37 X 10 <sup>9</sup> )	0.10	2,48 X 10 <sup>9</sup> (1,06 X 10 <sup>9</sup> )	<b>0.05</b>	2,25 X 10 <sup>9</sup> (7,96 X 10 <sup>9</sup> )	0.48
Etanol	<b>&lt; 0.01</b>	1,69 X 10 <sup>9</sup> (7,81 X 10 <sup>9</sup> )	0.07	1,85 X 10 <sup>6</sup> (3,65 X 10 <sup>9</sup> )	0.18	3,43 X 10 <sup>9</sup> (1,46 X 10 <sup>9</sup> )	0.02	2,77 X 10 <sup>9</sup> (1,44 X 10 <sup>9</sup> )	0.19
Glicose	0.60	1,05 X 10 <sup>9</sup> (9,66 X 10 <sup>8</sup> )	0.54	1,03 X 10 <sup>7</sup> (8,10 X 10 <sup>9</sup> )	0.56	1,08 X 10 <sup>9</sup> (1,65 X 10 <sup>9</sup> )	0.51	1,17 X 10 <sup>7</sup> (5,09 X 10 <sup>9</sup> )	0.45
Glutamina	0.15	1,19 X 10 <sup>9</sup> (4,73 X 10 <sup>9</sup> )	0.77	1,50 X 10 <sup>6</sup> (6,21 X 10 <sup>9</sup> )	0.46	1,61 X 10 <sup>9</sup> (7,13 X 10 <sup>9</sup> )	0.75	1,27 X 10 <sup>9</sup> (6,09 X 10 <sup>9</sup> )	0.13
Glutamato	0.19	1,26 X 10 <sup>9</sup> (5,27 X 10 <sup>9</sup> )	0.93	1,54 X 10 <sup>7</sup> (6,20 X 10 <sup>9</sup> )	0.30	1,67 X 10 <sup>9</sup> (7,53 X 10 <sup>9</sup> )	0.72	1,24 X 10 <sup>9</sup> (5,09 X 10 <sup>9</sup> )	0.06
Hidroxibutirato	<b>&lt; 0.01</b>	9,80 X 10 <sup>9</sup> (2,45 X 10 <sup>9</sup> )	0.11	1,36 X 10 <sup>6</sup> (3,15 X 10 <sup>8</sup> )	0.82	1,64 X 10 <sup>9</sup> (5,60 X 10 <sup>9</sup> )	0.29	1,31 X 10 <sup>9</sup> (4,92 X 10 <sup>9</sup> )	0.07
Hidroxibutirato	0.17	9,93 X 10 <sup>9</sup> (4,38 X 10 <sup>9</sup> )	0.77	1,24 X 10 <sup>7</sup> (5,24 X 10 <sup>9</sup> )	0.39	1,33 X 10 <sup>9</sup> (6,04 X 10 <sup>9</sup> )	0.75	1,05 X 10 <sup>9</sup> (3,85 X 10 <sup>9</sup> )	0.12
Hidroxibutirato	0.15	1,38 X 10 <sup>9</sup> (6,21 X 10 <sup>9</sup> )	0.64	1,61 X 10 <sup>7</sup> (5,92 X 10 <sup>9</sup> )	0.85	1,92 X 10 <sup>9</sup> (9,08 X 10 <sup>9</sup> )	0.47	1,54 X 10 <sup>9</sup> (7,69 X 10 <sup>9</sup> )	0.19
Isoleucina	0.14	2,90 X 10 <sup>9</sup> (1,52 X 10 <sup>9</sup> )	0.86	2,85 X 10 <sup>8</sup> (2,44 X 10 <sup>8</sup> )	0.93	4,31 X 10 <sup>9</sup> (2,29 X 10 <sup>9</sup> )	0.21	2,76 X 10 <sup>9</sup> (1,79 X 10 <sup>9</sup> )	<b>0.03</b>
Lisina	0.24	1,82 X 10 <sup>9</sup> (8,02 X 10 <sup>7</sup> )	0.82	1,76 X 10 <sup>7</sup> (8,79 X 10 <sup>9</sup> )	0.76	2,40 X 10 <sup>9</sup> (1,21 X 10 <sup>9</sup> )	0.27	1,92 X 10 <sup>9</sup> (1,09 X 10 <sup>9</sup> )	0.23
N-acetil açúcar	0.24	3,23 X 10 <sup>9</sup> (1,28 X 10 <sup>9</sup> )	0.93	4,33 X 10 <sup>6</sup> (1,70 X 10 <sup>9</sup> )	0.18	4,15 X 10 <sup>9</sup> (1,91 X 10 <sup>9</sup> )	0.85	3,29 X 10 <sup>9</sup> (1,34 X 10 <sup>9</sup> )	0.14
Região de açúcar	0.75	4,98 X 10 <sup>9</sup> (1,43 X 10 <sup>9</sup> )	0.74	4,27 X 10 <sup>6</sup> (1,12 X 10 <sup>9</sup> )	0.09	5,04 X 10 <sup>9</sup> (5,17 X 10 <sup>9</sup> )	<b>0.02</b>	5,07 X 10 <sup>9</sup> (7,49 X 10 <sup>9</sup> )	0.88
Sacarose	0.96	2,52 X 10 <sup>9</sup> (1,23 X 10 <sup>9</sup> )	0.72	2,34 X 10 <sup>6</sup> (3,60 X 10 <sup>9</sup> )	0.29	2,52 X 10 <sup>9</sup> (2,47 X 10 <sup>9</sup> )	0.19	2,59 X 10 <sup>9</sup> (4,48 X 10 <sup>9</sup> )	0.56
Treonina	0.46	3,24 X 10 <sup>9</sup> (1,72 X 10 <sup>9</sup> )	0.57	2,67 X 10 <sup>6</sup> (8,46 X 10 <sup>9</sup> )	0.17	3,43 X 10 <sup>9</sup> (6,73 X 10 <sup>9</sup> )	<b>0.03</b>	3,50 X 10 <sup>9</sup> (1,18 X 10 <sup>9</sup> )	0.82
Valina	0.45	4,60 X 10 <sup>9</sup> (1,41 X 10 <sup>9</sup> )	0.63	4,04 X 10 <sup>6</sup> (8,54 X 10 <sup>9</sup> )	0.14	4,77 X 10 <sup>9</sup> (5,70 X 10 <sup>9</sup> )	<b>0.02</b>	4,77 X 10 <sup>9</sup> (9,33 X 10 <sup>9</sup> )	0.97

Legenda: P<sup>1</sup> significância para os grupos DC e Controles com periodontite. P<sup>2</sup> significância para DC e Controles sem periodontite. P<sup>3</sup> significância controles sem periodontite e RCUI. P<sup>4</sup> significância entre Controles com periodontite e RCUI. P<sup>5</sup> significância para controles com e sem periodontite. Nível de significância foi estabelecido em 0,05.

Fonte: A autora, 2022.

## 5 DISCUSSÃO

No total foi possível identificar treze metabólitos nas amostras de saliva analisadas: butirato, caproato, etanol, glicose, sacarose, glutamina, glutamato, hidroxibutirato, treonina, isoleucina, lisina, região de açúcar, valina e grupo N-acetil. O hidroxibutirato, butirato e caproato são ácidos orgânicos, glicose e sacarose são carboidratos e a isoleucina, glutamina, glutamato, lisina, treonina e valina são aminoácidos. A análise univariada apontou diferenças estatisticamente significantes relacionadas a oito dos metabólitos identificados: butirato, etanol, hidroxibutirato, caproato, valina, região de açúcar, treonina e isoleucina.

Já sabemos que a DII está associada a um risco significativamente maior de periodontite e piores condições de saúde bucal (PAPAGEORGIOU; HAGNER; NOGUEIRA; FRANKE *et al.*, 2017) e na figura 2 é possível perceber semelhanças entre o perfil metabólico de pacientes com RCUI e periodontite e os controles com periodontite, enquanto o perfil de pacientes com DC e periodontite se assemelhou ao dos controles sistemicamente saudáveis, sem periodontite. Isso pode indicar que talvez a presença de doença inflamatória intestinal e o tipo (DC ou RCUI) possa também impactar no perfil metabólico da doença periodontal ou o inverso, com a influência da periodontite sobre o perfil metabólico salivar da DII. Qian et al (2021) em seu estudo verificaram que a microbiota salivar da periodontite exacerbou a colite induzida em um modelo experimental, com agravamento da polarização dos macrófagos e indução de células Th2, diminuição dos níveis de ácidos graxos insaturados e aumento do metabolismo do ácido araquidônico, sugerindo que a periodontite pode contribuir para a patogênese da colite através da deglutição da microbiota salivar (QIAN; LU; HUANG; WANG *et al.*, 2021).

Pacientes acometidos por periodontite e DII, tanto DC quanto RCUI, apresentaram níveis significantes de etanol e ácidos graxos de cadeia curta e média, como butirato e caproato, semelhante a estudos prévios (GARCÍA-VILLAESCUSA; MORALES-TATAY; MONLEÓN-SALVADÓ; GONZÁLEZ-DARDER *et al.*, 2018; GUAN; LI; MENG, 2021). O butirato na cavidade oral é produzido principalmente na bolsa periodontal e está relacionado ao metabolismo microbiano, sendo um fator de virulência conhecido da *Porphyromonas gingivalis* (GUAN; LI; MENG, 2021). Esses metabólitos atuam impedindo a divisão celular, dificultam o reparo e favorecem os

processos de degeneração tecidual, permitindo a entrada de patógenos e progressão da periodontite (QIQIANG; HUANXIN; XUEJUN, 2012). Por diminuírem significativamente após o tratamento periodontal e aumentarem gradualmente ao longo do tempo têm sido apontados como possíveis indicadores do desenvolvimento e progressão da DP (LU; MENG; GAO; XU *et al.*, 2014). Na DII os níveis de ácidos graxos de cadeia média encontram-se reduzidos e podem ter atividade anti-inflamatória (DE PRETER; MACHIELS; JOOSSENS; ARIJS *et al.*, 2015) através de efeito inibitório mediado por TNF- $\alpha$  (BJERRUM; WANG; HAO; COSKUN *et al.*, 2015). Em geral, os ácidos graxos de cadeia curta, principalmente o butirato, são fontes de energia para a parede celular intestinal e promovem o crescimento das células epiteliais (MARCHESI; HOLMES; KHAN; KOCHHAR *et al.*, 2007). O etanol é um composto orgânico volátil na saliva, produzido pela álcool desidrogenase bacteriana e, apesar da detecção de grande parte do etanol em biofluidos estar associada ao consumo de bebidas alcoólicas, acreditamos que devido aos horários e condições na qual as amostras foram coletas é mais provável que sua presença esteja relacionada ao metabolismo microbiano.

Curiosamente, o único metabólito com níveis significativos entre pacientes sistemicamente saudáveis com e sem periodontite foi isoleucina. Valina e treonina foram significativas somente nos pacientes acometidos por RCUI e periodontite, entretanto ambas já foram associadas à periodontite (AIMETTI; CACCIATORE; GRAZIANO; TENORI, 2012; GAWRON; WOJTOWICZ; ŁAZARZ-BARTYZEL; ŁAMASZ *et al.*, 2019; KUBONIWA; SAKANAKA; HASHINO; BAMBIA *et al.*, 2016; LIEBSCH; PITCHIKA; PINK; SAMIETZ *et al.*, 2019b; ROMANO; MEONI; MANAVELLA; BAIMA *et al.*, 2019; ROMANO; MEONI; MANAVELLA; BAIMA *et al.*, 2018; RZEZNIK; TRIBA; LEVY; JUNGO *et al.*, 2017; SINGH; SAXENA; SAIMBI; ARIF *et al.*, 2017). Ambos os três estão entre os aminoácidos essenciais e estão envolvidos na proteínogênese, sendo a valina e isoleucina aminoácidos de cadeia ramificada relacionados ao estresse, energia e metabolismo muscular. Apesar da função da valina e isoleucina no sistema imune ainda não estar totalmente clara, esta parece aumentar a excreção de  $\beta$ -defensina e, aquela pode aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias, diminuir a produção de citocinas anti-inflamatórias e aumentar a função das células dendríticas (ZHANG; ZENG; REN; MAO *et al.*, 2017).

A treonina é encontrada em todos os organismos e tem capacidade de gerar três dos principais aminoácidos (acetato, butirato e propionato), os quais agem como moduladores da resposta imune, atuando como ligantes do receptor acoplado a proteína G43, além disso, é amplamente metabolizada no intestino para a produção de mucina. Acredita-se que em condições patológicas a necessidade de treonina aumente, para manter a função intestinal (GAIFEM; GONÇALVES; DINIS-OLIVEIRA; CUNHA *et al.*, 2018). Os pacientes com DC apresentaram maiores concentrações de treonina no perfil metabólico salivar, entretanto ocorreu o inverso com pacientes diagnosticados com RCUI.

Pacientes com DII, tanto DC quanto RCUI apresentaram maiores concentrações de glicose e sacarose. A glicose já foi encontrada em maior concentração no plasma de indivíduos com diabetes tipo 2 (SUHRE; MEISINGER; DÖRING; ALTMAIER *et al.*, 2010). Estudos prévios já identificaram esses metabólitos em pacientes com periodontite (BARNES; TELES; TRIVEDI; DEVIZIO *et al.*, 2009; CITTERIO; ROMANO; MEONI; IADEROSA *et al.*, 2020; GAWRON; WOJTOWICZ; ŁAZARZ-BARTYZEL; ŁAMASZ *et al.*, 2019; SINGH; SAXENA; SAIMBI; ARIF *et al.*, 2017), porém seus papéis na etiopatogênese da periodontite ainda não estão claros.

O hidroxibutirato é sintetizado no fígado a partir do acetil-CoA e pode ser utilizado como fonte de energia quando há queda de glicose. Concentrações significativas deste metabólito já foram encontradas em pacientes com carcinoma de células escamosas, talvez associado a um maior *turnover* metabólico e a demanda de biossíntese de membrana para proliferação celular (OHSHIMA; SUGAHARA; KASAHARA; KATAKURA, 2017). Neste estudo seus níveis foram significantes somente nos pacientes acometidos por DC e periodontite, mas já foi observado previamente em pacientes sistemicamente saudáveis diagnosticados com periodontite (RZEZNIK; TRIBA; LEVY; JUNGO *et al.*, 2017; SINGH; SAXENA; SAIMBI; ARIF *et al.*, 2017). Recente revisão sistemática desenvolvida por nosso grupo de pesquisa, porém ainda não publicada, avaliou quais são os metabólitos de baixo peso molecular mais encontrados em fluidos biológicos de indivíduos com periodontite em comparação com indivíduos com gengivite ou saúde periodontal. Foi possível perceber que os metabólitos encontrados nos estudos incluídos podiam estar relacionados à microbiota, ao hospedeiro ou a ambos. Os principais metabólitos apontados pela revisão e coincidentes entre os estudos foram os ácidos

orgânicos e derivados, como acetato, alanina, butirato, formato, GABA, lactato, propionato, fenilalanina e valina.

A lisina é dos aminoácidos essenciais, sua deficiência pode resultar em imunodeficiência e a necessidade por esse metabólito pode ser aumentada pelo estresse. Pacientes com RCUI neste estudo apresentaram maiores níveis de lisina, indo de acordo com achados prévios em pacientes com DP, mas sistemicamente saudáveis (BARNES; TELES; TRIVEDI; DEVIZIO *et al.*, 2010; CHEN; ZHOU; LIAO; HU *et al.*, 2018; OZEKI; NOZAKI; AOKI; BAMBIA *et al.*, 2016). Os pacientes com DC e periodontite apresentaram menores concentrações de lisina.

A glutamina é um dos 20 aminoácidos codificados pelo código genético padrão, é considerado um aminoácido não essencial e é semelhante estruturalmente, ao aminoácido ácido glutâmico (DATABASE, 2005b). Glutamato é um alfa-aminoácido utilizado na biossíntese de proteínas. É encontrado em todos os organismos, desde bactérias a plantas e animais. Pode ser sintetizado via alanina ou ácido aspártico via alfa-cetoglutarato e pela ação de várias transaminases. Desempenha um papel importante na eliminação do excesso ou desperdício de nitrogênio pelo corpo. Em muitos aspectos, o glutamato é uma molécula chave no metabolismo celular (DATABASE, 2005a). Ambos já foram associados a hiperamonemia e mal de Alzheimer's (BAK; SCHOUSBOE; WAAGEPETERSEN, 2006). Grupos N-acetyl estavam em maior concentração nos pacientes com RCUI e nos controles com periodontite, e já foram identificados em pacientes com periodontite em estudos anteriores (AIMETTI; CACCIATORE; GRAZIANO; TENORI, 2012; ROMANO; MEONI; MANAVELLA; BAIMA *et al.*, 2019; ROMANO; MEONI; MANAVELLA; BAIMA *et al.*, 2018). Nos pacientes com DC e nos controles saudáveis, seus níveis foram menores, o que pode indicar interferência da DII no metabóloma salivar da periodontite.

No presente estudo os pacientes sistemicamente saudáveis com periodontite apresentaram pior score de sangramento à sondagem, quando comparados aos controles sem periodontite. A maior profundidade de bolsa (4 mm e  $\geq$  5mm) foi verificada nos controles com periodontite, assim como perda inserção de 3 a 4 milímetros. Diferente do que se pode observar em outros estudos, não houve diferença significativa nem com relação ao hábito de fumar nem ao número de dentes. Isso pode ter acontecido devido ao número reduzido de pacientes.

## CONCLUSÃO

Este estudo transversal foi capaz de detectar diferenças significantes no perfil metabólico entre pacientes com periodontite, mas sistemicamente saudáveis e pacientes com DII e periodontite. São necessários mais estudos na área, mas seguindo uma padronização metodológica a fim de comparações futuras.

## REFERÊNCIAS

ABEGUNDE, A. T.; MUHAMMAD, B. H.; BHATTI, O.; ALI, T. Environmental risk factors for inflammatory bowel diseases: Evidence based literature review. **World J Gastroenterol**, 22, n. 27, p. 6296-6317, Jul 21 2016.

ADEN, K.; REHMAN, A.; WASCHINA, S.; PAN, W. H. *et al.* Metabolic Functions of Gut Microbes Associate With Efficacy of Tumor Necrosis Factor Antagonists in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. **Gastroenterology**, 157, n. 5, p. 1279-1292.e1211, Nov 2019.

AGOSSA, K.; DENDOOVEN, A.; DUBUQUOY, L.; GOWER-ROUSSEAU, C. *et al.* Periodontal manifestations of inflammatory bowel disease: emerging epidemiologic and biologic evidence. **J Periodontal Res**, 52, n. 3, p. 313-324, Jun 2017.

AIMETTI, M.; CACCIATORE, S.; GRAZIANO, A.; TENORI, L. Metabonomic analysis of saliva reveals generalized chronic periodontitis signature. **Metabolomics**, 8, n. 3, p. 465-474, 2012. Article.

ALONSO, A.; JULIÀ, A.; VINAIXA, M.; DOMÈNECH, E. *et al.* Urine metabolome profiling of immune-mediated inflammatory diseases. **BMC Med**, 14, n. 1, p. 133, Sep 8 2016.

BAIMA, G.; CORANA, M.; IADEROSA, G.; ROMANO, F. *et al.* Metabolomics of gingival crevicular fluid to identify biomarkers for periodontitis: A systematic review with meta-analysis. **J Periodontal Res**, 56, n. 4, p. 633-645, Aug 2021.

BAIMA, G.; IADEROSA, G.; CITTERIO, F.; GROSSI, S. *et al.* Salivary metabolomics for the diagnosis of periodontal diseases: a systematic review with methodological quality assessment. **Metabolomics**, 17, n. 1, p. 1, Jan 1 2021.

BAK, L. K.; SCHOUSBOE, A.; WAAGEPETERSEN, H. S. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. **J Neurochem**, 98, n. 3, p. 641-653, Aug 2006.

BARNES, V. M.; CIANCIO, S. G.; SHIBLY, O.; XU, T. *et al.* Metabolomics reveals elevated macromolecular degradation in periodontal disease. **Journal of Dental Research**, 90, n. 11, p. 1293-1297, 2011. Article.

BARNES, V. M.; KENNEDY, A. D.; PANAGAKOS, F.; DEVIZIO, W. *et al.* Global metabolomic analysis of human saliva and plasma from healthy and diabetic subjects, with and without periodontal disease. **PLoS ONE**, 9, n. 8, 2014. Article.

BARNES, V. M.; TELES, R.; TRIVEDI, H. M.; DEVIZIO, W. *et al.* Assessment of the effects of dentifrice on periodontal disease biomarkers in gingival crevicular fluid. **Journal of Periodontology**, 81, n. 9, p. 1273-1279, 2010. Article.

BARNES, V. M.; TELES, R.; TRIVEDI, H. M.; DEVIZIO, W. *et al.* Acceleration of purine degradation by periodontal diseases. **Journal of Dental Research**, 88, n. 9, p. 851-855, 2009. Article.

BARROS, S. P.; WILLIAMS, R.; OFFENBACHER, S.; MORELLI, T. Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for periodontitis. **Periodontology 2000**, 70, n. 1, p. 53-64, 2016.

BJERRUM, J. T.; STEENHOLDT, C.; AINSWORTH, M.; NIELSEN, O. H. *et al.* Metabonomics uncovers a reversible proatherogenic lipid profile during infliximab therapy of inflammatory bowel disease. **BMC Med**, 15, n. 1, p. 184, Oct 16 2017.

BJERRUM, J. T.; WANG, Y.; HAO, F.; COSKUN, M. *et al.* Metabonomics of human fecal extracts characterize ulcerative colitis, Crohn's disease and healthy individuals. **Metabolomics**, 11, p. 122-133, 2015.

BORREN, N. Z.; PLICHTA, D.; JOSHI, A. D.; BONILLA, G. *et al.* Alterations in Fecal Microbiomes and Serum Metabolomes of Fatigued Patients With Quiescent Inflammatory Bowel Diseases. **Clin Gastroenterol Hepatol**, Mar 14 2020.

BRANDTZAEG, P. Inflammatory bowel disease: clinics and pathology. Do inflammatory bowel disease and periodontal disease have similar immunopathogeneses? **Acta Odontol Scand**, 59, n. 4, p. 235-243, Aug 2001.

BRITO, F.; DE BARROS, F. C.; ZALTMAN, C.; CARVALHO, A. T. *et al.* Prevalence of periodontitis and DMFT index in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. **J Clin Periodontol**, 35, n. 6, p. 555-560, Jun 2008.

BRITO, F.; ZALTMAN, C.; CARVALHO, A. T.; FISCHER, R. G. *et al.* Subgingival microflora in inflammatory bowel disease patients with untreated periodontitis. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, 25, n. 2, p. 239-245, Feb 2013.

CANUTO, G. A.; COSTA, J. L. D.; DA CRUZ, P. L.; SOUZA, A. R. L. D. *et al.* Metabolomics: definitions, state-of-the-art and representative applications. **Química Nova**, 41, n. 1, p. 75-91, 2018.

CATON, J. G.; ARMITAGE, G.; BERGLUNDH, T.; CHAPPLE, I. L. C. *et al.* A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. **J Periodontol**, 89 Suppl 1, p. S1-s8, Jun 2018.

CHANG, S.; MALTER, L.; HUDESMAN, D. Disease monitoring in inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, 21, n. 40, p. 11246-11259, Oct 28 2015.

CHEN, H. W.; ZHOU, W.; LIAO, Y.; HU, S. C. *et al.* Analysis of metabolic profiles of generalized aggressive periodontitis. **Journal of periodontal research**, 53, n. 5, p. 894-901, 2018. Article.

CHO, J. H. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nat Rev Immunol**, 8, n. 6, p. 458-466, Jun 2008.

CITTERIO, F.; ROMANO, F.; MEONI, G.; IADEROSA, G. *et al.* Changes in the Salivary Metabolic Profile of Generalized Periodontitis Patients after Non-surgical Periodontal Therapy: A Metabolomic Analysis Using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **J Clin Med**, 9, n. 12, Dec 8 2020.

DANILUK, U.; DANILUK, J.; KUCHARSKI, R.; KOWALCZYK, T. *et al.* Untargeted Metabolomics and Inflammatory Markers Profiling in Children With Crohn's Disease and Ulcerative Colitis-A Preliminary Study. **Inflamm Bowel Dis**, 25, n. 7, p. 1120-1128, Jun 18 2019.

DATABASE, H. M. **Glutamate**. 2005a. Disponível em: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000148>. Acesso em: 28 de maio de 2022.

DATABASE, H. M. **Glutamine**. 2005b. Disponível em: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000641>. Acesso em: 28 de maio de 2022.

DE PRETER, V.; MACHIELS, K.; JOOSSENS, M.; ARIJS, I. *et al.* Faecal metabolite profiling identifies medium-chain fatty acids as discriminating compounds in IBD. **Gut**, 64, n. 3, p. 447-458, Mar 2015.

EKE, P. I.; WEI, L.; THORNTON-EVANS, G. O.; BORRELL, L. N. *et al.* Risk Indicators for Periodontitis in US Adults: NHANES 2009 to 2012. **J Periodontol**, 87, n. 10, p. 1174-1185, Oct 2016.

ELABDEEN, H. R. Z.; MUSTAFA, M.; SZKLENAR, M.; RÜHL, R. *et al.* Ratio of pro-resolving and pro-inflammatory lipid mediator precursors as potential markers for aggressive periodontitis. **PloS one**, 8, n. 8, p. e70838-e70838, 2013.

FRANCIS, D. L. P085 ORAL HEALTH STATUS OF ULCERATIVE COLITIS PATIENTS: A COMPARATIVE STUDY. **Inflammatory Bowel Diseases**, 24, n. suppl\_1, p. S31-S31, 2018.

GAIFEM, J.; GONÇALVES, L. G.; DINIS-OLIVEIRA, R. J.; CUNHA, C. *et al.* L-Threonine Supplementation During Colitis Onset Delays Disease Recovery. **Front Physiol**, 9, p. 1247, 2018.

GARCÍA-VILLAESCUSA, A.; MORALES-TATAY, J. M.; MONLEÓN-SALVADÓ, D.; GONZÁLEZ-DARDER, J. M. *et al.* Using NMR in saliva to identify possible biomarkers of glioblastoma and chronic periodontitis. **PloS one**, 13, n. 2, p. e0188710-e0188710, 2018.

GAWRON, K.; WOJTOWICZ, W.; ŁAZARZ-BARTYZEL, K.; ŁAMASZ, A. *et al.* Metabolomic status of the oral cavity in chronic periodontitis. **In Vivo**, 33, n. 4, p. 1165-1174, 2019. Article.

GUAN, X.; LI, W.; MENG, H. A double-edged sword: Role of butyrate in the oral cavity and the gut. **Mol Oral Microbiol**, 36, n. 2, p. 121-131, Apr 2021.

HUANG, Y.; ZHU, M.; LI, Z.; SA, R. *et al.* Mass spectrometry-based metabolomic profiling identifies alterations in salivary redox status and fatty acid metabolism in response to inflammation and oxidative stress in periodontal disease. **Free Radical Biology and Medicine**, 70, p. 223-232, 2014. Article.

INDRIOLO, A.; GRECO, S.; RAVELLI, P.; FAGIUOLI, S. What can we learn about biofilm/host interactions from the study of inflammatory bowel disease. **J Clin Periodontol**, 38 Suppl 11, p. 36-43, Mar 2011.

JACOBS, J. P.; GOUDARZI, M.; SINGH, N.; TONG, M. *et al.* A Disease-Associated Microbial and Metabolomics State in Relatives of Pediatric Inflammatory Bowel Disease Patients. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol**, 2, n. 6, p. 750-766, Nov 2016.

JI, S.; CHOI, Y. Point-of-care diagnosis of periodontitis using saliva: technically feasible but still a challenge. **Front Cell Infect Microbiol**, 5, p. 65, 2015.

KAWALEC, P.; MIKRUT, A.; WIŚNIEWSKA, N.; PILC, A. Tumor necrosis factor- $\alpha$  antibodies (infliximab, adalimumab and certolizumab) in Crohn's disease: systematic review and meta-analysis. **Arch Med Sci**, 9, n. 5, p. 765-779, Oct 31 2013.

KESHTELI, A. H.; MADSEN, K. L.; MANDAL, R.; BOECKXSTAENS, G. E. *et al.* Comparison of the metabolomic profiles of irritable bowel syndrome patients with ulcerative colitis patients and healthy controls: new insights into pathophysiology and potential biomarkers. **Aliment Pharmacol Ther**, 49, n. 6, p. 723-732, Mar 2019.

KINANE, D. F.; PETERSON, M.; STATHOPOULOU, P. G. Environmental and other modifying factors of the periodontal diseases. **Periodontol** 2000, 40, p. 107-119, 2006.

KINANE, D. F.; STATHOPOULOU, P. G.; PAPAPANOU, P. N. Periodontal diseases. **Nat Rev Dis Primers**, 3, p. 17038, Jun 22 2017.

KOUTSOCHRISTOU, V.; ZELLOS, A.; DIMAKOU, K.; PANAYOTOU, I. *et al.* Dental Caries and Periodontal Disease in Children and Adolescents with Inflammatory Bowel Disease: A Case-Control Study. **Inflamm Bowel Dis**, 21, n. 8, p. 1839-1846, Aug 2015.

KRZYSZEK-KORPACKA, M.; FLESZAR, M. G.; BEDNARZ-MISA, I.; LEWANDOWSKI, Ł. *et al.* Transcriptional and Metabolomic Analysis of L-Arginine/Nitric Oxide Pathway in Inflammatory Bowel Disease and Its Association with Local Inflammatory and Angiogenic Response: Preliminary Findings. **Int J Mol Sci**, 21, n. 5, Feb 28 2020.

KUBONIWA, M.; SAKANAKA, A.; HASHINO, E.; BAMBA, T. *et al.* Prediction of Periodontal Inflammation via Metabolic Profiling of Saliva. **Journal of dental research**, 95, n. 12, p. 1381-1386, 2016. Article.

LAI, Y.; XUE, J.; LIU, C. W.; GAO, B. *et al.* Serum Metabolomics Identifies Altered Bioenergetics, Signaling Cascades in Parallel with Exposome Markers in Crohn's Disease. **Molecules**, 24, n. 3, Jan 27 2019.

LAURITANO, D.; BOCCALARI, E.; DI STASIO, D.; DELLA VELLA, F. *et al.* Prevalence of Oral Lesions and Correlation with Intestinal Symptoms of Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review. **Diagnostics (Basel, Switzerland)**, 9, n. 3, p. 77, 2019.

LE GALL, G.; NOOR, S. O.; RIDGWAY, K.; SCOVELL, L. *et al.* Metabolomics of fecal extracts detects altered metabolic activity of gut microbiota in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. **J Proteome Res**, 10, n. 9, p. 4208-4218, Sep 2 2011.

LETIERI, A. S.; FREITAS-FERNANDES, L. B.; SOUZA, I. P. R.; VALENTE, A. P. *et al.* Metabolomic Signatures of In Vitro Biofilm Maturation of *Streptococcus mutans*. **Curr Microbiol**, 79, n. 3, p. 86, Feb 7 2022.

LIEBSCH, C.; PITCHIKA, V.; PINK, C.; SAMIETZ, S. *et al.* The Saliva Metabolome in Association to Oral Health Status. **Journal of Dental Research**, 98, n. 6, p. 642-651, 2019a. Article.

LIEBSCH, C.; PITCHIKA, V.; PINK, C.; SAMIETZ, S. *et al.* The Saliva Metabolome in Association to Oral Health Status. **J Dent Res**, 98, n. 6, p. 642-651, Jun 2019b.

LORENZO-POUSO, A. I.; CASTELO-BAZ, P.; RODRIGUEZ-ZORRILLA, S.; PÉREZ-SAYÁNS, M. *et al.* Association between periodontal disease and inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. **Acta Odontol Scand**, 79, n. 5, p. 344-353, Jul 2021.

LU, R.; MENG, H.; GAO, X.; XU, L. *et al.* Effect of non-surgical periodontal treatment on short chain fatty acid levels in gingival crevicular fluid of patients with generalized aggressive periodontitis. **J Periodontal Res**, 49, n. 5, p. 574-583, Oct 2014.

MACKNER, L. M.; HATZAKIS, E.; ALLEN, J. M.; DAVIES, R. H. *et al.* Fecal microbiota and metabolites are distinct in a pilot study of pediatric Crohn's disease patients with higher levels of perceived stress. **Psychoneuroendocrinology**, 111, p. 104469, Jan 2020.

MARCHESAN, J. T.; MORELLI, T.; MOSS, K.; BARROS, S. P. *et al.* Association of Synergistetes and Cyclodipeptides with Periodontitis. **Journal of dental research**, 94, n. 10, p. 1425-1431, 2015. Article.

MARCHESI, J. R.; HOLMES, E.; KHAN, F.; KOCHHAR, S. *et al.* Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. **J Proteome Res**, 6, n. 2, p. 546-551, Feb 2007.

MEYLE, J.; CHAPPLE, I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. **Periodontol 2000**, 69, n. 1, p. 7-17, Oct 2015.

NAGANA GOWDA, G. A.; RAFTERY, D. NMR-Based Metabolomics. **Adv Exp Med Biol**, 1280, p. 19-37, 2021.

NGUYEN, C. M.; KIM, J. W.; QUAN, V. H.; NGUYEN, B. H. *et al.* Periodontal associations in cardiovascular diseases: The latest evidence and understanding. **J Oral Biol Craniofac Res**, 5, n. 3, p. 203-206, Sep-Dec 2015.

NGUYEN, T.; SEDGHI, L.; GANTHER, S.; MALONE, E. *et al.* Host-microbe interactions: Profiles in the transcriptome, the proteome, and the metabolome. **Periodontol 2000**, 82, n. 1, p. 115-128, Feb 2020.

OHASHI, Y.; HIRAYAMA, A.; ISHIKAWA, T.; NAKAMURA, S. *et al.* Depiction of metabolome changes in histidine-starved *Escherichia coli* by CE-TOFMS. **Mol Biosyst**, 4, n. 2, p. 135-147, Feb 2008.

OHSHIMA, M.; SUGAHARA, K.; KASAHARA, K.; KATAKURA, A. Metabolomic analysis of the saliva of Japanese patients with oral squamous cell carcinoma. **Oncol Rep**, 37, n. 5, p. 2727-2734, May 2017.

OPEKUN, A.; DING, H.; GRAHAM, D.; KELLERMAYER, R. Sa1765 – Methylated Plasma Metabolites Can Distinguish Ulcerative Colitis from Crohn's Disease. **Gastroenterology**, 156, p. S-393, 05/01 2019.

OZEKI, M.; NOZAKI, T.; AOKI, J.; BAMBIA, T. *et al.* Metabolomic Analysis of Gingival Crevicular Fluid Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry. **Mass Spectrom (Tokyo)**, 5, n. 1, p. A0047, 2016.

PAPAGEORGIU, S. N.; HAGNER, M.; NOGUEIRA, A. V.; FRANKE, A. *et al.* Inflammatory bowel disease and oral health: systematic review and a meta-analysis. **J Clin Periodontol**, 44, n. 4, p. 382-393, Apr 2017.

PAPAPANOU, P. N.; SANZ, M.; BUDUNELI, N.; DIETRICH, T. *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**, 89 Suppl 1, p. S173-s182, Jun 2018.

PAPAPANOU, P. N.; SUSIN, C. Periodontitis epidemiology: is periodontitis under-recognized, over-diagnosed, or both? **Periodontol 2000**, 75, n. 1, p. 45-51, Oct 2017.

PEI, J.; LI, F.; XIE, Y.; LIU, J. *et al.* Microbial and metabolomic analysis of gingival crevicular fluid in general chronic periodontitis patients: lessons for a predictive, preventive, and personalized medical approach. **EPMA Journal**, 2020. Article in Press.

QIAN, J.; LU, J.; HUANG, Y.; WANG, M. *et al.* Periodontitis Salivary Microbiota Worsens Colitis. **J Dent Res**, p. 220345211049781, Nov 19 2021.

QIQIANG, L.; HUANXIN, M.; XUEJUN, G. Longitudinal study of volatile fatty acids in the gingival crevicular fluid of patients with periodontitis before and after nonsurgical therapy. **J Periodontal Res**, 47, n. 6, p. 740-749, Dec 2012.

ROMANO, F.; MEONI, G.; MANAVELLA, V.; BAIMA, G. *et al.* Effect of non-surgical periodontal therapy on salivary metabolic fingerprint of generalized chronic periodontitis using nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Archives of oral biology**, 97, p. 208-214, 2019. Article.

ROMANO, F.; MEONI, G.; MANAVELLA, V.; BAIMA, G. *et al.* Analysis of salivary phenotypes of generalized aggressive and chronic periodontitis through nuclear magnetic resonance-based metabolomics. **Journal of periodontology**, 89, n. 12, p. 1452-1460, 2018. Article.

RZEZNIK, M.; TRIBA, M. N.; LEVY, P.; JUNGO, S. *et al.* Identification of a discriminative metabolomic fingerprint of potential clinical relevance in saliva of patients with periodontitis using <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. **PLoS One**, 12, n. 8, p. e0182767, 2017.

SAKANAKA, A.; KUBONIWA, M.; HASHINO, E.; BAMBA, T. *et al.* Distinct signatures of dental plaque metabolic byproducts dictated by periodontal inflammatory status. **Scientific reports**, 7, p. 42818, 2017. Article.

SANCESARIO, G. M.; BERNARDINI, S. Alzheimer's disease in the omics era. **Clin Biochem**, 59, p. 9-16, Sep 2018.

SANTORU, M. L.; PIRAS, C.; MURGIA, A.; PALMAS, V. *et al.* Cross sectional evaluation of the gut-microbiome metabolome axis in an Italian cohort of IBD patients. **Scientific Reports**, 7, n. 1, p. 9523, 2017/08/25 2017.

SCOVILLE, E. A.; ALLAMAN, M. M.; BROWN, C. T.; MOTLEY, A. K. *et al.* Alterations in Lipid, Amino Acid, and Energy Metabolism Distinguish Crohn's Disease from Ulcerative Colitis and Control Subjects by Serum Metabolomic Profiling. **Metabolomics**, 14, n. 1, p. 17, Jan 2018.

SHE, Y. Y.; KONG, X. B.; GE, Y. P.; LIU, Z. Y. *et al.* Periodontitis and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. **BMC Oral Health**, 20, n. 1, p. 67, Mar 12 2020.

SHI, M.; WEI, Y.; NIE, Y.; WANG, C. *et al.* Alterations and Correlations in Microbial Community and Metabolome Characteristics in Generalized Aggressive Periodontitis. **Front Microbiol**, 11, p. 573196, 2020.

SILWOOD, C. J.; LYNCH, E.; CLAXSON, A. W.; GROOTVELD, M. C. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopic analysis of human saliva. **J Dent Res**, 81, n. 6, p. 422-427, Jun 2002.

SINGH, M. P.; SAXENA, M.; SAIMBI, C. S.; ARIF, J. M. *et al.* Metabolic profiling by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy of saliva shows clear distinction between control and diseased case of periodontitis. **Metabolomics**, 13, n. 11, p. 137, 2017/10/07 2017.

SINGH, M. P.; SAXENA, M.; SAIMBI, C. S.; SIDDIQUI, M. H. *et al.* Post-periodontal surgery propounds early repair salivary biomarkers by <sup>1</sup>H NMR based metabolomics. **Metabolomics**, 15, n. 11, 2019. Article.

STANGE, E. F.; TRAVIS, S. P.; VERMEIRE, S.; REINISCH, W. *et al.* European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. **J Crohns Colitis**, 2, n. 1, p. 1-23, Mar 2008.

STEIN, J. M.; LAMMERT, F.; ZIMMER, V.; GRANZOW, M. *et al.* Clinical periodontal and microbiologic parameters in patients with Crohn's disease with consideration of the CARD15 genotype. **J Periodontol**, 81, n. 4, p. 535-545, Apr 2010.

SUHRE, K.; MEISINGER, C.; DÖRING, A.; ALTMAIER, E. *et al.* Metabolic footprint of diabetes: a multiplatform metabolomics study in an epidemiological setting. **PLoS One**, 5, n. 11, p. e13953, Nov 11 2010.

SUN, M.; DU, B.; SHI, Y.; LU, Y. *et al.* Combined Signature of the Fecal Microbiome and Plasma Metabolome in Patients with Ulcerative Colitis. **Med Sci Monit**, 25, p. 3303-3315, May 5 2019.

TEFAS, C.; CIOBANU, L.; TANȚĂU, M.; MORARU, C. *et al.* The potential of metabolic and lipid profiling in inflammatory bowel diseases: A pilot study. **Bosn J Basic Med Sci**, 20, n. 2, p. 262-270, May 1 2020.

TORRES, J.; MEHANDRU, S.; COLOMBEL, J. F.; PEYRIN-BIROULET, L. Crohn's disease. **Lancet**, 389, n. 10080, p. 1741-1755, Apr 29 2017.

VANCAMELBEKE, M.; SABINO, J.; DEROOVER, L.; VANDERMEULEN, G. *et al.* **P774 Metagenomics and metabolomics of patients with inflammatory bowel disease and their unaffected relatives.** 2017. S476-S477 p.

VANDEN BUSSCHE, J.; MARZORATI, M.; LAUKENS, D.; VANHAECKE, L. Validated High Resolution Mass Spectrometry-Based Approach for Metabolomic Fingerprinting of the Human Gut Phenotype. **Anal Chem**, 87, n. 21, p. 10927-10934, Nov 3 2015.

VAVRICKA, S. R.; MANSER, C. N.; HEDIGER, S.; VÖGELIN, M. *et al.* Periodontitis and gingivitis in inflammatory bowel disease: a case-control study. **Inflamm Bowel Dis**, 19, n. 13, p. 2768-2777, Dec 2013.

VILLAS-BÔAS, S. G.; MAS, S.; AKESSON, M.; SMEDSGAARD, J. *et al.* Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrom Rev**, 24, n. 5, p. 613-646, Sep-Oct 2005.

WENG, Y. J.; GAN, H. Y.; LI, X.; HUANG, Y. *et al.* Correlation of diet, microbiota and metabolite networks in inflammatory bowel disease. **J Dig Dis**, 20, n. 9, p. 447-459, Sep 2019.

WŁODARCZYK, M.; SOBOLEWSKA-WŁODARCZYK, A.; CYGANKIEWICZ, A. I.; JACENIK, D. *et al.* G Protein-Coupled Receptor 30 (GPR30) Expression Pattern in Inflammatory Bowel Disease Patients Suggests its Key Role in the Inflammatory Process. A Preliminary Study. **J Gastrointestin Liver Dis**, 26, n. 1, p. 29-35, Mar 2017.

ZHANG, L.; GAO, X.; ZHOU, J.; CHEN, S. *et al.* Increased risks of dental caries and periodontal disease in Chinese patients with inflammatory bowel disease. **Int Dent J**, 70, n. 3, p. 227-236, Jun 2020.

ZHANG, S.; ZENG, X.; REN, M.; MAO, X. *et al.* Novel metabolic and physiological functions of branched chain amino acids: a review. **J Anim Sci Biotechnol**, 8, p. 10, 2017.



DATA DE NASCIMENTO: COR: ( )BRANCA ( )PARDA ( )PRETA IDADE:  
 ( )NÃO-FUMANTE  
 ( )FUMANTE Há quanto tempo: Quantidade:  
 ( )EX-FUMANTE Foi fumante por quanto tempo: Quando parou: Qt.:  
 Teve COVID-19: ( )SIM ( )NÃO  
 Quando:  
 Hipertenso(a): ( )SIM ( )NÃO Medicamentos:  
 Diabético(a): ( )SIM ( )NÃO  
 Tratamento ortodôntico prévio:  
 Antib. nos últimos 6 meses: ( )SIM ( )NÃO Motivo:  
 Antiinflamatório nos últimos 6 meses: ( )SIM ( )NÃO Motivo:  
 Perdeu algum dente por periodontite: ( )SIM ( )NÃO Qt.:

Nº de dentes:

Total de sítios:

Média PB:

Média NI:

BOLSAS:

≤3mm:

4mm:

≥5mm:

NI:

0mm:

1/2mm:

3/4mm:

≥5mm:

Sítios com placa:

Sítios com sangramento:

Diagnóstico Periodont

**APÊNDICE B – Ficha clínica para pacientes com DII****NOME:****IDADE:****PESO DO PACIENTE:****TIPO/ LOCALIZAÇÃO DA DOENÇA:****ATIVIDADE OU REMISSÃO DA DOENÇA:****SLEDAI:****DATA DO DIAGNÓSTICO:****TEMPO DE DOENÇA:****OUTRAS DOENÇAS:**

- HIPERTENSÃO ( )
- DIABETES ( )
- OUTROS: \_\_\_\_\_ -

**TEVE COVID-19? SIM ( ) QUANDO: \_\_\_\_\_ NÃO ( )****RESULTADOS DO ÚLTIMO EXAME LABORATORIAL: DATA DO EXAME:**

- VHS:
- VITAMINA D:
- PCR:
- WBC:
- Hb:
- ESR:

**MEDICAÇÃO ATUAL:**

NOME	POSOLOGIA	INTERVALO	INÍCIO	TEMPO

**DATA:**

## APÊNDICE C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Título do Projeto: Análise do metaboloma salivar em pacientes com doença periodontal e doença inflamatória intestinal**  
**Pesquisador Responsável:** Profa. Dra. Fernanda de Brito Silva

**Participantes:** Heloisa Fernandes Queiroz Curcio

**Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável:** Faculdade de Odontologia / UERJ - Francisco Negrão de Lima.

**Endereço:** Rua São Francisco Xavier, 524, Maracanã, Rio de Janeiro – RJ – Cep 20550-900 TEL: (21) 2334-0000

**Telefones para contato:** (21) 98514-4125

**Nome do voluntário:** \_\_\_\_\_

**Idade:** \_\_\_\_\_ anos R.G. \_\_\_\_\_

O(A) Sr.(ª) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa “**Análise do metaboloma salivar em pacientes com doença periodontal e doença inflamatória intestinal**” de responsabilidade da pesquisadora Prof. Dra. Fernanda de Brito Silva.

**Objetivo e Justificativa** – Tanto as doenças inflamatórias intestinais quanto as doenças periodontais afetam a qualidade de vida dos pacientes acometidos e tem alta prevalência, tornando cada vez mais necessário fazer seu reconhecimento precoce e estabelecer tratamentos nas fases iniciais. Este estudo tem por objetivo investigar a relação entre periodontite e doenças inflamatórias intestinais através do estudo do metaboloma de pacientes acometidos por ambas as doenças comparadas a indivíduos saudáveis. Dessa forma, é possível avaliar como essas doenças estão relacionadas a nível metabólico e se compartilham potenciais biomarcadores para diagnóstico.

**Descrição do estudo** - Será realizado um estudo transversal, onde serão coletadas amostras de saliva, sangue e fluido gengival, além de um exame clínico bucal e anamnese, envolvendo como população alvo pacientes acometidos por doenças periodontais, doenças inflamatórias intestinais e pacientes saudáveis que procuram atendimento nas clínicas da Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), o Hospital Pedro Ernesto (HUPE/UERJ) e o Hospital Clementino Fraga Filho (HCFF/UFRJ).

**Desconfortos e riscos associados** - Por se tratar de uma pesquisa realizada por meio de exame clínico e coleta de amostras, poderá haver um risco mínimo de possíveis constrangimentos aos participantes do estudo, porém serão garantidas a não estigmatização, a não utilização das informações em prejuízo de pessoas e grupos, e a preservação da auto estima.

**Benefícios esperados** - A partir dos dados obtidos pretende-se fornecer informações à sociedade sobre como as doenças inflamatórias intestinais estão relacionadas às doenças periodontais a nível metabólico e fornecer possíveis biomarcadores para diagnóstico precoce dessas condições. Serão garantidas ações de promoção e prevenção de saúde dos entrevistados através de orientação sobre higiene bucal e profilaxia, e quando necessário serão encaminhados para devido tratamento na Clínica da Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ ou da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

**Informações** - Os voluntários têm garantia de que receberão respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento sobre os procedimentos, benefícios e aspectos relativos à pesquisa.

**Retirada de Consentimento** - Os voluntários têm a liberdade de cancelar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo.

**Garantia de Sigilo** - Os dados obtidos na pesquisa têm finalidade exclusivamente científica, sendo assegurada privacidade dos participantes da pesquisa. Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em congressos ou publicados em revista científica, porém a identidade do voluntário não será divulgada nessas apresentações.

**Ressarcimento** - Não há gastos previstos em decorrência da participação dos voluntários na pesquisa.

**Indenização aos Danos** - Não há danos previsíveis decorrentes desta pesquisa.

**Aspecto Legal** - O projeto foi escrito de acordo com as diretrizes e normas regulamentadas de pesquisas envolvendo seres humanos atendendo à resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde - Brasília - DF. Os pesquisadores assumem o compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando.

**Contatos** - A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos entre em contato com as pesquisadoras da pesquisa: Prof. Dra. Fernanda de Brito Silva/ Heloisa Fernandes Queiroz Curcio (21 98514-4125)

Eu, \_\_\_\_\_, RG nº \_\_\_\_\_, declaro ter sido informado e concordo com a minha participação, como voluntário, no projeto de pesquisa acima descrito.

Caso você tenha dificuldade em entrar em contato com o pesquisador responsável, comunique o fato à Comissão de Ética em Pesquisa da UERJ: Rua São Francisco Xavier, 524, sala 3018, bloco E, 3º andar, - Maracanã - Rio de Janeiro, RJ, e-mail: [etica@uerj.br](mailto:etica@uerj.br) - Telefone: (021) 2334-2180. O CEP COEP é responsável por garantir a proteção dos participantes de pesquisa e funciona às segundas, quartas e sextas-feiras, de 10h às 12h e 14h às 16h.

Rio de Janeiro, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Nome e assinatura do participante responsável por obter o consentimento:

Nome: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Assinatura:

\_\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador Responsável:

Rubrica do participante

Rubrica do pesquisador