



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

INFLUÊNCIA DA HIPERGLICEMIA E DAS ALTERAÇÕES NO MICROBIOMA
SALIVAR NAS ESTIMATIVAS DE DOENÇA CÁRIE EM INDIVÍDUOS COM
DIABETES MELLITUS

CAMILLA PEDROSA VIEIRA LIMA

Brasília, 30 de setembro de 2021

Camilla Pedrosa Vieira Lima

INFLUÊNCIA DA HIPERGLICEMIA E DAS ALTERAÇÕES NO MICROBIOMA
SALIVAR NAS ESTIMATIVAS DE DOENÇA CÁRIE EM INDIVÍDUOS COM
DIABETES MELLITUS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador(a): Nailê Damé-Teixeira

Coorientador(a): Daniela Côrrea Grisi

Brasília, 2021

Camilla Pedrosa Vieira Lima

INFLUÊNCIA DA HIPERGLICEMIA E DAS ALTERAÇÕES NO MICROBIOMA
SALIVAR NAS ESTIMATIVAS DE DOENÇA CÁRIE EM INDIVÍDUOS COM
DIABETES MELLITUS

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Data da defesa: 30 de setembro de 2021

Banca examinadora:

Profa. Dra. Nailê Damé-Teixeira (Orientadora)

Profa. Dra. Evelyn Mikaela Kogawa (Membro titular)

Profa. Dra. Sandra Liana Henz (Membro titular)

Profa. Dra. Loise Pedrosa Salles (Suplente)

Dedico este trabalho a Deus, por estar sempre presente em minha vida, me fornecendo oportunidades e força para lutar por todos os meus sonhos. À minha família, em especial aos meus pais, Tatiana e Afrísio, por todo amor, carinho e, principalmente, por nunca terem poupado esforços para minha educação e felicidade. Aos meus mestres de toda a vida, por serem minhas principais inspirações. Aos meus amigos, que me incentivam diariamente e tornam a minha jornada muito mais leve. Por fim, não menos importante, à minha orientadora, Profa. Dra. Nailê Damé-Teixeira, por nunca ter deixado de acreditar em mim e por me ensinar, pacientemente, o percurso rumo ao sucesso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela minha vida, pelas pessoas que amo, pelas oportunidades e pela fé que me guia e me transforma, fazendo com que eu encontre forças, diariamente, para ir em busca de cada um dos meus sonhos.

Aos meus pais, Tatiana e Afrísio, pelo amor, carinho e dedicação. A eles minha eterna gratidão, admiração e reconhecimento. Obrigada por sempre estarem na minha torcida, não importando qual seja o meu objetivo.

Aos meus avós, por sempre me motivarem em meio à vontade de encher-los de orgulho.

Aos mestres de toda a vida, vocês são minhas grandes inspirações. A vocês todo o meu respeito por esse amor depositado na mais bela das artes: ensinar.

Aos amigos de mestrado, em especial, Rafaella, Denise, Giulia, Cecília, Bárbara e Carlos. Sem vocês nada disso seria possível. Obrigada pela paciência, pelos ensinamentos e, principalmente, pelos inúmeros momentos de alegria que transformaram o nosso trabalho em algo muitíssimo prazeroso. Vocês são maravilhosos!

Aos colegas de trabalho do Seconci-DF e da Universidade Católica de Brasília, por vocês nutro enorme carinho e admiração, sempre. Deus, tão maravilhoso, me presenteou com bons companheiros, os quais pude contar ao longo desses anos.

À Profa. Dra. Nailê Damé-Teixeira, minha orientadora, que sempre dispôs de toda paciência comigo, nunca deixando de acreditar que esse sonho seria, sim, possível. Obrigada por todo incentivo e motivação a estar sempre em busca da ciência. Espero que esse tenha sido apenas o início de uma parceria e amizade.

À minha coorientadora, Daniela Corrêa Grisi, presente em minha vida já há alguns anos, fonte de grande inspiração para mim.

À técnica de laboratório e amiga, Priscila, por todo o auxílio, companheirismo e dedicação a todos nós, estudantes.

À minha psicóloga, Dra. Adriane, por me ouvir falar desse mestrado por longas horas e por me oferecer total suporte e apoio nos momentos de estresse máximo.

À Escola das Nações, que além de escola foi uma casa. Lugar onde fui ensinada não só as matérias básicas, mas, também, a ser uma cidadã do mundo, respeitando o próximo e a natureza. Costumo dizer que este lugar fez de mim a pessoa que sou hoje e nele, também, conheci meus melhores amigos, que me acompanham e me apóiam desde sempre, pra sempre.

À Universidade Católica de Brasília, minha instituição de formação, e, hoje, ambiente de trabalho. Instituição que me fez realizar um dos maiores sonhos: lecionar.

Aos meus alunos, que mais do que aprendem, me ensinam e me cativam, tornando-me, assim, cada dia mais apaixonada pela profissão.

À Universidade de Brasília e à Faculdade de Ciências da Saúde, que me receberam de portas abertas e me abriram inúmeras oportunidades pessoais e profissionais.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia e à Secretaria do Curso de Pós-Graduação pela colaboração, auxiliando-me nos procedimentos acadêmicos formais.

À CAPES, pelo financiamento ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Enfim, a todos que colaboraram direta ou indiretamente para que eu pudesse vencer mais esta etapa. Meus eternos e mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

A literatura já comprova que indivíduos portadores de Diabetes mellitus (DM) além da glicose sanguínea alterada, também apresentam maiores taxas de glicose salivar do que indivíduos normoglicêmicos. Acredita-se que a maior prevalência de cárie em indivíduos com DM pode estar relacionada com essas taxas de glicose. **Objetivos:** Avaliar se o aumento das estimativas de doença cárie em indivíduos com DM são explicados pela hiperglicemia salivar/sanguínea e/ou por alterações do microbioma salivar. **Métodos:** Estudo transversal realizado com indivíduos com DM e periodontite (DMP) e controles sistemicamente e periodontalmente saudáveis. Foram realizados exames clínicos, sanguíneos (glicose em jejum e hemoglobina glicada), testes de fluxo, pH e glicose salivar. O DNA microbiano total foi extraído, as regiões V3-V4 do gene 16S rRNA foram amplificadas e sequenciadas na plataforma Illumina MiSeq. **Resultados:** A prevalência de cárie coronária ativa encontrada foi de 43,59% e de cárie radicular ativa foi de 10,25%. A média dos níveis de glicose salivar foi de 0,95 mg/dL para pacientes com cárie coronária ativa, 0,37 mg/dL para aqueles com cárie radicular e 0,49 mg/dL para indivíduos sem cárie ativa. O CPOD e a extensão da cárie radicular foram correlacionados com HbA1c e FBG. Correlações significativas positivas foram observadas entre a glicose salivar, hemoglobina glicada (HbA1c) e glicose sanguínea em jejum ($p < 0,05$). O filo *Actinobacteria* apresentou maior abundância no grupo de indivíduos com glicose salivar $< 0,35$ mg/dL do que o grupo com glicose salivar $\geq 0,35$ mg/dL ($17,6 \pm 6,8\%$ vs. $13,1 \pm 5,1\%$). A relação *Firmicutes/Bacteroidota* foi maior no grupo de pacientes com saliva em pH 8 do que no grupo de pH 6 ($16,8 \pm 10,1$ vs. $81,8 \pm 120,4$), enquanto o filo *Proteobacteria* estava em menor abundância ($15,6 \pm 12,3\%$ vs. $3,9 \pm 3,8\%$). No nível de gênero, *Veillonella* foi esgotado em indivíduos com saliva alcalina. Vários organismos em quantidade inferior a 0,01% foram prevalentes em pelo menos 50% das amostras. **Conclusão:** Níveis de glicose sanguínea e salivar são correlacionados, e ambos associados ao aumento do risco de lesões cariosas radiculares e modificações no microbioma salivar. Deve-se compreender que o aumento de lesões cariosas em indivíduos com DM não é justificado por um motivo único, mas sim, por um conjunto de situações que favorecem o aumento da prevalência de tal doença oral, dentre os quais a hiperglicemia. Novos estudos longitudinais devem ser realizados para melhor compreender essa associação.

PALAVRAS-CHAVE: Diabetes mellitus tipo 2, Saliva, Glicose, Cárie coronária, Cárie radicular, Atividade de cárie, Microbioma oral, Glicose salivar, pH salivar, Sequenciamento Illumina.

ABSTRACT

It has been confirmed that individuals with Diabetes mellitus (DM) have altered blood glucose, as well as higher levels of salivary glucose, than the normoglycemic ones. The higher prevalence of caries in individuals with DM might be related to this hyperglycemia. **Objectives:** To assess whether the increased estimates of dental caries in individuals with DM are explained by salivary/blood hyperglycemia and/or alterations in the salivary microbiome. **Methods:** A cross-sectional study was conducted with individuals with DM and periodontitis (DMP) and systemically and periodontally healthy controls. Clinical, blood tests (fasting glucose and glycated hemoglobin), salivary flow, pH, and salivary glucose tests were performed. Total microbial DNA was extracted, the V3-V4 regions of the 16S rRNA gene were amplified and sequenced on the Illumina MiSeq platform. **Results:** The prevalence of active coronal caries found was 43.59% and active root caries was 10.25%. The salivary glucose levels were 0.95 mg/dL for individuals with active coronal caries, 0.37 mg/dL for those with root caries, and 0.49 mg/dL for individuals without active caries. DMFS and root caries extent were correlated with HbA1c and FBG. Significant positive correlations were observed between salivary glucose, glycated hemoglobin (HbA1c) and fasting blood glucose ($p < 0.05$). The *Actinobacteria* phylum was more abundant in the group of individuals with salivary glucose < 0.35 mg/dL than the group with salivary glucose ≥ 0.35 mg/dL ($17.6 \pm 6.8\%$ vs. $13.1 \pm 5.1\%$). The *Firmicutes/Bacteroidota* ratio was higher in saliva at pH 8 than in the pH 6 (16.8 ± 10.1 vs. 81.8 ± 120.4), while the *Proteobacteria* was less abundant ($15.6 \pm 12.3\%$ vs. $3.9 \pm 3.8\%$). At the genus level, *Veillonella* was depleted in individuals with alkali saliva. Several organisms with relative abundances $< 0.01\%$ were prevalent in at least 50% of the samples. **Conclusion:** Blood and salivary glucose levels are correlated, and both are associated with an increased risk of root carious lesions and changes in the salivary microbiome. The increase in carious lesions in individuals with DM is not justified by a single reason, but by a set of situations that favor the increased prevalence of this oral disease, including hyperglycemia. New longitudinal studies must be carried out to better understand this association.

KEYWORDS: Type 2 diabetes mellitus, Saliva, Glucose, Coronal caries, Root caries, Caries activity, Oral microbiome, Salivary glucose, salivary pH, Illumina sequencing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1- Especificidade de sítio das espécies bacterianas mais predominantes na cavidade oral livre de doença (Aas et al. 2005).....21

Figura 2- Representação gráfica da diversidade nos diferentes *habitats* orais (Caselli et al. 2020).....23

CAPÍTULO 2

Figura 1- Fluxograma do estudo.....56

Tabela 1- Características da amostra de acordo com a prevalência de cárie ativa..57

Tabela 2- Correlação de Spearman entre glicose salivar, glicose sanguínea e cárie coronária.....58

Figura 2- Dispersão do CPOD e níveis de glicose salivar, hemoglobina glicada e glicose sanguínea.....59

Figura 3- Dispersão de extensão de cárie coronária e níveis de glicose salivar, hemoglobina glicada e glicose sanguínea.....60

Tabela 3- Correlação de Spearman entre glicose salivar, hemoglobina glicada, glicose sanguínea e cárie radicular.....61

Figura 4- Dispersão de extensão de cárie radicular e níveis de glicose salivar, hemoglobina glicada e glicose sanguínea.....62

Tabela 4- Modelo de regressão Binomial negativa para cárie radicular e níveis de glicose salivar, glicose sanguínea e hemoglobina glicada.....63

CAPÍTULO 3

Tabela 1- Características clínicas da amostra.....	77
Figura 1- Índice da diversidade alfa de acordo com o grupo, pH salivar e glicose salivar.....	78
Figura 2- Filos mais abundantes no microbioma salivar.....	79
Tabela 2- Taxóns do microbioma salivar influenciados pelo pH salivar e/ou glicose salivar.....	80
Figura 3- 53 táxons com abundância maior que 1%.....	82
Figura 4- Gráfico de diversidade beta medida por Bray Curtis no NMDS (n=390 táxons)	83
Figura 5- Correlação de Spearman entre variáveis clínicas e táxons.....	84
Figura 6- Gráfico CCA (influência das variáveis clínicas de acordo com as alterações do microbioma salivar)	85
Figura 7- Gráfico de abundância diferencial.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs	<i>Advanced Glycation End-products</i>
ASVs	<i>Amplicon Sequence Variants</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CPOD	Índice de dentes cariados, perdidos e obturados
DGGE	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DMFS	<i>Decayed, missing and filled teeth index</i>
DMP	<i>Diabetes mellitus and Periodontitis</i>
DP	Doença periodontal
<i>E. corrodens</i>	<i>Eikenella corrodens</i>
FBG	<i>Fasting Blood Glucose</i>
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>G. adiacens</i>	<i>Granulicatella adiacens</i>
HbA1c	Hemoglobina glicada
HMP	<i>Human Microbiome Project</i>
IL-1α	Interleucina 1 alfa
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
<i>N. mucosa</i>	<i>Neisseria mucosa</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
OTU(s)	<i>Operational Taxonomic Unit(s)</i>
PA	Periodontite apical
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
pH	<i>Power of Hydrogen</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>P. melaninogenica</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>
<i>P. nigrescens</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>
Processo DES-RE	Processo Desmineralização-Remineralização
RAGEs	<i>Receptor for Advanced Glycation End-products</i>
rRNA	<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i>

R. dentocariosa	<i>Rothia dentocariosa</i>
S. australis	<i>Syconycteris australis</i>
S. gordonii	<i>Streptococcus gordonii</i>
S. intermedius	<i>Staphylococcus intermedius</i>
S. mutans	<i>Streptococcus mutans</i>
S. oralis	<i>Streptococcus oralis</i>
S. salivarius	<i>Streptococcus salivarius</i>
S. sanguinis	<i>Streptococcus sanguinis</i>
S. mitis	<i>Streptococcus mitis</i>
T. forsythia	<i>Tannerella forsythia</i>
T2D	<i>Type II Diabetes</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor</i>
Tregs	Células T
V. parvula	<i>Veillonella parvula</i>
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO, REVISÃO DE LITERATURA E OBJETIVOS.....	14
1.1 INTRODUÇÃO.....	14
1.2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1.2.1 A microbiologia da cavidade bucal no processo saúde/doença.....	16
1.2.2 O estudo do microbioma salivar.....	25
1.2.3 Hiperglicemia da Diabetes mellitus e sua relação com o aumento da glicose salivar.....	27
1.2.4 Manifestações orais da Diabetes mellitus: o que já se sabe.....	31
1.2.4.1 Diabetes mellitus e a doença periodontal.....	31
1.2.4.2 Hipossalivação e xerostomia.....	33
1.2.4.3 Diabetes mellitus e as doenças orais fúngicas.....	33
1.2.4.4 Diabetes mellitus e o tratamento endodôntico.....	34
1.2.4.5 Diabetes mellitus e a doença cárie.....	34
1.3 OBJETIVOS.....	37
1.3.1 Objetivo geral.....	37
1.3.2 Objetivos específicos.....	37
1.4 REFERÊNCIAS.....	38
CAPÍTULO 2- ARTIGO CIENTÍFICO: Can increased salivary glucose be a risk indicator for coronal and root caries in individuals with Diabetes mellitus type 2?	48
2.1 INTRODUÇÃO.....	49
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
2.2.1 Desenho e configurações do estudo.....	51
2.2.2 Participantes e critérios de elegibilidade.....	51
2.2.3 Características dos dados e variáveis.....	51
2.2.3.1 Exames dentários.....	51
2.2.3.2 Classificação periodontal.....	52
2.2.3.3 Níveis de glicose sanguínea.....	52
2.2.3.4 Amostras de saliva.....	52
2.2.3.6 pH salivar.....	53
2.2.3.7 Glicose salivar.....	53
2.2.4 Reprodutibilidade.....	53

2.2.5 Métodos estatísticos.....	53
2.3 RESULTADOS.....	54
2.4 DISCUSSÃO.....	63
2.5 CONCLUSÃO.....	66
2.6 REFERÊNCIAS.....	67
CAPÍTULO 3- ARTIGO CIENTÍFICO: Influence of salivary glucose and pH in the oral microbiome.....	70
3.1 INTRODUÇÃO.....	71
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	72
3.2.1 Ética.....	72
3.2.2 Desenho de estudo, participantes e critérios de elegibilidade.....	73
3.2.3 Exames clínicos.....	73
3.2.4 Coleta de saliva.....	73
3.2.5 Glicose salivar.....	74
3.2.6 Fluxo salivar e pH.....	74
3.2.7 Extração do DNA salivar e PCR.....	75
3.2.8 Bioinformática e análise de dados.....	75
3.3 RESULTADOS.....	75
3.4 DISCUSSÃO.....	86
3.5 CONCLUSÃO.....	89
3.6 REFERÊNCIAS.....	90
CAPÍTULO 4- DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO.....	94
4.1 Discussão geral.....	94
4.2 Conclusões.....	96
4.3 Referências.....	97
CAPÍTULO 5- PRESS RELEASE.....	98

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO, REVISÃO DE LITERATURA E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus (DM) é uma síndrome caracterizada por anormalidades no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas que resultam de uma deficiência profunda ou absoluta de insulina, relacionada à destruição autoimune das células beta pancreáticas, ou da resistência do tecido alvo ao seu metabolismo celular, o que ocorre, normalmente, em pacientes obesos (On the Diagnosis 2002).

A DM é a doença endócrina mais comum. Segundo o Atlas Internacional de Diabetes, em 2019, a prevalência global de DM atingiu 9,3%, sendo mais da metade dos adultos não diagnosticados, o que os torna mais propensos a complicações, uma vez que não tomam o devido cuidado com a saúde e não fazem o uso das devidas medicações (On the Diagnosis 2002). Já a Federação Internacional de Diabetes relata que a cada 2 pacientes com DM, um ainda não foi diagnosticado, porém a falta de diagnóstico varia de acordo com o país (Federation 2019). No Brasil, em 2021, a prevalência corresponde a 9,2% dos adultos (Muzy et al. 2021). São algumas das complicações da DM: o aumento da susceptibilidade às infecções, processo cicatricial comprometido, neuropatias, retinopatias, nefropatias, aneurisma e amputação de membros. A hiperglicemia é a marca registrada desta doença crônica, juntamente com as complicações metabólicas (Anthony and Vernillo 2003). Mais recentemente, uma importante complicação da COVID-19 foi relacionada com a DM e a hiperglicemia (Stulnig 2020).

Como citado anteriormente, a condição desta enfermidade pode estar relacionada a produção insuficiente de insulina, conhecida como DM do tipo 1, que é caracterizada pela destruição das células beta pancreáticas, resultando em deficiência da secreção do hormônio insulina e subsequente hiperglicemia. Já no quadro de DM do tipo 2 ocorre a secreção de insulina. Porém, sua ação é dificultada pela obesidade, o que é conhecido como resistência insulínica, uma das causas de hiperglicemia. Essas são as principais classificações da doença, porém, existe também a Diabetes gestacional (Sociedade Brasileira de Diabetes 2019).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou em uma revisão sistemática e metanálises que indivíduos com Diabetes mellitus (DM) tipo 2 têm chances aumentadas de desenvolver lesões de cárie coronária e radicular, quando

comparados com os sistemicamente saudáveis. Os resultados de tal estudo também mostraram que indivíduos com níveis glicêmicos não controlados apresentam maior prevalência de cárie do que indivíduos controlados (de Lima et al. 2020). A principal hipótese encontrada na literatura para explicar o maior risco de indivíduos com DM desenvolverem cárie é a redução do fluxo salivar (Mauri-Obradors, 2017). No entanto, oferecemos outras alternativas para explicar esses achados: **1)** uma forte influência sobre os critérios de detecção da doença pela inclusão da experiência anterior de cárie (dentes obturados e perdidos), e a classificação incorreta da atividade de cárie; **2)** composição bioquímica alterada da saliva; e **3)** a influência do aumento da glicose salivar na alteração do meio microbiológico (mais sacarolítico), devido ao menor pH.

Considerando as hipóteses **1** e **2**, observamos os seguintes resultados em nossos estudos prévios: **1)** a DM pode predispor os pacientes a um maior número de lesões de cárie, independentemente de sua experiência anterior à doença. A perda de dentes pode superestimar a extensão da cárie em indivíduos com DM, independente dos critérios de detecção utilizados (Ribeiro et al. 2021); **2)** a redução do fluxo salivar em repouso, associada a outros fatores, pode justificar o aumento de lesões cariosas em adultos com DM, como confirmam os recentes achados (Rahiotis, Petraki, and Mitrou 2021). Fatores esses que podem incluir hábitos dietéticos, colágeno dentinário alterado pela hiperglicemia, a diferente concentração de íons cálcio e fósforo na saliva, pH salivar modificado pela hiperglicemia (e não somente pelas bactérias orais), dentre outros (Marques 2021). No entanto, a redução do fluxo salivar, por si só, não foi capaz de explicar o aumento de lesões cariosas. Tendo em vista tais considerações, podemos afirmar que a doença cárie não é estritamente relacionada a alteração de microbioma. Ainda há pouca informação sobre como a hiperglicemia afeta a microbiota bucal, e como isso poderia estar influenciando nos achados de maior prevalência/extensão de cárie em pacientes portadores de DM. Neste estudo, propomos, então, observar se há relação entre a glicose sanguínea e a glicose salivar e se ambas podem ser associadas com o aumento de lesões de cárie, além de descrever a taxonomia do microbioma do paciente portador de DM e periodontite, avaliando se o controle glicêmico sanguíneo interfere na microbiota oral desses indivíduos.

Relacionar a microbiota bucal com a estrutura dos biofilmes orais permanece

sendo um desafio. As comunidades microbianas em biofilmes orais são altamente organizadas. Curiosamente, existe certa consistência entre todos os indivíduos com relação a composição microbiana mais abundante em saúde, o que é denominado de “core microbiome”. Porém, existem importantes diferenças que podem ser notadas quando o microbioma entra em desequilíbrio e começa a causar algum dano ao paciente, por exemplo, no caso da cárie. Fatores relacionados ao hospedeiro, como uma alteração na dieta ou a presença de doenças sistêmicas podem causar esse desequilíbrio. Nesse capítulo, o microbioma bucal em saúde e a sua transição para a doença será discutido. Além disso, será exposto, também, como a hiperglicemia afeta a microbiota e como isso pode alterar os índices de cárie nos indivíduos diabéticos. A análise de taxonomia de comunidades microbianas orais, por meio de tecnologias de sequenciamento de alto rendimento, independentes de cultivo dos microrganismos em laboratório, pode ajudar a elucidar as interações dos microrganismos e seu hospedeiro. Compreendendo como ocorre a transição do processo de saúde para o de doença (eubiose para disbiose), o cirurgião-dentista, de maneira inter e multidisciplinar, poderá intervir e prevenir a doença cárie nesses pacientes.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 A microbiologia da cavidade bucal no processo saúde/doença

O “*Human Microbiome Project*” (HMP), uma iniciativa de investigação do Instituto Nacional de Saúde (NIH) dos Estados Unidos, criado em 2007, mapeou e caracterizou o microbioma humano, observando que em todo sítio do nosso organismo existe um determinado conjunto de microrganismos interferindo na relação saúde/doença. Foram estabelecidos 48 principais sítios microbianos e um dos maiores destaques é a cavidade bucal. Apesar de se destacar como um sítio possuidor de um enriquecido microbioma, a cavidade bucal é, também, um ambiente desafiador para a sobrevivência de microrganismos, uma vez que sofre altas flutuações diárias de temperatura, pH, forças da mastigação, fornecimento incerto de nutrientes e práticas de higiene (Kreth, Merritt, and Qi 2009).

A cavidade bucal possui mais de 1000 espécies microbianas, sendo 700 delas bacterianas, que desenvolveram estratégias de sobrevivência para poderem se manter vivas nesse meio desafiador. Uma das principais soluções adaptativas

encontradas pelos microrganismos é a coagregação de diferentes células em comunidades embebidas com matriz de polissacarídeo extracelular, que as protege e as torna aderidas à uma superfície. Os biofilmes (Berger 2018), como são chamados esses conjuntos de microrganismos envoltos por sua matriz, fazem da cavidade oral o segundo sítio mais colonizado do corpo humano, perdendo, apenas, para o intestino em termos de diversidade (Radaic and Kapila 2021).

A criação do conjunto de dados do microbioma humano em 2012 (Consortium 2012) forneceu novas oportunidades para avaliação de padrões de coocorrência por análise de bioinformática dos dados metagenômicos. Uma comparação de diferentes locais dentro da cavidade bucal identificou 3 diferentes tipos de comunidades microbianas: **I.** grupo de microrganismos presentes na mucosa bucal, gengiva queratinizada e palato duro, apresentando, principalmente, *Firmicutes* e *Streptococcus spp.*, **II.** microrganismos que ocupam o meio próximo à garganta, tonsilas palatinas, dorso da língua e saliva, caracterizado por níveis elevados dos gêneros *Veillonella*, *Neisseria* e *Leptotrichia* e o grupo **III.** referente à placa dentária sub e supragengival, enriquecido de *Capnocytophaga*, *Actinomyces*, *Rothia* e *Corynebacterium* (Segata et al. 2012). Nota-se, no entanto, que as relações de coocorrência são uma média em todo o táxon, e podem não ser válidas para interações entre cepas individuais. Muitas associações negativas também foram identificadas entre táxons. Uma relação de coexclusão, por exemplo, ocorre entre *Streptococcus* e *Tannerella*. Tais gêneros são fundamentalmente distintos. Enquanto *Streptococcus spp.* são facultativamente anaeróbios e utilizam o açúcar como fonte primária de nutriente, as *Tannerella spp.* são anaeróbias obrigatórias que utilizam proteínas como fonte de energia (Levy and Borenstein 2013)(Jakubovics 2015).

A cavidade bucal difere dos demais nichos microbianos pela presença simultânea de dois tipos de superfícies de colonização: mucosas e “superfícies duras” (dentes e próteses). Esta propriedade oferece imensas possibilidades para maior diversidade (Scully and Greenman 2008). Zaura et al., em 2009, notaram que existem diversos microrganismos encontrados no estado de saúde do indivíduo, o que pode levar a conclusão de que um microbioma bucal saudável deve ser dominado por uma característica de “**core microbiano**”, ou “**microbioma central**”, que apresenta determinados filotipos, mantendo a estabilidade funcional e a homeostase necessária para um ecossistema compatível com saúde do hospedeiro. Nesse estudo, foi apresentada a primeira descrição da diversidade, singularidade e do nível de

sobreposição de microbiomas em vários nichos intraorais, fornecida por pirosequenciamento direcionado da região hiper variável V5-V6 da subunidade 16S do RNA ribossômico desses microrganismos. Mais de 3600 sequências únicas foram encontradas dentro da cavidade bucal, ou seja, mais de 500 OTUs (*Operational Taxonomic Unit*) diferentes, ou filotipos em “nível de espécie”, e 88-104 táxons diferentes. Os táxons predominantes em diferentes sujeitos, para situação de saúde foram: *Firmicutes* (gênero *Streptococcus*, família *Veillonellaceae*, gênero *Granulicatella*), *Proteobacteria* (gêneros *Neisseria*, *Haemophilus*), *Actinobacteria* (gêneros *Corynebacterium*, *Rothia*, *Actinomyces*), *Bacteroidetes* (gêneros *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Porphyromonas*) e *Fusobacteria* (gênero *Fusobacterium*) (Zaura et al. 2009). Assim sendo, nota-se que a maior parte das sequências bacterianas de indivíduos saudáveis é idêntica, comprovando o conceito de “**core microbiano**”.

Zaura et al. (2014) afirmam, em um estudo distinto, que a leitura do “*Human Microbiome Project*” avaliou a composição do microbioma oral de, aproximadamente, 200 indivíduos, em nove diferentes sítios intraorais: mucosa bucal, palato duro, gengiva queratinizada, tonsilas palatinas, saliva, placa sub e supragengival, garganta e dorso da língua. Puderam ser observados de 185-355 diferentes gêneros, pertencentes a 13-19 filos bacterianos distintos (Zhou et al. 2013)(Zaura et al. 2014). Um único OTU, *Streptococcus* OTU#2, demonstrou-se presente em quase todos os sítios de mucosa (Zaura et al. 2014).

Foi demonstrado que o microbioma bucal em recém-nascidos semeia o microbioma intestinal (Costello et al. 2013). Com base no conhecimento atual, é evidente que a aquisição desse core microbiano é um processo essencial para os recém-nascidos. Os bebês são colonizados por bactérias presentes em seu ambiente direto, vindas não só de suas mães, como, também, de outras fontes. Caso um bebê nascesse sem microbiota e fosse, de forma aleatória, colonizado por um microrganismo com alta virulência, não existiria o core microbiano e, muito menos, sistema imune capaz de combater o invasor. Por tal motivo, sugere-se que o desenvolvimento da tolerância fetal em relação ao microbioma da mãe, durante a gravidez, é o principal fator para a aquisição do *core*. Existem evidências clínicas que comprovam a presença de microrganismos já na placenta, no cordão umbilical, no fluido amniótico e no mecônio em gestações a termo, sem infecções evidentes (Bearfield et al. 2002)(Jiménez et al. 2008)(Stout et al. 2013)(Aagaard et al. 2014). A recente comparação de resultados do sequenciamento de 320 microbiomas

placentários com os dados do HMP comprovou que o microbioma da placenta não se assemelha a microbiomas vaginais ou intestinais da mãe, como se acreditava anteriormente, mas pelo menos um nível de filo é mais semelhante ao microbioma bucal normal, especialmente o da língua e amígdalas (Aagaard et al. 2014). Acredita-se, então, que durante a gravidez, a placenta se torne um local de coleta de antígeno para o sistema imunológico fetal ser treinado em tolerância, por meio de uma rota hematogênica de micróbios indígenas (Zaura et al. 2014).

Segundo Niederman (2013), uma possível explicação para o desenvolvimento do core microbiano e do consequente sistema imunológico fetal seria o fato das gestantes apresentarem aumento do sangramento gengival, o que torna possível o aparecimento de bactérias orais da mãe estarem disponíveis no sangue e, assim, obterem acesso à placenta (Niederman 2013). As células microbianas são, então, aprisionadas no tecido placentário para serem apresentadas ao sistema imunológico fetal. No período pré-natal, as células apresentadoras de antígenos fetais (APCs) interagem com os antígenos microbianos da mãe e retornam aos órgãos linfoides periféricos fetais. O feto possui um grande número de células T (Tregs) com atividade imunossupressora (Takahata et al. 2004), como resultado, o feto desenvolve tolerância pré-natal ao microbioma da mãe e o considera seguro durante os encontros pós-natal com essas bactérias. Se, então, a colonização da cavidade bucal e do trato gastrointestinal está relacionada à tolerância adquirida pelo feto e impacta no desenvolvimento da saúde do recém-nascido, esta deve ser mais estudada e investigada.

Após o nascimento, começa, então, a ocorrer a transmissão vertical, da mãe para o filho. A forma do parto, normal ou cesária, determina quais microrganismos serão primeiramente encontrados no recém-nascido (Dominguez-Bello et al. 2010). Tal fato afeta a diversidade do microbioma: bebês nascidos de parto normal mostram maior diversidade taxonômica aos 3 meses de idade (Lif Holgerson et al. 2011). Curiosamente, o modo do parto pode ter um impacto duradouro, já que bebês nascidos por cesarianas, adquirem *Streptococcus mutans* quase um ano antes quando comparados aos nascidos de parto natural (Li et al. 2005). O método de amamentação também intervém no microbioma bucal do bebê, que, quando alimentados, apresentam *Lactobacillos* orais com propriedades antimicrobianas, não encontrados em recém-nascidos amamentados por fórmulas (Lif Holgerson et al. 2011)(Holgerson et al. 2013)(Romani Vestman et al. 2013). Além do mecanismo de

transmissão vertical, há a transmissão horizontal, entre irmãos e outras pessoas próximas que compartilham microbiota, favorecendo a colonização central da criança (Baca et al. 2012)(Stahringer et al. 2012)(Zaura et al. 2014).

Utilizando o sequenciamento do gene 16S rRNA, Jorn et al., em 2005, propuseram técnicas de cultura independente com o propósito de ampliar o conhecimento sobre a diversidade bacteriana na cavidade bucal humana saudável, incluindo filotipos ainda não cultivados. Sabe-se que diferentes superfícies apresentam microrganismos distintos, devido às adesinas presentes nas diferentes bactérias que se ligam de forma específica aos receptores de células de cada tecido (Gibbons, Spinell, and Skobe 1976)(Gibbons 1989). Por este motivo, cinco indivíduos, representando ambos os sexos, sem sinais clínicos de cárie ou doença periodontal, foram avaliados. Os microrganismos coletados foram os de nove diferentes superfícies: dorso da língua, laterais da língua, epitélio oral, palato duro, palato mole, placa supragengival, placa subgengival, vestibulo anterior maxilar e amígdalas (Aas et al. 2005). Um total de 141 diferentes táxons bacterianos foram encontrados, representando 6 diferentes filós: **Firmicutes** (espécies como *Streptococcus*, *Gemella*, *Eubacterium*, *Selenomonas*, *Veillonella* e semelhantes), **Actinobacteria** (*Actinomyces*, *Atopobium* e *Rothia*), **Proteobacteria** (espécies: *Neisseria*, *Eikenella*, *Campylobacter* e semelhantes), **Bacteroidetes** (*Porphyromonas*, *Prevotella* e *Capnocytophaga*), **Fusobacteria** (*Fusobacterium* e *Leptotrichia*), e o filo **TM7**. Mais de 60% da microbiota bacteriana foi representada por filotipos ainda não cultivados (**Fig. 1**) (Aas et al. 2005).

Algumas espécies como *S. mitis* e *G. adiacens* foram encontradas em quase todos os sítios pesquisados, enquanto outras demonstraram-se bem específicas como *R. dentocariosa*, *Actinomyces spp.*, *S. sanguinis* e *S. gordonii*, que foram mais encontradas em superfícies dentárias, enquanto *S. salivarius* foi mais encontrada no dorso da língua. *S. sanguinis* e *S. australis* demonstraram preferência por tecidos moles. *S. intermedius* foi bastante encontrada na placa subgingival, mas também coloniza muitos outros sítios. *Neisseria spp.* não foi encontrada na placa subgengival, mas sim em outros sítios. Muitas espécies de *Prevotella* foram encontradas em vários ambientes, mas apenas em dois pacientes. Pode-se concluir, então, que existe uma flora bacteriana muito complexa e distinta quando em situação de saúde e de doença, e, em ambos os casos, dependente da superfície de colonização. Muitas espécies associadas à doença periodontal, por exemplo *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella*

forsythia e *Treponema denticola*, não foram detectadas em situação de saúde, em nenhum sítio, o que nos faz associá-las somente à quadros de enfermidades. Bactérias normalmente associadas à cárie, *S. mutans*, *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.*, também não foram detectadas em placas supra e sub de dentes saudáveis. No geral, ainda há mais espécies a serem descobertas, mas esse estudo já nos traz uma ampla visão da alteração existente entre os quadros de saúde e doença, e nos auxilia em diagnósticos, prevenção e até possíveis prescrições medicamentosas (Aas et al. 2005).

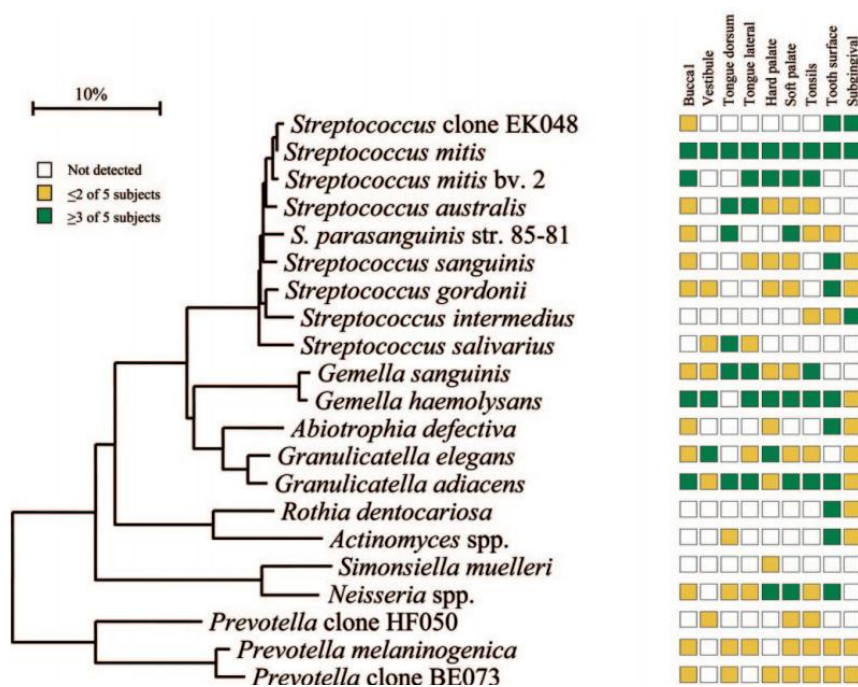


Figura 1. Imagem apresentada no artigo de JØrn *et al.*, 2005, mostrando a especificidade de sítio das espécies bacterianas mais predominantes na cavidade oral livre de doença.

Em um estudo mais recente, de 2020, vinte indivíduos saudáveis tiveram seus microbiomas avaliados por sequenciamento do genoma completo (*Whole Genome Sequencing: WGS*) e em PCR quantitativo em tempo real. Neste estudo, agora, foram avaliados oito sítios da cavidade oral: dorso da língua, palato duro, mucosa bucal, gengiva queratinizada, placa supra e subgengival e saliva (duas formas de coleta: expectoração e bochecho). Como no estudo anterior, cada nicho evidenciou uma comunidade microbiana diferente (Caselli et al. 2020).

Embora existam diferenças interindividuais, a função principal de desenvolvimento fisiológico, nutricional e defensivo é a mesma para todos os indivíduos. O estudo de Caselli superou o método que sequencia parcialmente o gene

16S rRNA, mais amplamente utilizado e mais acessível, pois apresenta melhor a resolução em nível de espécie, além de identificar o microbioma bucal não procarioto, que inclui fungos, vírus e protozoários. Nesse estudo, os autores detectaram pelo menos 218 gêneros e 570 espécies, incluindo bactérias, fungos e vírus (Caselli et al. 2020).

Streptococci foi o gênero mais abundante da mucosa, representando 12-23% da quantidade total de gêneros encontrados em todos os sítios, incluindo a língua (12%), placa supragengival (13%), placa subgengival (15%) e saliva, por expetoração (15%) e bochecho (23%). Os gêneros *Neisseria*, *Prevotella* e *Haemophilus* também foram bastante prevalentes em quase todos os sítios (6-29% do total de bactérias encontrados). Bactérias pertencentes ao gênero *Rothia* foram abundantes, variando de 4-24% em todos os sítios, exceto na gengiva queratinizada, onde era escassa. *Actinomyces*, *Veillonella* e *Fusobacterium* foram menos prevalentes e particularmente encontradas na placa subgengival. *Simonsiella* foi detectada quase exclusivamente no palato duro. Em nível de espécie, *Streptococcus mitis* foi o mais prevalente, seguido por *S. oralis*, *S. salivarius* e *S. sanguinis*. O cariogênico *S. mutans* foi detectado em pequenas quantidades, diferente do estudo anterior, onde não fora encontrado, talvez por dispor de método de sequenciamento não tão evoluído (Caselli et al. 2020).

Dentre os microorganismos eucariotos, foram encontrados principalmente as *C. albicans*. Os fungos, no entanto, representam uma porcentagem muito baixa do microbioma total (0,004%) e foram quase exclusivamente detectados no palato duro, placas sub e supra e amostras de enxágue oral. Protozoários não foram encontrados, diferentemente dos vírus, que se apresentaram, em sua maioria, na mucosa e na placa supragengival, representando 0,03% da contagem total de micróbios, sendo a maioria bacteriófago. Curioso foi que a saliva coletada por bochecho mostrou-se mais representativa, quando comparada a saliva expetorada (Caselli et al. 2020). A figura 2 representa um resumo das diferenças entre as amostras, mas não expressa detalhes delas, uma vez que os sítios são diferentes e não podem ser comparados da mesma forma. As árvores representam as diferenças na abundância de cada táxon nas amostras analisadas (**Fig. 2**).

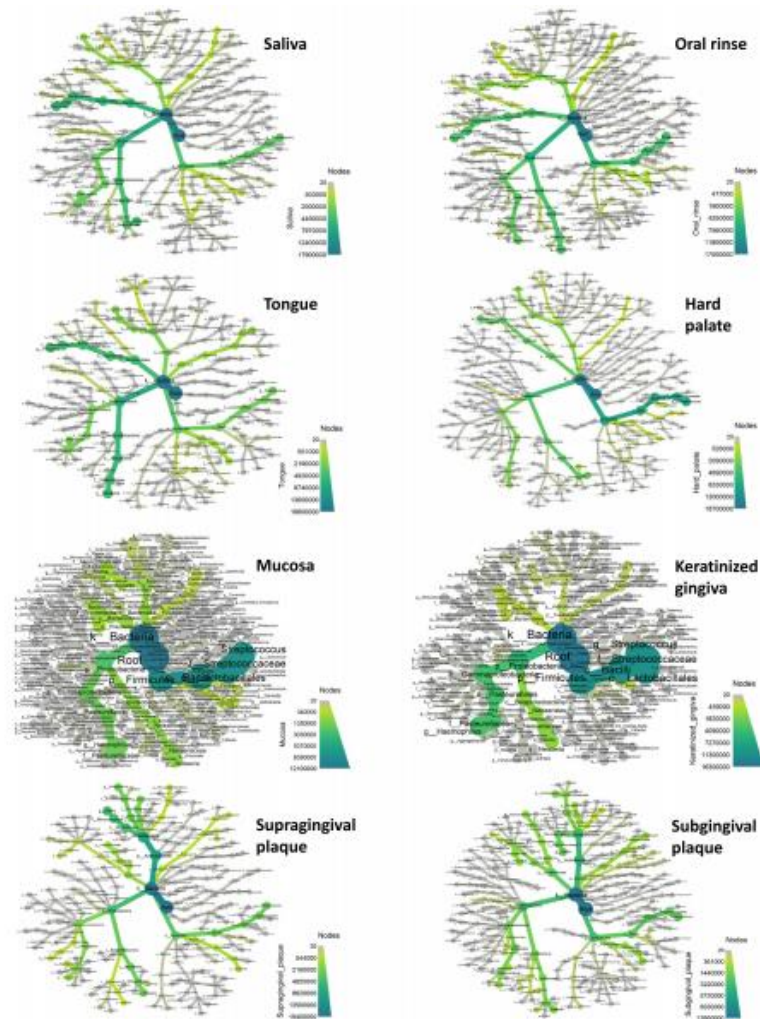


Figura 2. Representação gráfica, utilizando de árvore filogenética, da diversidade nos diferentes *habitats* orais estudados por Caselli *et al.*, 2020: saliva e saliva após bochecho, língua, palato duro, mucosa, gengiva ceratinizada e placas sub e supragengival.

Como vimos acima, muitos estudos avaliam o comensalismo do microbioma da boca concentrando-se no fator saúde. Isso é relevante, pois para diagnosticar e tratar doenças em um estágio inicial e reversível é necessário um amplo estudo do microbioma no estado de saúde e, também, em seu estado de transição. Nos biofilmes dentais, isso se torna essencial para melhor compreender doença cárie e periodontite.

Um biofilme dental toma forma ao longo de algumas horas. Culturas de microrganismos encontradas na superfície limpa de esmalte foram avaliadas, e, após 8 horas de introdução na cavidade bucal, identificou-se a presença de *Streptococcus spp.*, principalmente *S. mitis* e *S. oralis*, como primeiros colonizadores mais predominantes (Diaz *et al.* 2006). Outros gêneros comumente encontrados nesta etapa foram *Actinomyces*, *Gemella*, *Neisseria* e *Veillonella*. Durante o

desenvolvimento subsequente da placa, o equilíbrio dos primeiros colonizadores muda (Dige et al. 2009). No entanto, muitos desses colonizadores pioneiros, como o *Streptococcus*, *Neisseria*, *Abiotrophia*, *Gemella* e *Rothia* permanecem relativamente estáveis na placa por vários dias (Takeshita et al. 2015). O período de 18 horas a 4 dias de formação de placa tem sido descrito como fase de “pré-organização”, uma vez que os pioneiros permanecem como os mais abundantes do meio (Takeuchi and Yamamoto 2001). A diversidade de espécies vai aumentando gradualmente e bactérias anaeróbias como *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Veillonella* e *Capnocytophaga* ganham espaço e vão se tornando uma proporção significativa da população geral (Takeshita et al. 2015).

Dentro do biofilme, muitos táxons diferentes coexistem e interagem uns com os outros. Cada tipo de célula utiliza substratos diferentes do meio externo e secreta outro produto. Microrganismos vizinhos podem, assim, sentir a mudança do meio. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por exemplo, é produzido *in vitro* por alguns estreptococos orais, que inibem o crescimento de outras espécies (Jakubovics et al. 2008)(Liu, Tong, and Dong 2012), mas, em concentrações subletais, o H_2O_2 é uma molécula de sinalização que desencadeia a resposta de *C. albicans* (da Silva Dantas et al. 2010)(Hossain et al. 2015). Ácidos orgânicos e bacteriocinas, peptídeos antimicrobianos, podem mediar o antagonismo, fenômeno em que uma espécie impede, pela sua presença, o desenvolvimento de outra, ou o sinergismo, efeito favorecedor de um microrganismo sobre o outro, dependendo da situação. As bacteriocinas, que são produzidos por diferentes tipos de bactérias, incluindo *Streptococcus spp.* e *Lactobacillus spp.*, possuem atividade potente contra seus organismos-alvo e são consideradas responsáveis por efeitos benéficos das cepas probióticas (Messaoudi et al. 2013). A expressão de genes de bacteriocinas em muitas espécies está ligada à indução de competência para transformação genética, o que poderia estar intimamente relacionado ao desempenho de funções importantes na liberação de DNA (ácido desoxirribonucleico) para troca genética (Lemme et al. 2011), aumentando a capacidade adaptativa das espécies da placa às mudanças no ambiente predominante. Essas funções certamente ocorrem tanto em biofilmes em saúde quanto em doença. É possível, então, incorporar informações biológicas sobre o metabolismo derivadas da análise de sequências do genoma ao estudo das doenças causadas por biofilmes.

A composição da microbiota oral é significativamente afetada pela interrelação

entre as espécies de microrganismos, o que impacta, também, a saúde e a doença do hospedeiro (Kreth, Merritt, and Qi 2009). A saúde e equilíbrio da biologia bucal são importantes na manutenção da resposta imune local, relacionada com a imunidade do hospedeiro como um todo (Petersen and Round 2014)(Idris et al. 2017)(Gao et al. 2018). Conceitua-se “eubiose” as relações simbióticas/comensais equilibradas, ou seja, a homeostasia microbiana. À alteração deste equilíbrio dá-se o nome de “disbiose” (Petersen and Round 2014)(Radaic and Kapila 2021). A disbiose pode ocorrer em três situações diferentes: **I.** perda geral da diversidade microbiana, **II.** perda de micróbios benéficos ou **III.** aumento de microrganismos patogênicos (Petersen and Round 2014). Em seguida, discutiremos como esse equilíbrio pode ser perdido em situações onde o hospedeiro sofre de alguma doença crônica, como a Diabetes mellitus.

1.2.2 O estudo do microbioma salivar

A saliva tem sido utilizada em diversos estudos epidemiológicos como marcador biológico tanto para doenças orais como para doenças sistêmicas, por ser um método não invasivo, de fácil coleta e excelente para análise microbiológica de inúmeras localidades como mucosa oral e placa sub e supra gengival. O grande desafio sempre foi padronizar estudos epidemiológicos que, comumente, apresentam metodologias de coleta salivar diferentes. A saliva pode ser coletada de forma estimulada, não-estimulada, *swab* ou por bochecho bucal. Muito pouco se sabe sobre as potenciais diferenças existentes entre esses métodos, e como cada um deles pode refletir no resultado de determinado estudo. Gomar-Vercher et al., em 2018, decidiram então avaliar os microrganismos presentes após os diferentes meios de coleta salivar, para que assim pudessem determinar a melhor metodologia para cada objetivo. Este estudo avaliou a saliva não estimulada, coleta com o auxílio de pontas de papéis, e a estimulada, conseguida após o paciente mascar uma goma de parafina. Dez indivíduos tiveram o DNA extraído das amostras de saliva e o estudo da diversidade microbiana avaliado por pirosequenciamento do gene 16S rRNA. Os resultados mostraram diferenças significativas entre a microbiota desses dois tipos de saliva. Descobriu-se que a saliva estimulada contém um número estimado de espécies três vezes maior do que a não estimulada. Além disso, a composição em nível de classe e gênero é radicalmente diferente em ambas as amostras salivares (Gomar-Vercher

et al. 2018).

Os resultados desse estudo apresentaram que as amostras de saliva não estimulada possuíam em média 600 OTUs em nível de espécie bacteriana, enquanto a saliva estimulada possuía mais de 2000 OTUs, indicando que o último tipo de amostra possui diversidade muito maior, como citado. Observou-se que a saliva não estimulada é caracterizada por bactérias dominantes do ecossistema, *Streptococci*, enquanto na estimulada há uma representação mais uniforme de um maior número de espécies bacterianas orais. A proporção de *Bacilos* na saliva estimulada variou de 15 a 40%, enquanto nas amostras de saliva não estimulada eles excederam 50% do total em 7 dos 10 pacientes. No nível gênero, *Streptococcus* ocupa 10-35% das sequências totais na saliva estimulada, seguido por *Neisseria* (7-25%), *Prevotella* (2-25%) e *Veillonella* (6-22%). *Fusobacterium* não ultrapassa 10% do total, e o nível máximo de *Porphyromonas* foi de 7%. Esses dois habitantes típicos do biofilme aparecem em menor quantidade na saliva não estimulada, provavelmente devido à movimentação do biofilme durante a mastigação da parafina na coleta de saliva estimulada. O gênero *Streptococcus* é o mais abundante nas amostras de saliva não estimulada (Gomar-Vercher et al. 2018).

Belstrøm et al. (2016) encontraram resultados diferentes e afirmaram que os perfis microbianos de amostras de saliva não estimulada e estimulada coletadas da mesma pessoa não apresentam diferença estatística, talvez pelo fato de neste estudo a saliva estimulada inicial ter sido descartada, coletando-se, assim, apenas a saliva expectorada por 3 minutos após o término da mastigação de parafina. Pesquisas futuras, então, devem esclarecer esse ponto de discordância (Belstrøm et al. 2016).

Em estudos relacionados à cárie, o biofilme é a amostra mais indicada, pela especificidade com os locais onde há sinais da doença. Porém, quando indivíduos com alguma alteração sistêmica estão sendo avaliados, a saliva pode ser um marcador mais adequado, uma vez que o biofilme é alterado devido a condição salivar modificada pela enfermidade. Assim sendo, o escopo da identificação de bactérias na saliva de pacientes diabéticos, portadores de níveis de glicose elevado no sangue e nos fluídos corporais em geral, seria identificar os microrganismos mais presentes em ambientes ricos em açúcares, para que assim, possivelmente, tenhamos como intervir ou inibir o crescimento deles em todo e qualquer paciente, evitando ou controlando a doença cárie, por exemplo.

1.2.3 Hiperglicemia da Diabetes mellitus e sua relação com o aumento da glicose salivar

Uma vez que as bactérias bucais desenvolvem um importante papel na patogenia de doenças crônicas, influenciando a inflamação sistêmica, é de fundamental importância que sejamos capazes de avaliar se a microbiota de pacientes que apresentam comorbidades é diferente. Sendo essa diferente, pode-se saber como intervir para torná-la menos patogênica e de menor risco. Notou-se, assim, a importância de melhor associar e explicar a interrelação desses fatores, microbiota e doença crônica (Long et al. 2017). A taxonomia, então, ganhou espaço, identificando e classificando bactérias existentes em uma situação médica específica (Lange et al. 2011).

Para melhor compreensão das alterações taxonômicas da microbiota bucal causadas pela hiperglicemia, é preciso recordar as possibilidades de avaliação desse aumento de glicose no sangue. Idealmente, a glicose sanguínea deve apresentar-se <100mg/dL, em jejum (Sociedade Brasileira de Diabetes 2019). A porcentagem de hemoglobina glicada (HbA1c) também é de extrema importância, uma vez que está diretamente associada à hiperglicemia, e refere-se a um conjunto de substâncias formado com base em reações entre a hemoglobina A (HbA1c) e alguns açúcares. O processo de glicação de proteínas envolve uma ligação não enzimática e permanente com açúcares redutores como a glicose. A HbA1c é um componente menor da hemoglobina, encontrada em proporções de 1-4% em pacientes adultos não-diabéticos. Os níveis acima de 6,5- 7,0% estão associados a um risco maior de complicações crônicas (Netto et al. 2009). O exame de urina também avalia a quantidade de açúcar nesta presente (Mascarenhas, Fatela, and Barahona 2014). Normalmente, o organismo elimina a glicose através da urina apenas quando os níveis de glicose no sangue estão alterados. Em pacientes saudáveis, a glicose sanguínea é filtrada pelos rins e completamente reabsorvida para o sangue. Outro exame comumente utilizado é o de curva glicêmica, realizado em jejum de 8 -14 horas, durante o período da manhã, onde a glicose deve ser coletada 2 ou mais vezes, de acordo com o pedido médico, a cada 2 horas. A primeira coleta representa o valor glicêmico em jejum, que deve estar abaixo de 100mg/dL. Os demais resultados, obtidos após ingestões de água com açúcar, devem estar abaixo de 140mg/dL (Hechanova 2019).

O processo de glicação de proteínas não se restringe apenas às ligações da glicose com a hemoglobina. Tal processo diz respeito a fusão de diversas outras proteínas com o carboidrato em questão, contribuindo para formação dos chamados produtos finais da glicação avançada (*Advanced Glycation End Products* [AGEs]), os quais interferem demasiadamente nas complicações da DM. É importante ressaltar que a hemoglobina glicada reflete os níveis de glicose no sangue relacionado aos últimos 3-4 meses, o que torna esse exame mais confiável do que a aferição de glicose no sangue, que reflete a quantidade de açúcar presente apenas no momento do teste, o que pode ser alterado por consumo de algum alimento específico, por exemplo (Netto et al. 2009). Já a glicosúria é uma expressão médica utilizada para descrever a quantidade de glicose na urina, outro sintoma da DM. Quando alguma quantidade de glicose é identificada neste fluido, pode-se desconfiar da presença de DM. Porém, o exame de sangue ainda continua sendo o guia para rastreamento, monitoramento e diagnóstico de DM (Mascarenhas, Fatela, and Barahona 2014).

Vários estudos já haviam mostrado que a DM altera o fluxo salivar (Abikshyeet, Ramesh e Oza 2012)(Mahdavi et al. 2012)(Agrawal et al. 2013)(Mascarenhas, Fatela e Barahona 2014). Um possível motivo pode ser o acúmulo de lipídios nas glândulas salivares, que provoca alterações degenerativas, fazendo-as perder sua função adequada devido à desidratação causada pela hiperglicemia (Murrah 1985)(Rai et al. 2011). A alteração salivar, consequência dessa comorbidade, é uma questão importante para a manutenção da saúde bucal.

Naseri et al. em uma revisão sistemática com meta-análise, realizada em 2018, encontraram 20 estudos que comparavam a glicose salivar de pacientes com DM com a glicose salivar de pacientes saudáveis. O resultado encontrado foi um nível de glicose salivar significativamente maior em pacientes pertencentes ao grupo de estudo (Naseri et al. 2018). Os 20 estudos foram divididos em 2 subgrupos de acordo com a condição da amostra salivar, que poderia ter sido coletada com o paciente em jejum ou não. Em ambas as situações, o nível de glicose salivar foi significativamente maior nos pacientes com DM do que nos controles saudáveis. Dez desses estudos (Amer et al. 2001)(S. Kumar, Padmashree, and Jayalekshmi 2014)(Satish et al. 2014)(P. Abikshyeet, Ramesh, and Oza 2015)(S. Gupta et al. 2015)(Indira et al. 2015)(Mussavira, Dharmalingam, and Omana Sukumaran 2015)(Mussavira, Dharmalingam, and Omana Sukumaran 2015)(Ravindran, Gopinathan, and Sukumaran 2015)(Dhanya and Hegde 2016) demonstraram uma correlação entre os

níveis de glicose salivar e os níveis de glicose sérica em pacientes com DM, o coeficiente r foi $>0,75$ em sete estudos. Já outros dois desses estudos também mostraram correlação, porém, sem significância estatística (A. Gupta et al. 2015)(Indira et al. 2015). A estimativa combinada entre os estudos mostrou que há sim uma correlação significativa entre glicose salivar e glicose sanguínea.

Naseri et al. ainda comprovaram, analisando cinco outros estudos (Panda. Abikshyeet, Ramesh, and Oza 2012)(S. Kumar, Padmashree, and Jayalekshmi 2014)(Satish et al. 2014)(P. Abikshyeet, Ramesh, and Oza 2015)(Mussavira, Dharmalingam, and Omana Sukumaran 2015)(Dhanya and Hegde 2016), na mesma revisão sistemática, que há correlação entre glicose salivar e os níveis de glicose sérica também no grupo controle. A estimativa combinada mostrou uma correlação significativa entre ambos os níveis de glicose em pacientes saudáveis.

Quando a hiperglicemia se mantém crônica na saliva pode haver uma redução na capacidade dos fibroblastos de sintetizar fibras do tecido conjuntivo, o que torna mais difícil o processo de cicatrização, e também um aumento na produção de ácido láctico (Seethalakshmi et al. 2016), reduzindo o pH salivar e, conseqüentemente, alterando o microambiente biológico. Segundo Goodson et al. (2017), quando há hiperglicemia na saliva, o natural seria que ocorresse um aumento do nível de síntese bacteriana de metabólitos ácidos, visto que entre 39,9% e 44,2% das bactérias salivares são *Firmicutes* acidogênicas. De fato, a presença de carboidratos na dieta é bem reconhecida como um estímulo para o pH salivar reduzido, devido ao metabolismo de carboidratos por bactérias acidogênicas orais. Portanto, de acordo com esse modelo, o aumento de glicose no sangue em pacientes com DM tipo 2 leva a níveis elevados de concentração de glicose salivar, uma aumento da síntese de metabólitos ácidos por bactérias e, conseqüentemente, à acidificação do meio bucal (Goodson et al. 2017a).

Goodson et al., em um estudo concluído e publicado em 2017, descobriram que mais de 50% das bactérias contidas em amostras de saliva são representadas por 7 principais espécies (*N. mucosa*, *E. corrodens*, *S. mitis*, *P. melaninogenica*, *V. parvula*, *S. oralis* e *S. salivarius*). A contagem de bactérias salivar geral diminuiu com o aumento da glicose salivar. Já na consideração de espécies bacterianas individuais, 88% das 42 espécies mostraram diferença quantitativa quando comparadas em meio com maior ou menor quantidade de glicose salivar (Goodson et al. 2017a).

Sendo a glicose uma fonte de energia para muitas bactérias, presume-se que

uma vez que a quantidade de glicose é alterada, o microbioma deve, também, ser modificado. No entanto, como Goodson et al. relatam, não era esperado que a contagem de bactérias gerais diminuísse, mas sim, aumentasse. Notou-se, então, que muitas das espécies mais afetadas pela alteração de glicose salivar eram assacarolíticas, como é o caso da *P. nigrescens*, *P. intermedia* e *P. melaninogenica*. A hipótese levantada foi a de que quando a concentração de glicose no sangue ultrapassa 84,8mg/dL, a glicose começa a aparecer na saliva, alterando, assim, o meio microbiano (Goodson et al. 2017a).

Aqueles que investigam o papel das bactérias no trato gastrointestinal como causa da obesidade, geralmente buscam a identificação de bactérias patogênicas específicas. Essas observações, embora variáveis, relatam que a obesidade está associada a altas proporções de *Firmicutes* e proporções reduzidas de *Bacteroidetes* (Ley et al. 2005) no microbioma oral, o que é bastante semelhante aos achados de Goodson et al. O microbioma intestinal interage com a genética do hospedeiro e codifica várias proteínas essenciais necessárias para a saúde e doenças humanas. Xu e Gordon sugeriram que os microrganismos podem modificar a expressão gênica no hospedeiro para criar homeostase fisiológica ou para eliciar a patogênese de certas enfermidades (Xu and Gordon 2003). Então, qualquer mudança significativa na diversidade bacteriana pode afetar o perfil de fermentação intestinal, a permeabilidade da parede intestinal e a imunidade mucosa e sistêmica e, portanto, pode desencadear mecanismos responsáveis pelo estresse oxidativo, endotoxemia, obesidade e hiperglicemia (Sohail et al. 2017). As diferenças na composição bacteriana intestinal entre pessoas obesas e não obesas podem ser, então, em grande parte, consequência da hiperglicemia, e não a causa desta. Além disso, uma vez que as bactérias gástricas são introduzidas pela cavidade oral, é possível que um pH salivar reduzido, devido à hiperglicemia, possa atuar como um filtro para inibir a reposição de *Bacteroidetes* gástricos, enquanto transmite mais facilmente espécies de *Firmicutes* (Goodson et al. 2017a).

Apesar dos efeitos nocivos que um desequilíbrio no microbioma podem causar, uma eliminação total dele não seria a melhor opção a se pensar, uma vez que esse também oferece saúde ao hospedeiro. Dentre as técnicas atuais para modular o microbioma disbiótico podemos citar as técnicas tradicionais de higiene oral, peptídeos antimicrobianos, prebióticos e probióticos (Radaic and Kapila 2021).

A DM, quando não controlada através do uso de medicações antidiabéticas

orais ou por meio da insulinização exógena (Sociedade Brasileira de Diabetes 2014), pode gerar complicações na cavidade bucal (Anthony and Vernillo 2003). Gengivite e periodontite, hipossalivação e/ou xerostomia associada à alteração das glândulas salivares, aumento de infecções, perda dentária e uma total desorganização da microbiota natural, gerando um desequilíbrio microbiológico, que pode ser responsável até mesmo pelo aumento de lesões cáries, foco principal deste trabalho (D. D. S. Vernillo and Anthony 2001). O cirurgião-dentista deve estar sempre atento para avaliar esta situação e intervir com tratamentos iniciais e não invasivos como aplicações tópicas de flúor, bochechos contendo fluoretos e salivas artificiais para os casos de hipossalivação.

1.2.4 Manifestações orais da Diabetes mellitus

1.2.4.1 Diabetes mellitus e a doença periodontal

Existe uma relação bidirecional entre a DM e a periodontite. A inflamação que ocorre no periodonto pode contribuir para o início e persistência da hiperglicemia (Albandar, Susin, and Hughes 2018). A periodontite severa afeta os níveis de glicose sanguínea, tanto em pacientes com DM como nos pacientes saudáveis, e a hiperglicemia, comum da DM, afeta a microbiota periodontal (Taylor, Preshaw, and Lalla 2013). Ou seja, o controle glicêmico deficiente parece modular o microbioma subgingival e está relacionado a uma microbiota mais patogênica (Miranda et al. 2017)(Longo et al. 2018). No entanto, ainda não está claro se as diferenças de microbioma entre pacientes portadores de DM e pacientes saudáveis refletem o impacto do estado diabético nas bactérias ou simplesmente resultam em periodontite mais grave. A hiperglicemia crônica pode interferir, também, na resposta do hospedeiro, incluindo defeitos de neutrófilos, monócitos e aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias (Albandar, Susin, and Hughes 2018).

De forma resumida, a DM agrava a DP por alterações na composição do fluido gengival, mudança nos tecidos periodontais, alterações nas funções imunológicas e no sistema RANKL (sistema receptor ativador do fator nuclear kappa I^2 ligante), fator mais importante para a diferenciação dos osteoclastos (Taylor, Preshaw, and Lalla 2013)(Sonnenschein and Meyle 2015). Por outro lado, os mecanismos biológicos pelos quais a periodontite afeta a DM e leva à sua complicação estão relacionados à

elevação dos mediadores pró-inflamatórios, que podem levar a uma redução da função das células beta, e, conseqüentemente, resistência à insulina (Hasturk and Kantarci 2015). O aumento no nível de citocinas (interleucina-1 β , interleucina-6 e fator de necrose tumoral- α) tanto no tecido periodontal quanto no fluido crevicular pode influenciar nas condições locais e reação imune dos tecidos (Sonnenschein and Meyle 2015).

Níveis elevados de glicose no sangue levam ao acúmulo excessivo de produtos de glicação avançada (AGEs) nas células e tecidos periodontais e pulpar (Katz et al. 2005)(Singh et al. 2014). Os AGEs podem se ligar a receptores de membranas de diferentes células (RAGEs) e, assim, alterar a expressão fenotípica. A interação entre AGEs e RAGEs leva ao estresse oxidativo celular, resultando em maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), ocasionando uma desregulação crônica e um desequilíbrio dos níveis local e circulante de citocinas pró-inflamatórias, aumentando a secreção do fator de necrose tumoral (TNF- α) e Interleucina 1- β , que podem levar aos danos e periodontais (Sonnenschein and Meyle 2015)(Hasturk and Kantarci 2015).

Em 2017, a *European Federation of Periodontology* (EFP) e a *American Academy of Periodontology* (AAP) criaram uma nova classificação para as doenças periodontais (Dietrich et al. 2019). Na atual classificação da DP, o DM é um fator de risco reconhecido e também modula o grau da doença, sendo o menor grau (grau A) associado com a normoglicemia e o grau C associado com uma descompensação glicêmica, ou seja, níveis de hemoglobina glicada superiores a 7,0%.

O biofilme subgengival é distinto nas populações microbianas da gengivite crônica e tende a ser enriquecido em anaeróbios obrigatórios, como *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia*, *Filifactor alocis*, *Treponema denticola* e *Fretibacterium sp.* (Griffen et al. 2012)(Park et al. 2015). Dentes periodontalmente afetados apresentam os colonizadores pioneiros, *Actinomyces*, por exemplo, como os que permanecem aderidos à superfície da placa subgengival associada à periodontite, enquanto espécies como *P. gingivalis* estão predominantemente nas camadas externas, mais próximo ao tecido gengival (Zijngel et al. 2010). *F. nucleatum* e *T. forsythia* são mais comumente encontrados na camada intermediária da placa dentária, onde existe a interação com os colonizadores iniciais e com os tardios (Jakubovics 2015). Já o biofilme subgengival do diabético apresenta proporções menores de famílias de *Firmicutes*, *Lachnospiraceae* e

Peptostreptococcaceae. Ao nível de espécies, os sítios subgengivais de portadores de DM apresentam proporções significativamente diferentes de várias espécies dentro de *Firmicutes*. Dentro do filo das *Spirochaetae*, indivíduos com hiperglicemia possuem menores proporções de espécies/filótipos de *Treponema*, como *Treponema parvum*, *Treponema* HOT.231, HOT.238, HOT.250, HOT.256, HOT.490 e HOT.517, além de níveis mais elevados de *Prevotellaceae* (Longo, Dabdoub, and Kumar 2018).

1.2.4.2 Hipossalivação e xerostomia

A hipossalivação é a redução do fluxo salivar (von Bültzingslöwen et al. 2007), enquanto a xerostomia pode ser definida como sendo uma sensação subjetiva de boca seca, podendo estar associada a diminuição da produção de saliva (Guggenheimer and Moore 2003). Alguns pacientes apenas sentem a diferença quando a taxa do fluxo salivar cai pela metade, dando origem a xerostomia (von Bültzingslöwen et al. 2007).

Uma das principais funções da saliva está relacionada à capacidade tampão, que mantém o pH oral. Quando o fluxo salivar é prejudicado, ou sua composição é alterada, vários sinais orais como aumento do risco de cárie e doenças periodontais podem ser observados (Sharon et al. 1985). A DM pode levar a mudanças marcantes na secreção e composição salivar, mesmo quando os pacientes estão bem controlados. A DM do tipo 2 apresenta menos alteração salivar do que a DM do tipo 1, talvez pelo fato de ocorrer mais tardiamente (R. Cao et al. 2019).

Alterações na mucosa, língua fissurada, úlceras e dificuldades em manter as próteses aderidas são algumas das principais consequências da diminuição do fluxo salivar (Negrato and Tarzia 2010)(M. F. Silva et al. 2015).

1.2.4.3 Diabetes mellitus e as doenças orais fúngicas

A *Candida sp.* é um microorganismo oportunista, ou seja, ele está presente de forma natural na cavidade oral, mas, quando em grande quantidade pode se tornar bastante patogênico. Além disso, possui múltiplos fatores de virulência que podem auxiliar na penetração de tecidos do hospedeiro (Gome et al. 2017).

As manifestações fúngicas orais em pacientes portadores de DM são comuns. Estas infecções secundárias ocorrem principalmente devido a uma disfunção

imunológica. As doenças fúngicas mais comuns nestes pacientes são a candidíase, a queilite angular e a estomatite dentária (Simões, Fonseca, and Figueiral 2013)(Yamashita et al. 2013)(Prado and Vaccarezza 2013). Todas essas condições são causadas pela espécie *Candida sp.*, como resultado de uma hiperglicemia, da baixa imunidade e, também, de um baixo fluxo salivar (A. T. Vernillo 2003)(Bremenkamp, Caris, and Jorge 2011). A candidíase está associada a 67% dos casos de DM (Trentin, Verardi, and De C Ferreira 2017).

1.2.4.4 Diabetes mellitus e o tratamento endodôntico

Pacientes com DM apresentam o sistema imunológico e o processo cicatricial de feridas comprometidos, o que pode apresentar, como consequência, um aumento da prevalência de doenças endodônticas e gravidade das lesões periapicais. A periodontite apical consiste em uma lesão inflamatória localizada no ápice do dente, causada por infecção pulpar presente no sistema de canais radiculares (Segura-Egea et al. 2016)(Arya et al. 2017). Estudos indicam, ainda, uma relação existente entre a DM e a diminuição da taxa de sucesso do tratamento endodôntico, com alta prevalência de microrganismos no sistema de canais (Segura-Egea, Castellanos-Cosano, and Machuca 2012)(Nayak et al. 2013)(Sasaki et al. 2016).

Os níveis de DM provocam um resultado prejudicial no processo inflamatório (Segura-Egea, Castellanos-Cosano, and Machuca 2012), por exemplo, a inibição da função de macrófagos, quimiotaxia, fagocitose, infecção e o controle e proliferação celular podem comprometer a restauração da saúde pulpar ou do processo cicatricial do ápice (Fouad 2003). A DM a longo prazo, pode, também, resultar em angiopatia e espaçamento da membrana basal dos vasos da polpa, que afeta o fluxo sanguíneo, explicando, assim, o comprometimento do reparo nesses pacientes (Pishipati 2013). A maior quantidade de citocinas pró-inflamatória excretadas (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β e IL-6) favorecem uma resposta inflamatória exacerbada e uma maior destruição óssea periapical (S. M. F. Lima, Grisi, and Kogawa 2013).

1.2.4.5 Diabetes mellitus e a doença cárie

Hoje em dia, a teoria da “placa ecológica” é a mais aceita para explicar a etiologia da doença cárie (Marsh 2003). Tal hipótese afirma que o alto consumo de

açúcar leva a uma adaptação da bactéria comensal, favorecendo a sucessão de bactérias acidúricas e acidogênicas, inibindo organismos benéficos. A partir deste desequilíbrio, ocorre uma queda brusca no pH do meio, fazendo com que o dente perca minerais para a cavidade oral e para a saliva, como forma de buscar um equilíbrio na saturação (processo DES-RE) (Takahashi and Nyvad 2008)(Takahashi and Nyvad 2011)(Head, Devine, and Marsh 2017). Essa perda mineral acaba por enfraquecer e desmineralizar o tecido dentário em questão, iniciando o processo da cárie. A disbiose é causada, principalmente, pelo enriquecimento de certas espécies de *Streptococcus*, *Lactobacillus* e o gênero *Actinomyces*, os quais acredita-se que sejam os maiores responsáveis pela doença cárie em adultos (Marsh 2003)(He et al. 2015)(Radaic and Kapila 2021).

A ingestão frequente de açúcares na dieta seleciona uma população do biofilme dental acidogênica e acidúrica. A diversidade da população diminui durante o desenvolvimento da doença cárie (Simón-Soro et al. 2013), presumivelmente, devido à perda de espécies que não podem tolerar o baixo pH. No entanto, várias espécies de bactérias orais são bem adaptadas para viver em ambientes de pH ácido e algumas ainda são capazes de utilizar ácidos orgânicos como substrato de crescimento. *Veillonella spp.*, muito encontrada em lesões de cárie, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Actinomyces spp* são todas capazes de metabolizar ácido láctico (Takahashi and Yamada 1999)(Do et al. 2015).

Como a saliva tem papel protetor bem conhecido na doença cárie, alterações qualitativas e quantitativas na função salivar podem predispor à desmineralização dentária. As alterações salivares geram um desequilíbrio do meio, o que favorece o estabelecimento da microbiota cariogênica, como já citado anteriormente (Seethalakshmi, Jagat Reddy, et al. 2016)(Marsh et al. 2016). Além disso, a falta de controle nutricional e glicêmico de pacientes portadores de DM pode aumentar o risco à cárie. Por outro lado, pacientes com bom índice glicêmico podem apresentar baixa ingestão de açúcar, o que leva a diminuição das chances do aparecimento de lesões.

Um estudo realizado na cidade de Ahmedabad, na Índia, em 2016, mostrou que a prevalência de cárie no grupo diabético (tipo 2) foi de 73,33% e 33,33% no grupo não diabético. Tanto a prevalência quanto a média de superfícies cariadas foram maiores em portadores de DM não controlados, quando comparados aos controlados (Malvania et al. 2016). Um outro estudo, de 2012, concluiu que houve aumento dos níveis de antioxidantes salivares, redução do fluxo salivar e aumento da incidência de

cárie em pacientes portadores de DM tipo 2 (Rai et al. 2011). Seethalakshmi et al. (2016) notaram uma diminuição no pH salivar médio de 6,51 no grupo de estudo (DM 1 e 2), em comparação com o pH salivar médio normal de 7,88 no grupo controle. O índice CPOD (índice de dentes cariados, perdidos e obturados) médio também foi maior no grupo DM (Seethalakshmi, Reddy, et al. 2016). Jawed et al. (2011) afirmaram que a glicose sanguínea, a HbA1c e índice CPOD foram significativamente maiores em pacientes portadores de DM (Jawed et al. 2011).

Os mecanismos que explicam a maior prevalência de cárie associada à DM ainda precisam ser estudados. Como a DM apresenta alta prevalência, no Brasil e no mundo, é necessário compreender o padrão das manifestações orais dos pacientes que apresentam essa comorbidade para estratégias eficazes de prevenção e tratamento da cárie (IDF 2014). É importante levar em consideração que quando avaliamos a prevalência, o resultado pode diferir, dependendo do índice de cárie aplicado. O CPOD, uma medida da extensão da cárie relacionada ao histórico da doença, pode estar relacionado a uma vida de exposição à ingestão de carboidratos. Um índice que avalia a atividade de cárie, como o índice Nyvad (Nyvad and Baelum 2018), teria mais probabilidade de demonstrar uma correlação real entre cárie e a DM, sendo a doença sistêmica um maior risco para formação de lesões cariosas. De maneira geral, os estudos, em sua maioria, não investigam variáveis de confusão como a dieta dos indivíduos, que possivelmente explicam desfechos conflitantes (A. K. A. de Lima et al. 2020). Em 1937, o índice mais utilizado para avaliação da extensão de doença cárie foi criado por Klein e Palmer, o índice CPOD, obtido através da contagem de dentes cariados, perdidos e obturados/restaurados e utilizado até hoje. Existem certas falhas neste critério que foi adotado pela OMS em 1997, por exemplo, o fato de que na avaliação por tal índice a lesão cariada inicial, quando não cavitada, não entra na contagem para cálculo, ou o fato de não se saber se os dentes perdidos estão ou não associados à doença cárie, ou a classificação do paciente como “doente”, apresentando, apenas, lesões inativas cavitadas. Assim sendo, outros demais índices foram criados com o objetivo de suprir tais imperfeições. São alguns outros exemplos de classificação da cárie os índices Nyvad (2004) (Nyvad and Baelum 2018) e o ICDAS - Sistema Internacional de Detecção e Avaliação de Cárie (2007) (Mendes et al. 2010).

Lesões cariosas podem e devem ser identificadas e controladas no nível não cavitado, ou seja, antes do desenvolvimento da formação da cavidade. No entanto, as

lesões não cavitadas podem diferir amplamente por seu risco de progressão. A seguir, nessa dissertação, será apresentado estudo onde optou-se, então, pela utilização do critério Nyvad para avaliar se o aumento da glicose salivar pode, como consequência, aumentar o número de lesões cáries como um todo, cavitadas ou não (Nyvad and Baelum 2018).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se o aumento das estimativas de doença cárie em indivíduos com Diabetes mellitus são explicados pela hiperglicemia salivar/sanguínea e/ou por alterações do microbioma salivar.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Correlacionar os níveis de glicose sanguínea e glicose salivar (ARTIGO 1).
- 2) Correlacionar e associar a hiperglicemia salivar e sanguínea com a doença cárie (ARTIGO 1).
- 3) Descrever a taxonomia do microbioma bucal de acordo com a hiperglicemia e o pH salivar em indivíduos com e sem DM (ARTIGO 2).
- 4) Avaliar se os níveis glicêmicos salivares e sanguíneos do hospedeiro interferem na diversidade alfa, beta e na composição microbiana salivar (ARTIGO 2).
- 5) Correlacionar variáveis clínicas com a abundância relativa de microrganismos da saliva de indivíduos com e sem DM e periodontite (ARTIGO 2).

1.4 REFERÊNCIAS

1. Aagaard, K., J. Ma, K. M. Antony, R. Ganu, J. Petrosino, and J. Versalovic. 2014. "The Placenta Harbors a Unique Microbiome." *Sci. Transl. Med.* 6: 237–65. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599>.
2. Aas, Jørn A., Bruce J. Paster, Lauren N. Stokes, Ingar Olsen, and Floyd E. Dewhirst. 2005. "Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity." *Journal of Clinical Microbiology* 43 (11): 5721–32. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005>.
3. Abikshyeet, P., V. Ramesh, and N. Oza. 2015. "Glucose Estimation in the Salivary Secretion of Diabetes Mellitus Patients." *Diabetes Metab Syndr Obes.* 5: 149–54.
4. Abikshyeet, Panda., Venkatapathy. Ramesh, and Nirima. Oza. 2012. "Glucose Estimation in the Salivary Secretion of Diabetes Mellitus Patients." *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 5: 149–54. <https://doi.org/10.2147/dms.o.s32112>.
5. Agrawal, R.P., N Sharma, M.S. Rathore, V.B. Gupta, S. Jain, V. Agarwal, and S. Goyal. 2013. "Noninvasive Method for Glucose Level Estimation by Saliva." *Journal of Diabetes & Metabolism* 04 (05). <https://doi.org/10.4172/2155-6156.1000266>.
6. Albandar, J.M., C. Susin, and F.J. Hughes. 2018. "Manifestations of Systemic Diseases and Conditions That Affect the Periodontal Attachment Apparatus: Case Definitions and Diagnostic Considerations." *J Periodontol* 89: S183-203.
7. Amer, S., M. Yousuf, P.Q. Siddiqui, and J. Alam. 2001. "Salivary Glucose Concentrations in Patients with Diabetes Mellitus – A Minimally Invasive Technique for Monitoring Blood Glucose Levels." *Pak J Pharm Sci.* 14: 33–37.
8. Anthony, T., and D.D.S. Vernillo. 2003. "Dental Considerations for the Treatment of Patients with Diabetes Mellitus." *JADA* 134: 22–33.
9. Artico, G., R.S. Freitas, A.M. Santos Filho, G. Benard, R. Romiti, and D.A. Migliari. 2014. "Prevalence of Candida Spp., Xerostomia, and Hyposalivation in Oral Lichen Planus-a Controlled Study." *Oral Dis.* 20 (3): e36-41. <https://doi.org/10.1111/odi.12120>.
10. Arumugam, M., J. Raes, E. Pelletier, D. Le Paslier, T. Yamada, D.R. Mende, and Batto JM Fernandes GR, Tap J, Bruls T. 2011. "Enterotypes of the Human Gut Microbiome." *Nature* 473 (7346): 174–180.
11. Arya, S., J. Duhan, S. Tewari, P. Sangwan, V. Ghalaut, and S. Aggarwal. 2017. "Healing of Apical Periodontitis after Nonsurgical Treatment in Patients with Type 2 Diabetes." *J Endod* 43 (10): 1623–27.
12. Baca, P., A. M. Castillo, M. J. Liebana, F. Castillo, A. Martin-Platero, and J. Liebana. 2012. "Horizontal Transmission of Streptococcus Mutans in Schoolchildren." *Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal.* 17: e495–e500. <https://doi.org/10.4317/medoral.17592>.
13. Bearfield, C., E. S. Davenport, V. Sivapathasundaram, and R. P. Allaker. 2002. "Possible Association between Amniotic Fluid Micro-Organism Infection and Microflora in the Mouth." *BJOG* 109: 527–533. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2002.01349.x>.
14. Belstrøm, Daniel, Palle Holmstrup, Allan Bardow, Alexis Kokaras, Nils Erik Fiehn, and Bruce J. Paster. 2016. "Comparative Analysis of Bacterial Profiles in Unstimulated and Stimulated Saliva Samples." *Journal of Oral Microbiology* 8 (1): 30112. <https://doi.org/10.3402/jom.v8.30112>.
15. Berger, Daniela et al. 2018. "Oral Biofilms: Development, Control, and Analysis." *High-Throughput* 7 (3): 24.
16. Bremenkamp, R.M., A.R. Caris, and A.O. Jorge. 2011. "Prevalence and Antifungal Resistance Profile of Candida Spp. Oral Isolates from Patients with Type 1 and 2 Diabetes Mellitus." *Arch Oral Biol* 56 (6): 549–55.
17. Bültzingslöwen, I. von, T.P. Sollecito, P.C. Fox, T. Daniels, R. Jonsson, and P.B. Lockhart. 2007. "Salivary Dysfunction Associated with Systemic Diseases: Systematic Review and Clinical Management Recommendations." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 103: S57.e1-S57.e15.

18. Cao, R., Q. Li, Q. Wu, M. Yao, Y. Chen, and H. Zhou. 2019. "Effect of Non-Surgical Periodontal Therapy on Glycemic Control of Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Bayesian Network Meta-Analysis." *BMC Oral Health* 19 (1): 176.
19. Cao, Y., G. Yao, Y. Sheng, L. Yang, Z. Wang, Z. Yang, P. Zhuang, and Y. Zhang. 2019. "JinQi Jiangtang Tablet Regulates Gut Microbiota and Improve Insulin Sensitivity in Type 2 Diabetes Mice." *Journal of Diabetes Research* 2019: 12 pages. <https://doi.org/10.1155/2019/1872134>.
20. Carramolino-Cuéllar, Esther, Dorina Lauritano, Francisco Javier Silvestre, Francesco Carinci, Alberta Lucchese, and Javier Silvestre-Rangil. 2018. "Salivary Flow and Xerostomia in Patients with Type 2 Diabetes." *Journal of Oral Pathology and Medicine* 47 (5): 526–30. <https://doi.org/10.1111/jop.12712>.
21. Caselli, Elisabetta, Chiara Fabbri, Maria D'Accolti, Irene Soffritti, Cristian Bassi, Sante Mazzacane, and Maurizio Franchi. 2020. "Defining the Oral Microbiome by Whole-Genome Sequencing and Resistome Analysis: The Complexity of the Healthy Picture." *BMC Microbiology* 20 (1): 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01801-y>.
22. Chang, H.J.; S.J.; Lee, T.H.; Yong, N.Y.; Shin, B.G.; Jang, J.E.; Kim, K.H.; Huh, et al. 2020. "Deep Learning Hybrid Method to Automatically Diagnose Periodontal Bone Loss and Stage Periodontitis." *Scientific Reports* 10 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64509-z>.
23. Chatelier, E. Le, T. Nielsen, J. Qin, E. Prifti, F. Hildebrand, G. Falony, M. Almeida, and Kennedy S Arumugam M, Batto JM. 2013. "Richness of Human Gut Microbiome Correlates with Metabolic Markers." *Nature* 500 (7464): 541–546.
24. Cho, Nam Han. et al. 2017. "IDF Diabetes Atlas." *IDF Diabetes Atlas, 8th Edition*. <https://www.idf.org/aboutdiabetes/type-2-diabetes.html>.
25. Consortium, Human Microbiome Project. 2012. "Structure, Function and Diversity of the Healthy Human Microbiome." *Nature* 486: 207–14.
26. Côrtes, D.A., J.A. Cena, L. Marconatto, D.C. Guimarães, M.C.M. Grisi, L.A. Oliveira, L.P. Salles, L.G.A. Borges, A. Giongo, and N. Damé-Teixeira. 2019. "Correlation of the Salivary Microbiome with Clinical Parameters of Individuals with Periodontal Disease and Diabetes Mellitus: A Pilot Study."
27. Costello, E. K., E. M. Carlisle, E. M. Bik, M. J. Morowitz, and D. A. Relman. 2013. "Microbiome Assembly across Multiple Body Sites in Low-Birthweight Infants." *MBio* 4: e00782–e00713. <https://doi.org/10.1128/mBio.00782-13>.
28. Cullinan, M.P., P.J. Ford, and G.J. Seymour. 2009. "Periodontal Disease and Systemic Health: Current Status." *Aust Dent J* 54: S62–69.
29. Demmer, R.T., P. Trinh, M. Rosenbaum, G. Li, C. LeDuc, R. Leibel, A. González, et al. 2019. "Subgingival Microbiota and Longitudinal Glucose Change: The Oral Infections, Glucose Intolerance and Insulin Resistance Study (ORIGINS)." *Journal of Dental Research* 98 (13): 1488–96. <https://doi.org/10.1177/0022034519881978>.
30. Demmer, Ryan T., David R. Jacobs Jr, and Moises. Desvarieux. 2008. "Periodontal Disease and Incident Type 2 Diabetes." *Epidemiology/Health Services Research* 31 (7): 1373–79. <https://doi.org/10.1177/0022034510381902>.
31. Dhanya, M., and S. Hegde. 2016. "Salivary Glucose as a Diagnostic Tool in Type II Diabetes Mellitus: A Case-Control Study." *Niger J Clin Pract.* 19: 480–90.
32. Diaz, P.I. 2012. "Microbial Diversity and Interactions in Subgingival Biofilm Communities." *Front Oral Biol* 15: 17–40.
33. Diaz, P.I, N.I. Chalmers, A.H. Rickard, C. Kong, C.L. Milburn, and R.J. Palmer Jr. 2006. "Molecular Characterization of Subject-Specific Oral Microflora during Initial Colonization of Enamel." *Appl Environ Microbiol* 72: 2837–48.
34. Dietrich, T., P. Ower, M. Tank, N.X. West, C. Walter, I. Needleman, F.J. Hughes, et al. 2019. "Periodontal Diagnosis in the Context of the 2017 Classification System of Periodontal Diseases and Conditions – Implementation in Clinical Practice." *British Dental Journal* 226 (1): 16–22. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2019.3>.
35. Dige, I., M.K. Raarup, J.R. Nyengaard, M. Kilian, and B. Nyvad. 2009. "Actinomyces Naeslundii in Initial Dental Biofilm Formation." *Microbiology* 155: 2116–26.

36. Do, T., E.C. Sheehy, T. Mulli, F. Hughes, and D. Beighton. 2015. "Transcriptomic Analysis of Three *Veillonella* Spp. Present in Carious Dentine and in the Saliva of Caries-Free Individuals." *Front Cell Infect Microbiol.* 5: 25.
37. Dodds, Michael W.J., Chih Ko. Yeh, and Dorthea A. Johnson. 2000. "Salivary Alterations in Type 2 (Non-Insulin-Dependent) Diabetes Mellitus and Hypertension." *Community Dentistry and Oral Epidemiology* 28 (5): 373–81. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0528.2000.028005373.x>.
38. Dominguez-Bello, M. G., E. K. Costello, M. Contreras, M. Magris, G. Hidalgo, and N. Fierer. 2010. "Delivery Mode Shapes the Acquisition and Structure of the Initial Microbiota across Multiple Body Habitats in Newborns." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 11971–11975. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107>.
39. Douglas, C.W., K. Naylor, C. Phansopa, A.M. Frey, T. Farnilo, and G.P. Stafford. 2014. "Physiological Adaptations of Key Oral Bacteria." *Adv Microb Physiol* 65: 257–335. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2014.08.005>.
40. Emrich, L.J., M. Shlossman, and R.J. Genco. 1991. "Periodontal Disease in Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitus." *J Periodontol* 62: 123– 131.
41. Falcão, Denise Pinheiro., Soraya Coelho. Leal, Celi Novaes. Vieira, Andy. Wolff, Tayana Filgueira Galdino Almeida, Fernanda. De Paula e Silva Nunes, Rivadávio Fernandes Batista. De Amorim, and Ana Cristina Bezerra. 2014. "Sialometry of Upper Labial Minor Glands: A Clinical Approach by the Use of Weighing Method Schirmer's Test Strips Paper." *The Scientific World Journal* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/268634>.
42. Falcão, Denise Pinheiro., Licia Maria Henrique. da Mota, Aline Lauria. Pires, and Ana Cristina Barreto. Bezerra. 2013. "Sialometria: Aspectos de Interesse Clínico." *Revista Brasileira de Reumatologia* 53 (6): 525–31. <https://doi.org/10.1016/j.rbr.2013.03.001>.
43. Federation, International Diabetes. 2019. "International Diabetes Atlas." 9th. 2019. <https://www.diabetesatlas.org>.
44. Fouad, A.F. 2003. "Diabetes Mellitus as a Modulating Factor of Endodontic Infections." *J Dent Educ* 67 (4): 459–67.
45. Fujii, S., T. Maeda, I. Noge, Y. Kitagawa, K. Todoroki, K. Inoue, J.Z. Min, and T. Toyo'oka. 2014. "Determination of Acetone in Saliva by Reversed-Phase Liquid Chromatography with Fluorescence Detection and the Monitoring of Diabetes Mellitus Patients with Ketoacidosis." *Clin Chim Acta.* 20 (430): 140–44. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.01.006>.
46. Gao, L., T. Xu, G. Huang, S. Jiang, Y. Gu, and F. Chen. 2018. "Oral Microbiomes: More and More Importance in Oral Cavity and Whole Body." *Protein Cell* 9: 488–500.
47. Garton, B.J., and P.J. Ford. 2012. "Root Caries and Diabetes: Risk Assessing to Improve Oral and Systemic Health Outcomes." *Australian Dental Journal* 57 (2): 114–22. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2012.01690.x>.
48. Gibbons, R. J. 1989. "Bacterial Adhesion to Oral Tissues: A Model for Infectious Diseases." *J. Dent. Res.* 68: 750–760.
49. Gibbons, R. J., D. M. Spinell, and Z. Skobe. 1976. "Selective Adherence as a Determinant of the Host Tropisms of Certain Indigenous and Pathogenic Bacteria." *Infect. Immun.* 13: 238–246.
50. Gomar-Vercher, Sonia, Aurea Simón-Soro, José María Montiel-Company, José Manuel Almerich-Silla, and Alex Mira. 2018. "Stimulated and Unstimulated Saliva Samples Have Significantly Different Bacterial Profiles." *PLoS ONE* 13 (6): 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198021>.
51. Gome, S.C.C., E.S.L.S. Guimarães, L.C.C. Pinto, Gadcg. Camargo, M.I.B. Valente, and M.Id.M. Sarquis. 2017. "Investigations of the Prevalence and Virulence of *Candida Albicans* in Periodontal and Endodontic Lesions in Diabetic and Normoglycemic Patients." *J Appl Oral Sci.*
52. Goodson, J. Max., Mor Li. Hartman, Ping. Shi, Hatice. Hasturk, Tina. Yaskell, Jorel. Vargas, Xiaoqing. Song, et al. 2017a. "The Salivary Microbiome Is Altered in the Presence of a High Salivary Glucose Concentration." *PLoS ONE* 12 (3): 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170437>.

53. Goodson, J. Max, Mor Li Hartman, Ping Shi, Hatice Hasturk, Tina Yaskell, Jorel Vargas, Xiaoqing Song, et al. 2017b. "The Salivary Microbiome Is Altered in the Presence of a High Salivary Glucose Concentration." *PLoS ONE* 12 (3): 1–20.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170437>.
54. Griffen, A.L., C.J. Beall, J.H. Campbell, N.D. Firestone, P.S. Kumar, and Z.K. Yang. 2012. "Distinct and Complex Bacterial Profiles in Human Periodontitis and Health Revealed by 16S Pyrosequencing." *ISME J.* 6: 1176–85.
55. Grisi, D., I. Vieira, A.K. Lima, M. Mattos, N. Damé-Teixeira, L. Salles, L. Oliveira, C. Stefani, and M. C. Guimarães. 2021. "The Complex Interrelationship between Diabetes Mellitus, Oral Diseases and General Health." *Current Diabetes Reviews* 17: 1–15.
<https://doi.org/10.2174/1573399817666210322153210>.
56. Guggenheimer, J., and P.A. Moore. 2003. "Xerostomia: Etiology, Recognition and Treatment." *J Am Dent Assoc* 134 (1): 61–69.
57. Gupta, A., S.K. Singh, B.N. Padmavathi, S.Y. Rajan, G.P. Mamatha, and S. Kumar. 2015. "Evaluation of Correlation of Blood Glucose and Salivary Glucose Level in Known Diabetic Patients." *J Clin Diagn Res.* 9: ZC106–109.
58. Gupta, S., S.V. Sandhu, H. Bansal, and D. Sharma. 2015. "Comparison of Salivary and Serum Glucose Levels in Diabetic Patients." *J Diabetes Sci Technol* 9: 91–96.
59. Gupta, Shreya, Meghanand Nayak, J. Sunitha, Geetanshu Dawar, Nidhi Sinha, and Neelakshi Rallan. 2017. "Correlation of Salivary Glucose Level with Blood Glucose Level in Diabetes Mellitus." *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology.*
https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_222_15.
60. Hasturk, H., and A. Kantarci. 2015. "Activation and Resolution of Periodontal Inflammation and Its Systemic Impact." *Periodontol 2000* 69 (1): 255–73.
61. He, J., Y. Li, Y. Cao, J. Xue, and X. Zhou. 2015. "The Oral Microbiome Diversity and Its Relation to Human Diseases." *Folia Microbiol* 60: 69–80.
62. Head, D., A.D. Devine, and P.D. Marsh. 2017. "In Silico Modelling to Differentiate the Contribution of Sugar Frequency versus Total Amount in Driving Biofilm Dysbiosis in Dental Caries." *Sci Rep* 7: 17413.
63. Hechanova, L. Aimee. 2019. "Manual MSD." 2019.
<https://www.msmanuals.com/pt/profissional/distúrbios-geniturinários/anormalidades-do-transporte-renal/glicosúria-renal>.
64. Hintao, J., R. Teanpaisan, V. Chongsuvatwong, C. Ratarasan, and G. Dahlen. 2007. "The Microbiological Profiles of Saliva, Supragingival and Subgingival Plaque and Dental Caries in Adults with and without Type 2 Diabetes Mellitus." *Oral Microbiology and Immunology* 22 (3): 175–81. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00341.x>.
65. Holgerson, P. L., N. R. Vestman, R. Claesson, C. Ohman, M. Domellof, and A. C. Tanner. 2013. "Oral Microbial Profile Discriminates Breast-Fed from Formula-Fed Infants." *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 56: 127–136. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31826f2bc6>.
66. Hossain, M.A., S. Bhattacharjee, S.M. Armin, P. Qian, W. Xin, and H.Y. Li. 2015. "Hydrogen Peroxide Priming Modulates Abiotic Oxidative Stress Tolerance: Insights from ROS Detoxification and Scavenging." *Front Plant Sci.* 6: 420.
67. IDF. 2014. "International Diabetes Federation." *Diabetes Mellitus*.
68. Idris, A., S.Z. Hasnain, L.Z. Huat, and D. Koh. 2017. "Human Diseases, Immunity and the Oral Microbiota-Insights Gained from Metagenomic Studies." *Oral Sci Int* 14: 27–32.
69. Indira, M., P. Chandrashekar, K.K. Kattappagari, L.P. Chandra, R.T. Chitturi, and R.R. Bv. 2015. "Evaluation of Salivary Glucose, Amylase, and Total Protein in Type 2 Diabetes Mellitus Patients." *Indian J Dent Res.* 26: 271–75.
70. Jakubovics, N. S. 2015. "Intermicrobial Interactions as a Driver for Community Composition and Stratification of Oral Biofilms." *Journal of Molecular Biology* 427 (23): 3662–75.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.09.022>.
71. Jakubovics, N.S., S.R. Gill, M.M. Vickerman, and P.E. Kolenbrander. 2008. "Role of Hydrogen Peroxide in Competition and Cooperation between *Streptococcus Gordonii* and Actinomycetes

- Naeslundii." *FEMS Microbiol Ecol.* 66: 637–44.
72. Jawed, Muhammad., Syed M. Shahid, Shah A. Qader, and Abid. Azhar. 2011. "Dental Caries in Diabetes Mellitus: Role of Salivary Flow Rate and Minerals." *Journal of Diabetes and Its Complications* 25 (3): 183–86. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2010.07.001>.
 73. Jiménez, E., M. L. Marín, R. Martín, J. M. Odriozola, M. Olivares, and J. Xaus. 2008. "Is Meconium from Healthy Newborns Actually Sterile?" *Res. Microbiol.* 159: 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.12.007>.
 74. Katz, J., I. Bhattacharyya, F. Farkhondeh-Kish, F.M. Perez, R.M. Caudle, and M.W. Heft. 2005. "Expression of the Receptor of Advanced Glycation End Products in Gingival Tissues of Type 2 Diabetes Patients with Chronic Periodontal Disease: A Study Utilizing Immunohistochemistry and RT-PCR." *J Clin Periodontol* 32 (1): 40–44.
 75. Kogawa, Evelyn Mikaela, Daniela Corrêa Grisi, Denise Pinheiro Falcão, Ingrid Aquino Amorim, Taia Maria Berto Rezende, Izabel Cristina Rodrigues da Silva, Osmar Nascimento Silva, Octávio Luiz Franco, and Rivadávio Fernandes Batista de Amorim. 2016. "Salivary Function Impairment in Type 2 Diabetes Patients Associated with Concentration and Genetic Polymorphisms of Chromogranin A." *Clinical Oral Investigations* 20 (8): 2083–95. <https://doi.org/10.1007/s00784-015-1705-z>.
 76. Kreth, Jens, Justin Merritt, and Fengxia Qi. 2009. "Bacterial and Host Interactions of Oral Streptococci." *DNA and Cell Biology* 28 (8): 397–403.
 77. Kumar, P.S., M.F. Monteiro, S.M. Dabdoub, G.L. Miranda, M.Z. Casati, F.V. Ribeiro, F.R. Cirano, S.P. Pimentel, and R.C.V. Casarin. 2020. "Subgingival Host-Microbial Interactions in Hyperglycemic Individuals." *Journal of Dental Research* 99 (6): 650–57. <https://doi.org/10.1177/0022034520906842>.
 78. Kumar, S., S. Padmashree, and R. Jayalekshmi. 2014. "Correlation of Salivary Glucose, Blood Glucose and Oral Candidal Carriage in the Saliva of Type 2 Diabetics: A Case-Control Study." *Contemp Clin Dent.* 5: 312–17.
 79. Lange, C.C., M.A.V.P. Brito, J.R.F. Brito, E.F. Arcuri, G.N. Souza, M.A. Machado, R. Domingues, and A.P.S. Salimena. 2011. "Uso de PCR e Sequenciamento Do RDNA 16S Para Identificação de Bactérias Do Gênero Staphylococcus Isoladas de Mastite Bovina." *Pesq. Vet. Bras.* 31 (5): 36–40.
 80. Lasserre, J.F., M.C. Brex, and S. Toma. 2018. "Oral Microbes, Biofilms and Their Role in Periodontal and Peri-Implant Diseases." *Materials (Basel)* 11 (10): 1802. <https://doi.org/10.3390/ma11101802>.
 81. Leake, J.L. 2001. "Clinical Decision-Making for Caries Management in Root Surfaces." *J Dent Educ* 65: 1147–1153.
 82. Leake, James L. 2001. "Clinical Decision-Making for Caries Management in Root Surfaces." *Journal of Dental Education* 65 (10): 1147–53. <https://doi.org/10.1002/j.0022-0337.2001.65.10.tb03464.x>.
 83. Lemme, A., L. Grobe, M. Reck, J. Tomasch, and I. Wagner-Dobler. 2011. "Subpopulation-Specific Transcriptome Analysis of Competence-Stimulating-Peptide-Induced Streptococcus Mutans." *J Bacteriol.* 193: 1863–77.
 84. Levy, R., and E. Borenstein. 2013. "Metabolic Modeling of Species Interaction in the Human Microbiome Elucidates Community-Level Assembly Rules." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 12804–9.
 85. Ley, R.E., F. Backhed, P. Turnbaugh, C.A. Lozupone, R.D. Knight, and J.I. Gordon. 2005. "Obesity Alters Gut Microbial Ecology." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (31): 11070–11075.
 86. Li, Y., P. W. Caufield, A. P. Dasanayake, H. W. Wiener, and S. H. Vermund. 2005. "Mode of Delivery and Other Maternal Factors Influence the Acquisition of Streptococcus Mutans in Infants." *J. Dent. Res.* 84: 806–811. <https://doi.org/10.1177/154405910508400905>.
 87. Lif Holgersson, P., L. Harnevik, O. Hernell, A. C. Tanner, and I. Johansson. 2011. "Mode of Birth Delivery Affects Oral Microbiota in Infants." *J. Dent. Res.* 90: 1183–1188. <https://doi.org/10.1177/00220345111418973>.
 88. Lima, Ana Karolina Almeida de, Juliana Amorim dos Santos, Cristine Miron Stefani, Adriano

- de Almeida de Lima, and Nailê Damé-Teixeira. 2020. "Diabetes Mellitus and Poor Glycemic Control Increase the Occurrence of Coronal and Root Caries: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Clinical Oral Investigations* 24 (11): 3801–12. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03531-x>.
89. Lima, S.M.F., D.C. Grisi, and E.M. Kogawa. 2013. "Diabetes Mellitus and Inflammatory Pulpal and Periapical Disease: A Review." *Int Endod J* 46 (8): 700–709.
 90. Liu, L., H. Tong, and X. Dong. 2012. "Function of the Pyruvate Oxidase-Lactate Oxidase Cascade in Interspecies Competition between *Streptococcus Oligofermentans* and *Streptococcus Mutans*." *Appl Environ Microbiol* 78: 2120–27.
 91. Lloyd-Sherlock, Peter., Martin. McKee, Shah. Ebrahim, Mark. Gorman, Sally. Greengross, Martin. Prince, Rachel. Pruchno, et al. 2012. "Population Ageing and Health." *The Lancet* 379 (9823): 1295–96. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60519-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60519-4).
 92. Long, J., Q. Cai, M. Steinwandel, M.K. Hargreaves, S.R. Bordenstein, W. J. Blot, W. Zheng, and X. O. Shu. 2017. "Association of Oral Microbiome with Type 2 Diabetes Risk." *Journal of Periodontal Research* 52 (3): 636–43. <https://doi.org/10.1111/jre.12432>.
 93. Longo, P.L., S. Dabdoub, and P. Kumar. 2018. "Glycaemic Status Affects the Subgingival Microbiome of Diabetic Patients." *J Clin Periodontol* 45 (8): 932–40.
 94. Longo, P.L., S. Dabdoub, P. Kumar, H.P.C. Artese, S.A. Dib, G.A. Romito, and M.P.A. Mayer. 2018. "Glycaemic Status Affects the Subgingival Microbiome of Diabetic Patients." *Journal of Clinical Periodontology* 45: 932–40.
 95. López, María Elena, María Eugenia Colloca, Rafael Gustavo Páez, Judit Nora Schallmach, Myriam Adriana Koss, and Amalia Chervonagura. 2003. "Salivary Characteristics of Diabetic Children." *Brazilian Dental Journal* 14 (1): 26–31. <https://doi.org/10.20396/bjos.v10i2.8641644>.
 96. Lourenço, T.G.B., D. Heller, C.M. Silva-Boghossian, S.L. Cotton, B.J. Paster, and A.P.V. Colombo. 2014. "Microbial Signature Profiles of Periodontally Healthy and Diseased Patients." *Journal of Clinical Periodontology* 41 (11): 1027–36.
 97. Mahdavi, Seyyed Omid., Sedighe. Hashemi, Najmeh Sadat. Boostani, and Haleh. Zokaee. 2012. "A New Method to Evaluate Fasting Plasma Glucose by Salivary Glucose Measurement." *Iranian Journal of Diabetes and Obesity* 4 (3): 127–33.
 98. Maltz, Marisa., Berenice. Barbachan e Silva, Danusa Queiroz de. Carvalho, and Alexandre. Volkweis. 2003. "Results after Two Years of Non-Operative Treatment of Occlusal Surface in Children with High Caries Prevalence." *Brazilian Dental Journal* 14 (1): 48–54. <https://doi.org/10.1590/S0103-64402003000100009>.
 99. Malvania, Ekta A., Sona A. Sheth, Ashish S. Sharma, Saloni. Mansuri, Faizan. Shaikh, and Saloni. Sahani. 2016. "Dental Caries Prevalence among Type II Diabetic and Nondiabetic Adults Attending a Hospital." *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry* 6 (9): S232–36. <https://doi.org/10.4103/2231-0762.197202>.
 100. Marques, R.C.R. 2021. "Parâmetros Salivares Em Pacientes Com Diabetes Mellitus e Sua Relação Com Atividade de Cárie." Brasília.
 101. Marsh, P.D. 2003. "Are Dental Diseases Examples of Ecological Catastrophes?" *Microbiology* 149: 279–94.
 102. Marsh, P.D., T. Do, D. Beighton, and D.A. Devine. 2016. "Influence of Saliva on the Oral Microbiota." *Periodontol 2000* 70 (1): 80–92.
 103. Mascarenhas, Paulo., Bruno. Fatela, and Isabel. Barahona. 2014. "Effect of Diabetes Mellitus Type 2 on Salivary Glucose - A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies." *PLoS ONE* 9 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101706>.
 104. Mendes, F.M., M.M. Braga, L.B. Oliveira, J.L.F. Antunes, and T.M. Ardenghi. 2010. "Discriminant Validity of the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) and Comparability with World Health Organization Criteria in a Cross-Sectional Study." *Community Dent Oral Epidemiol* 38 (3): 398–407. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.2010.00557.x>.
 105. Messaoudi, S., M. Manai, G. Kergourlay, H. Prevost, N. Connil, and J.M. Chobert. 2013. "Lactobacillus Salivarius: Bacteriocin and Probiotic Activity." *Food Microbiol.* 36: 296–

- 304.
106. Miranda, T.S., M. Feres, B. Retamal-Valdés, P.J. Perez-Chaparro, S.S. Maciel, and P.M. Duarte. 2017. "Influence of Glycemic Control on the Levels of Subgingival Periodontal Pathogens in Patients with Generalized Chronic Periodontitis and Type 2 Diabetes." *J Appl Oral Sci* 25 (1): 82–89.
 107. Murrâh, V.A. 1985. "Diabetes Mellitus and Associated Oral Manifestations: A Review." *Journal of Oral Pathology & Medicine* 14 (4): 271–81. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1985.tb00494.x>.
 108. Mussavira, S., M. Dharmalingam, and B. Omana Sukumaran. 2015. "Salivary Glucose and Antioxidant Defense Markers in Type II Diabetes Mellitus." *Turk J Med Sci.* 45: 141–47.
 109. Muzy, J., M.R. Campos, I. Emmerick, R.S. da Silva, and J.M.A. Schramm. 2021. "Prevalência de Diabetes Mellitus e Suas Complicações e Caracterização Das Lacunas Na Atenção à Saúde a Partir Da Triangulação de Pesquisas." *Cad. Saúde Pública* 37 (5): e00076120. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00076120>.
 110. Naseri, R., H. Mozaffari, M. Ramezani, and M. Sadeghi. 2018. "Effect of Diabetes Mellitus Type 2 on Salivary Glucose, Immunoglobulin A, Total Protein, and Amylase Levels in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis of Case-Control Studies." *Journal of Research in Medical Sciences.* https://doi.org/10.4103/jrms.JRMS_135_18.
 111. Nayak, M., S. Kotigadde, H.R.V.D.V. Shetty, and B. Antony. 2013. "Impact Of Peptostreptococcus On Type 2 Diabetes Mellitus Related Secondary Root Canal Infections." *Int J Pharm Sci Res* 4: 4001–9.
 112. Negrato, C.A., and O. Tarzia. 2010. "Buccal Alterations in Diabetes Mellitus." *Diabetol Metab Syndr* 2 (3).
 113. Netto, Augusto Pimazoni, Adagmar Andriolo, Fadlo Fraige Filho, Marcos Tambascia, Marflia De Brito Gomes, Murilo Melo, Nairo Massakazu Sumita, Ruy Lyra, and Saulo Cavalcanti. 2009. "Atualização Sobre Hemoglobina Glicada (HbA 1c) Para Avaliação Do Controle Glicêmico e Para o Diagnóstico Do Diabetes: Aspectos Clínicos e Laboratoriais." *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 45 (1): 31–48. <https://doi.org/10.1590/s1676-24442009000100007>.
 114. Niederman, R. 2013. "Pregnancy Gingivitis and Causal Inference." *Evid. Based Dent.* 14: 107–8. <https://doi.org/10.1038/sj.ebd.6400966>.
 115. Nyvad, Bente., and Vibeke. Baelum. 2018. "Nyvad Criteria for Caries Lesion Activity and Severity Assessment: A Validated Approach for Clinical Management and Research." *Caries Research* 52 (5): 397–405. <https://doi.org/10.1159/000480522>.
 116. Ogawa, T., M. Honda-Ogawa, K. Ikebe, Y. Notomi, Y. Iwamoto, I. Shirobayashi, S. Hata, et al. 2018. "Characterizations of Oral Microbiota in Elderly Nursing Home Residents with Diabetes." *Journal of Oral Science* 60 (1): 163. <https://doi.org/10.2334/josnusd.16-072201>.
 117. On the Diagnosis, Expert Committee et al. 2002. "American Diabetes Association: Clinical Practice Recommendations 2002." *Diabetes Care* 25: S1–147.
 118. Organization, World Health. 2011. "Global Health and Aging." *Hum. Serv.*
 119. Papas, A., A. Joshi, A. Belanger, R.Jr. Kent, C. Palmer, and P. DePaola. 1995. "Dietary Models for Root Caries." *Am J Clin Nutr* 61: S417– 422.
 120. Park, O.J., H. Yi, J.H. Jeon, S.S. Kang, K.T. Koo, and K.Y. Kum. 2015. "Pyrosequencing Analysis of Subgingival Microbiota in Distinct Periodontal Conditions." *J Dent Res.* 94: 921–27.
 121. Petersen, C., and J.L. Round. 2014. "Defining Dysbiosis and Its Influence on the Host Immunity and Disease." *Cell Microbiol* 16: 1024–33.
 122. Pishipati, V. 2013. "Diabetes Mellitus: An Endodontic Perspective." *Eur J Gen Dent* 2: 241. <http://dx.doi.org/10.4103/2278-9626.115996>.
 123. Prado, B.N., and G.F. Vaccarezza. 2013. "Alterações Bucais Em Pacientes Diabéticos." *Rev Odontol Univ Cid São Paulo*, 147–53.

124. Quast, C., E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, and P. Yarza. 2013. "The SILVA Ribosomal RNA Gene Database Project: Improved Data Processing and Web-Based Tools." *Nucleic Acids Res.* 41: D590-6.
125. Qureshi, A., A. Qureshi, H. Quereshi, and A.A. Khan. 2007. "Blood Glucose Level, Salivary PH and Oral Bacterial Count in Type 1 Diabetic Children." *Infect Dis J.* 16 (2): 45–48.
126. Radaic, Allan., and Yvonne L. Kapila. 2021. "The Oralome and Its Dysbiosis: New Insights into Oral Microbiome-Host Interactions." *Computational and Structural Biotechnology Journal* 19: 1335–60. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.02.010>.
127. Rahiotis, C., V. Petraki, and P. Mitrou. 2021. "Changes in Saliva Characteristics and Carious Status Related to Metabolic Control in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus." *J Dent* 108: 103629.
128. Rai, Kavita., Amitha. Hegde, Ananth. Kamath, and Suchetha. Shetty. 2011. "Dental Caries and Salivary Alterations in Type i Diabetes." *Journal of Clinical Pediatric Dentistry* 36 (2): 181–84. <https://doi.org/10.17796/jcpd.36.2.x436ln878221g364>.
129. Ravindran, R., D.M. Gopinathan, and S. Sukumaran. 2015. "Estimation of Salivary Glucose and Glycogen Content in Exfoliated Buccal Mucosal Cells of Patients with Type II Diabetes Mellitus." *J Clin Diagn Res.* 9: ZC89–93.
130. Ribeiro, B.A., C.P. Vieira Lima, L.S. Alves, and N. Damé-Teixeira. 2021. "Impact of Detection Criteria on Coronal and Root Caries Estimates in Adults with and without Type II Diabetes Mellitus." Brasília.
131. Romani Vestman, N., N. Timby, P. Holgerson, C. Kressirer, R. Claesson, and M. Domellof. 2013. "Characterization and in Vitro Properties of Oral Lactobacilli in Breastfed Infants." *BMC Microbiol.* 13: 193. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-193>.
132. Sasaki, H., K. Hirai, C.M. Martins, H. Furusho, R. Battaglino, and K. Hashimoto. 2016. "Interrelationship between Periapical Lesion and Systemic Metabolic Disorders." *Curr Pharm Des* 22 (15): 2204–15.
133. Satish, B.N., P. Srikala, B. Maharudrappa, S.M. Awanti, P. Kumar, and D. Hugar. 2014. "Saliva: A Tool in Assessing Glucose Levels in Diabetes Mellitus." *J Int Oral Health* 6: 114–17.
134. Scully, C., and J. Greenman. 2008. "Halitosis (Breath Odor)." *Periodontol 2000* 48: 66–75.
135. Seethalakshmi, C., R.C. Jagat Reddy, Nisha. Asifa, and S. Prabhu. 2016. "Correlation of Salivary PH, Incidence of Dental Caries and Periodontal Status in Diabetes Mellitus Patients: A Cross-Sectional Study." *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 10 (3): ZC12–14. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/16310.7351>.
136. Seethalakshmi, C., R.C. Reddy, N. Asifa, and S. Prabhu. 2016. "Correlation of Salivary PH, Incidence of Dental Caries and Periodontal Status in Diabetes Mellitus Patients: A Cross-Sectional Study." *J Clin Diagn Res* 10 (3): ZC12-14.
137. Segata, N., S.K. Haake, P. Mannon, K.P. Lemon, L. Waldron, and D. Gevers. 2012. "Composition of the Adult Digestive Tract Bacterial Microbiome Based on Seven Mouth Surfaces, Tonsils, Throat and Stool Samples." *Genome Biol.* 13: R42.
138. Segura-Egea, J.J., L. Castellanos-Cosano, and G. Machuca. 2012. "Diabetes Mellitus, Periapical Inflammation and Endodontic Treatment Outcome." *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 17 (2): e356-361.
139. Segura-Egea, J.J., J. Martín-González, D. Cabanillas-Balsera, A.F. Fouad, E. Velasco-Ortega, and J. López-López. 2016. "Association between Diabetes and the Prevalence of Radiolucent Periapical Lesions in Rootfilled Teeth: Systematic Review and Meta-Analysis." *Clin Oral Investig* 20 (6): 1133–41.
140. Sharon, A., H. Ben-Aryeh, B. Itzhak, K. Yoram, R. Szargel, and D. Gutman. 1985. "Salivary Composition in Diabetic Patients." *Journal of Oral Medicine* 40 (1): 23–26.
141. Silva Dantas, A. da, M.J. Patterson, D.A. Smith, D.M. Maccallum, L.P. Erwig, and B.A. Morgan. 2010. "Thioredoxin Regulates Multiple Hydrogen Peroxide-Induced Signaling Pathways in *Candida Albicans*." *Mol Cell Biol* 30: 4550–63.

142. Silva, M.F., K.G. Barbosa, J.V. Pereira, P.M. Bento, G.P. Godoy, and D.Q. Gomes. 2015. "Prevalence of Oral Mucosal Lesions among Patients with Diabetes Mellitus Types 1 and 2." *An Bras Dermatol* 90 (1): 49–53.
143. Silva, N., L. Abusleme, D. Bravo, N. Dutzan, J. Garcia-Sesnich, R. Vernal, M. Hernández, and J. Gamonal. 2015. "Host Response Mechanisms in Periodontal Diseases." *J Appl Oral Sci.* 23 (3): 329–55.
144. Simões, R.J., P. Fonseca, and M.H. Figueiral. 2013. "Infecções Por Candida Spp Na Cavidade Oral." *OdontolClín-Cien.*
145. Simón-Soro, A., P. Belda-Ferre, R. Cabrera-Rubio, L.D. Alcaraz, and A. Mira. 2013. "A Tissue-Dependent Hypothesis of Dental Caries." *Caries Research* 47 (6): 591–600. <https://doi.org/10.1159/000351663>.
146. Singh, V.P., A. Bali, N. Singh, and A.S. Jaggi. 2014. "Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications." *Korean J Physiol Pharmacol* 18 (1): 1–14.
147. Smriti, Komal, Keerthilatha M. Pai, Vineetha Ravindranath, Srikanth Gadicherla, and Kalyana Chakravarthy Pentapati. 2016. "Salivary Glucose as a Diagnostic Marker for Diabetes Mellitus." *Journal of Diabetes Science and Technology* 10 (4): 991–92. <https://doi.org/10.1177/1932296816637619>.
148. Sociedade Brasileira de Diabetes. 2014. "Tratamento Combinado: Drogas Orais e Insulina No Diabetes Mellitus Tipo 2." *Diretrizes Da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2014-2015*, 64–70.
149. ———. 2019. "Diretrizes Da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2019-2020." <https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/DIRETRIZES-COMPLETA-2019-2020.pdf>.
150. Sohail, M.U., A. Althani, H. Anwar, R. Rizzi, and H.E. Marei. 2017. "Role of the Gastrointestinal Tract Microbiome in the Pathophysiology of Diabetes Mellitus." *Journal of Diabetes Research 2017*: 9 pages.
151. Sonnenschein, S.K., and J. Meyle. 2015. "Local Inflammatory Reactions in Patients with Diabetes and Periodontitis." *Periodontol 2000* 69 (1): 221–54.
152. Stahring, S. S., J. C. Clemente, R. P. Corley, J. Hewitt, D. Knights, and W. A. Walters. 2012. "Nurture Trumps Nature in a Longitudinal Survey of Salivary Bacterial Communities in Twins from Early Adolescence to Early Adulthood." *Genome Res.* 22: 2146–2152. <https://doi.org/10.1101/gr.140608.112>.
153. Steele, J.G., A. Sheiham, W. Marcenes, N. Fay, and A.W.G. Walls. 2001. "Clinical and Behavioural Risk Indicators for Root Caries in Older People." *Gerodontology* 80: 1828–1833.
154. Stout, M. J., B. Conlon, M. Landeau, I. Lee, C. Bower, and Q. Zhao. 2013. "Identification of Intracellular Bacteria in the Basal Plate of the Human Placenta in Term and Preterm Gestations." *Am. J. Obstet. Gynecol.* 208 (226): e221–226.e227. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2013.01.018>.
155. Stulnig, T.M. 2020. "Diabetes and COVID-19." *The Central European Journal of Medicine* 132: 356–61.
156. Takahashi, N., and B. Nyvad. 2008. "Caries Ecology Revisited: Microbial Dynamics and the Caries Process." *Caries Res* 42: 409–18.
157. ———. 2011. "The Role of Bacteria in the Caries Process: Ecological Perspectives." *J Dent Res* 90: 294–303.
158. Takahashi, N., and T. Yamada. 1999. "Effects of PH on the Glucose and Lactate Metabolisms by the Washed Cells of Actinomyces Naeslundii under Anaerobic and Aerobic Conditions." *Oral Microbiol Immunol.* 14: 60–65.
159. Takahata, Y., A. Nomura, H. Takada, S. Ohga, K. Furuno, and S. Hikino. 2004. "CD25+CD4+ T Cells in Human Cord Blood: An Immunoregulatory Subset Withnaive Phenotype and Specific Expression of Forkhead Box P3 (Foxp3) Gene." *Exp. Hematol.* 32: 622–629. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2004.03.012>.
160. Takeshita, T, M. Yasui, Y. Shibata, M. Furuta, Y. Saeki, and N. Eshima. 2015. "Dental Plaque Development on a Hydroxyapatite Disk in Young Adults Observed by Using a

- Barcoded Pyrosequencing Approach." *Sci Rep* 5: 8136.
161. Takeuchi, H., and K. Yamamoto. 2001. "Ultrastructural Analysis of Structural Framework in Dental Plaque Developing on Synthetic Carbonate Apatite Applied to Human Tooth Surfaces." *Eur J Oral Sci.* 109: 249–59.
 162. Taylor, J.J., P.M. Preshaw, and E. Lalla. 2013. "A Review of the Evidence for Pathogenic Mechanisms That May Link Periodontitis and Diabetes." *J Periodontol* 84 (4): S113-134.
 163. Tonetti, M.S., H.; Greenwell, and K.S. Kornman. 2018. "Staging and Grading of Periodontitis: Framework and Proposal of a New Classification and Case Definition." *Journal of Clinical Periodontology* 45: S149–61.
 164. Trentin, M.S., G. Verardi, and M. De C Ferreira. 2017. "Most Frequent Oral Lesions in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus." *J Contemp Dent Pract* 18 (2): 107–11.
 165. Vernillo, A.T. 2003. "Dental Considerations for the Treatment of Patients with Diabetes Mellitus." *J Am Dent Assoc* 134: 24S-33S.
<http://dx.doi.org/10.14219/jada.archive.2003.0366> PMID: 18196670.
 166. Vernillo, D.D.S., and T. Anthony. 2001. "Diabetes Mellitus: Relevance to Dental Treatment." *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 91 (3): 263–70. <https://doi.org/10.1067/moe.2001.114002>.
 167. Wang, J., and H. Jia. 2016. "Metagenome-Wide Association Studies: Fine-Mining the Microbiome." *Nat Rev Microbiol.* 14 (8): 508–522.
 168. Wei, Yu-Snan et al. 2020. "Identification of Hyperglycemia-Associated Microbiota Alterations in Saliva and Gingival Sulcus." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 682: 108278. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108278>.
 169. Xu, J., and J.I. Gordon. 2003. "Honor Thy Symbionts." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (18): 10452–10459.
 170. Yamashita, J.M., PGd Moura-GREC, M.M. Capelari, A. Sales-Peres, and SHdC Sales-Peres. 2013. "Manifestações Bucais Em Pacientes Portadores de Diabetes Mellitus: Uma Revisão Sistemática." *Rev Odontol UNESP*, 211–20. <http://dx.doi.org/10.1590/S1807-25772013000300011>.
 171. Zaura, Egija., Bart J.F. Keijser, Susan M. Huse, and Wim. Crielaard. 2009. "Defining the Healthy 'Core Microbiome' of Oral Microbial Communities." *BMC Microbiology* 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-259>.
 172. Zaura, Egija, Elena A. Nicu, Bastiaan P. Krom, and Bart J.F. Keijser. 2014. "Acquiring and Maintaining a Normal Oral Microbiome: Current Perspective." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4 (JUN): 1–8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00085>.
 173. Zhou, Y., H. Gao, K. A. Mihindukulasuriya, P. S. La Rosa, K. M. Wylie, and T. Vishnivetskaya. 2013. "Biogeography of the Ecosystems of the Healthy Human Body." *Genome Biol.* 14 (R1). <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-1-r1>.
 174. Zijngge, V., M.B. Van Leeuwen, J.E. Degener, F. Abbas, T. Thurnheer, and R. Gmur. 2010. "Oral Biofilm Architecture on Natural Teeth." *PLoS One* 5: e9321.

Artigo 1:**Can increased salivary glucose be a risk indicator for coronal and root caries in individuals with Diabetes mellitus type 2?**Camilla Pedrosa **Vieira Lima**¹Larissa Freire Arlindo **Chagas**¹Daniela Corrêa **Grisi**¹Loise Pedrosa **Salles**¹Maria do Carmo Machado **Guimarães**¹Naile **Dame-Teixeira**¹¹Department of Dentistry, School of Health Sciences, University of Brasilia, Brazil**Abstract**

Background and aim: A previous meta-analysis from our research group showed that individuals with Diabetes mellitus type 2 (T2D) have a greater chance of developing both coronal and root caries than the systemically healthy ones. Our hypothesis for that result is the influence of an increased salivary levels of glucose changing the microbial composition of the individuals with DM. Hence, this cross-sectional study aimed to associate the blood and salivary glucose levels with the prevalence and extent of root caries, as well as on active coronal caries. A secondary aim was to compare the levels of salivary and blood glucose levels. **Methods:** N=52 individuals were evaluated regarding the salivary and blood glucose levels. From those, n=39 underwent clinical examination to diagnose the presence of coronal dental caries and root caries. The salivary flow and the pH were also evaluated. Blood samples were used to examine fasting blood glucose (FBG) and glycated hemoglobin (HbA1c). Mann-Whitney/Fisher tests were used to compare averages of clinical parameters and the prevalence of active caries. Unadjusted and adjusted negative binomial regressions models were applied. The significance level was 5%. **Results:** The prevalence of active coronal caries was 43.59% and active root caries was 10.25%. The average of salivary glucose levels was 0.95 mg/dL for patients with active coronal caries, 0.37 mg/dL for the ones with root caries and 0.49 mg/dL for individuals without

active caries lesion. The DMFS and root caries extent were correlated with HbA1c and FBG. Significant correlations were observed between salivary glucose and both HbA1c and FBG. Negative binomial regression models confirmed the importance of the blood glucose levels to explain the increase of root caries, even after adjustment for unstimulated saliva and age. **Conclusion:** The blood glucose levels may be important not only to analyze the glycemic control but also to detect some risk of root caries. Although salivary glucose test was associated with blood glucose levels, its correlation with root caries must be supported by additional studies.

Keywords: Diabetes mellitus type 2, Saliva, Glucose, Coronal caries, Root caries, Caries activity.

Introduction

Population aging is a phenomenon that occurs on a global scale. This process is characterized by the constant increase in life expectancy, which occurs mainly due to medical technological advances and greater concern for health. Although people are living longer, they are not necessarily healthier. Aging has consequences, such as the emergence of chronic diseases (Cho 2017), mostly initiated by habits such as tobacco addiction, physical inactivity, inadequate diet, alcohol abuse, stress and pollution. In 2014, the World Health Organization declared that the world population over 60 years old would increase from 841 million (2014) to 2 billion, by 2050, thus making chronic diseases and the well-being of the elderly new challenges for world public health (Lloyd-Sherlock et al. 2012).

Diabetes mellitus (DM) is one of the most common metabolic disease in the aged population and it might be the disorder that brings more salivary implications for elderly (Organization 2011). Persistent hyperglycemia leads to microvascular alterations in blood vessels, as well as in the salivary glands' membrane. These facts increase the leakage of glucose from the ductal cells of the salivary glands, expanding the glucose amount in saliva (Qureshi et al. 2007)(Panda. Abikshyeet, Ramesh, and Oza 2012). Salivary glands act as filters of blood glucose that are altered by hormonal or neural regulation (López et al. 2003).

There is a growing body of literature that recognize the importance of saliva as a biomarker of glucose levels (Ryan T. Demmer, Jacobs Jr, and Desvarieux 2008)(Smriti et al. 2016; Mascarenhas et al. 2014)(Mascarenhas, Fatela, and

Barahona 2014)(Panda. Abikshyeet, Ramesh, and Oza 2012)(Agrawal et al. 2013). Saliva collection is a non-invasive and painless method with an important advantage, particularly in cases of DM, where daily blood glucose measurement is essential. However, the effectiveness of saliva-based tests is still up for debate (Mascarenhas, Fatela, and Barahona 2014). Saliva can become a complementary test, being able to detect undiagnosed uncontrolled patients, through a quick, affordable, and easily accessible test, by checking the hyperglycemia in oral fluids.

This chronic hyperglycemia in saliva can reduce the ability of fibroblasts to synthesize connective tissue fibers, what makes the cicatrizing process possible. It can, perhaps, increase lactic acid production (Seethalakshmi, Jagat Reddy, et al. 2016), reducing the salivary pH. A lower pH can consequently favor the enrichment of aciduric species in the microbiota (Goodson et al. 2017a), leading to an oral dysbiosis (Belstrøm et al. 2016). Furthermore, individuals with DM frequently show high incidence and severity of periodontitis, due to their inflamophylic microbial profile (Long et al. 2017). Bone loss, followed by gingival recession are consequences of periodontitis can make those patients more prone to root caries (Panda. Abikshyeet, Ramesh, and Oza 2012).

Recently, our research group demonstrated in a systematic review and meta-analyses that individuals with DM type 2 (T2D) are more prone to develop both coronal and root caries than the systemically healthy ones. The results also displayed that individuals with uncontrolled glycemic levels have higher prevalence of caries than that of controlled ones (A. K. A. de Lima et al. 2020). Reduced salivary flow is considered the most important factor related to a higher risk of dental caries in DM individuals (Mauri-Obradors, 2017). However, other hypotheses might explain the higher prevalence of dental caries in patients with chronic hyperglycemia: **1)** the clinical criteria used for caries diagnosis and detection in most study is considering the past caries experience rather than evaluating caries activity; **2)** altered biochemical composition of saliva; and **3)** the influence of the increased salivary glucose in the previously described dysbiosis due to the lower pH. Hence, this study aimed to associate the blood and salivary glucose levels with the prevalence and extent of root caries, as well as on active coronal caries. A secondary aim was to compare the levels of salivary and blood glucose levels.

Material and methods

Study design and settings

This cross-sectional study was performed following the STROBE checklist. This research is in accordance with the guidelines for studies in humans, and it was approved by the Research Ethics Committee (number: 87962818.4.0000.0030). Individuals received the basic dental treatment, and the ones without oral diseases received oral hygiene instruction and professional prophylaxis.

Participants and eligibility criteria

The inclusion criteria were toothed individuals over 18 years old attending the Diabetes Dental Clinic at the University Hospital of Brasilia and that accepted to perform salivary and blood exams. From those individuals, a group had a previous medical diagnose of T2D, and/or use of insulin or hypoglycemic medications. The same individuals were also diagnosed with periodontitis, presenting at least two teeth with interproximal clinical attachment loss $\geq 3\text{mm}$ (Chang et al. 2020). Another group of individuals were healthy (control group).

Individuals with type 1 DM were excluded, as well as the ones with T2D without periodontitis, and the ones with periodontitis without T2D; individuals with complications and others systemic comorbidities, for example hyperglycemia, pregnant or puerperal, transplanted patients, individuals with a history of epilepsy, or with systemic conditions that may influence the physiology of the salivary gland, such as hypothyroidism, radiotherapy or chemotherapy treatment that preceded 3 months.

Data sources, measurement and variables

The study was carried out with the diabetic and non-diabetic patients of the Dental Clinic from the University Hospital of Brasilia (Brazil). Participants were recruited and examined from March 2018 to March 2020.

-Dental caries examination: The presence of coronal and root caries were observed in a complete dental examination, under artificial light, in a supine position, using clinical mirrors, WHO probes, and tooth isolation with cotton rolls. After tooth cleaning and drying, the visual-tactile inspection was performed to record active and inactive coronal caries lesions, based on Nyvad index (Nyvad and Baelum 2018). Lesions with characteristics of opaque enamel with a dull whitish surface were

diagnosed as active non-cavitated, and the inactive non-cavitated were the ones with shiny surface with different degrees of brownish discoloration. Active cavitated lesion was defined as localized surface destruction with dull-whitish enamel and soft dentin. Inactive cavitated lesions were classified as localized surface destruction with arrested characteristics (shiny and hard surfaces). The prevalence of coronal caries was the proportion of individuals with at least one non-cavitated or cavitated active lesion. For the coronal caries extent, we summed the number of surfaces with any kind of coronal active caries lesion. For root caries, lesions were classified as active according to the surface hardness. The root caries prevalence was the proportion of individuals with at least one surface suffering with active root caries. For the root caries extent, we included the active and inactive lesions.

-Periodontitis classification: The panoramic x-ray exams were evaluated and the stage and extension of periodontitis were classified by the same examiner with long experience as a periodontist, based on the International Classification for Periodontal Diseases (2017) (Tonetti, Greenwell, and Kornman 2018).

-Blood glucose levels: Prior to treatment, fasting blood glucose (mg/dL) and glycated hemoglobin (%) tests were carried out at the partner specialized center (Sabin labs, Brasilia - Distrito Federal, Brazil). Data were analyzed as continuous variables. Individuals were also categorized according to their glycemic level control as controlled (HbA1c<6.5; FBG<100) or uncontrolled (HbA1c>6.5; FBG>100).

-Saliva sampling: Saliva samples were collected in the morning (8-10am) to minimize the effect of circadian rhythms. The individuals were instructed to refrain from drinking, eating, and performing physical activity for at least two hours before the procedure. The unstimulated saliva was collected by passive drooling for 5 minutes. The amount of saliva was measured to calculate the salivary flow. The salivary flow of unstimulated saliva was classified according to the criteria used by Falcão et al (2014) as: **(1)** 0.0mL/min.- **assialia**, **(2)** 0.1 to 0.24mL/min.- **hyposialia** and **(3)** 0.3 to 0.4mL/min.- **ideal salivary flow** (Falcão et al. 2014).

The stimulated saliva was also collected according to the protocol used by Kogawa et al., 2016 to measure the salivary pH and glucose level. Individuals chewed a silicone device for 1 min. Saliva produced during the chewing was discarded and all

saliva produced in the next 5 minutes were collected and stored (Kogawa et al. 2016).

-Salivary pH: The stimulated saliva was used to evaluate salivary pH with the pH-Fix® indicator strips (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG- Düren, Germany). After 30 seconds to 1 minute of immersion in the saliva, the result is compared with the standard table, present in the tape packaging itself. The pH results were classified as =6, =7 or =8.

-Salivary glucose assay: Salivary glucose was measured from the stimulated saliva using the Labtest Glucose liquiform® kit (Labtest Diagnóstica S.A - Minas Gerais, Brazil), according to the manufacture instructions with an adaptation for the salivary volumes. The samples were centrifuged for 1 minute, and the 150 µL of the supernatant added to 500 µL of reagent 1 (phosphate buffer 30 mmol/L, pH 7.5; phenol 1 mmol/L; glucose oxidase 12500 U/L; peroxidase 800 U/L; 4-aminoantipyrine 290 mol/L; azide sodium 7.5 mmol/L; and surfactant). A glucose standard tube was added with the same volumes (glucose 100 mg/dL). The tubes were homogenized and incubated at 37 °C for 10 minutes. After the incubation time, 250 µL of the reaction was transferred in duplicate to the 96-wells plate, that was read at the photometer at 505 nm. The salivary glucose was evaluated as a continuous variable.

Reproducibility

Dental caries examinations were performed by trained and calibrated dental students (Kappa > 0.7). Calibration was performed using photographs that were first evaluated for the inter examiner calibration with a gold-standard. The photos were reassessed after 7 days for the intra-examiner calibration. The calibration was repeated every six months, and the examiners with both Kappa intra and inter-examiners > 0.7 performed the dental caries diagnosis. An average of 5 examiners performed dental examinations semesterly.

Statistical methods

Frequencies, average \pm and standard deviation (SD) were generated per group. Differences among the variables were observed between individuals regarding its coronal and root caries prevalence by using the following tests: the Chi-square test, to calculate ordinal and nominal categorical data pH and salivary flow, respectively; the

Fisher exact test, to calculate the significance of the relationship between the qualitative variables gender, periodontitis and T2D; and the Mann-Whitney test, for independent non-parametric data such as age, glucose intake, extent of root and coronal caries, DMFS, salivary glucose, fasting blood (FBG) and glycated hemoglobin (HbA1c). Spearman correlation was applied comparing the salivary glucose and blood glucose with root and coronal caries. Unadjusted and adjusted (for unstimulated salivary flow and age) negative binomial regression models for dispersed count data were used to test the risk for root caries when the salivary glucose levels, FBG and HbA1c are altered. The significance level of 5% was used.

Results

The total sample consisted of 52 patients that underwent salivary exams. From those, n=39 underwent dental caries examinations, including 22 individuals with a previous diagnosis of T2D and with periodontitis (n=6 had stage 4 generalized periodontitis, n=10 had stage 4 localized periodontitis; n=6 had stage 3 localized periodontitis) and 17 individuals systemically and periodontally healthy. Forty-five individuals performed blood tests. Figure 1 displayed the flowchart of the study, containing the number of individuals evaluated according to each parameter.

Table 1 shows the sampling characteristics regarding the active caries prevalence. Regarding gender, most were women (71.8%). The average age was similar between individuals with and without active caries, although individuals were older when active and inactive root caries lesions were considered (data not shown). The prevalence of active root and coronal caries were 10.25% and 43.59%, respectively. No statistically significant difference regarding the prevalence of periodontitis and sugar intake frequency was observed. The average of DMFS (decay, missing and filled surfaces) was high (more than 50 affected surfaces in average), and similar between groups with and without caries activity.

All individuals in the root caries group had a neutral salivary pH (pH=7), 50% had an ideal unstimulated salivary flow, while 25% were diagnosed with hyposalivation and assialia. In 75% of the cases positive for active root caries, there were controlled glycemic levels. The mean salivary glucose in individuals with root caries was 0.37, the mean HbA1c was 9.67 and the mean FBG was 196.7, but no statistical difference in averages was found regarding active caries prevalence. Regarding the individuals with active coronal caries, most had a neutral pH (n=13; 76.5%). Out of the 17 patients

belonging to this group, 3 (17.6%) demonstrated ideal unstimulated salivary flow, 4 (23.5%) assialia and 10 (58.8%) hyposalivation ($p=0.1$).

Spearman's correlations between extent of active coronal caries (meaning the number of surfaces with active caries) and salivary glucose, DMFS, extent of active coronal caries, Hb1c and FBG are shown at Table 2, Figures 2 and 3. DMFS and HbA1c as well as DMFS and FBG were positively correlated. Significances with active caries extent were not observed. As expected, HbA1c and FBG were strongly and significantly correlated. Furthermore, this analysis confirmed the correlation of the salivary glucose with blood parameters, both HbA1c and FBG.

Spearman's correlations between glucose levels and root caries extent (meaning the number of root caries lesions, either active or inactive) were also performed (Table 3 and Figure 4). Significant positive correlations between root caries extent and HbA1c, FBG, and active root caries extent, although the coefficient showed that the correlations were weak to moderate, varying from 0.5 to 0.7.

Negative binomial regression (Table 4) was used to assess the risk of increasing the extent of root caries when increasing levels of salivary glucose, FBG and HbA1c. Although salivary glucose is strongly associated with blood glucose parameters, its relationship with root caries lesions was not observed ($p=0.769$). In the regression models, the increase of HbA1c and FBG explained some increase of root caries extent ($p<0.05$). When the regression models were adjusted for unstimulated salivary flow and age, the significance of the models was maintained. It means that each one-unit increase on HbA1c, the expected log count of the number of root caries lesions increases by 0.522, while for FBG it increases by 0.019. No regression models were significant for the active coronal caries.

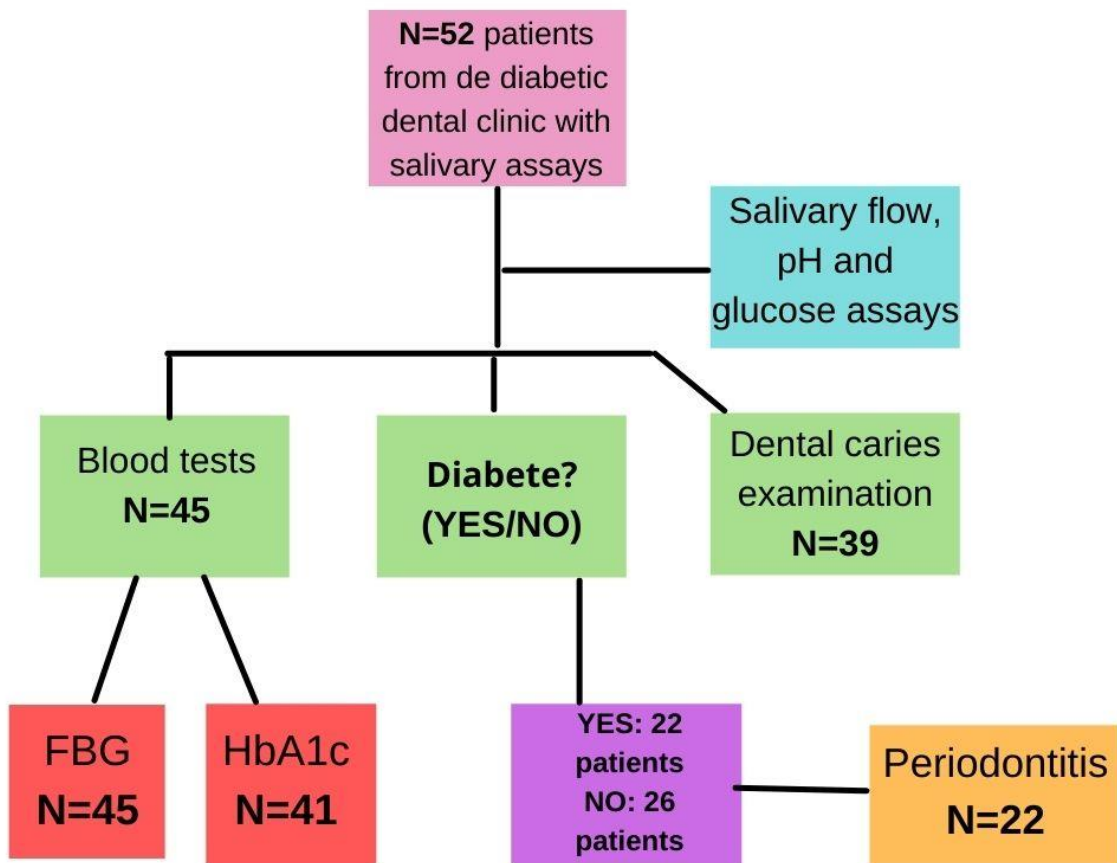


Figure 1: Flowchart of the study.

Table 1: Characteristics of the sample according to the prevalence of active caries (at least one active decayed surface).

	Active root caries			Active coronal caries		
	No (n=35)	Yes (n=4)	p	No (n=22)	Yes (n=17)	p
Demographic						
Age	51.63±13.6	55.75±6.8	0.5 ^{&}	49.36±14.1	55.53±10.98	0.1 ^{&}
Gender (Female)	24	4	0.3 [§]	17	11	0.4 [§]
Dental examinations						
Periodontitis			1.0 [§]			0.5 [§]
• No	16	19		11	6	
• Yes***	1	2		11	10	
Sucrose intake frequency	1.3±1.4	2.0±1.7	0.4 ^{&}	1.35±1.5	1.37±1.4	0.8 ^{&}
Root caries extent (including inactive lesions)	0.29±1.2	1.5±0.58	0.001 ^{&}	0.18±0.5	0.71±1.72	0.3 ^{&}
Coronal caries extent (only active lesions)	1.26±2.55	3.75±4.79		0	3.47±3.5	
DMFS	63.74±36.5	54.25±34.99	0.5 ^{&}	63.27±42.3	62.12±27.04	0.9 ^{&}
Salivary characteristics						
Salivary pH			0.4 [*]			0.4 [*]
• pH6	5	0		4	1	
• pH7	25	4		16	13	
• pH8	5	0		2	3	
Non-stimulated salivary flow diagnosis			0.5 [*]			0.1 [*]
• Assialia	5	1		2	4	
• Hyposialia	19	1		10	10	
• Ideal	11	2		10	3	
Glucose levels						
Glycemic level control			0.2 [§]			1.0 [§]
• Controlled	16	3		10	9	
• Uncontrolled	15	0		8	7	
Salivary glucose	0.67±0.62	0.37±0.39	0.5 ^{&}	0.43±0.32	0.95±0.76	0.05 ^{&}
HbA1c	7.37±2.36	9.67±2.1	0.1 ^{&}	7.66±2.78	7.49±1.97	0.7 ^{&}
FBG	122.85±51.63	196.7±94.73	0.06 ^{&}	130±69.4	127.75±42.12	0.4 ^{&}

*Chi-square test; § Fisher exact test; &Mann-Whitney test; *** These individuals are the same that presented a previous diagnosis of T2D.

T2D = Type 2 Diabetes Mellitus; **HbA1c**= Blood glycated hemoglobin; **FBG**= Fasting blood glucose.

Table 2. Spearman correlation between salivary glucose, fasting blood glucose and coronal caries (DMFT and active caries extent).

		DMFS	Caries active extent	HbA1c	FBG
Salivary glucose (mg/mL)	Correlation coefficient	0.4	0.319	0.5	0.4
	p	0.007	0.062	0.001	0.006
	N	35	35	39	43
DMFS	Correlation coefficient		-0.18	0.6	0.6
	p		0.26	0.000	0.000
	N		39	34	36
Caries active extent	Correlation coefficient			0.013	0.142
	p			0.942	0.408
	N			34	36
HbA1c	Correlation coefficient				0.7
	p				0.000
	N				41

DMFS= Decayed, missing and filled surfaces (OMS criteria); **FBG=** Fasting blood glucose; **HbA1c=** Blood glycosylated hemoglobin.

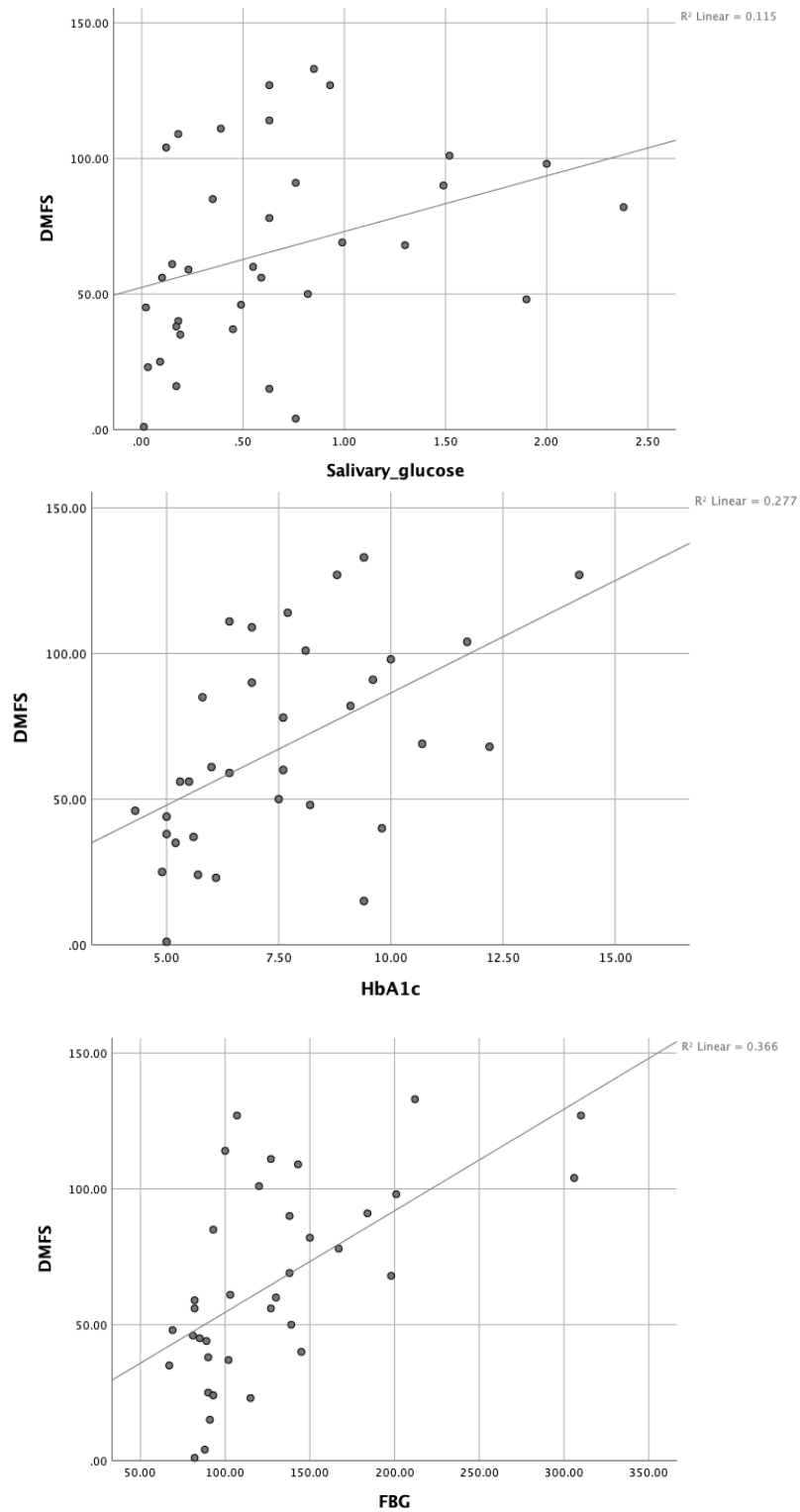


Figure 2. Dispersion of the DMFS (decayed, missing or filled surfaces) and glucose levels, glycated hemoglobin (HbA1c) and fasting blood glucose (FBG).

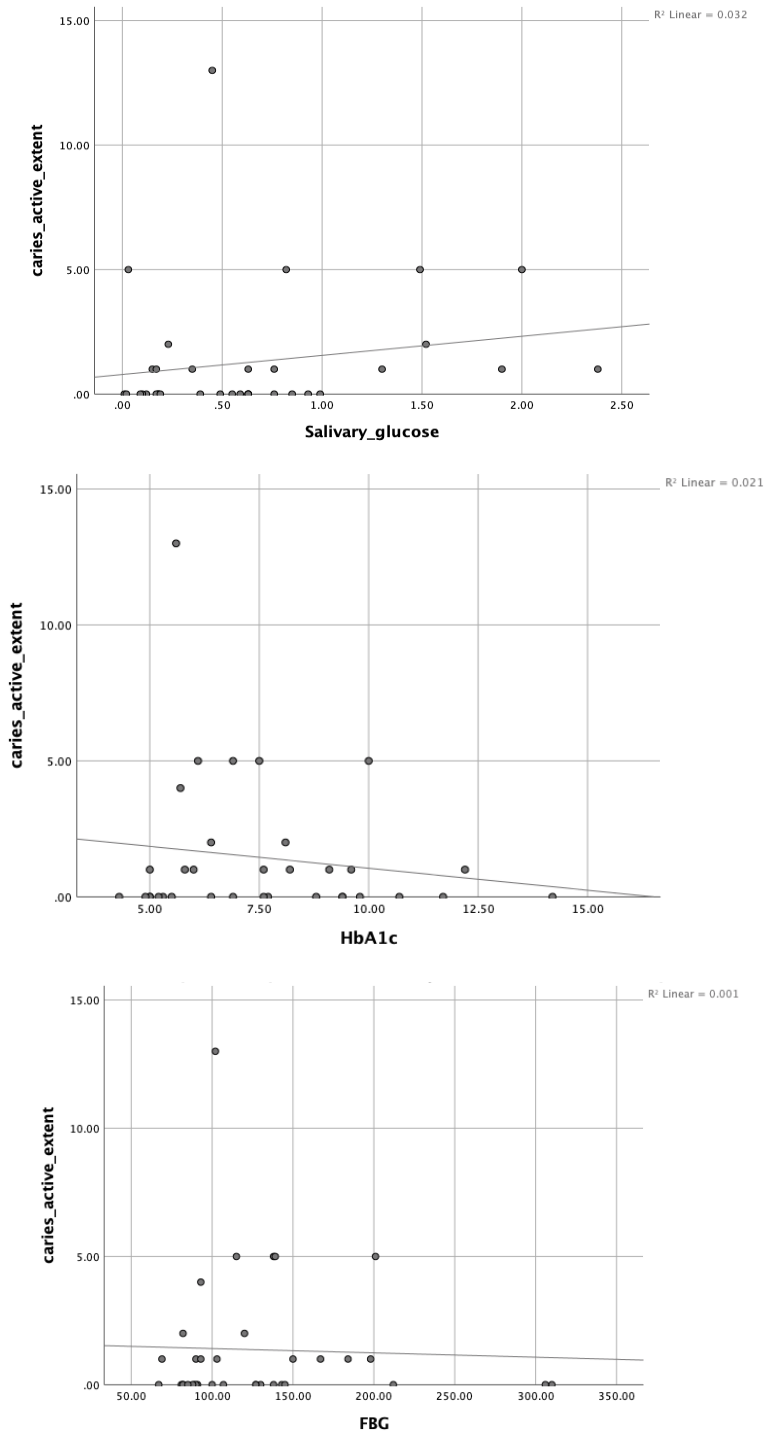


Figure 3. Dispersion of the active coronal caries extent and glucose levels, glycated hemoglobin (HbA1c) and fasting blood glucose (FBG).

Table 3. Spearman correlation between salivary glucose, glycated hemoglobin, fasting blood glucose and root caries.

		RC active	RC extent
Salivary glucose (mg/mL)	Correlation coefficient	-0.1	0.2
	p	0.506	0.261
	N	35	35
HbA1c	Correlation coefficient	0.280	0.495
	p	0.108	0.003
	N	34	34
FBG	Correlation coefficient	0.324	0.523
	p	0.054	0.001
	N	36	36
RC active	Correlation coefficient		0.673
	p		0.000
	N		39

FBG= Fasting blood glucose; **HbA1c=** Blood glycated hemoglobin; **RC extent=** Number of surfaces with active or inactive, non-cavitated or cavitated, root caries lesion; **RC active=** Number of surfaces with an active non-cavitated or cavitated root caries lesion.

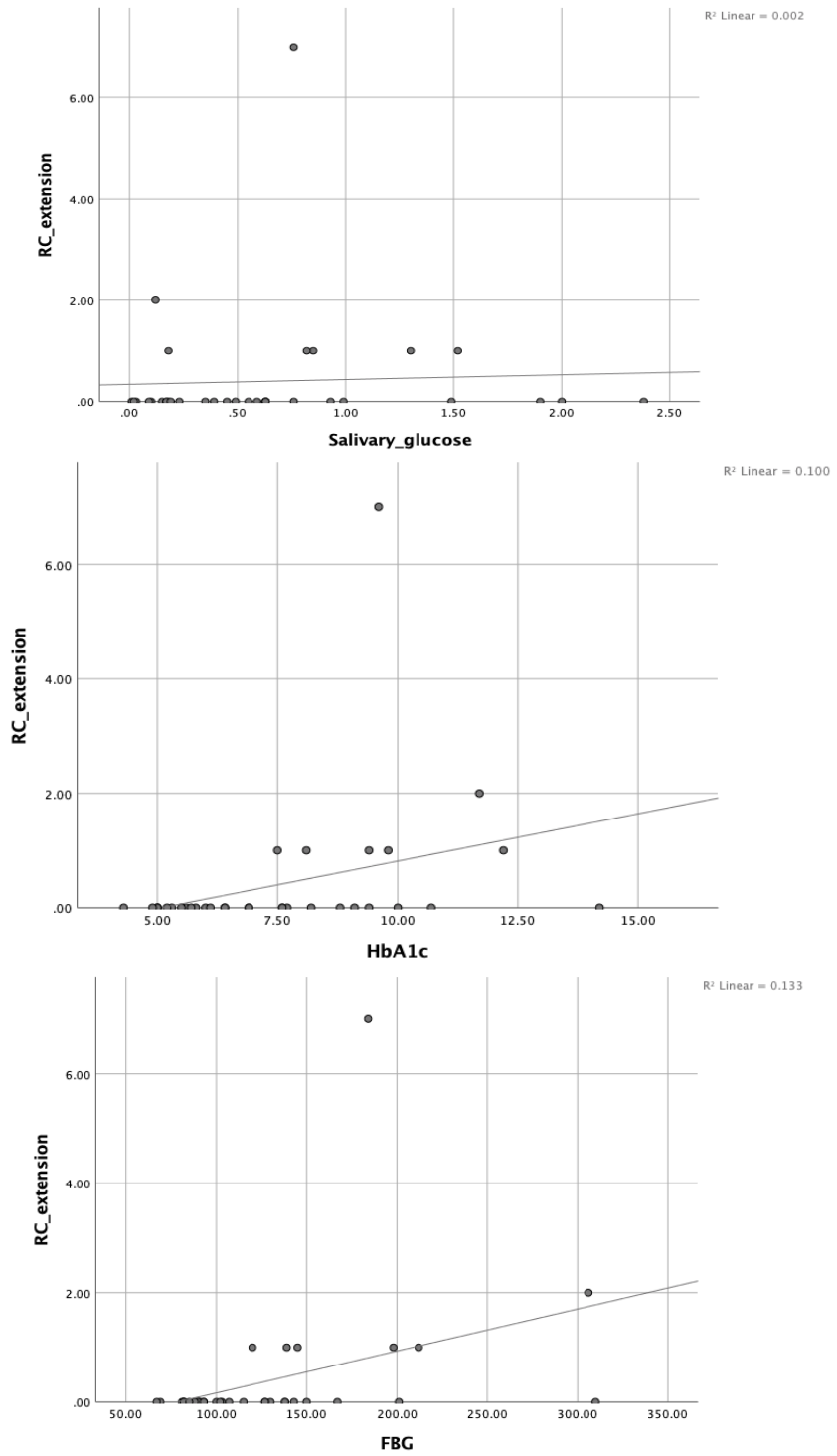


Figure 4. Dispersion of the root caries extent and glucose levels, glyated hemoglobin (HbA1c) and fasting blood glucose (FBG).

Table 4. Negative binominal regression model of root caries extent and salivary glucose levels, fasting blood glucose and glycated hemoglobin.

	Unadjusted			Adjusted*				
	Exp(B)	95% Intervalo de Confiança de Wald		p	Exp(B)	95% Intervalo de Confiança de Wald		p
Salivary glucose	0.169	-0.959	1.298	0.769				
HbA1c	0.486	0.135	0.838	0.007	0.522	0.118	0.905	0.008
FBG	0.016	0.004	0.029	0.010	0.019	0.006	0.032	0.006

FBG= Fasting blood glucose; **HbA1c=** Blood glycated hemoglobin. *Adjusted for unstimulated salivary flow and age.

Discussion

Our previous systematic review and meta-analysis detected significant higher caries extent of both coronal and root caries in diabetic individuals than in systemically healthy ones (A. K. A. de Lima et al. 2020). One of our hypotheses for that result is the influence of an increased salivary levels of glucose that might be modulating the oral environment favoring the growth of cariogenic microorganisms. To test this hypothesis, we develop the present cross-sectional study, where the correlation and association of glucose levels with the prevalence and extent of root caries were tested, as well as on active coronal caries. A secondary aim was to compare the levels of salivary and blood glucose levels. Our findings suggest a strong influence of the blood levels at the root caries, confirming our initial hypothesis.

Some parameters have been studied as risk indicators for dental caries such as the salivary flow, buffer capacity and salivary pH. In the present cross-sectional study, we showed that high glucose levels should be further studied as possible biomarker for caries. Our results for coronal caries showed a positive relation between salivary glucose with FBG and HbA1c (Gupta et al. 2017; Mascarenhas). Positive correlations between all the glucose variables with DMFS were observed, confirming the findings from Seethalakshmi et al. (2016). This author showed a mean DMFT index higher in the DM group when compared to control group. It is worth noting that the DMFS level counts missing teeth but not necessarily due to caries, what makes us question whether this result is valid. It is crucial to bear in mind the importance of the caries activity evaluation. The activity of caries represents the disease in course: patients who were losing mineral from the teeth in the moment of the study and that could be related to the high glucose levels. If inactive lesions or missed and filled teeth were included in the analysis, it could add a bias due to the loss of temporality. Furthermore, the difference in our results is that pH decreased when observing DM patients (data not

shown), although pH was 7,0 for most of the sample, even for those patients with more caries, coronary and root ones.

Several studies had already shown that DM alters the salivary flow (Mascarenhas, Fatela, and Barahona 2014)(Panda. Abikshyeet, Ramesh, and Oza 2012)(Agrawal et al. 2013)(Mahdavi et al. 2012). A possible reasons could be the accumulation of lipids due to hyperglycemia that causes degenerative changes in the salivary glands, impairing their function (Rai et al. 2011)(Murrah 1985). The salivary alteration caused by this comorbidity is an important issue for oral health maintenance. Salivary gland hypofunction may lead to important changes at oral mucosa, further than problems for chewing, swallowing and lubrication, those leading to an inadequate diet. Halitosis increment of exfoliated cells and pathogens, decreased production of antimicrobial substances, saburral tongue and a greater possibility to develop oral mucosal diseases, such as oral candidiasis or lichen planus, are typical consequences of hyposalivation (Artico et al. 2014). In this study, the focus were given to the rise of glucose concentrations in saliva, which was previously shown to be involved in the predisposition for caries (Carramolino-Cuéllar et al. 2018)(Anthony and Vernillo 2003)(Dodds, Yeh, and Johnson 2000). We confirmed the hypothesis that not just salivary flow reduction, but also the glucose levels, had effect in caries risk increase in DM individuals, as the regression models still significant risk of increased root caries in individuals with higher blood glucose levels even after adjustment for the salivary flow.

Root caries lesions are more common than coronal ones due to the largely organic (collagen) nature of this tissue allowing it to slowly soften when exposed to low pH levels. If the diagnosis comes early, this changed dentine has the potential to remineralizers (James L. Leake 2001)(Garton and Ford 2012). Although salivary glucose is an indicator of the blood glucose levels, we were unable to demonstrate its relationship with an increase in root caries lesions. The lack of differences in salivary glucose might be explained due to of the sample size. For each value increased in HbA1c and FBG, more chances of develop root caries are expected, even when adjusted for unstimulated salivary flow. The adjustment for the unstimulated salivary flow was chosen due to the significant reduction in DM patients (data not shown). However, the salivary glucose (so as the blood glucose) influenced the DMFS in a statistically significant way, although we believe this result can be questioned, as discussed before, since the DMFS can inflate the estimates of caries in diabetic

individuals (Ribeiro et al. 2021). Taken all the results together, we believe that the assessment of salivary glucose could be a complementary parameter for the analysis of caries risk in the future in the dental care of DM individuals, where salivary glucose levels may represent blood glucose levels.

Here, significant correlations were observed between salivary glucose and both HbA1c and FBG. Also, the salivary glucose levels were altered in uncontrolled patients. Abikshyeet (2012) explained the association between FBG with the increasement of glucose in saliva saying that hyperglycemia leads to increased final products of glycosylation, commonly known as "AGEs". These products can cause endothelial dysfunction by changing the basement membrane, making it more permeable. Products like sorbitol and fructose-6-phosphate are examples of substances formed because of the presence of chronic high glucose concentration and they also change the basement membrane by altering extracellular matrix proteins. The result of these all facts is a leak in the membrane, which explains the increase in the passage of blood glucose from blood to saliva in DM.

However, there are some debates regarding glucose assessment via saliva. Nowadays, to detect T2D there are blood and urine tests available. However, urine tests suffer with two disadvantages: First, the increasement of glucose in urine only happens when there is an extremely high concentration of glucose in blood, so, DM would be diagnosed in urine just when the patient is not well-controlled. Second, it is much more difficult to collect urine under fasting conditions, so far blood test remains the gold standard for screening, monitoring and diagnosing DM (Mascarenhas, Fatela, and Barahona 2014). To discuss if saliva would be considered as a biomarker for DM or not, Mascarenhas, 2014, developed a systematic review, where in 7 studies two kinds of salivary glucose measurement were used: Glucose oxidase/phenol and aminophenazone method (GOD-PAP), and the oxidase-peroxidase method (GOD-POD). The first one determines the level of glucose after enzymatic oxidation by glucose oxidase. The colorimetric indicator is quinoneimine, which is generated from 4-aminoantipyrine and phenol by hydrogen peroxide under the catalytic action of peroxidase (RP, 2013). The other method is summarized by glucose oxidase (GOD) catalyzing the oxidation of glucose to gluconic acid. The formed hydrogen peroxide (H₂O₂) is detected by a chromogenic oxygen acceptor phenol, 4-AP, 4-aminophenazone in the presence of POD, peroxidase (Mahdavi et al. 2012). In our study the salivary glucose was measured by the stimulated saliva using the Labtest

Glucose liquiform® kit (Labtest Diagnóstica S.A - Minas Gerais, Brazil), according to the manufacture instructions with an adaptation for the salivary volumes. This method may be influenced by factors such as storage of carbohydrates in saliva, sugar consumption, release of carbohydrates by salivary glycoprotein, and salivary contamination by elevated crevicular fluid in patients with gingivitis (Mahdavi et al. 2012). In other hand, it is a cheaper and painless method, but depends on a laboratory, just like the blood measurement.

More research is needed to understand the practices currently employed by dentists to diagnose root caries and assess the risk of developing future lesions. Furthermore, the ability to track DM at a dental appointment appears to be a very cost-effective and a simple way to deal with the burden of the disease. In case of identification of patients with high glucose in saliva, with or without a previous history of DM, they should immediately be referred to an endocrinologist. It is important to emphasize that the saliva test, simple and affordable, can be an early diagnosis for DM, in the case of uncontrolled glycemia. It is recommended that an adequate and multidisciplinary follow-up be carried out with such patients, combining several areas of action in health, such as: Medicine, Dentistry, Nutrition and Physical Education, always focusing on the educational issue, so that changes in habits and behavior occur, when required (Garton and Ford 2012).

The power of the study was calculated based on the prevalence of root caries for cross-sectional studies, considering the 95% of confidence interval, 35 unexposed individuals and 4 exposed, with prevalence rate of 8 and prevalence difference of 77%, reaching a power of 88.16%. The power for the coronal caries was low, then more studies are needed to confirm the results on coronal caries. As this is a study carried out in a University Hospital, it has some data not collected from all individuals and it downrate the external validity. Cohort studies should be developed to confirm results with external validity once oral manifestations of DM can modify dental care needs. More research is also needed to evaluate the sensitivity/specificity of measuring glucose in saliva for the detection of uncontrolled DM. However, we confirmed that the salivary glucose measurement can be a fast and simple preliminary test that can be applied in the clinic by a trained member of the dental team as a complementary exam.

Conclusion

The blood glucose levels may be important not only to analyze the glycemie

control but also to detect some risk of root caries. Although salivary glucose test was associated with blood glucose levels, its correlation with root caries must be supported by additional studies.

Acknowledgment

Authors gratefully acknowledge the financial support from the FAP-DF (process number: 16991.78.45532.26042017), the Postgraduate Program in Dentistry of the University of Brasilia and CAPES. Sabin laboratories are thanked for the partnership with the blood tests. Priscilla Fernandes is acknowledged for her assistance.

References

1. Abikshyeet, Panda., Venkatapathy. Ramesh, and Nirima. Oza. 2012. "Glucose Estimation in the Salivary Secretion of Diabetes Mellitus Patients." *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 5: 149–54. <https://doi.org/10.2147/dmso.s32112>.
2. Agrawal, R.P., N Sharma, M.S. Rathore, V.B. Gupta, S. Jain, V. Agarwal, and S. Goyal. 2013. "Noninvasive Method for Glucose Level Estimation by Saliva." *Journal of Diabetes & Metabolism* 04 (05). <https://doi.org/10.4172/2155-6156.1000266>.
3. Anthony, T., and D.D.S. Vernillo. 2003. "Dental Considerations for the Treatment of Patients with Diabettes Mellitus." *JADA* 134: 22–33.
4. Artico, G., R.S. Freitas, A.M. Santos Filho, G. Benard, R. Romiti, and D.A. Migliari. 2014. "Prevalence of Candida Spp., Xerostomia, and Hyposalivation in Oral Lichen Planus-a Controlled Study." *Oral Dis.* 20 (3): e36-41. <https://doi.org/10.1111/odi.12120>.
5. Belstrøm, Daniel, Palle Holmstrup, Allan Bardow, Alexis Kokaras, Nils Erik Fiehn, and Bruce J. Paster. 2016. "Comparative Analysis of Bacterial Profiles in Unstimulated and Stimulated Saliva Samples." *Journal of Oral Microbiology* 8 (1): 30112. <https://doi.org/10.3402/jom.v8.30112>.
6. Carramolino-Cuéllar, Esther, Dorina Lauritano, Francisco Javier Silvestre, Francesco Carinci, Alberta Lucchese, and Javier Silvestre-Rangil. 2018. "Salivary Flow and Xerostomia in Patients with Type 2 Diabetes." *Journal of Oral Pathology and Medicine* 47 (5): 526–30. <https://doi.org/10.1111/jop.12712>.
7. Chang, H.J.;, S.J.; Lee, T.H.; Yong, N.Y.; Shin, B.G.; Jang, J.E.; Kim, K.H.; Huh, et al. 2020. "Deep Learning Hybrid Method to Automatically Diagnose Periodontal Bone Loss and Stage Periodontitis." *Scientific Reports* 10 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64509-z>.
8. Cho, Nam Han. et al. 2017. "IDF Diabetes Atlas." *IDF Diabetes Atlas, 8th Edition*. <https://www.idf.org/aboutdiabetes/type-2-diabetes.html>.
9. Demmer, Ryan T., David R. Jacobs Jr, and Moises. Desvarieux. 2008. "Periodontal Disease and Incident Type 2 Diabetes." *Epidemiology/Health Services Research* 31 (7): 1373–79. <https://doi.org/10.1177/0022034510381902>.

10. Dodds, Michael W.J., Chih Ko. Yeh, and Dorthea A. Johnson. 2000. "Salivary Alterations in Type 2 (Non-Insulin-Dependent) Diabetes Mellitus and Hypertension." *Community Dentistry and Oral Epidemiology* 28 (5): 373–81. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0528.2000.028005373.x>.
11. Falcão, Denise Pinheiro., Soraya Coelho. Leal, Celi Novaes. Vieira, Andy. Wolff, Tayana Filgueira Galdino Almeida, Fernanda. De Paula e Silva Nunes, Rivadávio Fernandes Batista. De Amorim, and Ana Cristina Bezerra. 2014. "Sialometry of Upper Labial Minor Glands: A Clinical Approach by the Use of Weighing Method Schirmer's Test Strips Paper." *The Scientific World Journal* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/268634>.
12. Garton, B.J., and P.J. Ford. 2012. "Root Caries and Diabetes: Risk Assessing to Improve Oral and Systemic Health Outcomes." *Australian Dental Journal* 57 (2): 114–22. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2012.01690.x>.
13. Goodson, J. Max., Mor Li. Hartman, Ping. Shi, Hatice. Hasturk, Tina. Yaskell, Jorel. Vargas, Xiaoqing. Song, et al. 2017. "The Salivary Microbiome Is Altered in the Presence of a High Salivary Glucose Concentration." *PLoS ONE* 12 (3): 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170437>.
14. Gupta, Shreya, Meghanand Nayak, J. Sunitha, Geetanshu Dawar, Nidhi Sinha, and Neelakshi Rallan. 2017. "Correlation of Salivary Glucose Level with Blood Glucose Level in Diabetes Mellitus." *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_222_15.
15. Kogawa, Evelyn Mikaela, Daniela Corrêa Grisi, Denise Pinheiro Falcão, Ingrid Aquino Amorim, Taia Maria Berto Rezende, Izabel Cristina Rodrigues da Silva, Osmar Nascimento Silva, Octávio Luiz Franco, and Rivadávio Fernandes Batista de Amorim. 2016. "Salivary Function Impairment in Type 2 Diabetes Patients Associated with Concentration and Genetic Polymorphisms of Chromogranin A." *Clinical Oral Investigations* 20 (8): 2083–95. <https://doi.org/10.1007/s00784-015-1705-z>.
16. Leake, James L. 2001. "Clinical Decision-Making for Caries Management in Root Surfaces." *Journal of Dental Education* 65 (10): 1147–53. <https://doi.org/10.1002/j.0022-0337.2001.65.10.tb03464.x>.
17. Lima, Ana Karolina Almeida de, Juliana Amorim dos Santos, Cristine Miron Stefani, Adriano de Almeida de Lima, and Nailê Damé-Teixeira. 2020. "Diabetes Mellitus and Poor Glycemic Control Increase the Occurrence of Coronal and Root Caries: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Clinical Oral Investigations* 24 (11): 3801–12. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03531-x>.
18. Lloyd-Sherlock, Peter., Martin. McKee, Shah. Ebrahim, Mark. Gorman, Sally. Greengross, Martin. Prince, Rachel. Pruchno, et al. 2012. "Population Ageing and Health." *The Lancet* 379 (9823): 1295–96. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60519-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60519-4).
19. Long, J., Q. Cai, M. Steinwandell, M.K. Hargreaves, S.R. Bordenstein, W. J. Blot, W. Zheng, and X. O. Shu. 2017. "Association of Oral Microbiome with Type 2 Diabetes Risk." *Journal of Periodontal Research* 52 (3): 636–43. <https://doi.org/10.1111/jre.12432>.

20. López, María Elena, María Eugenia Colloca, Rafael Gustavo Páez, Judit Nora Schallmach, Myriam Adriana Koss, and Amalia Chervonagura. 2003. "Salivary Characteristics of Diabetic Children." *Brazilian Dental Journal* 14 (1): 26–31. <https://doi.org/10.20396/bjos.v10i2.8641644>.
21. Mahdavi, Seyyed Omid., Sedighe. Hashemi, Najmeh Sadat. Boostani, and Haleh. Zokae. 2012. "A New Method to Evaluate Fasting Plasma Glucose by Salivary Glucose Measurement." *Iranian Journal of Diabetes and Obesity* 4 (3): 127–33.
22. Maltz, Marisa., Berenice. Barbachan e Silva, Danusa Queiroz de. Carvalho, and Alexandre. Volkweis. 2003. "Results after Two Years of Non-Operative Treatment of Occlusal Surface in Children with High Caries Prevalence." *Brazilian Dental Journal* 14 (1): 48–54. <https://doi.org/10.1590/S0103-64402003000100009>.
23. Mascarenhas, Paulo., Bruno. Fatela, and Isabel. Barahona. 2014. "Effect of Diabetes Mellitus Type 2 on Salivary Glucose - A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies." *PLoS ONE* 9 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101706>.
24. Murrah, V.A. 1985. "Diabetes Mellitus and Associated Oral Manifestations: A Review." *Journal of Oral Pathology & Medicine* 14 (4): 271–81. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1985.tb00494.x>.
25. Nyvad, Bente., and Vibeke. Baelum. 2018. "Nyvad Criteria for Caries Lesion Activity and Severity Assessment: A Validated Approach for Clinical Management and Research." *Caries Research* 52 (5): 397–405. <https://doi.org/10.1159/000480522>.
26. Organization, World Health. 2011. "Global Health and Aging." *Hum. Serv.*
27. Qureshi, A., A. Qureshi, H. Quereshi, and A.A. Khan. 2007. "Blood Glucose Level, Salivary PH and Oral Bacterial Count in Type 1 Diabetic Children." *Infect Dis J.* 16 (2): 45–48.
28. Rai, Kavita., Amitha. Hegde, Ananth. Kamath, and Suchetha. Shetty. 2011. "Dental Caries and Salivary Alterations in Type i Diabetes." *Journal of Clinical Pediatric Dentistry* 36 (2): 181–84. <https://doi.org/10.17796/jcpd.36.2.x436ln878221g364>.
29. Ribeiro, B.A., C.P. Vieira Lima, L.S. Alves, and N. Damé-Teixeira. 2021. "Impact of Detection Criteria on Coronal and Root Caries Estimates in Adults with and without Type II Diabetes Mellitus." Brasília.
30. Seethalakshmi, C., R.C. Jagat Reddy, Nisha. Asifa, and S. Prabhu. 2016. "Correlation of Salivary PH, Incidence of Dental Caries and Periodontal Status in Diabetes Mellitus Patients: A Cross-Sectional Study." *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 10 (3): ZC12–14. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/16310.7351>.
31. Smriti, Komal, Keerthilatha M. Pai, Vineetha Ravindranath, Srikanth Gadicherla, and Kalyana Chakravarthy Pentapati. 2016. "Salivary Glucose as a Diagnostic Marker for Diabetes Mellitus." *Journal of Diabetes Science and Technology* 10 (4): 991–92. <https://doi.org/10.1177/1932296816637619>.
32. Tonetti, M.S., H.; Greenwell, and K.S. Kornman. 2018. "Staging and Grading of Periodontitis: Framework and Proposal of a New Classification and Case Definition." *Journal of Clinical Periodontology* 45: S149–61.

Artigo 2:**Influence of salivary glucose and pH in the oral microbiome**Camilla Pedrosa **Vieira Lima**¹Maria do Carmo Machado **Guimarães**¹Loise Pedrosa **Salles**¹Paula de Castro **Kruly**¹Thuy **Do**²Luiz Gustavo dos Anjos **Borges**³Daniela Corrêa **Grisi**¹Naile **Dame-Teixeira**^{1,2}¹ School of Health Sciences, University of Brasilia, Brazil² School of Dentistry, University of Leeds, UK³ Microbial Interactions and Processes Research Group, Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Germany**Abstract**

Objectives: We recently published a metanalysis showing that poor glycaemic control makes individuals with type 2 Diabetes Mellitus (T2D) more prone to caries. Our hypothesis is that higher levels of salivary glucose are more likely to predispose to dental caries. This study aimed to investigate the association between the salivary microbiome, pH and glucose levels. **Methods:** A cross-sectional study was carried out, including adults with and without a diagnosis of T2D. Coronal and root caries, periodontitis, fasting blood glucose (FBG), and glycated haemoglobin (HbA1c) were detected. Saliva was collected for salivary glucose and pH measurements. Total DNA was extracted from saliva, and amplicons of the V4 region of the 16S rRNA gene were submitted to high throughput sequencing. The amplicon sequence variants were identified by the DADA2 pipeline, and the association of microbial taxa with the salivary and blood glucose levels were verified using Spearman correlation. **Results:** Salivary glucose was positively associated with FBG and HbA1c ($p < 0.05$). The *Actinobacteria* phylum showed higher abundance in the group of individuals with salivary glucose

<0.35mg/dL than the group with salivary glucose \geq 0.35mg/dL (17.6 \pm 6.8% vs. 13.1 \pm 5.1%). The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio was higher in the group of patients with saliva at pH8 than in the pH6 group (16.8 \pm 10.1 vs. 81.8 \pm 120.4), while *Proteobacteria* phylum was in lower abundance (15.6 \pm 12.3% vs. 3.9 \pm 3.8%). At the genus level, *Veillonella* was depleted in individuals with alkali saliva. Several organisms in abundance lower than 0.01% were prevalent in at least 50% of the samples. Significant differences were found for the Shannon diversity index regarding the salivary pH.

Conclusion: Salivary glucose and pH are associated with the salivary microbiome composition that predisposes to dental caries risk. Further studies on *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio might be suggested as a promising predictor of oral disease.

Keywords: Oral microbiome, Salivary glucose, Salivary pH, Illumina sequencing.

Introduction

One well established oral manifestation of Diabetes Mellitus (DM) is periodontitis, and it may also impair the glycemic control systemically (Grisi et al. 2021). However, several other oral manifestations of DM can be explained by the hyperglycemia state that can directly favor the growth of pathogens, damaging cellular functions and, consequently, host defenses. DM can exacerbate several oral diseases, essentially when the glycemic levels are uncontrolled (Grisi et al. 2021). As an example, the reduced salivary flow is commonly observed in individuals suffering with metabolic disorder (Falcão et al. 2013). Furthermore, our research group recently published a metanalysis showing that a poor glycaemic control makes individuals with type 2 DM (T2D) more prone to dental caries (A. K. A. de Lima et al. 2020). Our hypothesis is that higher levels of salivary glucose might predispose individuals to that situation, as hyperglycemia can changes the oral microbial environment, as well as promotes a salivary acidification.

According to Douglas et al., when the blood glucose concentration exceeds 84.8 mg/dL, it is then in detectable levels at saliva (Douglas et al. 2014). Due to that, there is a growing body of literature that recognize the importance of saliva as a biomarker of glucose levels (Mascarenhas, Fatela, and Barahona 2014)(Panda. Abikshyeet, Ramesh, and Oza 2012)(Agrawal et al. 2013)(Mascarenhas, Fatela, and Barahona

2014)(Smriti et al. 2016). In a high concentration, salivary glucose may change the pH of the oral cavity since bacteria are nourishing and excreting acid metabolites. The acidification is proposed to interfere with bacterial reproduction, altering the relative bacterial species frequency and count of the microbiome (Belstrøm et al. 2016)(Goodson et al. 2017b)(Belstrøm et al. 2016). However, the acidification of saliva can also be explained by the presence of ketone bodies, which makes the oral pH of DM individuals more acid in general (Fujii et al. 2014).

An fundamental issue in microbiome studies is to understand how the dysbiosis happen changing the host's health status to a disease condition, since microorganisms have coevolved with humans contributing to their nutrition and interacting with the mammalian immune system (P. S. Kumar et al. 2020). As an example, the gut microbiota represents an "extra organ" of the human body. However, the gut microbiome is closely associated with local and systemic diseases. DM individuals and obese people, for example, present alterations in the taxonomic and functional composition of their gut microbiota (Ogawa et al. 2018). Also, since all gastric bacteria are introduced through the oral cavity, it is possible that a lowered salivary pH due to hyperglycemia may act as a filter to inhibit replenishment of gastric *Bacteroidota* species, while more facilely transmitting gastric *Firmicutes* species, what was already reported (Goodson et al. 2017b).

Once the salivary microbiome is described in the presence high glucose concentration, a possible way to control this dysbiosis can be evaluated, avoiding the increase of DM oral manifestations. Thus, we can also answer whether the higher caries index in DM individuals is associated with reduction in salivary flow, or with the altered biochemical composition of saliva, or even with the alteration of the microbiological environment. So, this study aims to investigate the association between the salivary microbiome, pH and glucose levels, and correlate the microbiome with clinical variables, root and coronal caries.

Subjects and Methods

Ethics

This study was approved by the Research Ethics Committee of the School of Health Sciences of the University of Brasilia (process number 87962818.4.0000.0030) in accordance with the declaration of Helsinki. All patients signed a formal consent

form and received basic dental treatment.

Study Design, Setting and Participants

This cross-sectional study was performed following the STROBE checklist. Fifty-two toothed individuals (>18 years old) were enrolled to Diabetes Dental Clinic at the University Hospital of Brasilia (Brazil). Patients were recruited and the data collected from March 2018 to March 2020. They received the basic dental treatment. The ones without oral diseases received oral hygiene instruction and professional prophylaxis.

A group of individuals (n=23) had a previous medical diagnose of T2D, and/or use of insulin or hypoglycemic medications. The same individuals were also diagnosed with periodontitis, presenting at least two teeth with interproximal clinical attachment loss ≥ 3 mm (Chang et al. 2020). Another group belonged to the control group, without any systemic changes (n=29).

Individuals with type 1 DM were excluded, as well as the ones with severe systemic comorbidities, pregnant or puerperia, transplanted patients, individuals with a history of epilepsy, or with systemic conditions that may influence the physiology of the salivary gland, such as hypothyroidism, radiotherapy or chemotherapy treatment that preceded 3 months.

Clinical examination

- Dental **caries examinations** were also performed by trained and calibrated dental students (Kappa > 0.7). The number of remaining teeth was counted by visual inspection. The presence of caries was observed in a complete dental examination, under artificial light, in a supine position, using clinical mirrors, WHO probes, and tooth isolation with cotton rolls. After tooth cleaning and drying, the visual-tactile inspection was performed to record active and inactive coronal caries lesions, based on Nyvad index (Nyvad and Baelum 2018). Caries activity (the number of surfaces with either non-cavitated or cavitated caries, the traditional DMFS (WHO criteria; at the cavity level, representing the past caries experience), as well as the number of surfaces with root caries, either non-cavitated or cavitated root caries were evaluated.

- **Fasting blood glucose** (mg/dL) and **glycated hemoglobin** (%) tests were carried out at the partner specialized center (Sabin labs, Brasilia - Distrito Federal, Brazil). Individuals were also categorized according to their glycemic level control as

controlled (HbA1c<6.5; FBG<100) or uncontrolled (HbA1c>6.5; FBG>100).

Salivary collection

Stimulated and passive salivary flow collects were performed in the morning (8-10 am) to minimize the effect of circadian rhythms. Individuals were asked to refrain from drinking, eating, and performing physical activities at least two hours before salivary collection. The collection time by passive drooling was 5 minutes. After collection, the unstimulated saliva was aliquoted (500µL) into sterile DNase and RNase free microtubes and stored at -20°C until further DNA extraction and sequencing. The suspension was then centrifuged for 30 seconds at 10,000 rpm and the supernatant discarded.

Salivary glucose assay

Salivary glucose was measured from the stimulated saliva using the Labtest Glucose liquiform® kit (Labtest Diagnóstica S.A - Minas Gerais, Brazil), according to the manufacture instructions with an adaptation for the salivary volumes. The samples were centrifuged for 1 minute, and the 150 µL of the supernatant added to 500 µL of reagent 1 (phosphate buffer 30 mmo/L, pH 7.5; phenol 1 mmol/L; glucose oxidase 12500 U/L; peroxidase 800 U/L; 4-aminoantipyrine 290 mol/L; azide sodium 7.5 mmol/L; and surfactant). A glucose standard tube was added with the same volumes (glucose 100 mg/dL). The tubes were homogenized and incubated at 37 °C for 10 minutes. After the incubation time, 250 µL of the reaction was transferred in duplicate to the 96-wells plate, that was read at the photometer at 505 nm. The salivary glucose was evaluated as a continuous variable, as well as dichotomic (cut-off point 0.35mg/dL).

Salivary flow and pH

The salivary pH and buffer capacity were tested in the stimulated saliva. After a minute of chewing a rubber device, the total volume of stimulated saliva was collected for 5 minutes by passive drool to a plastic container. The pH was evaluated with the pH-Fix® indicator strips (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG- Düren, Germany). After 30 seconds to 1 minute of immersion in the saliva, the result is compared with the standard table, present in the tape packaging itself.

Salivary DNA extraction and PCR

DNA was extracted using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), following the manufacturer's protocol. The regions V3-V4 from the 16S rRNA gene were amplified using the Q5 High Fidelity DNA polymerase kit (New England BioLabs Inc., Life Technologies Inc. US) with the 564F and 806R primers (Eurogentec, Belgium). After PCR products checking using agarose gel electrophoresis, amplicons were purified using MicroCLEAN (Microzone Ltd, UK). Nextera XT kit was used for library preparation and adaptor ligation, followed by clean up with AMPure Beads (Beckerman Coulter, Inc). Amplicon sizes were assessed with 2200 TapeStation System and the QuantiT PicoGreen dsDNA Assay Kit was used to quantify the libraries. Amplicons were then sequenced on the Illumina MiSeq platform.

Bioinformatics and data analysis

The reads were submitted to the DADA2 (Quast et al. 2013) for a single read dataset of amplicon sequence variants (ASVs), a more stringent pipeline to identify low abundant microorganisms. Reads were filtered by quality and size, and error rates were estimated. Singletons were identified and removed during dereplication. Chimeras were removed, and taxonomy was assigned using the Silva v.132 database (Diaz 2012). ASVs assigned to Eukaryote, Chloroplast, or Mitochondria were removed for further analysis.

Mann-Whitney test was applied to compare clinical parameters between groups after confirming the non-parametric condition of the data (SPSS software version 25.0 for Mac; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Mean and standard deviation were calculated for the clinical variables. The values per ASVs were summed per phyla and then the average was calculated by the clinical characteristics. A metadata table was done with the clinical characteristics of the individuals, including salivary pH, HbA1c, FBG, and the number of caries lesions. Spearman correlation was used to compare ASVs relative abundance (RA) with these metadata. The DESeq algorithm, followed by the Benjamini-Hockenberg correction test, were used to calculate the differential abundance between groups.

Results

Clinical characteristics

The total sample consisted of 52 individuals that underwent salivary exams.

From those, n=23 had a clinical diagnosis of T2D and periodontitis (DMP), and n=25 were systemically and periodontally healthy (non-DMP), as shown in table 1 (missing data regarding the diagnosis of T2D and/or periodontitis for 4 individuals). DMP group was significantly older than non-DMP. This is a relevant finding, once individuals with DM have clinical characteristics, such as age, that can represent additional selective pressure under the microbiome.

Salivary glucose was positively correlated with HbA1c and FBG (Spearman; $p=0.001$ and 0.006 , respectively, data not showed) and the glucose levels of both saliva and blood confirmed the significantly higher hyperglycaemia in DMP group. DMP individuals had higher past caries experience, as the DMFS was significantly higher, but neither active caries (active D-S component) nor root caries (D-S component) was significantly different between groups.

Sequencing output and the relative abundance of the microbiota

During the sequencing of the 52 saliva samples, after screening and optimization (removal of 3526 ASVs of kingdom Eukaryota, 23 ASVs of unclassified bacteria -phyla "NA"-, 19 ASVs of chloroplast, and 216 ASVs of mitochondria), 2281 ASVs were identified, from which 78 belonged to the *Archaea* domain and 2203 from the *Bacteria* domain. The overall oral salivary microbiota was composed by 33 phyla, 61 classes, 130 orders, 194 families, 332 genera, 407 different taxa annotations.

After metadata analysis, 5 samples were excluded due to missing data. A total of 47 samples were included on downstream analysis. After rarefaction for minimum count of 35.000 reads, n=45 samples remained in the alpha-diversity analysis (C12 and DMP51 excluded after rarefaction).

Table 1. Clinical characteristics of the sample.

	non-DMP N=25		DMP N=23		p
	Average	SD	Average	SD	
Sociodemographic					
Age	43.13	12.98	58.52	8.5	0.000*
Sex - N(%) female	19 (76%)		35 (72%)		0.748**
Glucose levels					
Salivary glucose	0.37	0.5	0.84	0.65	0.002*
HbA1c	5.25	0.41	8.83	2.02	0.000*
FBG	89.67	13.07	148.13	65.43	0.000*
Dental caries					
Root caries extent (D-S)	0.12	0.49	0.64	1.53	0.061*
DMFS (WHO criterium)	36.06	21.01	83.41	31.41	0.000*
Caries active extent (active D-S)	2.00	3.9	1.14	1.69	0.637*
Other salivary characteristics					
Unstimulated salivary flow - N (%)					
Assialia	3 (12%)		3 (13%)		0.440**
Hyposalivation	10 (40%)		13 (56.5%)		
Ideal	12 (48%)		7 (30.4%)		
Salivary pH	7.08	0.49	7.04	0.64	0.850*

*U Mann-Whitney test; **Fisher exact test; **WHO=** World Health Organization criterium for caries detection.

Alpha-diversity

The alpha-diversity was calculated for samples rarefied at 35.000 reads (45 samples with or without diagnosis of DM and periodontitis). There is no difference for alpha-diversity indexes (diversity, richness, evenness) on salivary microbiome between “DMP” and “non-DMP” groups (Figure 1).

The influence of salivary pH and glucose on alpha-diversity were analysed and a tendency of higher diversity (Shannon index) in individuals with normal salivary glucose (<0.35 mg/dL) and in the non-DMP group can be observed (healthy associated characteristics). This found agrees with the concept that the higher the diversity, the better for the health, once loss of diversity is one type of dysbiosis.

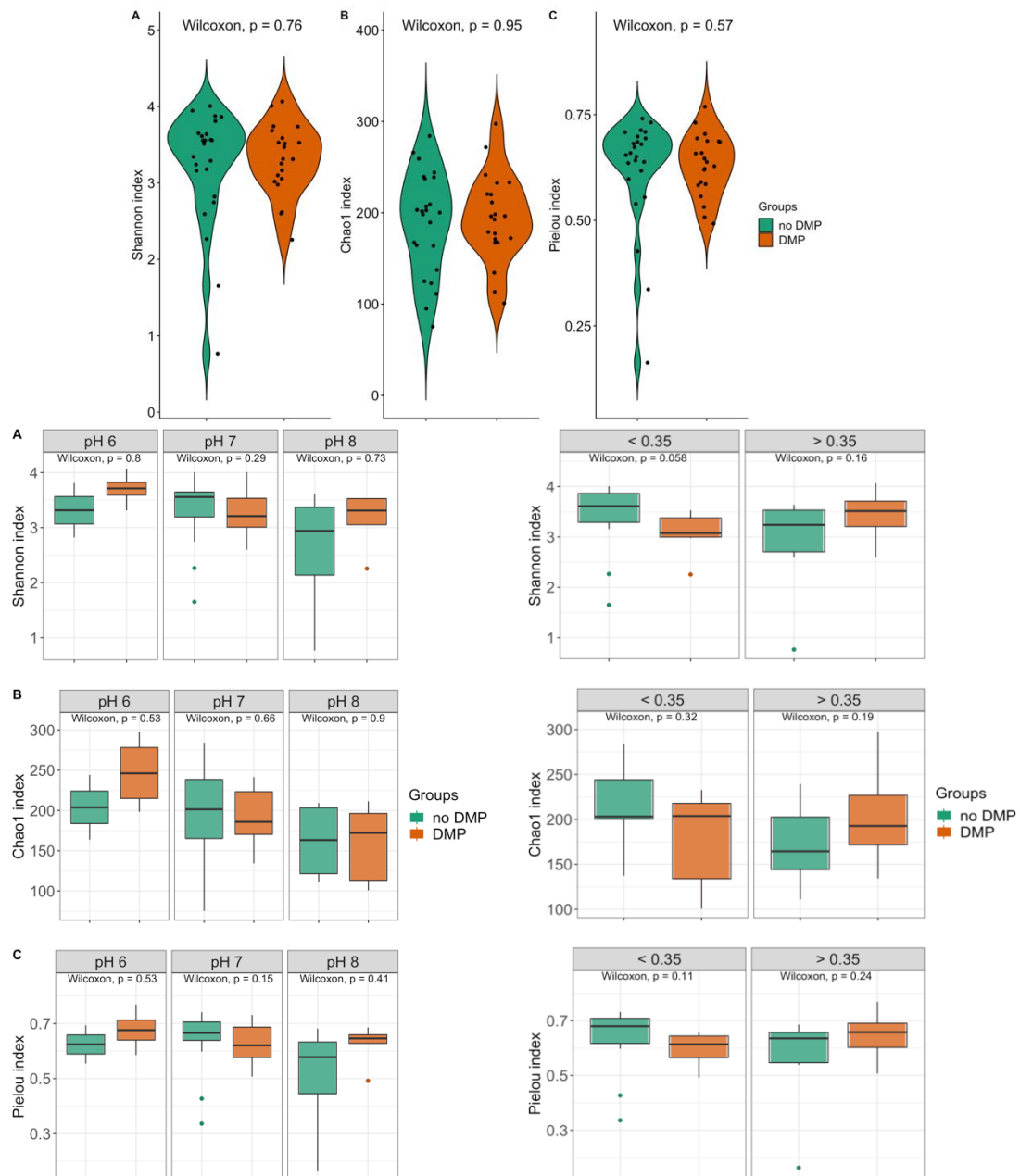


Figure 1. Alpha-diversity indexes according to the group, salivary pH, and salivary glucose (<0.35 mg/dL or >0.35 mg/dL).

Taxa annotation

Figure 2 shows the 10 most abundant phyla from 33 in total. From those, 23 phyla present very low abundance and prevalence. The average abundance of phyla was 22 in DMP and 25 in controls. Interestingly, no important difference was observed in the most abundant phyla when groups were compared, although both groups present differences in clinical characteristics, what should strongly shape oral microbiome (age, diagnosis of DM and periodontitis). The same was observed at the

genus level (Figure 3).

Using the total dataset of 52 samples, we calculated the differences between relative abundance averages. The *Firmicutes/Bacteroidota* ratio significantly increase with the alkalisation of the salivary pH (Kruskal-Wallis test $p=0.028$). The contrary can be observed in the averages of *Proteobacteria* and *Veillonella* relative abundances (increase with the acidification of the pH; $p=0.012$). *Bacteroidetes* ($p=0.021$), *Spirochaetota* ($p=0.004$), and *Desantisbacteria* ($p=0.037$) were in low abundance, but also affected by the salivary pH (Table 2; Kruskal-Wallis test). The *Actinobacteria* phylum showed higher abundance in the group of individuals with salivary glucose $<0.35\text{mg/dL}$ than the group with salivary glucose $\geq 0.35\text{mg/dL}$ ($17.6\pm 6.8\%$ vs. $13.1\pm 5.1\%$; U Mann-Whitney $p=0.019$; table 2). These evaluations were realized based on non-parametric calculations, what makes it important to consider the small size of the saliva samples at pH 6 and pH 8.

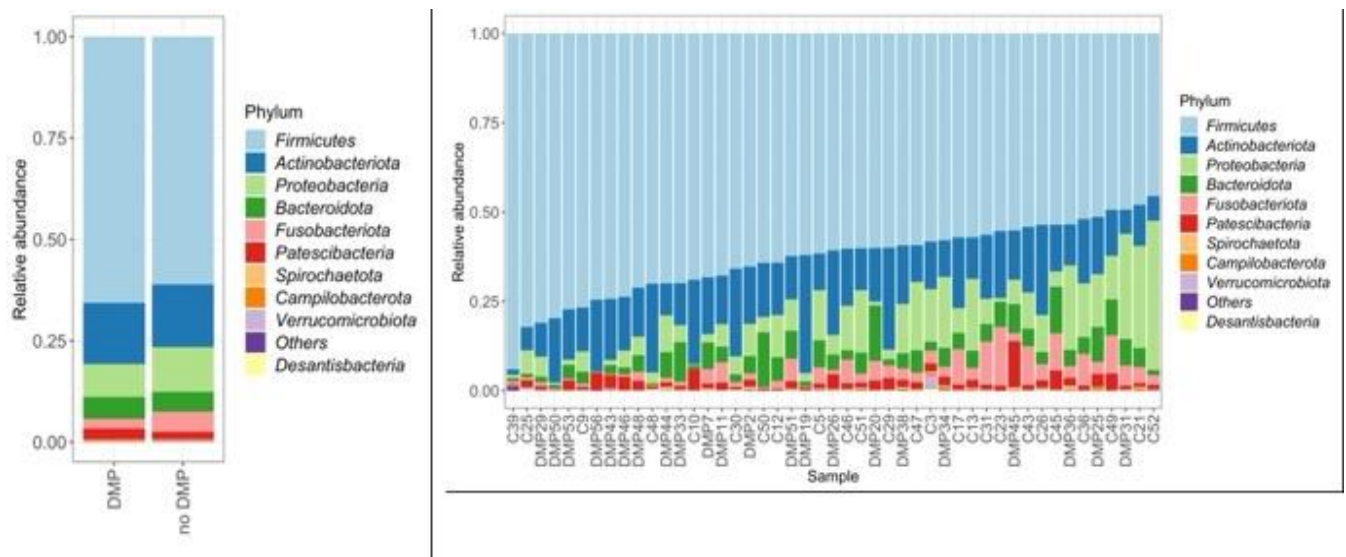


Figure 2. Most abundant phyla in the salivary microbiome (DMP= type 2 *Diabetes mellitus* and periodontitis; non-DMP= systemically and periodontally health).

Table 2. Salivary microbiome taxa influenced by the salivary pH and/or salivary glucose.

Salivary pH	Rate Firmicutes/ Bacteroidota	Proteobacteria	Actinobacteriota	Bacteroidota	Spirochaetota	Desulfobact erota	Veillonella
pH 6 (n=8)	16.83±10.12	0.16±0.12	0.13±0.04	0.05±0.03	0.01±0.01	0.00±0.00	0.03±0.02
pH 7 (n=34)	25.06±32.04	0.11±0.10	0.15±0.05	0.06±0.04	0.00±0	0.00±0	0.04±0.03
pH 8 (n=10)	81.88±120.41	0.04±0.04	0.20±0.09	0.02±0.02	0.00	0.001±0.003	0.01±0.01
Salivary glucose <0.35 mg/dL (n=21)	49.94±89.29	0.09±0.07	0.18±0.07	0.04±0.03	0.001±0.002	0.00	0.03±0.02
Salivary glucose ≥0.35 mg/dL (n=26)	23.89±26.16	0.12±0.12	0.13±0.05	0.05±0.04	0.002±0.004	0.00±0.002	0.03±0.03

Genera

Fifty-three taxa with abundance higher than 1% were found (of 390 taxa from 47 samples, as shown in Figure 3). At the genus level, *Veillonella* was depleted in individuals with alkali saliva and several organisms in abundance lower than 0.01% were prevalent in, at least, 50% of the samples, such as *Absconditabacteriales* (SR1), what can be positively associated with root caries extension.

The ubiquitous microorganism, that means present nearly in all situations (in this study the cutoff point was 50% or more samples), includes the following taxons: *Abiotrophia*, *Absconditabacteriales_(SR1)*, *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Actinobacillus*, *Actinomyces*, *Aggregatibacter*, *Alloprevotella*, *Alloscardovia*, *Anaerovoracaceae*, *Aquabacterium*, *Atopobium*, *Bergeyella*, *Bifidobacterium*, *Butyrivibrio*, *Campylobacter*, *Candidatus_Saccharimonas*, *Capnocytophaga*, *Cardiobacterium*, *Catonella*, *Centipeda*, *Clostridia_UCG-014*, *Comamonas*, *Corynebacterium*, *Defluviitaleaceae_UCG-011*, *Desantisbacteria*, *Dialister*, *Eikenella*, *Enhydrobacter*, F0058, F0332, *Filifactor*, *Fusobacterium*, *Gemella*, *Granulicatella*, *Haemophilus*, *Isobaculum*, *Johnsonella*, *Kingella*, *Lachnoanaerobaculum*, *Lactobacillus*, *Lautropia*, *Leptotrichia*, *Mannheimia*, *Mobiluncus*, *Mogibacterium*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *Oceanivirga*, *Oribacterium*, *Parvimonas*, *Peptoanaerobacter*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Prevotellaceae_YAB2003*, *Pseudoramibacter*, *RF39*, *Rothia*, *Saccharimonadaceae,,* *Saccharimonadales*, *Selenomonas*, *Solobacterium*, *Sphingobium*, *Stomatobaculum*, *Streptococcus*, *Tannerella*, *TM7x*, *Treponema*, *Veillonella* and *Verrucomicrobiales*.

It is relevant to mention the ubiquitous taxa only present in DMP: *Desulfobulbus*, DMI, *Fretibacterium* JGI_0000069-P22, *Peptostreptococcaceae*, *Porphyromonadaceae* and *Shuttleworthia*. The ubiquitous taxons only in non-DMP group included *Brevundimonas*, *Necropsobacter*, *Ottowia* and *Scardovia*.

Beta-diversity

The compositional dissimilarity among samples was calculated by the Permanova test, for 10.000 permutations. It showed significant variability in community composition between groups ($p=0.022398$; $R^2=0.03969$) and with respect to pH ($p=0.006799$; $R^2=0.07737$). However, when both variables are grouped (salivary pH and group), the difference was not maintained ($p=0.560844$; $R^2=0.03821$) suggesting that the salivary pH can be influenced by Diabetes, periodontitis, or age (Figure 4). The same pattern was observed at the ASV-level ($n=2055$ ASVs).



Figure 3. Fifty-three taxa with abundance higher than 1% (of 390 taxa, from 47 samples). DMP= type 2 *Diabetes mellitus* and periodontitis; non-DMP= systemically and periodontally health.

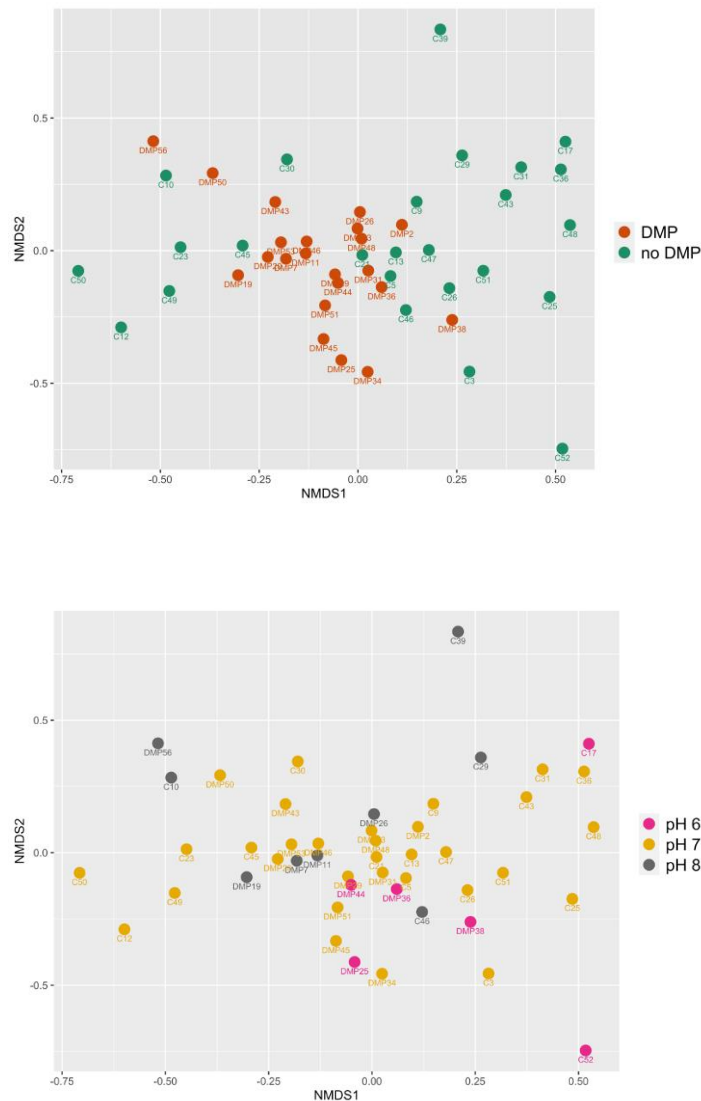


Figure 4. Beta-diversity measured by Bray Curtis distance on NMDS plot (n=390 taxa).

Correlation of the microbial composition and the clinical parameters

There were 119 taxa significantly correlated to clinical variables, either positively or negatively (38 taxa with $p < 0.01$). Those clinical variables included the salivary pH, salivary glucose, HbA1c, FBG, number of active caries lesions and DMFS. What stands out from this result (Figure 5) is the positive correlation between both blood glucose levels (FBG and HbA1c) with *Treponema*, *Desulfobulbus* and *Phocaicola*.

Abiotrophia and *Oceanivirga* were positively, while *Desantisbacteria* was negatively correlated with both caries variables (active caries extent and DMFS, representing caries activity and past caries experience, respectively). For this result,

we can identify the age and diagnosis of DM (DMP older and had higher DMFS average) as confounding factors.

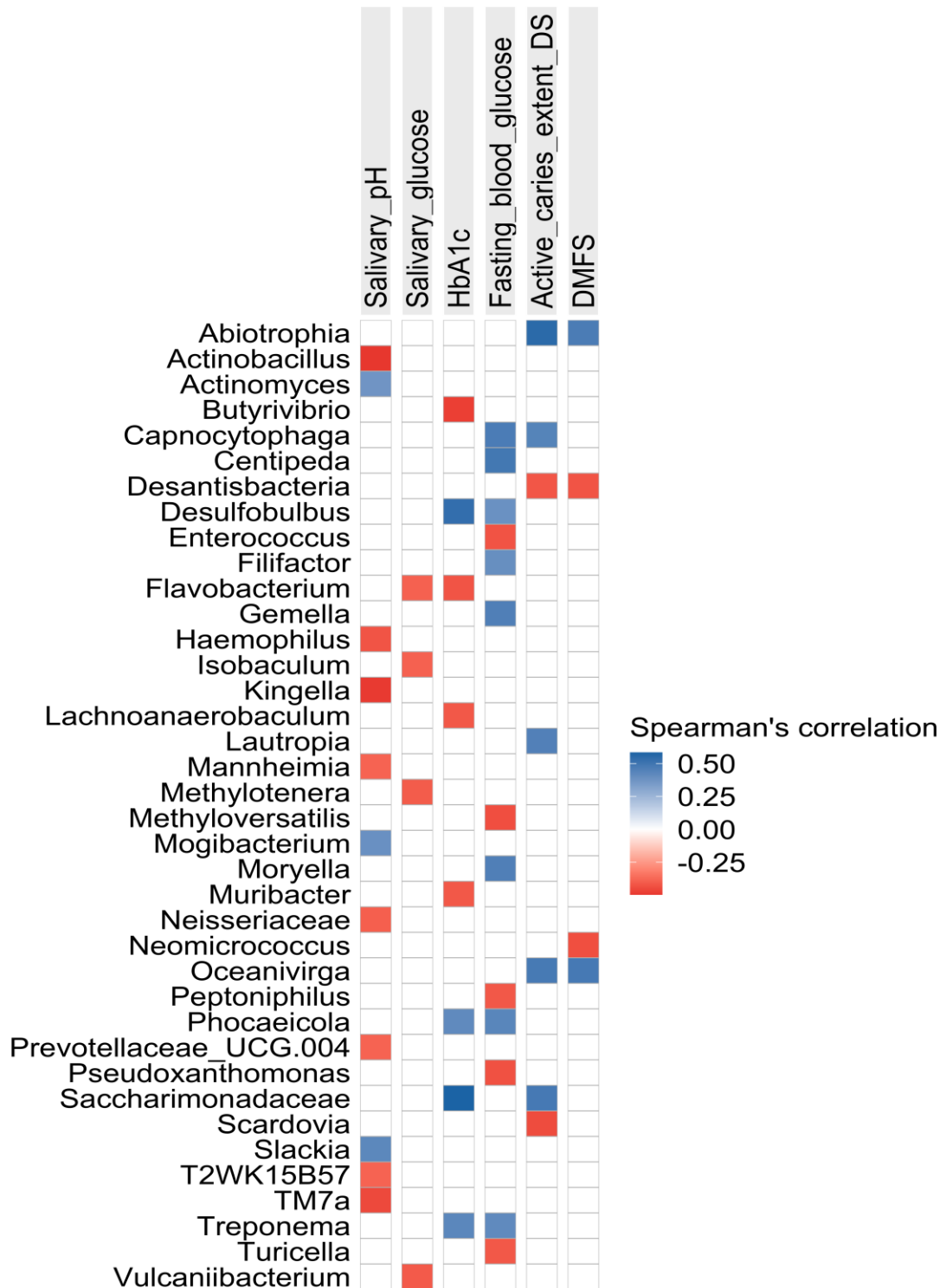


Figure 5. Spearman correlation between clinical variables and taxa ($p < 0.01$).

Permutation test for CCA under reduced model (Number of permutations: 10000)

The Permutation test for CCA under reduced model showed statistical significance for salivary pH ($p=0.04$) and HbA1c ($p=0.02$) (53 taxa with abundance higher than 1% for $n=47$). Caries indices (active caries extent and DMFS) followed all blood indexes (HbA1c, FBG and salivary glucose), and *Desulfobulbus* and *Saccharimonadaceae* followed the increase of all those parameters (Figure 6).

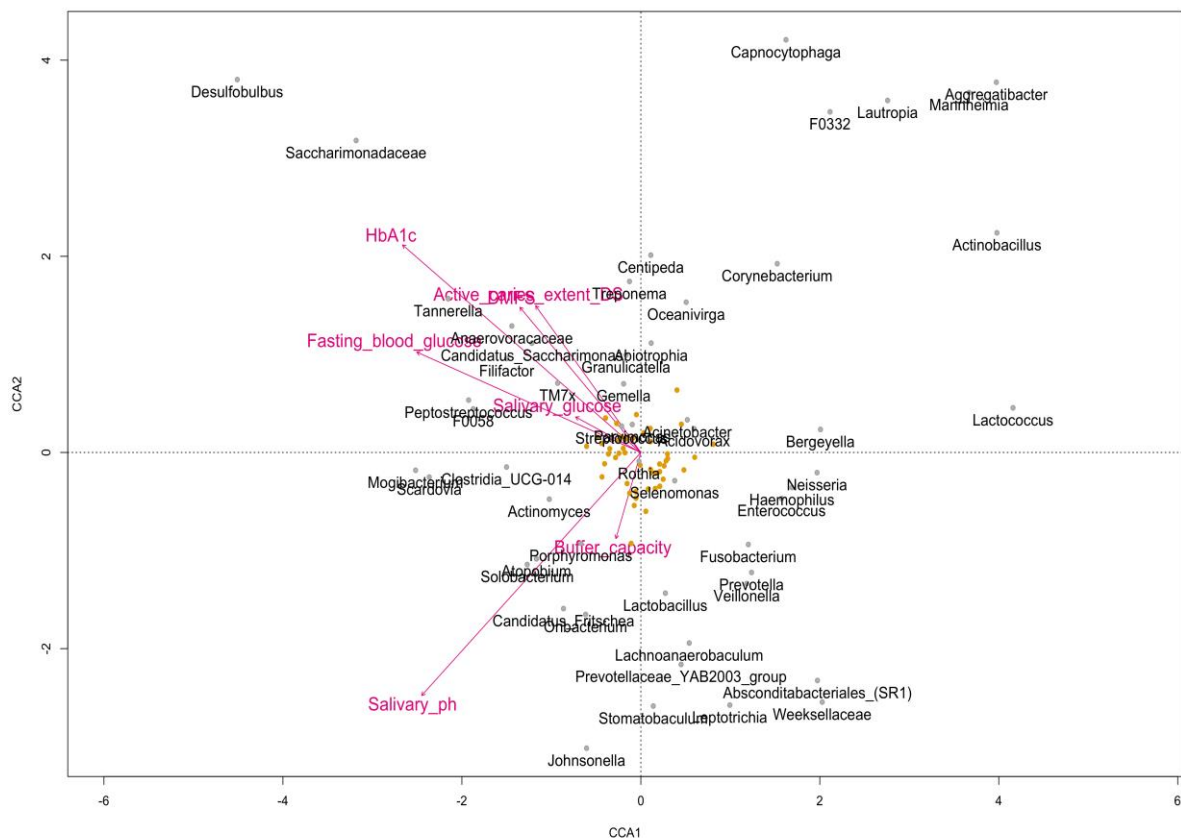


Figure 6. CCA plot showing the influence of the clinical variable in the salivary microbiome changes.

Differential abundance analysis using Deseq2

BH correction test for Deseq2 analysis showed statistical significance for nine taxa ($p<0.05$) of 390 taxa of 47 samples (Figure 7). Taxa with positive values ($\log_2\text{foldchange}$) are more abundant (enriched) in non-DMP and negative values ($\log_2\text{foldchange}$) are more abundant (enriched) in DMP. *Desulfobacterota* ($\log_2\text{FC}=-4$; p adjusted=0.04), the greater difference was at the *Methyloversatilis* and *Neomicrococcus*= $\log_2\text{FC}>6$.

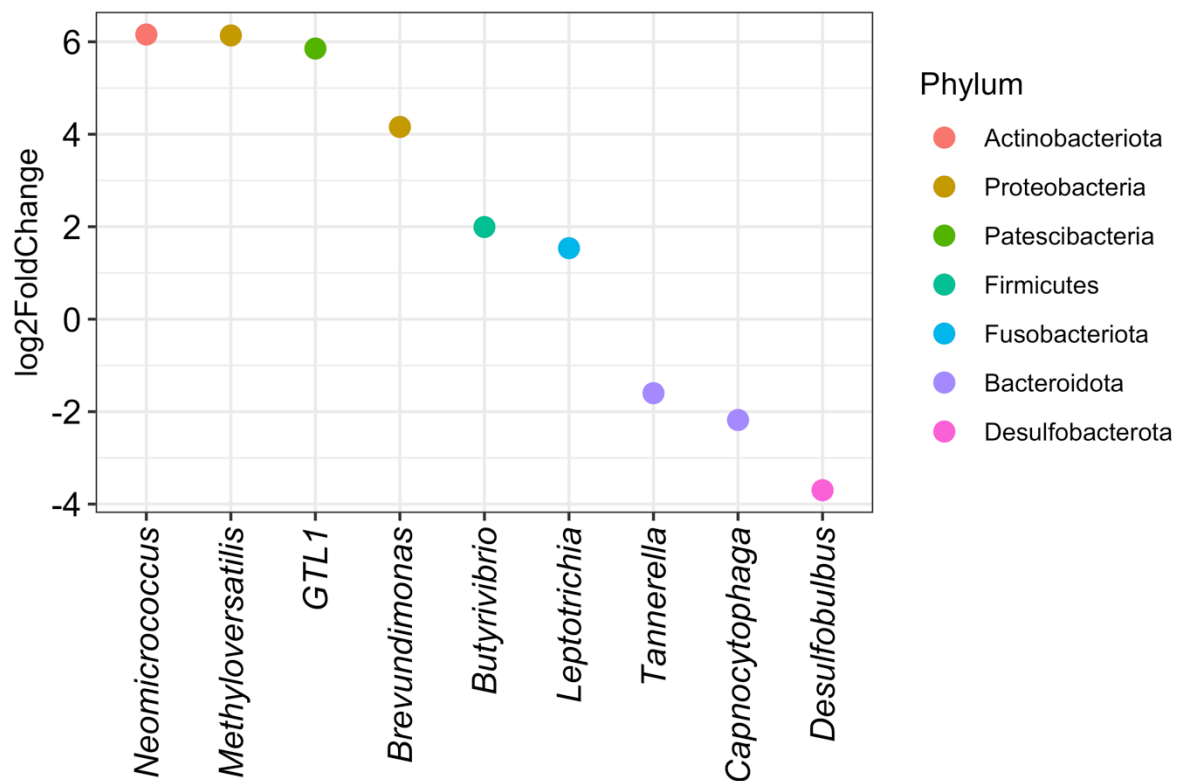


Figure 7. Differential abundance plot. Taxa with positive values (log₂foldchange) are more abundant (enriched) in non-DMP and negative values (log₂foldchange) are more abundant (enriched) in DMP.

Discussion

Dysbiosis of the oral microbiota may be a typical feature of hyperglycemia and a potential contributor to progression of hyperglycemia itself. However, the oral microbial signatures that mediate the progression of hyperglycemia were clear so far. Here, we proved that the hyperglycemia significantly affected the oral microbiome by significantly increasing proportions of *Tannerella*, *Capnocytophaga*, and *Desulfobulbus*. Also, the increase of blood glucose levels was significantly linked to the increase of *Treponema*, *Desulfobulbus*, *Phocaeicola* and *Saccharimonadaceae*. Furthermore, the salivary pH strongly shaped the salivary microbiome by changing the proportions of *Firmicutes/Bacteroidota* and other taxa. Our results confirm the importance of analyzing not only the majority taxa but also the microorganisms in low abundance, as these ones are impacted by clinical changes.

The ubiquity of the minority phylum and its association with clinical parameters are consistent with the findings of our pilot study comparing the salivary microbiome of 3 DMP individuals with periodontitis controls (Côrtes et al. 2019). Interestingly, DMP group also showed higher prevalence of *Desulfovibrionaceae*, a taxonomic order of

bacteria that is associated with dyslipidaemia and obesity. This microorganism is a sulfate-reducing prokaryote, which can perform anaerobic respiration utilizing sulfate as terminal electron acceptor. Therefore, the presence of this sulfidogenic microorganisms in periodontitis is easily to be understood. *Prevotella* and *Veillonella* were also higher in DMP group, as both are closely related to periodontal disease (Y. Cao et al. 2019)(Wei 2020)(Côrtes et al. 2019).

It is well known that hyperglycemia increases the concentration of advanced glycation end-products (AGEs). AGEs induce inflammatory responses, contributing to systemic degradation of connective tissues, including the periodontal one (Cullinan, Ford, and Seymour 2009). Interactions between AGEs and inflammatory cells lead to increased production of proinflammatory cytokines such as interleukin 1 beta (IL-1 β) and tumor necrosis factor alfa (TNF- α), which leads to an increase in collagenase activity. Individuals with DM commonly have bone destruction, increased attachment loss and impaired capacity of healing due to the rapid degradation of localized collagen (Emrich, Shlossman, and Genco 1991). The presence of gingival recession exposes root surfaces, what represents a higher risk for root caries (J.L. Leake 2001). Furthermore, dietary risk factors contributes to both caries and T2D (Papas et al. 1995)(Steele et al. 2001). Low salivary flow, buffering capacity, an increased number of missing teeth and existing coronal caries have also been shown as related to the development of root caries in diabetic individuals (Hintao et al. 2007)(Garton and Ford 2012). A previous study (Hintao et al. 2007) found higher levels of *Treponema denticola*, *Prevotella nigrescens*, *S. sanguinis*, *S. oralis* and *S. mutans* in the supragingival biofilm of individuals with both T2D and root caries. However, there was a relevant limitation of this study: bioifilm samples were pooled from all oral sites rather than specifically from root caries sites. So, limited and inconclusive data exists on the specific relationship between DM and the root caries biofilms. Our study showed an enrichment of the *Abiotrophia* and *Oceanivirga* in the oral microbiome with the increase of active caries extent and DMFS. Meanwhile, *Desantisbacteria* was negatively correlated with both caries variables. We could not observe important differences regarding root caries.

Sun et al. (2020) showed a more complex microbial diversity in unhealthy individuals than in control group, what was not expected from the authors. In our study, there was no difference for alpha-diversity indexes (diversity, richness, evenness) on salivary microbiome between “DMP” and “non-DMP” groups, what was also not

expected once healthy individuals should probably present higher diversity than unhealthy ones considering all aspects affecting this groups differences (age, diagnostic of DM, and diagnostic of periodontitis). According to Petersen et al. (2014) the lost diversity can be justified by three different scenarios that are not mutually exclusive and may occur simultaneously: **1.** the overall loss of microbial diversity, **2.** losing the beneficial microbes and **3.** expansion of the pathogenic microbes, what may explain our findings (Petersen and Round 2014). However, it is important to bear in mind that the dichotomization of the individuals “mixed” the ones with controlled and uncontrolled glucose levels, as well as the ones with long-term diagnostic of DM and use of hypoglycemic drugs. Interestingly, when the glucose levels were evaluated without considering the diagnostic of DM, the differences were found.

Differently, the beta-diversity was affected by groups and salivary pH, showing significant variability in community composition. Since all gastric bacteria are introduced through the oral cavity, it is possible that a lowered salivary pH due to hyperglycemia may act as a filter to inhibit replenishment of gastric *Bacteroidota*, while more easily transmitting gastric *Firmicutes* species. It can have an effect at the oral microbiota, as we could observe a significant increase of the Firmicutes/Bacteroidota ratio with the increase of the salivary pH (meaning high proportions of Firmicutes). Increased levels of *Leptotrichia sp.*, in the present study, were related to less glucose change. Although we might have expected the opposite relationship because prior studies show *Leptotrichia spp.* to be overly abundant in periodontal disease (Lourenço et al. 2014), other studies have found *Leptotrichia spp.* to be more abundant among healthy controls versus patients with diabetes (Zhou et al. 2013).

Hyperglycemia causes several changes in the microbiome of individuals. Active glycemic control could lead to a change in oral microbial communities resembling the healthy population (Sun et al. 2020). Demmer et al. (2019) reported that microbial communities along the mucosal surfaces of the digestive tract are hypothesized as risk factors for hyperglycemia regulation in DM individuals and for the development of clinical cardiometabolic diseases. So, the subgingival microbiota was investigated to predict fasting plasma glucose longitudinally. The results showed the dysbiosis index explaining 6% of the variation in longitudinal glucose change, predicting 2 years glucose change among diabetes-free men and women (R.T. Demmer et al. 2019). Our observations are consistent with the broader hypothesis that microbial communities along the digestive tract might be involved in the early natural history of DM

development (Wang and Jia 2016). A previous study reported notable differences in gut taxa between individuals with and without DM (Arumugam et al. 2011). Accordingly, Le Chatelier et al. (2013) reported a low gut bacterial richness correlated with metabolic parameters in a cross-sectional analysis (Le Chatelier et al. 2013).

When comparing the DMP group with the periodontally and systemically healthy control, our findings suggest that DM individuals present higher level of *Firmicutes*, *Actinobacteria* and *Proteobacteria*. *Spirochaetas* were much more present in DMP than in control group just as our pilot study already proved (Côrtes et al. 2019), which might correlate to the presence of periodontitis. In terms of periodontal disease, changes in salivary microbial diversity remain controversial, with some reports indicating loss of microbial diversity, and others indicating the opposite, because of the increased amount of nutrients derived from host's tissue degradation (N. Silva et al. 2015)(Lasserre, Brex, and Toma 2018). This can be considered a limitation of this study, as we did not dichotomized periodontitis and did not separately correlate it with the microbiome.

Conclusion

The salivary microbiome is strongly shaped by both systemic and local hyperglycaemia, as well as changes in the salivary pH. The changes might be somehow related to the oral manifestations of DM, including the increased risk of dental caries.

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Funding

This project was partially funded by the Research Support Foundation of the Federal District (FAP-DF) (process no. 16991.78.45532.26042017).

Acknowledgments

The authors are grateful to the Scientific Initiation Program from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and

Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

References

1. Abikshyeet, Panda., Venkatapathy. Ramesh, and Nirima. Oza. 2012. "Glucose Estimation in the Salivary Secretion of Diabetes Mellitus Patients." *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 5: 149–54. <https://doi.org/10.2147/dmso.s32112>.
2. Agrawal, R.P., N Sharma, M.S. Rathore, V.B. Gupta, S. Jain, V. Agarwal, and S. Goyal. 2013. "Noninvasive Method for Glucose Level Estimation by Saliva." *Journal of Diabetes & Metabolism* 04 (05). <https://doi.org/10.4172/2155-6156.1000266>.
3. Arumugam, M., J. Raes, E. Pelletier, D. Le Paslier, T. Yamada, D.R. Mende, and Batto JM Fernandes GR, Tap J, Bruls T. 2011. "Enterotypes of the Human Gut Microbiome." *Nature* 473 (7346): 174–180.
4. Belstrøm, Daniel, Palle Holmstrup, Allan Bardow, Alexis Kokaras, Nils Erik Fiehn, and Bruce J. Paster. 2016. "Comparative Analysis of Bacterial Profiles in Unstimulated and Stimulated Saliva Samples." *Journal of Oral Microbiology* 8 (1): 30112. <https://doi.org/10.3402/jom.v8.30112>.
5. Brailsford, S.R., B. Shah, and D. Simons. 2001. "The Predominant Aciduric Microflora of Root-Caries Lesions." *J Dent Res.* 80: 1828–1833.
6. Burgess, J.O., and J.R. Gallo. 2002. "Treating Root-Surface Caries." *Dent Clin North Am* 46: 385–404.
7. Cao, Y., G. Yao, Y. Sheng, L. Yang, Z. Wang, Z. Yang, P. Zhuang, and Y. Zhang. 2019. "JinQi Jiangtang Tablet Regulates Gut Microbiota and Improve Insulin Sensitivity in Type 2 Diabetes Mice." *Journal of Diabetes Research* 2019: 12 pages. <https://doi.org/10.1155/2019/1872134>.
8. Chang, H.J.; S.J.; Lee, T.H.; Yong, N.Y.; Shin, B.G.; Jang, J.E.; Kim, K.H.; Huh, et al. 2020. "Deep Learning Hybrid Method to Automatically Diagnose Periodontal Bone Loss and Stage Periodontitis." *Scientific Reports* 10 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64509-z>.
9. Chatelier, E. Le, T. Nielsen, J. Qin, E. Prifti, F. Hildebrand, G. Falony, M. Almeida, and Kennedy S Arumugam M, Batto JM. 2013. "Richness of Human Gut Microbiome Correlates with Metabolic Markers." *Nature* 500 (7464): 541–546.
10. Côrtes, D.A., J.A. Cena, L. Marconatto, D.C. Guimarães, M.C.M. Grisi, L.A. Oliveira, L.P. Salles, L.G.A. Borges, A. Giongo, and N. Damé-Teixeira. 2019. "Correlation of the Salivary Microbiome with Clinical Parameters of Individuals with Periodontal Disease and Diabetes Mellitus: A Pilot Study."
11. Cullinan, M.P., P.J. Ford, and G.J. Seymour. 2009. "Periodontal Disease and Systemic Health: Current Status." *Aust Dent J* 54: S62–69.
12. Demmer, R.T., P. Trinh, M. Rosenbaum, G. Li, C. LeDuc, R. Leibel, A. González, et al. 2019. "Subgingival Microbiota and Longitudinal Glucose Change: The Oral Infections, Glucose Intolerance and Insulin Resistance Study (ORIGINS)." *Journal of Dental Research* 98 (13): 1488–96. <https://doi.org/10.1177/0022034519881978>.
13. Diaz, P.I. 2012. "Microbial Diversity and Interactions in Subgingival Biofilm Communities." *Front Oral Biol* 15: 17–40.

14. Douglas, C.W., K. Naylor, C. Phansopa, A.M. Frey, T. Farmilo, and G.P. Stafford. 2014. "Physiological Adaptations of Key Oral Bacteria." *Adv Microb Physiol* 65: 257–335. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2014.08.005>.
15. Emrich, L.J., M. Shlossman, and R.J. Genco. 1991. "Periodontal Disease in Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitus." *J Periodontol* 62: 123– 131.
16. Falcão, Denise Pinheiro., Licia Maria Henrique. da Mota, Aline Lauria. Pires, and Ana Cristina Barreto. Bezerra. 2013. "Sialometria: Aspectos de Interesse Clínico." *Revista Brasileira de Reumatologia* 53 (6): 525–31. <https://doi.org/10.1016/j.rbr.2013.03.001>.
17. Fujii, S., T. Maeda, I. Noge, Y. Kitagawa, K. Todoroki, K. Inoue, J.Z. Min, and T. Toyo'oka. 2014. "Determination of Acetone in Saliva by Reversed-Phase Liquid Chromatography with Fluorescence Detection and the Monitoring of Diabetes Mellitus Patients with Ketoacidosis." *Clin Chim Acta*. 20 (430): 140–44. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.01.006>.
18. Garton, B.J., and P.J. Ford. 2012. "Root Caries and Diabetes: Risk Assessing to Improve Oral and Systemic Health Outcomes." *Australian Dental Journal* 57 (2): 114–22. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2012.01690.x>.
19. Goodson, J. Max, Mor Li Hartman, Ping Shi, Hatice Hasturk, Tina Yaskell, Jorel Vargas, Xiaoqing Song, et al. 2017. "The Salivary Microbiome Is Altered in the Presence of a High Salivary Glucose Concentration." *PLoS ONE* 12 (3): 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170437>.
20. Grisi, D., I. Vieira, A.K. Lima, M. Mattos, N. Damé-Teixeira, L. Salles, L. Oliveira, C. Stefani, and M. C. Guimarães. 2021. "The Complex Interrelationship between Diabetes Mellitus, Oral Diseases and General Health." *Current Diabetes Reviews* 17: 1–15. <https://doi.org/10.2174/1573399817666210322153210>.
21. Hintao, J., R. Teanpaisan, V. Chongsuvivatwong, C. Ratarasan, and G. Dahlen. 2007. "The Microbiological Profiles of Saliva, Supragingival and Subgingival Plaque and Dental Caries in Adults with and without Type 2 Diabetes Mellitus." *Oral Microbiology and Immunology* 22 (3): 175–81. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00341.x>.
22. Kumar, P.S., M.F. Monteiro, S.M. Dabdoub, G.L. Miranda, M.Z. Casati, F.V. Ribeiro, F.R. Cirano, S.P. Pimentel, and R.C.V. Casarin. 2020. "Subgingival Host-Microbial Interactions in Hyperglycemic Individuals." *Journal of Dental Research* 99 (6): 650–57. <https://doi.org/10.1177/0022034520906842>.
23. Lasserre, J.F., M.C. Brex, and S. Toma. 2018. "Oral Microbes, Biofilms and Their Role in Periodontal and Peri-Implant Diseases." *Materials (Basel)* 11 (10): 1802. <https://doi.org/10.3390/ma11101802>.
24. Leake, J.L. 2001. "Clinical Decision-Making for Caries Management in Root Surfaces." *J Dent Educ* 65: 1147–1153.
25. Lima, Ana Karolina Almeida de, Juliana Amorim dos Santos, Cristine Miron Stefani, Adriano de Almeida de Lima, and Nailê Damé-Teixeira. 2020. "Diabetes Mellitus and Poor Glycemic Control Increase the Occurrence of Coronal and Root Caries: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Clinical Oral Investigations* 24 (11): 3801–12. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03531-x>.
26. Lourenço, T.G.B., D. Heller, C.M. Silva-Boghossian, S.L. Cotton, B.J. Paster, and A.P.V.

- Colombo. 2014. "Microbial Signature Profiles of Periodontally Healthy and Diseased Patients." *Journal of Clinical Periodontology* 41 (11): 1027–36.
27. Maltz, Marisa., Berenice. Barbachan e Silva, Danusa Queiroz de. Carvalho, and Alexandre. Volkweis. 2003. "Results after Two Years of Non-Operative Treatment of Occlusal Surface in Children with High Caries Prevalence." *Brazilian Dental Journal* 14 (1): 48–54.
<https://doi.org/10.1590/S0103-64402003000100009>.
28. Mascarenhas, Paulo., Bruno. Fatela, and Isabel. Barahona. 2014. "Effect of Diabetes Mellitus Type 2 on Salivary Glucose - A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies." *PLoS ONE* 9 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101706>.
29. Nyvad, Bente., and Vibeke. Baelum. 2018. "Nyvad Criteria for Caries Lesion Activity and Severity Assessment: A Validated Approach for Clinical Management and Research." *Caries Research* 52 (5): 397–405. <https://doi.org/10.1159/000480522>.
30. Ogawa, T., M. Honda-Ogawa, K. Ikebe, Y. Notomi, Y. Iwamoto, I. Shirobayashi, S. Hata, et al. 2018. "Characterizations of Oral Microbiota in Elderly Nursing Home Residents with Diabetes." *Journal of Oral Science* 60 (1): 163. <https://doi.org/10.2334/josnurd.16-072201>.
31. Papas, A., A. Joshi, A. Belanger, R.Jr. Kent, C. Palmer, and P. DePaola. 1995. "Dietary Models for Root Caries." *Am J Clin Nutr* 61: S417– 422.
32. Petersen, C., and J.L. Round. 2014. "Defining Dysbiosis and Its Influence on the Host Immunity and Disease." *Cell Microbiol* 16: 1024–33.
33. Preza, D., I. Olsen, J.A. Aas, T. Willumsen, B. Grinde, and B.J. Paster. 2008. "Bacterial Profiles of Root Caries in Elderly Patients." *J Clin Microbiol* 46: 2015–2021.
34. Quast, C., E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, and P. Yarza. 2013. "The SILVA Ribosomal RNA Gene Database Project: Improved Data Processing and Web-Based Tools." *Nucleic Acids Res.* 41: D590-6.
35. Ravald, N. 1994. "Root Surface Caries." *Curr Opin Periodontol*, 78–86.
36. Silva, N., L. Abusleme, D. Bravo, N. Dutzan, J. Garcia-Sesnich, R. Vernal, M. Hernández, and J. Gamonal. 2015. "Host Response Mechanisms in Periodontal Diseases." *J Appl Oral Sci.* 23 (3): 329–55.
37. Smriti, Komal, Keerthilatha M. Pai, Vineetha Ravindranath, Srikanth Gadicherla, and Kalyana Chakravarthy Pentapati. 2016. "Salivary Glucose as a Diagnostic Marker for Diabetes Mellitus." *Journal of Diabetes Science and Technology* 10 (4): 991–92.
<https://doi.org/10.1177/1932296816637619>.
38. Steele, J.G., A. Sheiham, W. Marcenes, N. Fay, and A.W.G. Walls. 2001. "Clinical and Behavioural Risk Indicators for Root Caries in Older People." *Gerodontology* 80: 1828– 1833.
39. Stephan, R.M., and B.F. Miller. 1943. "A Quantitative Method for Evaluating Physical and Chemical Agents Which Modify Production of Acids in Bacterial Plaques on Human Teeth." *J Dental Research* 22: 45–51.
40. Tonetti, M.S., H.; Greenwell, and K.S. Kornman. 2018. "Staging and Grading of Periodontitis: Framework and Proposal of a New Classification and Case Definition." *Journal of Clinical Periodontology* 45: S149–61.

41. Wang, J., and H. Jia. 2016. "Metagenome-Wide Association Studies: Fine-Mining the Microbiome." *Nat Rev Microbiol.* 14 (8): 508–522.
42. Wei, Yu-Snan et al. 2020. "Identification of Hyperglycemia-Associated Microbiota Alterations in Saliva and Gingival Sulcus." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 682: 108278. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108278>.
43. Zambon, J.J., and S.A. Kasprzak. 1995. "The Microbiology and Histopathology of Human Root Caries." *Am J Dent* 8: 323–328.
44. Zhou, Y., H. Gao, K. A. Mihindukulasuriya, P. S. La Rosa, K. M. Wylie, and T. Vishnivetskaya. 2013. "Biogeography of the Ecosystems of the Healthy Human Body." *Genome Biol.* 14 (R1). <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-1-r1>.

CAPÍTULO 4- DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO

4.1 DISCUSSÃO GERAL

O envelhecimento populacional é um fenômeno que ocorre em escala global. Esse processo caracteriza-se pelo constante aumento da expectativa de vida, que ocorre devido, principalmente, aos avanços tecnológicos medicinais e maior preocupação com a saúde. Embora as pessoas estejam vivendo mais, elas não necessariamente são mais saudáveis. O envelhecimento traz consequências como o surgimento de doenças crônicas, como a DM (Cho 2017).

Nosso grupo de pesquisa comprovou em uma recente revisão sistemática e metanálises que indivíduos com DM tipo 2 têm chances aumentadas de desenvolver lesões de cárie coronária e radicular, quando comparados com os sistemicamente saudáveis. Os resultados de tal estudo também mostraram que indivíduos com níveis glicêmicos não controlados apresentam maior prevalência de cárie do que indivíduos controlados (de Lima et al. 2020). A principal hipótese encontrada na literatura para explicar o maior risco de indivíduos com DM desenvolverem cárie é a redução do fluxo salivar (Mauri-Obradors, 2017). No entanto, oferecemos outras alternativas para explicar esses achados: **1)** uma forte influência sobre os critérios de detecção da doença pela inclusão da experiência anterior de cárie (dentes obturados e perdidos), e a classificação incorreta da atividade de cárie; **2)** composição bioquímica alterada da saliva; e **3)** a influência do aumento da glicose salivar na alteração do meio microbiológico (mais sacarolítico), devido ao menor pH.

Na presente dissertação de mestrado, testamos a hipótese 3, confirmando que a redução do fluxo salivar, por si só, não é capaz de explicar o aumento de lesões cáries em indivíduos com DM quando comparados com controles normoglicêmicos e que a hiperglicemia, tanto local quanto sistêmica, é um bom marcador correlacionado com o aumento do número de lesões cáries radiculares e do CPOD. Porém, ainda há pouca informação sobre como a hiperglicemia afeta a microbiota bucal, e como isso poderia estar influenciando nos achados de maior prevalência/extensão de cárie em pacientes portadores de DM.

A taxonomia foi mais bem esclarecida nos últimos anos graças ao emprego de técnicas de biologia molecular que permitiram relacionar ou comparar os resultados dos testes fenotípicos e genotípicos. Entre esses meios, a análise da comparação de

sequência de determinados genes de macromoléculas conservadas tem sido utilizada para essa classificação de microrganismos. O sequenciamento do gene do rRNA 16S, constituinte da subunidade menor do ribossomo da célula procariótica, tem sido empregado com finalidade taxonômica e filogenética e é considerado o método de referência para a identificação bacteriana. Assim sendo, o escopo da identificação de bactérias na saliva de pacientes diabéticos, portadores de níveis de glicose elevado no sangue e nos fluídos corporais em geral, seria identificar os microrganismos mais presentes em ambientes ricos em açúcares, para que assim, possivelmente, tenhamos como intervir ou inibir o crescimento deles em todo e qualquer paciente, evitando ou controlando a doença cárie, tanto coronária como radicular.

Dentre os procariontes, aqui avaliados, que demonstraram enriquecimento correlacionado com o aumento da glicose sanguínea, destacamos os gêneros *Treponema*, *Desulfobulbus* e *Phocaicola*. *Treponema* são espiroquetas Gram-negativas anaeróbias facultativas, extremamente sensíveis às variações de temperatura e umidade, e muito conhecido pelos periodontistas. Sua presença reflete o perfil inflamofílico, provavelmente associado ao aumento dos AGEs. Já o gênero *Desulfobulbus*, também Gram-negativo e anaeróbio, são bactérias elipsoidais e redutoras de sulfato. Esses microrganismos são capazes de crescer por meio de uma reação fermentativa ou acetogênica. Piruvato, lactato e etanol são substâncias facilmente fermentadas por eles, porém parece ser a primeira vez que é fortemente associado a hiperglicemia. Já os *Phocaicola* são Gram-negativos, estritamente anaeróbios e ainda pouco conhecidos.

Interessantemente, observamos uma correlação dos níveis de glicose sanguínea, doença cárie e microbioma salivar. Diferente do que foi proposto por Goodson (Goodson et al. 2017a) de que a hiperglicemia afetaria o microbioma e a cavidade oral pelo aumento da disponibilidade de glicose e consequente enriquecimento dos microrganismos acidogênicos e baixa do pH, parece que a hiperglicemia pode afetar o indivíduo sistemicamente. Como explorado no capítulo 1, o sistema imune tem um papel fundamental no estabelecimento do “core microbiome” e a hiperglicemia sanguínea pode, então, modular o microbioma não somente pela condição local do aumento da glicose salivar, mas também sistemicamente pela alteração do pH e do sistema imune.

4.2 CONCLUSÕES

Através do presente estudo podemos concluir que os níveis de glicose sanguínea e glicose salivar são correlacionados, e ambos associados ao aumento do risco de lesões cariosas radiculares e modificações no microbioma salivar. Confirma-se, aqui, que a glicose salivar e o pH apresentam íntima relação com a composição do microbioma salivar que podem predispor ao risco de manifestações orais, incluindo a doença cárie. Outros estudos serão necessários para melhor avaliar os microrganismos em baixa abundância e sua relação com características clínicas. Por todo o exposto, deve-se compreender que o aumento de lesões cariosas em indivíduos com DM não é justificado por um motivo único, mas sim, por um conjunto de situações que favorecem o aumento da prevalência de tal doença, dentre os quais a hiperglicemia parece ser uma delas. Novos estudos longitudinais devem ser realizados para melhor compreender essa associação.

4.3 REFERÊNCIAS

1. Cho, Nam Han. et al. 2017. "IDF Diabetes Atlas." *IDF Diabetes Atlas, 8th Edition*.
<https://www.idf.org/aboutdiabetes/type-2-diabetes.html>.
2. Cruvinel, L.A., S.N. Melo, and G.A. Lacorte. 2017. "Uso de Ferramentas Na Identificação Das Comunidades Bacterianas de Queijos Artesanais: Uma Revisão Sistemática Da Literatura." *ForScience* 5 (2): e310.
3. Demmer, R.T., P. Trinh, M. Rosenbaum, G. Li, C. LeDuc, R. Leibel, A. González, et al. 2019. "Subgingival Microbiota and Longitudinal Glucose Change: The Oral Infections, Glucose Intolerance and Insulin Resistance Study (ORIGINS)." *Journal of Dental Research* 98 (13): 1488–96. <https://doi.org/10.1177/0022034519881978>.
4. Gomar-Vercher, Sonia, Aurea Simón-Soro, José María Montiel-Company, José Manuel Almerich-Silla, and Alex Mira. 2018. "Stimulated and Unstimulated Saliva Samples Have Significantly Different Bacterial Profiles." *PLoS ONE* 13 (6): 1–12.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198021>.
5. Inc., ChunLab. n.d. "16S RRNA And 16S RRNA Gene." Accessed June 23, 2021.
<https://help.ezbiocloud.net/16s-rrna-and-16s-rrna-gene/>.
6. Lange, C.C., M.A.V.P. Brito, J.R.F. Brito, E.F. Arcuri, G.N. Souza, M.A. Machado, R. Domingues, and A.P.S. Salimena. 2011. "Uso de PCR e Sequenciamento Do RDNA 16S Para Identificação de Bactérias Do Gênero Staphylococcus Isoladas de Mastite Bovina." *Pesq. Vet. Bras.* 31 (5): 36–40.
7. Marques, R.C.R. 2021. "Parâmetros Salivares Em Pacientes Com Diabetes Mellitus e Sua Relação Com Atividade de Cárie." Brasília.
8. Nyvad, B., W. Crielaard, A. Mira, N. Takahashi, and D. Beighton. 2013. "Dental Caries from a Molecular Microbiological Perspective." *Caries Res.* 47 (2): 89–102.
9. Rahiotis, C., V. Petraki, and P. Mitrou. 2021. "Changes in Saliva Characteristics and Carious Status Related to Metabolic Control in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus." *J Dent* 108: 103629.
10. Ribeiro, B.A., C.P. Vieira Lima, L.S. Alves, and N. Damé-Teixeira. 2021. "Impact of Detection Criteria on Coronal and Root Caries Estimates in Adults with and without Type II Diabetes Mellitus." Brasília.

CAPÍTULO 5 - PRESS RELEASE

A Diabetes mellitus (DM) é uma doença caracterizada por anormalidades no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas que resultam de uma deficiência profunda ou absoluta do hormônio insulina. O aumento de glicose no sangue, conhecido como hiperglicemia, é marca registrada desta doença crônica. A literatura já comprova que indivíduos com DM possuem não só a glicose sanguínea alterada, como também a glicose salivar. Por isso, diversas são as manifestações orais encontradas em pessoas com DM, entre elas destaca-se a periodontite, doença que afeta os tecidos gengival e ósseo. Recentemente, nosso grupo de pesquisa de Cariologia da Universidade de Brasília (UnB) demonstrou que indivíduos com Diabetes mellitus tipo 2 têm, também, maiores chances de desenvolverem lesões de cárie, tanto nas coroas, como nas raízes dos dentes. Os resultados de tal estudo também mostraram que indivíduos com níveis açúcar sanguíneo não controlados apresentam maior prevalência de cárie do que indivíduos controlados por meio de medicações. A principal hipótese encontrada na literatura para explicar o maior risco de diabéticos desenvolverem cárie é a redução do fluxo salivar; no entanto, oferecemos outras alternativas para explicar esses achados, tais como a composição bioquímica alterada da saliva desses pacientes e a influência do aumento da glicose salivar que causaria, assim, uma alteração do meio microbiológico oral, fazendo com que microrganismos relacionados a doença cárie se destacassem. Neste estudo, propomos observar se há relação entre glicose sanguínea e glicose salivar e se ambas podem ser associadas com o aumento de lesões de cárie, além de descrever os microrganismos presentes na cavidade oral da pessoa com DM e periodontite, avaliando se o controle glicêmico sanguíneo interfere na microbiota oral desses indivíduos. A importância desse estudo seria compreender o porquê dos pacientes com DM apresentarem maiores riscos de cárie, para que, de tal forma, o cirurgião-dentista possa intervir, de maneira inter e multidisciplinar, controlando ou evitando o aumento de lesões cariosas e a perda dentária.