

Expressão gênica diferencial do biofilme subgengival de pacientes com periodontite com e sem diabetes

Palavras-Chave: Doença periodontal, Diabetes mellitus, Microbiologia.

Autores/as:

João Vitor Samogin (FOP – UNICAMP)

Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin (orientador) (FOP – UNICAMP)

INTRODUÇÃO:

A doença periodontal e o diabetes mellitus (DM) são doenças crônicas altamente prevalentes e inter-relacionadas, tendo uma relação bidirecional. A hiperglicemia do diabetes resulta em alterações do sistema imune que podem exacerbar a doença periodontal induzida por bactérias; por outro lado, a infecção periodontal pode complicar a gravidade do diabetes e o controle metabólico glicêmico. Essa dupla via sugere que o controle da infecção periodontal é essencial para o manejo do diabetes mellitus, assim como o controle glicêmico é importante para a prevenção e controle da doença periodontal (Negrini et al., 2021).

A influência da hiperglicemia sobre a doença periodontal, se dá por diferentes vias. Na presença da DM, ocorre um acúmulo dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no plasma e tecidos, que têm a capacidade de se ligar a receptores de membranas das células (RAGE – receptor de produtos finais glicosilados) presentes em células endoteliais, monócitos/macrófagos, células do sistema nervoso e também células musculares. A interação entre AGEs e RAGE, aumenta o estresse oxidativo celular, o que resulta em maior produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias, associadas à diferenciação e atividade de osteoclastos, causando maior reabsorção óssea e a produção de metaloproteases da matriz (MMPs). Contudo, outra via de relação entre o avanço da periodontite e a presença da DM é a alteração microbiológica no ambiente subgengival (Śmiga et al., 2021).

Casarin et al (2013), observaram uma microbiota subgengival diferente entre pacientes com DM e periodontite. Entretanto, assim como mostrado por Ganesan et al. (2017), indivíduos com DM apresentaram um grande número de bactérias Gram-positivas em pacientes diabéticos, sugerindo um papel maior dessas bactérias na progressão da doença e ao fracasso dos tratamentos. No entanto, a maioria dos estudos tem focado apenas na constituição da comunidade microbiana e não na expressão de fatores de virulência desta ou de seus principais agentes.

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

METODOLOGIA:

1. *Seleção dos pacientes*

Foram selecionados os pacientes que preenchiam os seguintes requisitos:

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

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

Foi coletado biofilme subgengival de 6-8 sítios de cada indivíduo, preferencialmente primeiros molares e incisivos, com curetas estéreis após isolamento relativo da região. As amostras foram acondicionadas em RNAlater, armazenadas por 2 horas em geladeira e, após esse tempo, em freezer - 80°C até a análise.

2. Coleta do biofilme subgengival e análise metatranscriptômica

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

RESULTADOS:

1. Identificação dos genes diferencialmente expressos

Foram identificados 25 genes diferencialmente expressos entre os grupos, evidenciando diferenças no perfil funcional microbiano do biofilme subgengival em pacientes diabéticos (Tabela 1).

Tabela 1. Genes diferencialmente expressos regulados positivamente no grupo de pacientes diabéticos.

KEGG	Definição do Gene
K02959	RP-S16, MRPS16, rpsP; small subunit ribosomal protein S16
K01610	pckA; phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)
K00262	gdhA; glutamate dehydrogenase (NADP+)
K02986	RP-S4, rpsD; small subunit ribosomal protein S4
K00962	pnp, PNPT1; polyribonucleotide nucleotidyltransferase
K09458	fabF, OXSM, CEM1; 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II
K02968	RP-S20, rpsT; small subunit ribosomal protein S20

K02519	infB, MTIF2; translation initiation factor IF-2
K00024	mdh; malate dehydrogenase
K02939	RP-L9, MRPL9, rplI; large subunit ribosomal protein L9
K02355	fusA, GFM, EFG; elongation factor G
K19304	mepM; murein DD-endopeptidase
K02863	RP-L1, MRPL1, rplA; large subunit ribosomal protein L1
K01880	GARS, glyS1; glycyl-tRNA synthetase
K03072	secD; preprotein translocase subunit SecD
K01006	ppdK; pyruvate, orthophosphate dikinase
K03046	rpoC; DNA-directed RNA polymerase subunit beta'
K01835	pgm; phosphoglucomutase
K03040	rpoA; DNA-directed RNA polymerase subunit alpha
K03076	secY; preprotein translocase subunit SecY
K03286	TC.OOP; OmpA-OmpF porin, OOP family
K02933	RP-L6, MRPL6, rplF; large subunit ribosomal protein L6
K06158	ABCF3; ATP-binding cassette, subfamily F, member 3
K02867	RP-L11, MRPL11, rplK; large subunit ribosomal protein L11
K03733	xerC; integrase/recombinase XerC

Tabela 2. Bactérias associadas ao top 10 de genes positivamente expressos no grupo de diabéticos.

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

K02519	translation initiation factor IF-2	Multiespécies
K00024	malate dehydrogenase	Actinobaculum sp., Actinomyces, Corynebacterium, Porphyromonas gingivalis, Prevotella, Selenomonas sp., Tannerella sp.
K02939	large subunit ribosomal protein L9	Multiespécies

DISCUSSÃO:

O conhecimento do microbioma associado a doença periodontal vem cada vez mais mostrando que a presença ou ausência de determinadas bactérias por si só não explica inteiramente como a doença periodontal surge ou progride. Para o nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo que compara dois perfis de biofilmes disbióticos: diabéticos (grau C) versus periodontite grau A/B.

Alguns genes encontrados na Tabela 1, mais expressos no grupo de pacientes diabéticos, estão associados a alguns fatores de virulência adicionais que podem estar associados a maior progressão da doença. O gene relacionado a porina OmpA-OmpF pode ser importante nesse aspecto, visto que são proteínas associadas a manutenção da integridade da membrana, principalmente em bactérias Gram-negativas (Pages et al., 2008). Dessa forma, as porinas podem mediar a difusão passiva de agentes antimicrobianos e componentes tóxicos, tornando-as mais resistentes a perturbações exógenas (Choi & Lee, 2019), o que pode facilitar a perpetuação e patogênese de bactérias Gram-negativas no ambiente subgengival.

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

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

CONCLUSÕES:

Através da análise dos resultados obtidos referentes às bactérias associadas aos grupos de genes diferencialmente expressos (KEGGs) em pacientes diabéticos, é possível concluir que a diabetes mellitus pode influenciar no perfil de expressão gênica subgengival em pacientes portadores de doença periodontal, assim como provocar um aumento no fator de virulência do meio.

BIBLIOGRAFIA

1. Andrews, S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. (2010). Available at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
2. Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., and Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat. Biotechnol.* 34, 525–527. doi:10.1038/nbt.3519.
3. Casarin RC, Barbagallo A, Meulman T, Santos VR, Sallum EA, Nociti FH, Duarte PM, Casati MZ, Gonçalves RB. Subgingival biodiversity in subjects with uncontrolled type-2 diabetes and chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2013 Feb;48(1):30-6.
4. Farina R, Severi M, Carrieri A, Miotto E, Sabbioni S, Trombelli L, Scapoli C. Whole metagenomic shotgun sequencing of the subgingival microbiome of diabetics and non-diabetics with different periodontal conditions. *Arch Oral Biol.* 2019 Aug;104:13-23. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.05.025. Epub 2019 May 25. PMID: 31153098.
5. F. Escapa, I., Huang, Y., Chen, T., Lin, M., Kokaras, A., Dewhirst, F. E., et al. (2020). Construction of habitat-specific training sets to achieve species-level assignment in 16S rRNA gene datasets. *Microbiome* 8, 65. doi:10.1186/s40168-020-00841-w.
6. Frias-Lopez J, Duran-Pinedo A. Effect of periodontal pathogens on the metatranscriptome of a healthy multispecies biofilm model. *J Bacteriol.* 2012 April;194(8):2082–2095.
7. Ganesan SM, Joshi V, Fellows M, Dabdoub SM, Nagaraja HN, O'Donnell B, et al. A tale of two risks: smoking, diabetes and the subgingival microbiome. *ISME J* [Internet]. 2017;11(9):2075–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28534880>.
8. Jorth P, Turner KH, Gumus P, Nizam N, Buduneli N, Whiteley M. Metatranscriptomics of the human oral microbiome during health and disease. *MBio.* 2014 Apr 1;5(2):e01012-14. doi: 10.1128/mBio.01012-14. PubMed PMID: 24692635.
9. Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., and Tanabe, M. (2016). KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *NucleicAcids Res.* 44, D457–D462. doi:10.1093/nar/gkv1070.
10. Kopylova, E., Noé, L., and Touzet, H. (2012). SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics* 28, 3211–3217. doi:10.1093/bioinformatics/bts611.
11. Kumar PS, Leys EJ, Bryk JM, Martinez FJ, Moeschberger ML, Griffen AL. Changes in periodontal health status are associated with bacterial community shifts as assessed by quantitative 16S cloning and sequencing. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2006 Oct;44(10):3665–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17021095>.
12. Langmead, B., and Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357–359. doi:10.1038/nmeth.1923.
13. Longo PL, Dabdoub S, Kumar P, Artese HPC, Dib SA, Romito GA, Mayer MPA. Glycaemic status affects the subgingival microbiome of diabetic patients. *J Clin Periodontol.* 2018 Aug;45(8):932-940. doi: 10.1111/jcpe.12908. Epub 2018 Jun 25. PMID: 29742293.
14. Negrini TC, Carlos IZ, Duque C, Caiaffa KS, Arthur RA. Interplay Among the Oral Microbiome, Oral Cavity Conditions, the Host Immune Response, Diabetes Mellitus, and Its Associated-Risk Factors-An Overview. *Front Oral Health.* 2021 Sep 9;2:697428. doi: 10.3389/froh.2021.697428. PMID: 35048037; PMCID: PMC8757730.
15. Pimentel, H., Bray, N., Puente, S. et al. Differential analysis of RNA-seq incorporating quantification uncertainty. *Nat Methods* 14, 687–690 (2017). <https://doi.org/10.1038/nmeth.4324>
16. Śmiga M, Smalley JW, Ślęzak P, Brown JL, Siemińska K, Jenkins RE, Yates EA, Olczak T. Glycation of Host Proteins Increases Pathogenic Potential of *Porphyromonas gingivalis*. *Int J Mol Sci.* 2021 Nov 8;22(21):12084. doi: 10.3390/ijms222112084. PMID: 34769513; PMCID: PMC8585099.
17. Yost, S., Duran-Pinedo, A. E., Teles, R., Krishnan, K. & Frias-Lopez, J. Functional signatures of oral dysbiosis during periodontitis progression revealed by microbial metatranscriptome analysis. *Genome Med.* 7, 27 (2015).
18. Pages J. M., James C. E., Winterhalter M. (2008). The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 6 893–903. 10.1038/nrmicro1994
19. Choi U, Lee CR. Distinct Roles of Outer Membrane Porins in Antibiotic Resistance and Membrane Integrity in *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 2019 Apr 30;10:953.
20. Ram-Mohan N, Meyer MM. Comparative Metatranscriptomics of Periodontitis Supports a Common Polymicrobial Shift in Metabolic Function and Identifies Novel Putative Disease-Associated ncRNAs. *Front Microbiol.* 2020 Apr 9;11:482.
21. Qin H, Li G, Xu X, Zhang C, Zhong W, Xu S, Yin Y, Song J. The role of oral microbiome in periodontitis under diabetes mellitus. *J Oral Microbiol.* 2022 Jun 3;14(1):2078031.