

BIOTRANS

**Programa de Pós - Graduação em
Biomedicina Translacional**

Mestrado e Doutorado



**Caracterização clínica e proteômica da saliva e plasma
sanguíneo para detecção de biomarcadores de comorbidades
associadas a obesidade**

Doutorando: Carlos Vinícius Ferreira da Silva

Orientadora: Dra. Eidy de Oliveira Santos

Duque de Caxias

2023

Carlos Vinicius Ferreira da Silva

**Caracterização clínica e proteômica da saliva e plasma
sanguíneo para detecção de biomarcadores de comorbidades
associadas a obesidade**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biomedicina Translacional (BIOTRANS), como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Biomédicas.

Orientadora:

Profa. Dra. Eidy de Oliveira Santos

Duque de Caxias

2023

S586c Silva, Carlos Vinicius Ferreira da.

Caracterização clínica e proteômica da saliva e plasma sanguíneo para detecção de biomarcadores de comorbidades associadas a obesidade / Carlos Vinicius Ferreira da Silva. – Duque de Caxias, 2023.
196 f.

Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) – UNIGRANRIO. Programa de Pós-graduação em Biomedicina Translacional (BIOTRANS), Rio de Janeiro, 2023.

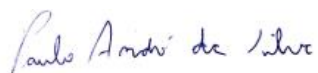
Orientadora: Eidy de Oliveira Santos

1. Proteômica. 2. Saliva. 3. Sangue. 4. Obesidade. 5. Gengivite. 6. Diabetes Mellitus. 7. Síndrome metabólica I. Santos, Eidy de Oliveira. II. Unigranrio. III. Título.

CDD – 610

Carlos Vinicius Ferreira da Silva

Defesa apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biomedicina Translacional (BIOTRANS), como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Biomédicas.



Prof. Dr. Paulo André da Silva
Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO
Presidente da Banca



Prof.ª Dr.ª Claudia Maria Pereira
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ



Prof.ª Dr.ª Leticia Miranda Lery Santos
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ



Documento assinado digitalmente
JULIO JABLONSKI AMARAL
Data: 17/02/2023 13:16:12 -0300
Verifique em <https://verificador.ri.br>

Prof. Dr. Julio Jablonski Amaral
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO



Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo
Coordenador Geral do Programa de
Pós-Graduação em Biomedicina Translacional – BIOTRANS

Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo
Coordenador do PPG em Biomedicina
Translacional - BIOTRANS
UNIVERSIDADE
UNIGRANRIO

Aos mestres pela sua força e apoio

À minha família e amigos que sempre me ajudaram

A todos que participaram dessa minha jornada sempre me apoiando

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus mestres espirituais por todo apoio, força, coragem e sabedoria necessária para prosseguir nessa jornada.

Aos meus pais, Marlene Gomes Ferreira (*in memorian*) e Carlos José da Silva, ao meu irmão Carlos José, ao meu tio Hugo, a minha avó Helena (*in memorian*), ao meu amigo Rafael Carvalho que é um irmão para mim e a minha namorada Jéssica Braga.

À professora Eidy de Oliveira Santos, por todo seu apoio companheirismo e amizade. Agradeço imensamente por toda ajuda e conselhos, por todas as dicas e ensinamentos e por toda amizade que construímos.

Aos professores Youssef Bacila Sade e Sandra Mara Naressi Scapin do Inmetro por toda sua ajuda e paciência, me ajudando e ensinando todos os fundamentos da espectrometria de massas.

A todos os professores do programa de Pós-graduação Biotrans e pelos ensinamentos e conselhos nessa jornada, pelo enriquecimento e por todo conhecimento que me foi ofertado.

A todos os meus amigos Carlos Roberto, Juliana Rosa, Tamara, Danielle Voigt.

Aos voluntários que participaram do estudo.

Aos órgãos de fomento, Capes, CNPq e Faperj pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas que me ajudaram direta e indiretamente não só no doutorado, mas em toda a minha vida.

“Se você pode conceber e acreditar,
então você pode realizar”

Napoleon Hill

Resumo

A obesidade é uma condição crônica relacionada a múltiplas comorbidades, como diabetes tipo 2, síndrome metabólica, doenças periodontais e cardiovasculares. O objetivo do presente estudo foi analisar os potenciais biomarcadores para comorbidades associadas a obesidade: Gengivite, Diabetes *Mellitus* 2 e Síndrome Metabólica. Foram analisados os proteomas de amostras de saliva e/ou sangue de um total de 121 voluntários, assim como parâmetros clínicos e demográficos. Todas as proteínas extraídas foram caracterizadas por cromatografia líquida vinculada a espectrometria de massas (LC-ESI-MS/TOF), com estratégia independente de gel e de marcação, seguida de identificação e análise quantitativa das proteínas com softwares Progenesis e MetaboAnalyst. Inicialmente, realizamos a comparação de componentes da saliva entre indivíduos com gengivite e um grupo saudável, sem gengivite, com 18 voluntários, alunos e/ou funcionários da Unigranrio. Foram identificadas 71 proteínas humanas e 116 bacterianas nas amostras salivares, muitas apresentando alteração na abundância relativa, em resposta a condição gengivite, como Anexina A1, Histatina e Anidrase Carbônica humanas, além das bacterianas, como a proteína carreadora de acila, MurQ e GrpE. Na segunda parte do projeto, tivemos por objetivo comparar indivíduos saudáveis com peso normal, sobrepeso e obesidade, com outro grupo de indivíduos doentes, com Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2) e Síndrome Metabólica (SM). A segunda população de estudo foi constituída por 103 voluntários adultos, moradores no Estado do RJ. Os resultados mostraram o impacto da DMT2 e SM, também o aumento de peso, na alteração em diversos parâmetros antropométricos e sanguíneos. A análise proteômica permitiu a identificação de 203 proteínas plasmáticas e 64 salivares, sendo determinadas proteínas que com alteração na abundância relativa de acordo com o ganho de peso corporal e com o desenvolvimento de SM e DMT2, como por exemplo as proteínas: S100-A8, Profilina 1, WRS e APOC3. As alterações nessas proteínas sugerem o seu uso como potenciais biomarcadores, podendo auxiliar futuramente no diagnóstico de SM e DMT2, junto a outros parâmetros clínicos já usados atualmente.

Palavras-Chave: Proteômica, Saliva, Sangue, Obesidade, Gengivite, Diabetes Mellitus, Síndrome Metabólica.

Abstract

Obesity is a chronic condition related to multiple comorbidities, such as type 2 diabetes, metabolic syndrome, periodontal and cardiovascular diseases. The aim of the present study is to analyze the potential biomarkers for comorbidities associated with obesity: Gingivitis, Diabetes Mellitus 2 and Metabolic Syndrome. Proteomes of saliva and/or blood samples from a total of 121 volunteers were analyzed, as well as clinical and demographic parameters. All extracted proteins were characterized by liquid chromatography linked to mass spectrometry (LC-ESI-MS/TOF), with a gel-independent and unmarked strategy, followed by identification and quantitative analysis of proteins with Progenesis and MetaboAnalyst software. Initially, we compared saliva components between individuals with gingivitis and a healthy group, a population of 18 volunteers, students and/or employees of Unigranrio. 71 human proteins and 116 bacterial ones were identified in salivary samples, many showing alteration in relative abundance in response to the gingivitis condition, such as human Annexin A1, Histatin and Carbonic Anhydrase, in addition to bacterial proteins, such as the transcriptional regulator WhiB1, MurQ and GrpE. In the second part of the project, we aimed to compare healthy individuals with normal weight, overweight and obesity, with another group of sick individuals, with Type 2 Diabetes Mellitus (DMT2) and Metabolic Syndrome (SM). The second study population consists of 103 adult volunteers, living in the State of RJ. The results showed the impact of DMT2 and MS, as well as weight gain, on changes in several anthropometric and blood parameters. The proteomic analysis identified 203 plasmatic and 64 salivary proteins, with some that changed in relative abundance according to body weight gain and the development of MS and DMT2, such as proteins: S100-A8, Profilin 1, Cytoplasmic tryptophan-tRNA ligase and APOC3. Changes in these proteins suggest their use as potential biomarkers, which may help in the future in the diagnosis of MS and DMT2, along with other clinical parameters already used today.

Keywords: Proteomics, Saliva, Blood, Obesity, Gingivitis, Diabetes Mellitus, Metabolic Syndrome.

Lista de figuras

Figura 1	Prevalência mundial da DMT2 dispostas em caixas, os valores superiores são pessoas com DMT2 em milhões, os números do meio são estimativas esperadas para 2035 e o valor inferior é o aumento observado entre o período de 2013 a 2035. Adaptado de DeFronzo 2015.	p 14
Figura 2	Distribuição dos voluntários segundo o IMC, DMT2 e SM	p 66
Figura 3	PLS-DA cluster das amostras plasmáticas dos 5 grupos estudados	p 10
Figura 4	PLS-DA cluster das amostras plasmáticas dos grupos Controle x SM (A) e Controle x DMT2 (B)	p 103
Figura 5	PLS-DA cluster das amostras salivares dos 5 grupos da pesquisa	p 104
Figura 6	PLS-DA cluster das amostras salivares do grupo ControlexDMT2	p 105
Figura 7	Vip score das quinze proteínas plasmáticas mais importantes para a diferenciação entre os 5 grupos estudados	p 106
Figura 8	Vip score. A) quinze proteínas mais importantes para a diferenciação entre os grupos Controle x SM na amostra plasmática e B) quinze proteínas mais importantes que diferenciam os grupos Controle x DMT2 na amostra plasmática	p 107
Figura 9	Vip score. Quinze proteínas mais importantes que diferenciam os 5 grupos de estudo na amostra salivar	p 108
Figura 10	Vip score. Quinze proteínas mais importantes que diferenciam os grupos Controle x DMT2 na amostra salivar	p 109
Figura 11	Heatmap mostrando as 15 proteínas plasmáticas dos grupos Controle x SM, baseadas na análise de Vip score	p 111
Figura 12	Heatmap mostrando as 15 proteínas plasmáticas dos grupos Controle x SM, baseadas na análise de Vip score	p 112
Figura 13	Heatmap mostrando as 15 proteínas plasmáticas dos grupos	p 113

	Controle x DMT2, baseadas na análise de Vip score	
Figura 14	Heatmap mostrando as 15 proteínas plasmáticas dos grupos Controle x DMT2, baseadas na análise de Vip score	p 114
Figura 15	Heatmap mostrando as 15 proteínas salivar dos grupos Controle x SM, baseadas na análise de Vip score	p 125
Figura 16	Heatmap mostrando as 15 proteínas salivar dos grupos ControlexDMT2, baseadas na análise de Teste T	p 116
Figura 17	Análise de Pattern Hunter das 25 melhores proteínas plasmáticas dos 5 grupos estudados, usando Correlação de Pearson r	p 118
Figura 18	Análise de Pattern Hunter das 25 melhores proteínas, usando Correlação de Spearman. Amostra plasmática ControlexSM (A) e ControlexDMT2 (B)	p 119
Figura 19	Análise de Pattern Hunter das 25 melhores proteínas salivares dos 5 grupos estudados, usando Correlação de Pearson r	p 121
Figura 20	Análise de Pattern Hunter das 25 melhores proteínas, usando Correlação de Spearman. Amostra salivar ControlexSM (A) e ControlexDMT2 (B)	p 127
Figura 21	Abundância relativa da Proteína Homólogo de proteína de mitocôndrias agrupadas em A) ControlexSM; B) ControlexDMT2; C) comparação com os 5 grupos de estudo	p 128
Figura 22	Abundância relativa da Proteína 1 de ligação ao domínio LIM em A) ControlexSM; B) ControlexDMT2; C) comparação com os 5 grupos de estudo	p 130
Figura 23	Abundância relativa da Fator de iniciação de tradução eucariótica 4 gama 1 em A) ControlexSM; B) ControlexDMT2; C) comparação com os 5 grupos de estudo	p 131
Figura 24	Abundância relativa da Transportador de cobalamina lisossomal ABCD4 em A) ControlexSM; B) ControlexDMT2; C) comparação com os 5 grupos de estudo	p 133

Figura 25	Abundância relativa da Proteína de canal de cálcio de dois poros 1 em A) ControlexSM; B) ControlexDMT2; C) comparação com os 5 grupos de estudo	p 134
Figura 26	Abundância relativa da Apolipoproteína C-III em A) ControlexSM; B) ControlexDMT2; C) comparação com os 5 grupos de estudo	p 136
Figura 27	Abundância relativa da Abundância relativa da Triptofano-tRNA ligase, citoplasmática em A) ControlexSM; B) ControlexDMT2; C) comparação com os 5 grupos de estudo.	p 138
Figura 28	Abundância relativa da Profilina 1 em A) ControlexSM; B) ControlexDMT2; C) comparação com os 5 grupos de estudo	p 139
Figura 29	Abundância relativa da Fosfolipase A2 gama citosólica em A) ControlexSM; B) ControlexDMT2	p 141
Figura 30	Abundância relativa da Colagenase intersticial em A) ControlexSM; B) ControlexDMT2	p 142
Figura 31	Abundância relativa da Glutamato Descarboxilase 2 em A) ControlexSM; B) ControlexDMT2	p 143
Figura 32	Abundância relativa da Proteína S100-A8 em A) ControlexSM; B) ControlexDMT2; C) comparação com os 5 grupos de estudo	p 144
Figura 33	Abundância relativa da Proteína S100-A9 em A) ControlexSM; B) ControlexDMT2; C) comparação com os 5 grupos de estudo	p 147

Lista de tabelas

Tabela 1	Fatores de Risco da Síndrome Metabólica, de acordo com as Organizações de Saúde. Adaptado de SAMSON & GARBER (2014)	P28-29
Tabela 2	Prevalência de Síndrome Metabólica no Brasil. Adaptado de RAMIREZ <i>et al</i> (2018)	P 31
Tabela 3	Dados demográficos da primeira população estudada	P 45-46
Tabela 4	Proteínas salivares humanas identificadas em indivíduos com e sem gengivite	P 47-49
Tabela 5	Proteínas bacterianas identificadas na saliva de voluntários com e sem gengivite no estudo piloto	p 50-53
Tabela 6	Dados demográficos dos 103 voluntários estudados	p 64
Tabela 7	Dados antropométricos do segundo grupo amostral	p 65
Tabela 8	Dados clínicos e antropométricos do segundo grupo amostral categorizado de acordo com IMC e doenças	p 66-67
Tabela 9	Dados clínicos e antropométricos do grupo Controle e SM	p 67-68
Tabela 10	Dados clínicos e antropométricos do grupo Controle e DMT2	p 68-69
Tabela 11	Dados clínicos e antropométricos do grupo SM e DMT2	p 70
Tabela 12	Dados clínicos e antropométricos do grupo Obeso e DMT2	p 70-71
Tabela 13	Dados clínicos e antropométricos do grupo Obeso e SM	p 71-72
Tabela 14	Proteínas plasmáticas identificadas nos 5 grupos de estudo	p 73-82
Tabela 15	Proteínas plasmáticas identificadas na comparação ControlexSM	p 82-89
Tabela 16	Proteínas plasmáticas identificadas na comparação ControlexDMT2	p 89-92
Tabela 17	Proteínas salivares identificadas nos 5 grupos de estudo	p 96-99
Tabela 18	Proteínas salivares identificadas na comparação ControlexSM	p 99-101
Tabela 19	Proteínas salivares identificadas na comparação ControlexDMT2	p 101-103

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	17
2- REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 – Obesidade e sobrepeso	19
2.2 - Doenças periodontais	22
2.3 - Diabetes mellitus tipo 2	24
2.4 - Síndrome Metabólica	26
2.5 - Biomarcadores sanguíneos e salivares	31
3- JUSTIFICATIVA	35
4 -OBJETIVOS	35
4.1 – Objetivo principal	35
4.2 - Objetivos específicos	36
5 – MATERIAIS E MÉTODOS	36
5.1 – Casuística	36
5.2 - Avaliação clínica	38
5.2.1 - Exame intra-oral	38
5.2.2 - Exame antropométrico	38
5.2.3 - Aferição da pressão arterial	39
5.3 - Análises laboratoriais	39
5.4 Diagnóstico de DMT2 e SM	40
5.5 - Análise proteômica	40
5.5.1 - Extração das proteínas da saliva.....	40
5.5.2 - Extração das proteínas do plasma	41
5.5.3 – Espectrometria de massas	41
5.6 - Análise dos dados	44
Capítulo 1 – Estudo piloto	45
6 - RESULTADOS	45
6.1 Dados demográficos	45
6.2 - Identificação de proteínas salivares humanas no estudo piloto	47
6.3 - Identificação de proteínas bacterianas da saliva no estudo piloto	50
6.4- Análise estatística dos dados proteômicos	54
7 – DISCUSSÃO	54
7.1- Proteínas salivares humanas moduladas em resposta a gengivite	54
7.1.1 Anexina A1.....	54
7.1.2 Fator de alongamento negativo E	55
7.1.3 Proteína 5 contendo domínio de ligação de nucleossomo	55

7.1.4 Cistatina	56
7.1.5 Amilase.....	56
7.1.6 Lactotransferrina.....	56
7.2 - Proteínas bacterianas secretadas diferencialmente na saliva em resposta a gengivite	57
7.2.1 Proteínas de <i>Actinobateria</i>	58
7.2.2 N-acetilmurâmico 6-fosfato de <i>Bacterioidetes</i>	58
7.2.3 Proteínas de <i>Chlamydiae</i>	58
7.2.4 Proteínas de <i>Fusobacteria</i>	59
Capítulo 2 – Segundo grupo de estudo	61
8 - RESULTADOS	61
8.1 – Dados demográficos	61
8.2.1 - Dados antropométricos do segundo grupo amostral	63
8.4 Análise comparativa dos grupos Controle x SM e Controle x DMT2	65
8.5 Análise comparativa dos grupos obeso, DMT2 e SM	67
8.6- Identificação de proteínas plasmáticas	70
8.7- Identificação de proteínas salivares	87
8.8- Análises estatísticas das proteínas identificadas nas amostras plasmáticas e salivares	93
9 - DISCUSSÃO	113
9.1 - Dados antropométricos e demográficos da segunda população de estudo dos 5 grupos de estudo.	113
9.2 – Dados clínicos da segunda população de estudo dos 5 grupos de estudo	113
9.3- Análise dos dados clínicos da comparação ControlexSM e ControlexDMT	114
9.4- Análise dos dados clínicos dos grupos obeso, DMT2 e SM	114
9.5- Análise comparativa dos proteomas salivares e plasmáticos	116
9.5.1 Proteínas plasmáticas	116
9.5.1.1 Homólogo de proteína de mitocôndrias agrupadas (CLUH)	116
9.5.1.2 Proteína 1 de ligação ao domínio LIM	118
9.5.1.3 Fator de iniciação de tradução eucariótica 4 – gama 1	120
9.5.1.4 Transportador de cobalamina lisossomal ABCD4	121
9.5.1.5 Proteína de canal de cálcio de dois poros 1	123
9.5.1.6 Apolipoproteína C-III	124
9.5.1.7 Triptofano-tRNA ligase, citoplasmática	126
9.5.2 Proteínas salivares	127
9.5.2.1 Profilina 1	127

9.5.2.2 Fosfolipase A2 gama citosólica	129
9.5.2.3 Colagenase intersticial	131
9.5.2.4 Glutamato Descarboxilase 2	132
9.5.2.5 Proteína S100-A8/9	133
10- CONCLUSÃO	135
11-REFERÊNCIA	138
ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	163
ANEXO 2: PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	166
ANEXO 3: CARTA DE ACEITE	170
APÊNDICE 1: CORREÇÃO DE BONFERRONI	172
APÊNDICE 2: ARTIGO ACEITO NA REVISTA PROTEOMICS CLINICAL APPLICATION	179
APÊNDICE 3: RELEVANCE OF OBESITY AND OVERWEIGHR TO SALIVAR AND PLASMA PROTEOMES OF HUMAN YOUNG ADULTS FROM BRAZIL	197

1- INTRODUÇÃO

A obesidade é definida segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) como um acúmulo de gordura de forma anormal ou excessiva e que pode prejudicar a saúde do indivíduo (WHO, 2021a). Evidências apontam que na obesidade e em suas comorbidades há troca de informações entre o sistema imune e o sistema metabólico, com os adipócitos exercendo funções imunológicas (KAU *et al.*, 2011). A obesidade influencia o aumento do infiltrado de macrófagos no tecido adiposo branco em camundongos e humanos, criando uma inflamação local e sistêmica, e assim, levando ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e resistência à insulina, dentre outras doenças associadas (WEISBERG *et al.*, 2003; CANCELLO *et al.*, 2005).

Estudos epidemiológicos demonstram que a prevalência de sobrepeso e obesidade em adultos com idade a partir de 18 anos tem dobrado nas últimas 4 décadas. Em 2016, foram constatados cerca de 39% da população com sobrepeso e 13% com obesidade (WHO, 2021a). Este cenário dramático pode representar um impacto importante na saúde pública devido às comorbidades associadas. As consequências comuns da obesidade são doenças cardiovasculares, Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2), desordens musculoesqueléticas e alguns cânceres (BERG *et al.*, 2005; YUSUF *et al.*, 2005 *et al.*, 2022). O aumento de peso pode levar a alterações metabólicas significativas, as quais podem servir como biomarcadores para doenças associadas a obesidade (BULLO *et al.*, 2007; SHAH *et al.*, 2008; DE SPIEGELEER *et al.*, 2021).

Biomarcadores são definidos como substâncias que podem ser medidas e avaliadas experimentalmente e indicam uma condição normal ou patológica de um organismo ou de respostas farmacológicas a intervenções terapêuticas (STRIMBU & TAVEL., 2011). Os biomarcadores podem ser usados na área clínica para diagnóstico ou para identificar riscos para a ocorrência de doenças (BUYSE *et al.*, 2011; FOROUTAN., 2015). Os biomarcadores podem ser de diversos tipos, como enzimas, proteínas, genes e células específicas.

Os biomarcadores proteicos vêm sendo utilizados para o estudo de diversas doenças, tais como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, assim como

doenças cardiovasculares, DMT2, Síndrome Metabólica (SM) e doenças periodontais, as quais são comorbidades relacionadas à obesidade (PINHO *et al.*, 2014; YOSHIZAWA *et al.*, 2013; MCGHEE *et al.*, 2014; CHAHINE *et al.*, 2014; HUYNH and MOHAN., 2017; CHIEN *et al.*, 2017). Nesse sentido, estudos proteômicos, em particular com aplicação da espectrometria de massas (MS), facilitam as descobertas de novos biomarcadores, uma vez que geram um grande número de proteínas identificadas (ZOU *et al.*, 2013; WHITE *et al.*, 2014).

Em estudos anteriores do nosso grupo, a proteômica foi utilizada como método de busca por potenciais biomarcadores precoces para doença periodontal e risco cardiovascular, utilizando a saliva e o sangue de jovens adultos voluntários como fonte de proteínas para a pesquisa. Durante minha dissertação de mestrado (SILVA, 2019), confirmamos que os proteomas de ambos os fluidos eram modulados em resposta a variação no Índice de Massa Corporal (IMC), além de detectar algumas proteínas com potencial para biomarcador por estarem associadas a comorbidades relativas ao ganho de peso (Apêndice 3), o que abriu novas perspectivas para trabalhos futuros com outras doenças. Além disso, a saúde bucal dos voluntários foi avaliada no mestrado, o que levou a observação de gengivite em 1/3 da população do estudo (6 em 18 indivíduos). Agora, como objetivo deste projeto doutorado realizamos uma análise comparativa das proteínas humanas e bacterianas presentes na saliva dos indivíduos com e sem gengivite, cujos resultados e discussão estão descritos em no primeiro Capítulo desta Tese.

Em paralelo, iniciamos a captação de novos voluntários, em busca do aumento no número amostral e da obtenção de amostras de indivíduos com as doenças com Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2) e Síndrome Metabólica, conseguindo 103 voluntários saudáveis e com as doenças citadas, com diferentes faixas de IMC. Todos os resultados obtidos a partir desta segunda população de estudo, estão descritos no Capítulo 2 deste texto.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Obesidade e sobrepeso

A obesidade e o sobrepeso são definidos pelo acúmulo excessivo ou anormal de gordura, representando um risco à saúde (SUVAN *et al.*, 2011). O sobrepeso e a obesidade estão relacionados a múltiplas comorbidades como doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, doença periodontal, hipertensão, diabetes tipo 2, levando a uma diminuição da saúde e perda da longevidade (SAITO & SHIMAZAKI, 2007; CHAFFEE *et al.*, 2010; BORGES *et al.*, 2013; CARLUCCI *et al.*, 2013; DHANDA & TAHERI, 2017).

O número de pessoas obesas no mundo teve um aumento significativo desde 1980, mais do que dobrando seu número. Em 2016 a estimativa era que 1,9 bilhões de adultos, acima de 18 anos, tinham sobrepeso (39%), sendo 600 milhões de adultos obesos (13%) (WHO, 2021a). Em torno de 41 milhões de crianças na faixa de 5 anos tinham sobrepeso ou eram obesos. Segundo a OMS, caso esse aumento expressivo não se altere, em 2025 haverá cerca de 2,3 bilhões de pessoas com sobrepeso, sendo 700 milhões de adultos e 75 milhões de crianças com obesidade (ABESO, 2022).

O aumento da prevalência de sobrepeso e obesidade nos países em desenvolvimento e desenvolvidos tem se agravado com o passar dos anos, tornando-se um dos mais graves problemas de saúde pública do século 21 (BARNES *et al.*, 2007; STEVENS *et al.*, 2012; POPKIN *et al.*, 2012). Em 2010, a obesidade e o sobrepeso foram responsáveis por cerca de 3,4 milhões de mortes, estando ligados a mais mortes que o baixo peso (LIM *et al.*, 2012; WHO, 2021a).

No Brasil, segundo dados da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), em 2020 a taxa de sobrepeso nos adultos atingiu 57,5%, com maior prevalência nos homens (58,9%) do que nas mulheres (56,2%). A obesidade teve uma frequência de 21,5% nos adultos, sendo semelhante entre homens e mulheres. A pesquisa foi realizada nas 26 capitais da federação e no Distrito Federal, usando como base de dados de beneficiários de planos de saúde (VIGITEL, 2020).

A constatação da condição de obesidade é realizada através do cálculo do IMC (Índice de Massa Corporal), avaliando a relação entre o peso e a altura elevada ao quadrado (Kg/m^2). Adultos com IMC menor que 18,5 estão abaixo do peso; o peso normal situa-se na faixa entre 18,5 e 24,9; o sobrepeso, entre 25 e 29,9; e a obesidade, igual ou maior que 30 (HOSPITAL ISRELITA ALBERT EINSTEIN, 2016).

Apesar de comumente utilizado, o IMC não consegue distinguir massa gordurosa de massa magra, causando dados conflitantes, pois há uma superestimação em pessoas musculosas e imprecisão em idosos, devido à perda de massa magra. Além disso, o IMC não traduz como a gordura corporal está distribuída, sendo este fator de extrema importância na avaliação de sobrepeso e obesidade (ABESO, 2016). Outro método utilizado em combinação com o IMC, e que pode verificar as condições de saúde de uma pessoa e o grau de risco de desenvolvimento de problemas à saúde, é a mensuração de Circunferência de Cintura e de Quadril (CCQ). Estas medidas são utilizadas para verificar o nível de gordura visceral. A partir destes dados, é possível obter a relação cintura-quadril (ABESO, 2009).

A obesidade é uma doença complexa, porém comumente relacionada ao aumento anormal de gordura no tecido adiposo, denominado adiposidade (WHO 2021a), podendo influenciar no desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), acidente vascular cerebral (AVC) e apneia do sono. O aumento da gordura corporal tem influência na produção de adipocinas, que apresentam um papel importante nas complicações cardiometabólicas (KAHN & FLIER, 1993; OGLESBY *et al.*, 2006).

O tecido adiposo apesar de apresentar em grande parte a função de estocar energia, também é responsável por diversas funções, como secreção de proteínas e peptídeos pelos adipócitos, sendo um órgão metabolicamente ativo e de grande importância para o organismo (SANTOS & TORRENT, 2010; SIPPEL *et al.*, 2014). Este tecido pode ser dividido de acordo com sua localização em tecido adiposo visceral (TAV) e tecido adiposo subcutâneo (TAS), os quais apresentam características metabólicas diferentes. O TAS é encontrado no abdômen, nas regiões glúteas e femoral e embaixo da pele, produzindo adipocinas pró-inflamatórias, como leptina e Proteína Estimulante de Acilação

(ASP). O TAV encontrado principalmente na área abdominal, secreta maior quantidade de adipocinas pró-inflamatórias, como: i) TNF- α , citocina com características pró-inflamatórias sintetizadas por neutrófilos, macrófagos e adipócitos que atua em processos de apoptose, citotoxicidade, inflamação, ativação da lipólise e inibição da lipogênese; ii) IL-6, uma citocina produzida por diversas células do sistema imune como macrófagos e monócitos, além de adipócitos e fibroblastos, tendo a capacidade de induzir a produção de PCR e aumentar a produção de VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*); e iii) resistina, produzida por macrófagos e adipócitos, está relacionada a resistência à insulina, realizando maior liberação de ácido graxo e lipólise (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2007; ALANIZ *et al.*, 2007; KONRAD *et al.*, 2007; GUIMARÃES *et al.*, 2007; PORTER *et al.*, 2009; MOULIN *et al.*, 2009; AL-MANSOORI *et al.*, 2021).

Na década de 90, foi mostrado que a obesidade é uma doença inflamatória, observando maior expressão do gene responsável pela produção da adipocina TNF- α no tecido adiposo de ratos (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1993). Novos estudos relacionaram a obesidade com alterações nas funções endócrinas e metabólicas do tecido adiposo, mostrando um aumento na síntese de adipocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , interleucina e outros (BULLO *et al.*, 2007; SHAH *et al.*, 2008; KAWAI *et al.*, 2021).

A adipocina leptina é uma proteína produzida principalmente pelo Tecido Adiposo Branco (TAB), tendo a função de ativar células do sistema imune como células *natural killer* e macrófagos/monócitos, além de regular a quimiotaxia, proliferação e liberação de radicais de oxigênio por neutrófilos. A produção da leptina depende da quantidade de TAB e o tamanho dos adipócitos (HSU *et al.*, 2015). A leptina é considerada um potencial biomarcador para doenças cardiovasculares, sendo associado a marcadores de hipercoagulabilidade, hiperatividade plaquetária e hipofibrinólise (CSONGRÁDI *et al.*, 2017).

A adiponectina uma adipocina anti-inflamatória, possui uma capacidade antiaterogênica, através da inibição de monócitos nas células endoteliais, diminuindo a produção de moléculas de adesão e da transformação de macrófagos em células espumosas, macrófagos carregados de lipídeos, estando relacionadas a aterosclerose (MIHALOPOULOS *et al.*, 2020). Além disso a adiponectina também mostrou aumentar a síntese de IL-10, uma citocina anti-

inflamatória e diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF α (KUMADA *et al.*, 2004).

Devido ao aumento no acúmulo de gordura, o sobrepeso e a obesidade representam um grave risco à saúde (SUVAN *et al.*, 2011), influenciando no desenvolvimento de doenças, cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, hiperlipidemia, periodontite e hipertensão (SAITO & SHIMAZAKI., 2007; MORITA *et al.*, 2011). A hiperplasia dos adipócitos ocasionada em condições de sobrepeso e obesidade, aumenta a quantidade de adipocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e TNF α , (KARMIRIS *et al.*, 2006; SATPATHY *et al.*, 2015), podendo levar ao desenvolvimento ou agravamento de doenças periodontais, como a periodontite, e de doenças cardiovasculares, como a aterosclerose (VERHAGEN & VISSEREN, 2011; GOCKE *et al.*, 2014).

2.2 - Doenças periodontais

As doenças periodontais são doenças inflamatórias que acometem o periodonto, denominadas gengivite e periodontite (ARMITAGE, 1999). O fator etiológico destas doenças é o biofilme bacteriano dental (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005). Dentre as doenças infecto-inflamatórias, a doença periodontal ganha destaque, sendo uma das mais comuns (HUANG & GIBSON III, 2015).

A gengivite se caracteriza por ser uma inflamação dos tecidos marginais, reversível e não destrutiva (EBERHARD *et al.*, 2013). Na gengivite, ocorre o acúmulo de placa bacteriana, apresentando edema gengival, eritema e sangramento à sondagem (ARMITAGE, 2004; KIM *et al.*, 2013), enquanto a periodontite é caracterizada por uma inflamação destrutiva, na qual há perda irreversível de osso alveolar e ligamento periodontal (ARMITAGE, 1999; EBERHARD *et al.*, 2013). A demora no tratamento da periodontite pode levar à perda dentária, alterações na mastigação, aumento da mobilidade dentária e dor (PIHLSTROM *et al.*, 2005). A periodontite é modulada e ligada à resposta inflamatória do indivíduo, evoluindo de uma condição de gengivite em indivíduos susceptíveis (KIM *et al.*, 2013; KAYAL, 2013).

Em 1997, Perlstein e colaboradores realizaram um estudo em ratos Zucker obesos com o objetivo de verificar se a obesidade poderia levar a alterações na histologia do periodonto na ausência de irritação e a alterações na resposta do periodonto na presença de irritação, através do contato de um fio de aço em torno do segundo molar superior. Durante o estudo, foi observado que em ratos obesos a inflamação e destruição do periodonto eram mais graves, tendo a obesidade contribuído para a maior gravidade da periodontite (PERLSTEIN *et al.*, 1997).

Em 2005, Genco e colaboradores analisaram os dados do levantamento epidemiológico nacional dos Estados Unidos (*Third National Health and Nutrition Examination Survey*), incluindo 12.367 indivíduos não-diabéticos. Na avaliação, o IMC foi utilizado para mensurar a obesidade e o nível clínico de inserção foi utilizado para avaliar o perfil periodontal dos indivíduos. Quando os dados foram cruzados, foi observado que a obesidade poderia ser um fator de risco para a periodontite. Além disso, verificou-se um aumento dos níveis plasmáticos de TNF- α , podendo ocasionar um estado hiperinflamatório, aumentando os riscos para a doença periodontal. Os dados da análise logística indicaram que esta associação entre IMC e periodontite talvez seja modulada pela resistência à insulina (GENCO *et al.*, 2005).

Há estudos sendo realizados com enfoque na relação da periodontite e obesidade em crianças, demonstrando um aumento no índice de placa bacteriana e gengivite, conforme o do IMC (FRANCHINI *et al.*, 2011; SFASCIOTTI *et al.*, 2016). Tem sido demonstrado que a obesidade está relacionada ao aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias como a TNF- α e adipocinas como a leptina, envolvida no gasto energético, na regulação da ingestão alimentar e funções neuroendócrinas. Estes mediadores inflamatórios levam a aumento da inflamação gengival e doenças periodontais. Essa alteração é influenciada pelo aumento do tecido adiposo encontrado na obesidade e no sobrepeso e, consequente, aumento na produção de adipocinas pró-inflamatórias (SAITO *et al.*, 2008; MARTINEZHERRERA *et al.*, 2017).

As doenças periodontais também apresentam associação com outras doenças abordadas no estudo, DMT2 e SM. A Diabetes pode aumentar o risco

de doenças periodontais de forma direta, através da resposta inflamatória gengival ou indiretamente pela diminuição na produção de saliva e uso de medicamentos. Aproximadamente um terço das pessoas com DMT2 possui doença periodontal grave, podendo levar eventualmente a perda de um ou mais dentes (HASTINGS and VASQUEZ., 2017; VIDONE., 2018). Em relação a SM, estudos observaram que a presença da doença periodontal pode influenciar no desenvolvimento ou agravamento da SM. O aumento da proteína C-reativa na doença periodontal pode influenciar no aumento da inflamação sistêmica, impactando na SM. Também foi observado que o aumento na profundidade das bolsas periodontais está relacionado a uma maior produção de mediadores inflamatórios (SAITO *et al.*, 2003; SAITO *et al.*, 2006; MORITA *et al.*, 2010; LOPEZ *et al.*, 2012)

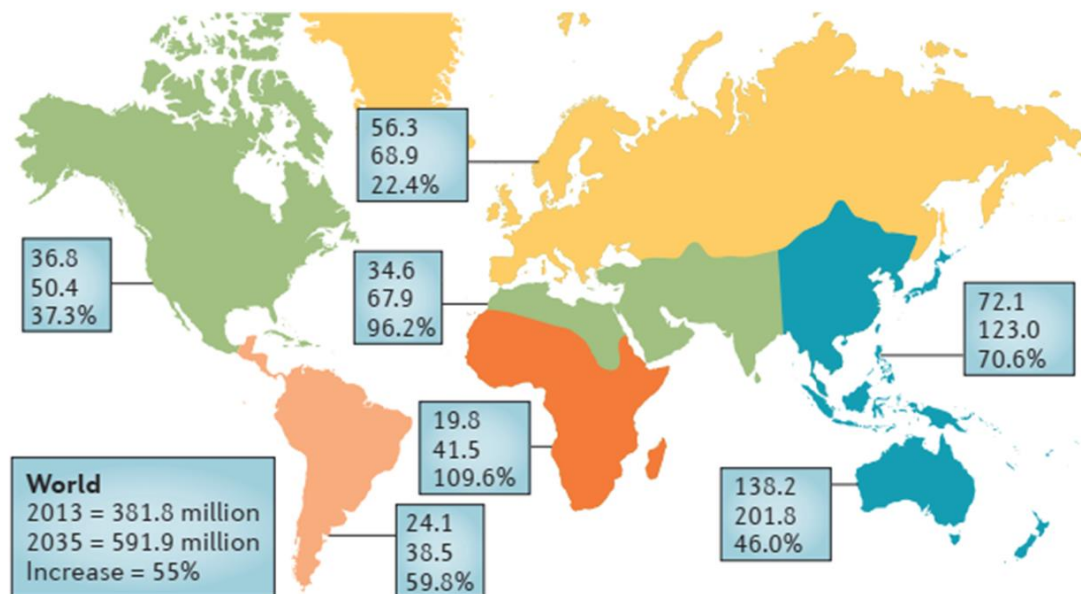
2.3 - Diabetes mellitus tipo 2

A Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2) é uma doença definida pelo desequilíbrio do metabolismo de lipídios, proteínas e carboidratos, resultando assim na secreção deficitária de insulina pelas células β pancreáticas, além de resistência à insulina ou a combinação de ambos (DEFRONZO, 2009). A complexidade desta doença leva a necessidade de cuidados médicos constantes (INZUCCHI, 2012).

A DMT2 tornou-se um grande motivo de preocupação para a saúde, tanto em nível local quanto mundial (Figura 1). Segundo a *International Diabetes Federation* (IDF), o número de adultos com idade entre 20 e 70 anos com DMT2 em 2013 foi 382 milhões em todo o mundo, com estimativa de aumentar para 592 milhões em 2035 (IDF, 2013). De acordo com a OMS, o número de pessoas com DMT2 vem aumentando ao longo dos anos, tendo, em 1980, 108 milhões de pessoas doentes e 422 milhões em 2013. A prevalência mundial em adultos com mais de 18 anos quase que dobrou, de 4,7% para 8,5% entre o período de 1980 e 2014. A mortalidade prematura ocasionada pela diabetes aumentou em 5% entre 2000 e 2016. Cerca de 2,2 milhões de mortes foram atreladas ao

aumento de glicose sanguínea. Em 2016 a diabetes causou diretamente a morte de 1,6 milhões de pessoas (WHO, 2020).

Figura 1. Prevalência mundial da Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2).



Os valores superiores nas caixas azuis indicam o número de pessoas com DMT2, em milhões; os números do meio são estimativas esperadas para 2035; o valor inferior é o aumento estimado entre o período de 2013 a 2035. Adaptado de DeFronzo, 2015.

Segundo dados da VIGITEL, no Brasil a frequência de diabetes em nível nacional, em 2019, foi de 8,2%, sendo as mulheres com 9,0% e os homens 7,3%. Um dos agravantes encontrados no estudo para o desenvolvimento da doença foi a idade, influenciando ambos os sexos de maneira semelhante (VIGITEL., 2020).

A intolerância à glicose e a DMT2 ocorrem sempre que o controle homeostático das concentrações de glicose no plasma é prejudicado devido a uma diminuição na sensibilidade à insulina que não é totalmente compensada por um aumento na quantidade de insulina produzida pela célula β pancreática (KAHN, 2006).

A inflamação sistêmica é um fator já bem estudado para a resistência à insulina. Em pacientes com resistência à insulina, já foi constatado aumento nos níveis de células inflamatórias, como os macrófagos M1, assim como de

citocinas pró-inflamatórias no fígado, soro e tecido adiposo (ROMEO, 2012). A infiltração de macrófagos M1, macrófagos pró-inflamatórios, no tecido adiposo é um fator crucial para o desenvolvimento da resistência à insulina, assim como a diminuição de macrófagos anti-inflamatórios do tipo M2 (NISHIMURA, 2009; LUMENG, 2011).

O processo inflamatório encontrado em indivíduos obesos pode vir a ser um dos gatilhos necessários para o desenvolvimento da DMT2 (AL-GOBLAN *et al.*, 2014). O fato de a obesidade desequilibrar as funções metabólicas e endócrinas, acaba por levar ao aumento dos níveis de citocinas e proteínas pró-inflamatórias e diminuir os níveis de proteínas e citocinas anti-inflamatórias (BULLO *et al.*, 2007). Citocinas inflamatórias como a IL-6, proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1) e TNF- α são proteínas ligadas à obesidade em especial a obesidade abdominal. A TNF- α e IL-6 possuem a capacidade de desencadear a Resistência à Insulina (RI), através da inibição de vias de sinalização de insulina, causando a diminuição da expressão de GLUT4 e Substrato 1 do receptor de insulina (IRS1). Em adição, elevados níveis de TNF- α e IL-6 estão relacionados a níveis aumentados de proteína C-reativa (PCR), um conhecido marcador inflamatório agudo (AL-MANSOORI *et al.*, 2022). Dessa forma a busca por proteínas relacionadas e alteradas em DMT2 pode vir a ser usadas como potenciais biomarcadores da doença.

2.4 - Síndrome Metabólica

A Síndrome Metabólica (SM) é definida pela reunião de fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e DMT2, sendo caracterizada pela hipertrigliceridemia, baixa de HDL, circunferência de cintura e hipertensão (GRUNDY *et al.* 2005). Reaven foi o primeiro a discutir sobre esse grupo de fatores de risco. Esta síndrome, também conhecida como Síndrome da resistência à insulina (DEFRONZO & FERRANNINI, 1991) ou Síndrome X (REAVEN, 1988), está associada a resistência à insulina, risco de doenças cardiovasculares, estresse oxidativo e inflamação (FESTA *et al.* 2000, ONAT *et al.* 2006, LANN & LEROITH 2007, HAJER *et al.* 2007). Um dos fatores que contribuem para seu desenvolvimento é o consumo excessivo de alimentos

ricos em lipídeos e carboidratos, podendo ainda ser incluído o modo de vida sedentário (ROBBERECHT, 2018).

A SM acabou por se tornar um problema de saúde global. Segundo a IFD, a prevalência de SM na Europa varia de 18-30% e nos Estados Unidos de 33-39% (O'NEIL & O'DRISCOL, 2018; AGUIAR *et al.*, 2015). Sua prevalência varia conforme a região ou país de estudo, sexo, idade, etnia e genótipo, além das diversas metodologias de diagnóstico que influenciam na variação da SM no mundo (PUCCI *et al.*, 2018). No Brasil, de acordo com De Siqueira Valadares e colaboradores 2022 a prevalência de SM nos últimos 10 anos, 2011 a 2021, foi de 26% no sexo masculino e 38 no feminino. Quando analisado pelos diferentes critérios, a prevalência foi de 25% no JIS, 33% no IDF e 31% no NCEP ATP III.

Após os fatores de risco terem sido agrupados e caracterizados, várias tentativas para estabelecer os critérios para diagnóstico de SM foram realizadas (WEN *et al.*, 2015). A Organização Mundial da Saúde (OMS) foi a primeira a criar uma definição de SM internacionalmente reconhecida. Os critérios usados pela OMS foram editados pelo Grupo Europeu para o Estudo da Resistência à Insulina (EGSIR) em 1999. Em 2001 outro critério para SM foi empregado pelo Painel de Tratamento de Adultos do Programa Nacional de Educação sobre Colesterol (NCEP / ATPIII), atualizando as diretrizes para a síndrome. Em 2003 a *American Association of Clinical Endocrinologists* (AACE) elaborou sua própria definição, seguido pela IDF, em 2005 (FORD, 2005; ALBERTI *et al.*, 2009). Essas variações nos critérios ocorrem devido a alguns diferentes sintomas encontrados nas populações, o que impacta na susceptibilidade a DM2 e doenças cardiovasculares (FORD, 2005; WEN., 2015). Com isso, o diagnóstico de SM vai depender da região e quais critérios são utilizados pelas Instituições de referência (Tabela 1).

Segundo o estudo de Ramires e colaboradores de 2018, a prevalência de SM no Brasil em 2013 foi de 8,9%, sendo maior em mulheres que em homens. Dentre os homens, 7,5%, apresentavam a doença, enquanto nas mulheres, 10,4% foram diagnosticadas com SM (Tabela 2). Os critérios seguiram o consenso internacional de cardiologia com 3 ou mais dos seguintes componentes: diabetes autorreferido, hipercolesterolemia, pressão alta e circunferência da cintura alta. Este estudo mostrou que somente 23,8% dos

participantes não possuíam nenhum dos componentes da SM e 67,3% possuíam até dois fatores para o desenvolvimento da doença, o que indica o elevado número de brasileiros com risco de desenvolver a SM.

A obesidade, em específico a obesidade abdominal é um dos fatores para o diagnóstico da SM. Foi observado que indivíduos com SM possuem alterações nos níveis de proteínas como IL-1RA, TNF- α , fator derivado do pâncreas (PANDER), e interleucina (IL-)-37. A IL-1RA já foi associado a todos os cinco componentes da SM, hiperglicemia, baixo de HDL, obesidade abdominal, hipertensão, altos níveis de triglicerídeos. As TNF- α e PANDER se mostraram elevadas em indivíduos com SM e a IL-37 diminuída na doença (CHIELLE *et al.*, 2018; LIND *et al.*, 2021; ABDEL-MONEIM *et al.*, 2022). Essas alterações ocasionadas pela SM podem ser detectadas, analisadas e usadas como possíveis biomarcadores para a doença.

Tabela 1. Fatores de Risco da Síndrome Metabólica, de acordo com as Organizações de Saúde.

Organização	WHO	EGIR	NCEP/ATPIII	AACE	AHA/NHLBI/ADA - Atualização NCEP/ATPIII	IDF	Definição Combinada ¹
Ano	1999	1999	2001	2003	2004	2005	2009
Fatores de Risco	IG/DMT2/ ou Resistência à Insulina + 2 fatores	Resistência à Insulina + 3 fatores ou mais	3 ou mais fatores	Intolerância a glicose + qualquer um dos fatores	3 ou mais fatores	Obesidade + 2 fatores	3 ou mais fatores
Obesidade	Relação Cintura/Quadril (>0,9 cm H e >0,85 cm M) ou IMC .30,0 Kg/m ²	Circunferência da Cintura (≥94 cm H e ≥80 cm M)	Circunferência da Cintura (≥102 cm H e ≥88 cm M)	IMC ≥25 Kg/m ²	Circunferência da Cintura (≥102 cm H e ≥88 cm M)	Circunferência da Cintura (≥94 cm H; ≥90 cm H asiáticos e ≥80 cm M)	Varia de acordo com a etnia
Dislipidemia	HDL <0,91 mmol/L H (35 mg/dL) <1,0 mmol/L F (<39 mg/dL) TG 1,7 mmol / L (150 mg / dL)	HDL <1.0 mmol/L (39 mg/dL) TG 2.0 mmol/L (177 mg/dL) ou em tratamento	HDL <1.0 mmol/L M (40 mg/dL) <1.3 mmol/L F (50 mg/dL) TG 1.69 mmol/L (150 mg/dL)	HDL <1.0 mmol/L M (40 mg/dL) <1.3 mmol/L F (50 mg/dL) TG 1.69 mmol/L (150 mg/dL)	HDL <1.0 mmol/L M (40 mg/dL) <1.3 mmol/L F (50 mg/dL) TG 1.69 mmol/L (150 mg/dL) ou em tratamento	HDL <1.0 mmol/L M (40 mg/dL) <1.3 mmol/L F (50 mg/dL) TG 1.7 mmol/L (150 mg/dL) ou em tratamento	HDL <1.0 mmol/L M (40 mg/dL) <1.3 mmol/L F (50 mg/dL) TG 1.7 mmol/L (150 mg/dL) ou em tratamento
Glicemia	DMT2 Glicose em jejum	Sem DMT2 Glicose em	DMT2 Glicose em	Sem DMT2 Glicose em	DMT2 Glicose em jejum	DMT2 Glicose em jejum	Glicose em jejum 5.6 mmol/L

	>6.1 mmol/L (110 mg/dL)	jejum >6.1 mmol/L (110 mg/dL)	jejum 6.1 mmol/L (110 mg/dL)	jejum 6.1 mmol/L (110 mg/dL)	5.6 mmol/L (100 mg/dL)	5.6 mmol/L (100 mg/dL)	(100 mg/dL) ou em tratameto
Pressão Arterial	PAS 140 PAD 90	PAS 140 PAD 90 ou em tratamento	PAS 130 PAD 85	PAS 130 PAD 85	PAS 130 PAD 85 ou em tratamento	PAS 130 PAD 85 ou em tratamento	PAS 130 PAD 85 ou em tratamento
Fatores Adicionais	Microalbuminúria 20 mg/min Albumina/creatinina 30 mg/g	X	X	Resistencia a insulina (histórico familiar DMT2, Idade, etnia, estilo de vida, SOP)	X	X	X

Legenda: World Health Organization (WHO); European Group for Study of Insulin Resistance (EGIR); National Cholesterol Education Program's Adul Treatmen Panel III (NCEP/ATPIII); American Association of Clinical Endocrinology (AACE); American Heart Association (AHA); National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI); American Diabetes Association (ADA); International Diabetes Federation (IDF); intolerância à glicose(IG); Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2); Homem (H); Mulher (M); Triglicerídeos (TG); Pressão Arterial Sistólica (PAS) sistólica; Pressão arterial diastólica (PAD); Síndrome do Ovário Policístico (SOP). ¹ Definição conjunta elaborada pelos órgãos AHA/NHBI, IDF, World Heart Federation, International Atherosclerosis Society e International Association for the Study of Obesity. Adaptado de SAMSON & GARBER (2014).

Tabela 2: Prevalência da Síndrome Metabólica no Brasil.						
Fatores da SM	Total N= 59.402		Masculino N = 25.920		Feminino N = 33.482	
	%	% IC 99%	%	% IC 99%	%	% IC 99%
Pressão Arterial	40,7	39,6 – 41,7	46,9	45,5 – 48,3	34,9	33,7 – 36,3
Circunferência de Cintura	65,2	64,4 – 65,9	55,6	54,0 – 57,1	73,9	72,7 – 75,0
Diabetes	7,1	6,6 – 7,6	6,3	5,6 – 7,2	7,8	7,1 – 8,5
Dislipidemia	14,7	14,0 – 15,5	11,9	10,9 – 13,1	16,9	16,0 – 17,9
Quantidade de Fatores						
0	23,8	22,9 – 24,7	28,0	26,7 – 29,4	19,9	18,8 – 21,1
1	38,1	37,2 – 39,0	34,8	33,5 – 36,2	41,0	39,8 – 42,3
2	29,2	28,3 – 30,1	29,7	28,4 – 31,0	28,7	27,6 – 29,9
3	7,5	7,1 – 8,1	6,5	5,8 – 7,3	8,5	7,8 – 9,3
4	1,4	0,9 – 1,2	1,0	0,7 – 1,3	1,8	1,5 – 2,2
Legenda: N, número de voluntários que apresentam o fator de risco associado à Síndrome Metabólica; IC 99%, intervalo de confiança de 99%. Adaptado de RAMIREZ <i>et al</i> (2018).						

2.5 - Biomarcadores sanguíneos e salivares

Marcadores biológicos ou biomarcadores referem-se a moléculas marcadoras que podem ser mensurados e relacionados a alguma condição ou estado biológico. Os biomarcadores incluem proteínas, genes, diferenças na expressão metabólica e mudanças genéticas, encontrados em diferentes fontes como tecidos e fluidos corporais (FOROUTAN., 2015).

Os biomarcadores podem ser divididos em quatro grupos, de acordo com suas características e variações: diagnóstico, prognóstico e preditivo (ZIEGLER *et al.*, 2012; HE., 2015). O biomarcador preventivo auxilia na prevenção de uma doença. Este tipo de biomarcador é muito utilizado na prevenção de câncer (HE., 2015). Por exemplo,

mutações no gene BRAC 1 e BRAC 2 têm maiores riscos para desenvolver câncer, aumentando as chances em cerca de 56 e 87% (SRIVASTAVA *et al.*, 2001).

Os biomarcadores diagnósticos servem como indicativos clínicos para detectar e predeterminar uma doença, prevendo a severidade e o possível curso de uma doença em uma população específica. Moléculas presentes em urina, sangue, líquido cefalorraquidiano, saliva, tecidos tumorais, fluidos pleural e sinovial podem ser usados como fonte para a detecção de biomarcadores (TOPALIAN *et al.*, 2012; JOANNA *et al.*, 2015). Um exemplo de biomarcadores diagnósticos são os anticorpos anti-peptídeos citrulinados cíclicos (CCP), que são usados como diagnósticos de artrite reumatoide (SOUSLOVA *et al.*, 2013; HE., 2015).

Os biomarcadores prognósticos e preditivos são comumente determinados em projetos de ensaios farmacológicos. Estão ligados à resposta ao tratamento com fármacos específicos (BUYSE *et al.*, 2010). Os biomarcadores preditivos e de diagnósticos estão relacionados a traços moleculares, celulares e genéticos de uma população. Dentre os biomarcadores de prognóstico, o *Mamma Print* é um teste que observa a atividade de 70 diferentes genes relacionados ao câncer de mama, detectando possíveis riscos de metástases (SLODKOWSKA & ROSS., 2009). Os biomarcadores preditivos também são importantes na escolha dos tratamentos específicos para o câncer. O gene HER2 (*Human Epidermal growth factor Receptor-type 2*) é usado como um marcador preditivo, tendo um papel importante na seleção da modalidade de um tratamento para o câncer de mama (DAVOLI *et al.*, 2010).

O sangue é conhecido por ter um papel central na fisiologia humana, refletindo o estado do indivíduo. A parte líquida do sangue é o plasma que contém proteínas funcionais, apolipoproteínas, proteínas imunológicas, proteínas de coagulação, proteínas de sinalização e proteínas de extravasamento tecidual, tornando o plasma uma boa fonte para a busca de biomarcadores (GEYER *et al.*, 2017). Seus componentes celulares são eritrócitos, trombócitos e linfócitos. A parte líquida é chamada de plasma, quando todos os componentes estão retidos, e soro, quando a cascata de coagulação foi ativada (coagulação do sangue). Para simplificar, usaremos o termo “plasma” em vez de “soro”, pois a maioria das conclusões se aplica a ambos.

O plasma sanguíneo é um bom candidato para busca de biomarcadores proteicos, pois apresentam proteínas que circulam pelo corpo todo, refletindo o metabolismo sistêmico e o estado inflamatório (VAN DIJK *et al.*, 2010). No plasma sanguíneo, a interleucina 10 foi relacionada com o desenvolvimento da Síndrome Metabólica (IYER *et al.*, 2012; AROOR *et al.*, 2013). Os níveis de interleucina-10 foram identificados de forma diminuída em adolescentes e crianças com sobrepeso e obesidade, sendo um marcador de risco metabólico (CHANG *et al.*, 2014). Segundo o estudo de Weiss e colaboradores, a IL-6 está relacionada a hipertensão, hipertrigliceridemia e hiperglicemia, além de ter sido encontrado níveis aumentados dessa proteína em mulheres com obesidade (CHEDRAUI *et al.*, 2014). A IL-6 também tem sido observada de forma elevada em pacientes com DMT2, estando envolvida em ações imunorreguladoras e no metabolismo e homeostase da glicose (REHMAN *et al.*, 2017).

A saliva é fluido versátil e de fácil coleta, além de não invasivo. A saliva é um fluido composto por 98% de água e 2% de outros componentes como, muco, compostos antibacterianos e eletrólitos. Diversas proteínas salivares têm sido associadas a doenças orais quanto sistêmicas na saliva, podendo estar relacionadas a câncer oral, doença cardiovascular e HIV, bem como complementar achados clínicos e também ser usadas como uma fonte de biomarcadores (RATHNAYAKE *et al.*, 2013). A saliva é um bom fluido corporal para ser explorado como biomarcador proteico, tendo a vantagem de ser de fácil acesso, não demandando técnicas invasivas de coleta, o que geralmente é bem aceito pelo paciente. É um componente importante do sistema imune e pode ser uma fonte importante de biomarcadores, refletindo mudanças tanto na cavidade oral quanto na saúde geral (Wu *et al.*, 2009).

A elevação dos níveis de metaloproteinase de matriz-8 (MMP-8) em doenças periodontais, principalmente a periodontite, é um biomarcador bem conhecido da atividade da doença. A MMP-8 degrada os componentes da matriz extracelular e o aumento de sua atividade pode levar à perda de tecido periodontal; além disso, seus níveis diminuem após o tratamento da periodontite, tornando-se uma proteína ideal para ser utilizada em point-of-care diagnostics (PoCT), que são testes rápidos de diagnóstico realizados em pontos de atendimento, como consultórios médicos e farmácias. Estudos também observaram que as bactérias orais têm a capacidade de

converter proMMP-8 em sua forma ativada, levando a um aumento no nível de MMP-8 em doenças periodontais, confirmando seu valor como biomarcador de degradação periodontal (SORSA *et al.*, 2016; PÄRNÄNEN *et al.*, 2020; PÄRNÄNEN *et al.*, 2021).

A visfatina, por sua vez, é uma proteína produzida pelo tecido adiposo e por macrófagos, que possui a capacidade de estimulação de mediadores pró-inflamatórios (MOSCHEN *et al.*, 2010). Valores elevados de visfatina foram observados em doenças inflamatórias, como DMT2, aterosclerose, artrite e obesidade (CHANG *et al.*, 2011). A visfatina também pode ser encontrada no fluido gengival (FG), se encontrando elevada em casos de gengivite e periodontite. Devido ao fato dos níveis de visfatina estarem aumentados na obesidade, estudos começaram a correlacionar essa adipocina com o aumento do risco de inflamação periodontal ou o comprometimento da saúde do periodontal de pacientes obesos (PRADEEP *et al.*, 2011).

A proteína alfa-2 macroglobulina tem sido detectada de forma elevada na saliva de pacientes com DMT2 (AITKEN *et al.*, 2015). No estudo de Dezayee e Al-Nimer de 2016, foi observado que a proteína C reativa, uma proteína relacionada ao risco de doenças coronarianas, estava alterada tanto em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 1 quanto no tipo 2. No estudo de Kim e colaboradores em 2021 foi observado que 7 proteínas (Alfa-1-antitripsina, Alfa-1-antitripsina, Apolipoproteína A-I, haptoglobina, proteína de ligação ao retinol 4, transtirretina e zinco-alfa2-glicoproteína) apresentavam diferenças significativas quando se comparava indivíduos saudáveis com pessoas com pré-diabetes e DMT2.

Ostrowska e colaboradores em 2020 analisaram a concentração de proteínas (fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-8 (IL-8), molécula de adesão intercelular solúvel 1 (sICAM1), calprotectina, matriz metaloproteinase-9 (MMP-9), matriz metaloproteinase-2 (MMP-2) para verificar a existência de biomarcadores relacionados a obesidade metabólica. A obesidade metabólica ou visceral está positivamente relacionada a concentrações elevadas de glicose em jejum, hipertensão, dislipidemia e doenças cardíacas, sendo um dos fatores para o desenvolvimento da SM. No estudo de Ostrowska e colaboradores em 2020 foi observado correlações positivas entre o IMC e as proteínas salivares de TNF- α , MMP-2 e IL-8.

O constante aumento da obesidade no mundo e no Brasil junto aos problemas que essa doença e suas comorbidades, gengivite, DMT2 e SM, trazem a população torna necessário o desenvolvimento de métodos mais precisos, baratos e de fácil acesso de diagnóstico. Além disso, é crucial a padronização de metodologias de diagnóstico precoce, analisando o risco de desenvolver estas doenças metabólicas, podendo assim diminuir os gastos com o tratamento e melhorar a qualidade de vida da população.

3- JUSTIFICATIVA

O aumento no número de indivíduos com doenças não transmissíveis como a obesidade, doença periodontal, SM e DMT2, está elevando o gasto dos países com os seus sistemas de saúde. Países como o Brasil, apresentam dificuldades para conseguir direcionar seus recursos financeiros para o tratamento dessas doenças. A utilização da espectrometria de massas para a descoberta de biomarcadores de diagnóstico, através do proteoma salivar e plasmático, pode ajudar tanto no combate dessas doenças como no diagnóstico precoce, melhorando a qualidade de vida da população.

4 -OBJETIVOS

4.1 – Objetivo principal

O objetivo deste estudo é determinar fatores clínicos, demográficos e proteicos diferenciais entre indivíduos adultos com gengivite, Síndrome Metabólica e Diabetes Mellitus tipo 2, contra indivíduos saudáveis, a fim de determinar potenciais biomarcadores para tais comorbidades associadas a obesidade.

4.2 - Objetivos específicos

Capítulo 1:

- Comparar os proteomas salivares de indivíduos com gengivite e indivíduos periodonto saudáveis, do grupo de estudo piloto com 18 voluntários;
- Determinar proteínas humanas e bacterianas com expressões distintas entre os dois grupos de estudo para propor possíveis biomarcadores salivares novos para gengivite.

Capítulo 2:

- Estudar uma nova população com maior número amostral, incluindo 103 voluntários moradores do Rio de Janeiro que sejam saudáveis ou que apresentem diagnósticos para DMT2 e SM.
- Realizar exames demográficos, antropométricos e sanguíneos nesta nova população de estudo e classificar os indivíduos entre as três categorias de IMC (magros, com sobrepeso e obesos).
- Determinar dentre os voluntários a presença de Síndrome Metabólica e confirmar, pelo indicativo de glicemia, quais voluntários previamente diagnosticados com DMT2 estavam decompensados;
- Detectar proteínas com expressão diferencial entre os proteomas da saliva e plasma sanguíneo de adultos com peso normal, sobrepeso e obesidade, com ou sem SM e DMT2;

5 – MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 – Casuística

A casuística inclui amostras constituídas por indivíduos adultos residentes no Estado do Rio de Janeiro que foram em categorizados três faixas de acordo com o índice de massa corporal (IMC), como sobrepeso (SP), obesidade (OB) e com peso normal (GC). Os valores determinantes de IMC foram: $IMC \geq 18,5 \text{ kg/m}^2$ e $\leq 24,9 \text{ kg/m}^2$ para GC; $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ e $\leq 29,9 \text{ kg/m}^2$ para SP; e $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ para OB.

Todos os participantes foram informados sobre os detalhes do projeto e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2), concordando com a avaliação demográfica, clínica, laboratorial e molecular. Foram registrados em questionário anamnésico o gênero, a raça, a renda familiar e dados de saúde geral. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unigranrio No: 3.402.791 (Anexo 3).

Em um estudo inicial, piloto, foi selecionado um grupo com dezoito (18) adultos jovens, de 18 a 35 anos. Avaliações da saúde bucal, realizadas na clínica de odontologia da Unigranrio por técnicos qualificados, mostraram alguns indivíduos com gengivite (1/3 da população estudada).

Neste trabalho, um segundo grupo amostral foi montado, com 103 voluntários com idade a partir de 18 anos, com peso normal, sobrepeso e obesos, sendo alguns apresentando-se saudáveis e outros com Diabetes Mellitus tipo 2 e Síndrome metabólica. Os indivíduos foram distribuídos em cinco grupos, de acordo com o IMC e a presença das doenças: peso normal (PN), sobrepeso (SB), obeso (OB), com Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2) previamente diagnosticados e com Síndrome Metabólica (SM).

Os critérios de exclusão do primeiro grupo de estudo foram: presença de hepatopatia, nefropatia, endocrinopatias, neoplasias e doenças cardiovasculares, autoimune, hematológica, psiquiátrica e inflamatória intestinal; gestação e lactação, tabagismo, uso de fármacos que interferem com o peso corporal, metabolismo de carboidratos e lipídios e hipotensores. Uso de quimioprofilaxia para o atendimento odontológico, uso de antibiótico nos últimos 6 meses e serem alunos do curso de odontologia.

Os critérios de exclusão do segundo grupo de estudo foram: presença de hepatopatia, nefropatia, endocrinopatias (com exceção da DMT2), neoplasias e doenças cardiovasculares, autoimune, hematológica, psiquiátrica e inflamatória intestinal; gestação e lactação, tabagismo, uso de fármacos que interferem com o peso corporal, uso de antibiótico nos últimos 6 meses, metabolismo de carboidratos e lipídios e hipotensores.

5.2 - Avaliação clínica

5.2.1 - Exame intra-oral

Os exames da saúde bucal foram realizados por examinadores qualificados do Clínica de odontologia da Unigranrio, e incluem registros dicotomizados da presença de biofilme dental supragengival, sangramento gengival, sangramento e/ou supuração à sondagem (SS) e medida da profundidade de sondagem (PS) e do nível clínico de inserção (NCI), em mm. A presença de biofilme dental foi confirmada por visualização das superfícies dentárias após secas com jato de ar em campo sob isolamento relativo. A sondagem periodontal foi feita em seis sítios, por elemento dentário com sonda periodontal milimetrada da Carolina do Norte (Hu-Friedy; Chicago). Os segundos sítios foram examinados: ângulo disto-vestibular, face vestibular, ângulo mésiovestibular, ângulo mésio-palatino ou mésio-lingual, face palatina ou lingual e ângulo disto-palatino ou disto-lingual. Durante a sondagem periodontal foram registrados a PS e o NCI simultaneamente. Os terceiros molares não foram incluídos na avaliação clínica.

Todos os voluntários foram submetidos à avaliação clínica de seu estado periodontal de acordo com os seguintes critérios: saúde periodontal (PH), $\leq 10\%$ dos locais com SS, sem PS ou NCI > 3 mm, embora PS ou NCI = 4 mm em até 5% de sites sem ss foi permitido; e gengivite (G), $> 10\%$ dos locais com SS, sem PS ou NCI > 3 mm, embora PS ou NCI = 4 mm em até 5% dos locais sem SS fosse permitido (DA SILVA-BOGHOSSIAN *et al.*, 2011).

5.2.2 - Exame antropométrico

Para medir o Índice de Massa Corporal (IMC), os indivíduos foram pesados e medidos em uma mesma balança com estadiômetro (balança antropométrica mecânica, Mod. 104A – Balmak). Esta balança é capaz de mensurar até 300 Kg e seu estadiômetro possui régua antropométrica retrátil, medindo até 2 m com graduação de 0,5 cm. Portanto, o peso foi registrado em quilogramas e a altura em cm. Para a

realização destas avaliações, os participantes estavam trajando roupas leves, descalços, sem acessórios ou bolsas e com os bolsos vazios. Ao subir na balança, o indivíduo distribuiu o peso em ambos os pés, olhando para a linha do horizonte. O IMC foi calculado dividindo-se o peso (em kg) pela altura ao quadrado (em m²).

As circunferências da cintura (CC) e do quadril (CQ) foram mensuradas com fita métrica metálica, graduada em centímetros, com o paciente em pé. CC e CQ foram medidas, respectivamente, no ponto médio entre a crista ilíaca e o último arco costal e na maior circunferência posterior das nádegas. A relação cintura-quadril (RCQ) foi obtida com a divisão da CC pela CQ.

5.2.3 - Aferição da pressão arterial

A pressão arterial (PA) foi aferida por método oscilométrico, utilizando-se um monitor automático da marca OMRON. Os manguitos possuem tamanho apropriado ao braço dos participantes e os registros foram feitos com o indivíduo sentado. Após 5 min de repouso, foram realizadas três medidas sequenciais, com intervalos de 3 min, com vistas ao cálculo da média dos níveis pressóricos. Foram descartados valores que apresentarem diferenças acima de 10 mmHg na PA sistólica e 5 mmHg na PA diastólica (MALACHIAS., *et al* 2016; LIU *et al.*, 2022).

5.3 - Análises laboratoriais

Amostras de sangue foram coletadas após 12 h de jejum e alíquotas de plasma foram estocadas a -20°C ou -80°C, conforme apropriado ao método. Foram avaliados os seguintes componentes sanguíneos:

- a) Glicemia de jejum – Método enzimático (hexoquinase). Foram utilizados tubos sem anticoagulantes, com as amostras centrifugadas imediatamente após a coleta. Os valores são expressos em mg/dl.
- b) Insulina – Determinada por ELISA (Enzo Life Sciences). Os valores são expressos em µU/ml.
- c) Resistência à insulina – aplicação da fórmula do HOMA-IR (*homeostasis model assessment – insulin resistance*), o índice que avalia o grau de resistência à insulina

possuindo ou não DMT2, em que a resistência é determinada pelo produto da insulinemia ($\mu\text{U/ml}$) e glicemia de jejum (mmol/l), dividido por 22,5. Esse índice possui alta correlação com o clamp euglicêmico/ hiperinsulinêmico. A resistência insulínica utilizada no estudo foi de $\text{HOMA-IR} \geq 2,3$ (GELONEZE et al., 2009).

d) Funcionalidade das células beta ($\text{HOMA-}\beta$)- método usado para avaliar a liberação de insulina, através de valores de insulina e da glicemia em jejum, refletindo o balanço entre a produção hepática de glicose e secreção de insulina, utilizando a fórmula:

$\text{insulina em jejum (uU/mL)} \times 20 / (\text{Glicose em jejum (mg/dL)} \times 0,0555) - 3,5$ (GONG et al., 2022).

e) Perfil lipídico – Colesterol total (CT), HDL-colesterol (HDL-C), e triglicerídeos (TG) foram determinados por método enzimático-colorimétrico. O LDL-C foi estimado pela fórmula de Friedwald para valores de TG inferiores a 400 mg/dl: $(\text{CT} - \text{HDL-C} + \text{TG} / 5)$. Os valores são expressos em mg/dl.

5.4 Diagnóstico de DMT2 e SM

Os voluntários incluídos no estudo com DMT2 já possuíam um diagnóstico prévio da doença, não sendo realizado nenhum tipo de diagnóstico com relação a essa doença no estudo, além da avaliação de glicemia, cujos dados foram usados para verificar se tais pacientes estariam descompensados. A SM foi determinada segundo o protocolo da NCEP/ATPIII (descrito na Tabela 1) modificado. A modificação ocorreu dentro do fator de glicemia, de acordo com Geloneze e colaboradores, 2009, que passou a incorporar a resistência à insulina ($\text{HOMA-IR} \geq 2,3$) como o fator de risco essencial para o desenvolvimento de SM, assim como proposto por Reaven (Reaven, 1988; Geloneze et al., 2009).

5.5 - Análise proteômica

5.5.1 - Extração das proteínas da saliva

As amostras de saliva foram coletadas como descrito por Gonçalves e colaboradores (2010), com algumas modificações. As coletas foram realizadas no período da manhã com o voluntário em jejum de 12 horas e com uma hora sem ingerir água. Cinco mililitros (mL) de água Milli-Q foram ofertados ao voluntário para bochechar por 5 minutos, sendo a mistura, contendo saliva, recolhida em tubo estéril e homogeneizada com 1 mM de *Phenylmethylsulfonyl fluoride* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e 1 mM de *Ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA; Sigma-Aldrich). As amostras foram mantidas em gelo e rapidamente centrifugadas a 13.500 rpm por 10 minutos (min). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e misturado com 1 mM de *Protease inhibitor cocktail* (Sigma-Aldrich). Foi realizada uma centrifugação a 17,146 g, 10°C, por 10 minutos para coleta do sobrenadante.

O sobrenadante da saliva foi diretamente submetido à precipitação com TCA 20% (concentração final). As proteínas finalmente foram recuperadas pela adição de 300 µL de Bicarbonato de Amônia (50mM). Esse processo foi repetido 3 vezes, segundo Santos e colaboradores em 2011. Todo o material biológico foi armazenado a -80°C.

5.5.2 - Extração das proteínas do plasma

As amostras de sangue (5 ml) foram coletadas por via intravenosa e armazenadas em tubos contendo EDTA com anticoagulante. O plasma foi separado por centrifugação a 3,1754 g por 10 min a 25°C, e, após, transferido para tubos estéreis de 1,5 ml e homogeneizados com 1 mM *Protease inhibitor cocktail*, sendo preservados a -80°C até o processamento. Os proteomas de plasma foram submetidos a depleção de albumina, com o uso de colunas *ProteoPrep Blue Albumin & IgG Depletion Kit* (Sigma-Aldrich), de acordo com o fabricante, sendo utilizados 50 µl de cada amostra de plasma no início do processo de depleção.

5.5.3 – Espectrometria de massas

Os proteomas totais da saliva e do plasma foram submetidos à digestão com tripsina (método *shotgun*). Cinquenta microgramas de cada amostra foram tratados com ureia 8 M (1:1), seguido por redução de proteína com *ditiotreitól* (DTT) 5 mM por 25 min., a 56° C, e alquilação com iodoacetamida (IAA) 14 mM por 30 min em temperatura ambiente, no escuro. Para a digestão da proteína, a ureia foi diluída para uma concentração final de 1,6 M com bicarbonato de amônio 50 mM e cloreto de cálcio 1 mM foi adicionado às amostras. Tripsina modificada para sequenciamento (Promega, Madison, WI, EUA) foi utilizada na digestão proteica, sendo adicionada na proporção de 1:50 (enzima: substrato) e a reação foi incubada por 16 h a 37° C. A reação foi paralisada com ácido fórmico a 0,4% (CARNIELLI *et al.*, 2018). As amostras digeridas foram filtradas usando colunas Oasis HLB 1cc (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) para remover a ureia da amostra.

No estudo piloto, dois conjuntos com os proteomas individuais de saliva foram preparados, relativos ao grupo saudável (periodonto saudável) (n=12 voluntários) e o grupo com gengivite (n=6).

Na segunda parte do estudo, também foram preparados conjuntos proteômicos salivares e plasmáticos dos voluntários, correspondendo a: peso normal (n=29), sobrepeso (n=25), obeso (n=15), DMT2 (n=11) e SM (n=23). Para uma melhor representação total dos voluntários e devido a limitação do tempo de uso do equipamento, os cinco grupos foram subdivididos em: peso normal 1 (n=13), peso normal 2 (n=13) e peso normal 3 (n=13); sobrepeso 1 (n=12), sobrepeso 2 (n=12) e sobrepeso 3 (n=11); obeso 1 (n=5), obeso 2 (n=5) e obeso 3 (n=5); DM 1 (n=3); DM 2 (n=3), DM 3 (n=3) e DM 4 (n=2); SM 1 (n=11), SM 2 (n=11) e SM 3 (n=11). O grupo DM foi subdividido em 4 devido presença de dois voluntários que apesar de possuírem DMT2 estavam com sua glicemia controlada e podiam produzir um viés nos dados, em relação ao restante do grupo. Cada subgrupo originou 1 conjunto proteômico, dessa forma, analisamos 16 conjuntos de saliva e plasma. Todos os conjuntos foram formados por concentrações equimolares das amostras de proteínas coletadas de cada indivíduo do mesmo grupo. Tais sets de amostras foram submetidos a digestão com tripsina, como descrito acima, gerando os respectivos peptidomas (16 conjuntos

de amostras salivares e plasmáticas), que foram analisados no espectrômetro de massas em triplicata, criando 3 réplicas analíticas para cada set.

As análises de MS foram realizadas em um nanoUPLC seguido por um espectrômetro de massa (MS), Synapt HDMS G1 (Waters Corporation), tipo Electrospray-Quadrupolo com Tempo de vôle (ESI-Q-TOF), no INMETRO, Rio de Janeiro, Brasil. A fase móvel cromatográfica A consistiu em ácido fórmico 0,1% em água (v/v) e a fase móvel B foi de ácido fórmico 0,1% em acetonitrila (v/v). A dessalinização da amostra foi realizada com um nanoACQUITY UPLC *Symmetry C18 Trap Column* (5 µm, 20 mm x 180 µm), usando uma taxa de fluxo de 5 µL / min por 3 minutos. A separação cromatográfica foi obtida com uma coluna de fase reversa nanoACQUITY UPLC HSS T3 (1,8 µm, 100 mm x 100 µm). Foi utilizada uma taxa de fluxo constante de 0,6 µL / min e o seguinte gradiente linear foi aplicado: 7-40% B de 0-19,9 min, 40-85% B de 19,9-23,9 min, constante de 85% B por mais 4 min e então a coluna foi reequilibrada às condições iniciais de 27,9-29,9 min e enxaguada por mais 7 minutos. O ensaio de espectrometria de massa foi realizado usando uma fonte de ionização nanoeletrospray (nanoESI +) positiva. O modo de aquisição foi MSe, com aquisição independente de dados (DIA) e fragmentação paralela de todos os íons parentais, com aquisição alternada em baixa e alta energia. Em baixa energia, espectros contínuos de 50 a 2000 Da foram adquiridos com tempo de varredura de 0,8s, temperatura da fonte de 80 °C, temperatura de dessolvatação de 100 °C, cone de amostragem de 35 V, capilar de 3,0 kV e energia de colisão constante de 6V. Em alta energia, todos os parâmetros eram os mesmos, mas a energia de colisão foi reduzida de 15-55 V durante o tempo de varredura. O espectrômetro de massa foi previamente calibrado usando uma solução de 300 fmol / µL de fibrinopeptídeo B humano (Glu1) (Waters Corporation). Esta solução foi usada no spray de referência durante as análises e varrida a cada 30s a uma taxa de fluxo de 0,2 µL / min. Os dados adquiridos foram corrigidos em massa considerando o íon precursor duplamente carregado de (Glu1) -fibrinopeptídeo B (785,8426 Da).

Nas análises de MS, todos os conjuntos de peptídeos foram inicialmente analisados em sequência por injeção direta no espectrômetro de massa para normalização e, em seguida, foram submetidos a avaliações em triplicatas analíticas para uma avaliação quantitativa que levou em consideração as médias das

abundâncias relativas de cada peptídeo das triplicatas, usando a contagem de íons relativos (*Total Ion Account-TIC*).

5.6 - Análise dos dados

As diferenças entre os grupos quanto aos parâmetros demográficos e clínicos foram avaliadas por meio dos testes T e Anova em um programa estatístico (SPSS Statistics 20, IBM Brasil, São Paulo, Brasil). O teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov foi realizado no conjunto amostral da pesquisa para determinar a distribuição normal das amostras do estudo. Após verificar quais variáveis possuíam distribuição normal ou não, foram aplicados os testes não paramétricos e paramétricos de acordo com cada variável. Por se tratar de uma análise univariada com mais de dois fatores, foi realizado um teste Post Hoc de comparações pareadas com correção de Bonferroni. O ajuste de Bonferroni (Anexo 4) foi feito com a comparação de pares para confirmar a existência de resultados significativos dentro das comparações realizadas quando essa correção foi aplicada.

Para a identificação das proteínas foi utilizado o banco de dados de proteínas humanas do UNIPROT (<https://www.uniprot.org/>), sendo o mesmo realizado para os 8 filos bacterianos, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Chlamydiae*, *Fusobacterium*, *Firmicutes*, *Synergistetes* e *Spirochaetes*, usando a ferramenta Progenesis (Waters).

A análise foi realizada com base nos requisitos de correspondência de íons: correspondências de íons de fragmentos mínimas por peptídeos, 3; correspondências de íons de fragmentos mínimos por proteína, 7; correspondências peptídicas mínimas por proteína, 1; clivagens perdidas de tripsina, 1; carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa e oxidação de metionina como modificação variável. Os polipeptídeos foram identificados se correspondessem a pelo menos um peptídeo único e específico de dados experimentais. Qualquer peptídeo não tríptico passando do critério de filtro foi descartado. A identificação foi classificada como real quando detectada em pelo menos duas réplicas analíticas. A taxa de falsa descoberta em todos os dados foi inferior a 1%. Os valores de abundância de proteínas foram

estimados pela média das abundâncias dos três primeiros peptídeos correspondentes.

A comparação entre os grupos foi realizada através do programa Progenesis (Waters) na primeira parte do estudo e com MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/home.xhtml>) na segunda parte do estudo. Neste último, as diferenças entre os grupos foram observadas por meio da realização de Heatmap, Test T, Volcano Plot, Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) e Pattern Hunter. Foram realizadas formas de comparação para as amostras plasmáticas e salivares: i) comparação entre o grupo controle e gengivite; ii) comparação entre os cinco grupos individualmente; iii) comparação entre o grupo controle (peso normal, sobrepeso e obeso) contra SM; iv) comparação entre o grupo controle (peso normal, sobrepeso e obeso) contra DMT2. As 3 formas de análise usadas na segunda parte do estudo foram realizadas para melhor verificar o impacto do IMC na SM e DMT2.

Capítulo 1 – Estudo piloto

6 - RESULTADOS

6.1 Dados demográficos

Foram coletados os dados demográficos e clínicos dos voluntários (Tabela 3). Com exceção da doença periodontal e triglicerídeos, nenhum dos dados clínicos mostrou diferenças significativas entre os grupos estudados. O grupo controle apresentou maior nível de triglicerídeos, o que discordou da literatura e pode ser explicado pela presença de outliers no grupo controle (KIM et al., 2020). Como era esperado, a avaliação periodontal de PS, BS, NCI, sangramento gengival e SS revelou diferenças significativas entre os grupos. Os níveis de PS, NCI e SS foram maiores no grupo caso, enquanto o BS diminuiu no grupo gengivite. Apesar desses dados inesperados do SB, as avaliações periodontais restantes foram capazes de diagnosticar nossos voluntários quanto à presença ou ausência de gengivite.

Tabela 3. Dados demográficos e clínicos do grupo de periodonto saudável x gengivite (n=18).

		% Homem	% Mulher	Valor de p
Gênero	Controle	16.6	83.3	NS*
	Caso	25	75	
		Média	DP	
Idade média (± DP)	Controle	26	5,5	NS†
	Caso	24	3,6	
Peso	Controle	68	13,8	NS†
	Caso	77	24,4	
Altura	Controle	157	5,4	NS†
	Caso	166	9,7	
IMC	Controle	28	3,5	NS†
	Caso	28	7,6	
CC	Controle	87	10,5	NS†
	Caso	82	16,6	
CQ	Controle	102	5,7	NS†
	Caso	101	13,8	
RCQ	Controle	1	0,1	NS†
	Caso	1	0,1	
Colesterol Total (mg/dl)	Controle	182	33,1	NS†
	Caso	171	34,3	
HDL (mg/dl)	Controle	53	11,7	NS†
	Caso	53	10,8	
Glicose (mg/dl)	Controle	94	11,9	NS†
	Caso	88	7	
Triglicerídeos (mg/dl)	Controle	129	82,9	0.0105†
	Caso	89	48,9	
LDL (mg/dl)	Controle	104	28,3	NS†
	Caso	100	31,6	
Insulina (mcUI/ml)	Controle	13	6,7	NS†
	Caso	9	4,6	
HOMA-IR	Controle	3	1,6	NS†
	Caso	2	1,1	
Pressão sistólica	Controle	113	12,9	NS†
	Caso	114	13,5	
Pressão diastólica	Controle	75	9,5	NS†
	Caso	73	9	
OS	Controle	1.8	0.4	0.025†
	Caso	2.4	0.51	
NCI	Controle	2	0.0001	0.0001†

	Caso	2.4	0.5	
BS (% de sítios)	Controle	20.5	19.6	0.004†
	Caso	10.6	7.7	
SS (% de sítios)	Controle	4.6	2.5	0.048†
	Caso	35.7	19.4	

* Teste qui-quadrado; † Teste T Independente; NS: Não significativo; DP: desvio padrão; HDL: Lipoproteína de Alta Densidade; LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade; HOMA-IR: Avaliação do Modelo Homeostático-Resistência à Insulina; BS: Biofilme supragengival; SS Sangramento à sondagem; NCI: Nível clínico de inserção e PS: profundidade de sondagem.

6.2 - Identificação de proteínas salivares humanas no estudo piloto

Na Tabela 4 estão apresentadas todas as 71 proteínas salivares humanas identificadas nas amostras da primeira população estudada. A maior parte das identificações foi relacionada com resposta imune (30 proteínas), seguida pela função de transporte (8 proteínas) e inibidores de protease (4 proteínas). Das 47 proteínas diferencialmente expressas, 22 estão induzidas e 25 apresentaram expressão diminuída nos indivíduos com gengivite em relação aos saudáveis. A maior parte das proteínas identificadas são relacionadas com resposta imune (22 proteínas), seguidas pelo transporte (6 proteínas) e inibidor de protease (5 proteínas).

Tabela 4: Proteínas salivares humanas identificadas em indivíduos com gengivite e controle

Acesso	Proteína	Razão (caso/controle)	Valor de P
Processo metabólico de proteínas celulares			
P02768	Albumina	-1,2	0,0001
Processo metabólico de carboidratos			
P04745	Alfa-amilase 1	+1,6	0,00038014
P19961	Alfa-amilase 2B	NS	NS
P04746	Alfa-amilase pancreática	NS	NS
Resposta imune			
P01877	Imunoglobulina pesada constante alfa 2	+1,2	0,00021694
P01833	Receptor de imunoglobulina polimérica	+1,4	0,00003
P01876	Imunoglobulina pesada constante alfa 1	NS	NS
Q8TAX7	Mucina-7	NS	NS
P01591	cadeia J de imunoglobulina	+1,4	0,0066502

A0A0C4DH69	Imunoglobulina kappa variável 1-9	+2,4	0,00007
P0DMS9	Proteína contendo domínio transmembranar TMIGD3	-2	0,00004
Q8N4F0	Membro 2 da família B contendo dobra BPI	+1,5	0,00004
P01857	Imunoglobulina pesada constante gama 1	+1,2	0,0096204
P05109	Proteína S100-A8	NS	NS
P22079	Lactoperoxidase	NS	NS
P06702	Proteína S100-A9	+1,1	0,0017612
P01834	Constante kappa de imunoglobulina	+1,2	0,026989
P0DOY2	Imunoglobulina lambda constante 2	-1,2	0,024191
P61626	Lisozima C	NS	NS
P04083	Anexina A1	-1,5	0,00097668
B9A064	Polipeptídeo tipo 5 de imunoglobulina lambda	NS	NS
P01859	Imunoglobulina gama constante pesada 4	+1,9	0,0085286
Q9NUQ9	Proteína FAM49B	-1,3	0,01255
Q5VY80	Proteína de ligação UL16 6	-1,2	0,010985
Q9BXJ3	Proteína 4 relacionada ao fator de necrose tumoral C1q do complemento	-1,5	0,026115
P02788	Lactotransferrina	+1,6	0,00002
P02808	Statherin	NS	NS
P06733	alfa-enolase	NS	NS
P04406	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	NS	NS
P02808	Statherin	NS	NS
Q14508	WAP proteína de domínio central de quatro dissulfeto 2	NS	NS
P15515	Histatina-1	NS	NS
P27544	Ceramida sintase 1	NS	NS
Q9H0F6	Sharpin	NS	NS
Inibidor de protease			
P01036	Cistatina-S	-1,6	0,001
P01037	Cistatina-SN	NS	NS
P09228	Cistatina-AS	+1,6	0,00001
P28325	Cistatina-D	+1,6	0,031199
Transporte			
P25311	Zinco-alfa-2-glicoproteína	+1,4	0,00034386
P12273	Proteína induzida por prolactina	+1,4	0,0011004
P02787	Serotransferrina	-1,3	0,0036109
P31025	Lipocalina-1	-1,3	0,0071376
Q14012	Proteína quinase tipo 1 dependente de cálcio/calmodulina	-1,3	0,017365
P68871	Subunidade beta da hemoglobina	NS	NS
P23280	Anidrase carbônica 6	NS	NS
O75674	Proteína tipo TOM1 1	NS	NS

Regulação da percepção sensorial da dor			
P02814	Proteína 3B regulada por andrógenos da glândula submandibular	NS	NS
Processo apoptótico			
P82970	Proteína 5 contendo o domínio de ligação ao nucleossomo do grupo de alta mobilidade	+1,3	0,001391
Homeostase da retina			
Q96DA0	Proteína de grânulo de zimogênio 16 homólogo B	-2	0,00022757
Angiogênese			
P63261	Actina_ citoplasmática 2	+1,3	0,0017054
Processamento de mRNA			
Q8WXA9	Glutamina reguladora de Splicing	+1,3	0,010846
Modificação de Proteína			
Q9UBF6	RING-box proteína 2	NS	NS
Estabilização de proteínas			
P07737	Profilina-1	+1,3	0,0007055
Processo catabólico lipídico			
P07098	Lipase de triacilglicerol gástrica	NS	NS
Desconhecido			
Q6PL24	Proteína TMED8	-4	0,0010495
A6NLU5	V-set e proteína contendo domínio transmembranar 2B	NS	NS
Outros			
O43760	Sinaptogirina-2	NS	NS
P02812	Proteína 2 rica em prolina salivar básica	NS	NS
P0CG38	membro da família de domínio de anquirina POTE I	NS	NS
P18615	Fator de alongamento negativo E	-2	0,00078695
Q9BUR4	Telomerase Cajal proteína corporal 1	NS	NS
Q6P5S2	Proteína homóloga LEG1	+1,5	0,00087526
P02810	Fosfoproteína rica em prolina ácida salivar 1/2	NS	NS
Q5VSP4	Proteína 1 semelhante à lipocalina 1 putativa	-1,8	7,3827e-06
Q96KC9	Proteína 1 de ligação ao cálcio e específica da espermátide	+3,2	0,00017193
P56159	receptor alfa-1 da família GDNF	-2,2	0,0001837
Q96A83	Cadeia de colágeno alfa-1 (XXVI)	-1,5	0,0070707
Q9UPV7	Proteína de dedo PHD 24	+2	0,00042488
Q8N983	Proteína ribossomal 39S L43_mitocondrial	NS	NS
P28562	Proteína fosfatase 1 de dupla especificidade	NS	NS
Q07654	Trefoil fator 3	NS	NS
Q6PCT2	Proteína F-box/repetição LRR 19	NS	NS

P05976	Cadeia leve de miosina 1/3_ isoforma do músculo esquelético	NS	NS
P54725	Proteína de reparo por excisão UV RAD23 homólogo A	NS	NS

Razão (caso/controle): razão dos valores médios de abundância, sendo (-) e (+) mostrando, respectivamente, diminuição e aumento na abundância relativa nos indivíduos doentes em relação aos saudáveis; *: valor de p quando $\leq 0,05$ no teste t independente; NS: Valores estatisticamente não significativos. Funções celulares obtidas do banco de dados Uniprot, onde OTHER indica as funções: tradução; contração muscular; desmetilação de proteínas; exocitose regulada; homeostase retiniana; regulação negativa da poliadenilação do mRNA; organização corporal cajal; desenvolvimento de organismo multicelular; espermatogênese; regulação positiva da adesão célula-substrato; Organização de Golgi.

6.3 - Identificação de proteínas bacterianas da saliva no estudo piloto

Para determinação das proteínas bacterianas secretadas na saliva dos voluntários do primeiro estudo, os dados de MS foram utilizados em buscas contra bancos de dados do Uniprot contendo proteínas de oito filos bacterianos. Um total de 116 proteínas foram identificadas, sendo elas oriundas dos seguintes Filos bacterianos: *Actinobacteria* (13); *Bacteroidetes* (12); *Chlamydiae* (17); *Cloroflexi* (10); *Firmicutes* (9); *Fusobacteria* (39); *Spirochaetes* (13) e *Synergistetes* (3). Na tabela 5 estão apresentadas todas as identificações de proteínas expressas microbiotas salivares de indivíduos com e sem gengivite, onde observamos uma dominância de proteínas de *Fusobactérias*.

Tabela 4. Proteínas bacterianas identificadas na saliva de voluntárias com gengivite e controle

Acesso	Proteína	Razão Caso/controle	Valor de P
<i>Actinobacteria</i>			
Q49642	Proteína de membrana não caracterizada ML0467	+1,6	0,00001
A1KNT4	Nucleosídeo trifosfato pirofosfatase	+2,3	0,00006
Q47KH4	Fosforribosilaminoimidazol-succinocarboxamida sintase	+1,2	0,0063378
Q1AXT1	Aspartil/glutamil-tRNA(Asn/Gln) subunidade C da amidotransferase	-1,3	0,031281
Q82JI1	Proteína H do sistema de clivagem de glicina	+1,2	0,10772

A1UHU3	ATP fosforibosiltransferase	NS	NS
Q8RQM6	Diaminopimelato descarboxilase	NS	NS
P9WLG7	Proteína não caracterizada Rv2240c	NS	NS
Q82EE8	GTP ciclohidrolase 1	NS	NS
Q8NQE4	Proteína de translocase independente de sec TatA	NS	NS
C5BVB1	L-cisteína:1D-mio-inositol 2-amino-2-desoxi- alfa-D-glucopiranosídeo ligase	NS	NS
Bacteroidetes			
Q2S580	Enzima de reparo de NAD(P)H-hidrato bifuncional Nnr	-2	0,000006
A0M3Z1	Proteína ribossômica 50S L10	-1,6	0,00002
Q2S6G3	ácido N-acetilmurâmico 6-fosfato eterase	+1,2	0,00007
Q5LJ28	S-adenosilmetionina:tRNA ribosiltransferase- isomerase	-1,6	0,0015376
A5FIJ2	Proteína ribossômica 50S L7/L12	+1,4	0,0026031
Q11S31	Provável transaldolase	+1,3	0,0041093
Q2S2I4	Glicerol-3-fosfato desidrogenase [NAD(P)+] 1	+1,8	0,0042322
Q2S3M6	Nucleosídeo difosfato quinase	-1,2	0,0045368
Q11WK5	5'-nucleotidase SurE	-1,2	0,037076
A0M587	Proteína ribossômica 50S L24	NS	NS
A6LHA9	Acetato quinase	NS	NS
Q11YV5	Fator de maturação do ribossomo RimM	NS	NS
B2RJ75	6_7-dimetil-8-ribitilumazina sintase	NS	NS
Chlamydia			
Q9PLJ0	UPF0098 proteína TC_0109	+11,2	0,000004
Q6MAF8	Proteína carreadora de acil	+1,5	0,00001
Q254Z5	Ribose-5-fosfato isomerase A	-2,4	0,00006
Q5L6Z2	Nucleosídeo difosfato quinase	+2	0,0001
Q9PJE1	Proteína TolB homóloga	+2,7	0,00011452
O84620	Provável dihidroneopterin aldolase	-2	0,00043129
Q9PKB5	Na(+)-translocando NADH-quinona redutase subunidade C	+3,1	0,0012787
O84839	Proteína antiterminação da transcrição NusB	+3	0,002815
O84048	Proteína de ligação ao DNA de fita simples	-1,2	0,0041304
Q9Z7U6	Orotato fosforibosiltransferase	-1,9	0,0046645
Q255X6	Alanina-tRNA ligase	-1,2	0,0089208
B0B7Z0	Proteína ribossômica 50S L21	-1,9	0,010364
Q822F3	Arginina descarboxilase dependente de piruvil AaxB	NS	NS
B0B8Q5	Fator de alongamento Ts	NS	NS
Q824H2	Citidilato quinase	NS	NS
Q6ME55	Proteína ribossômica 50S L29	NS	NS
D6YXE8	Proteína A da membrana de inclusão	NS	NS
Chloroflexi			
Q3Z969	Proteína ribossômica 50S L5	-2,3	0,0001
Q3Z7U5	tRNA pseudouridina sintase B	+1,6	0,00018321

A5UV64	2-tiouridilase MnmA específica de tRNA	+1,8	0,00044909
B9LDT2	Proteína antiterminação da transcrição NusB	-1,3	0,0043884
B9L2J0	4-hidroxi-2-oxovalerato aldolase	+1,4	0,010049
Q3Z6W1	Proteína ribossômica 50S L31	+1,2	0,01313
A9AXC6	glutamato racemase	+1,2	0,013952
Q3ZZK6	Junção Holliday ADN helicase dependente de ATP RuvA	-1,4	0,018275
Q3ZX82	Subunidade proteolítica de protease Clp dependente de ATP	NS	NS
A5FSN9	D-aminoacil-tRNA desacilase	NS	NS
Firmicutes			
P35151	Proteína não caracterizada YpuB	+1,6	0,00001
P00268	Rubredoxina	-1,2	0,003397
Q5L046	UPF0145 proteína GK1405	+1,2	0,012544
Q8NZJ0	Proteína 2 de ligação ao DNA de fita simples	NS	NS
Q03MI2	UPF0398 proteína STER_0279	NS	NS
P43683	Lantibiótico mersacidina	NS	NS
Q4L6S0	Endoribonuclease YbeY	NS	NS
A0R899	Proteína de recombinação RecR	NS	NS
P85110	Proteína 2 da camada S	NS	NS
Fusobacteria			
Q8RIE0	Provável proteína reguladora transcricional FN1661	+4,3	0,00000001
Q8RIA5	ADP-L-glicero-D-mano-heptose-6-epimerase	-1,4	0,00007
Q8RED1	Endonuclease Cas1 associada a CRISPR	+1,2	0,00007
Q8RFZ9	Provável metiltransferase de RNA de dupla especificidade RlmN	+1,2	0,0001
Q8RH07	Proteína GrpE	+1,6	0,00011301
Q8RDP7	Piridoxal 5'-fosfato sintase subunidade PdxS	+1,8	0,00012683
Q8RDV6	Proteína UPF0122 FN1394	+1,6	0,00021444
Q8RG87	Carbamoil-fosfato sintase de cadeia pequena	+1,4	0,00031355
Q8RFP5	Porfobilinogênio desaminase	+1,2	0,0003616
Q8REV6	Proteína de biossíntese de purina bifuncional PurH	+2	0,0004384
Q8RFV0	Sistema liberador de lipoproteína Proteína de ligação de ATP LolD	-1,6	0,00064171
Q8RE26	Proteína de ligação ao DNA de fita simples	+1,7	0,00087671
Q8RI76	Subunidade F da ATP sintase tipo V	+1,1	0,0013041
Q8RF94	Shiquimato quinase	+1,3	0,0022665
Q8RHX8	Subunidade beta da lisina 5_6-aminomutase	+1,3	0,0026685
E3H9T2	Proteína tipo mini-ribonuclease 3	1,30	0,0036464
Q8RI63	tiazole sintase	-1,4	0,0045462
Q8RGH8	cadeia beta triptofano sintase	-1,2	0,0057217
Q8RDX7	Triosefosfato isomerase	+1,4	0,005771
Q8RHJ9	Protease Clp dependente de ATP Subunidade de ligação a ATP ClpX	-1,6	0,0077166
Q8RII2	Bomba de efluxo de manganês putativa MntP	-1,7	0,00887
E3HDJ8	Homoserina O-acetiltransferase 2	-1,1	0,014072

Q8RI74	ATP sintase tipo V subunidade E	+1,3	0,01442
Q8R6B1	Subunidade pequena do RNA ribossômico metiltransferase A	+1,3	0,017068
P58884	Diidroorotato desidrogenase B (NAD(+))_subunidade de transferência de elétrons	-1,3	0,01959
Q8REF0	Peptídeo deformilase	+1,5	0,023111
P29709	ATP sintase cadeia épsilon_ íon sódio específico	+1,5	0,024249
Q8RDM9	Adenina fosforibosiltransferase	-1,5	0,033195
Q8RF18	Glicerol-3-fosfato desidrogenase [NAD(P)+]	-1,3	0,034971
Q8R5X4	Endoribonuclease YbeY	+1,2	0,045395
Q8R622	1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato redutoisomerase	NS	NS
Q8REE6	glutamato racemase	NS	NS
Q8RG65	Glutamina-frutose-6-fosfato aminotransferase [isomerizando]	NS	NS
Q8RHZ9	glicerol quinase	NS	NS
Q8KRV2	Subunidade da ATP sintase b_ específica do íon sódio	NS	NS
Q8RG55	Subunidade grande do RNA ribossômico metiltransferase H	NS	NS
Q8RHI5	Proteína ribossômica 50S L7/L12	NS	NS
Q8RDM4	Fold de proteína bifuncional	NS	NS
Q8RE43	Proteína ribossomal 30S S4	NS	NS
<i>Spirochaetes</i>			
O83172	Lipoproteína não caracterizada TP_0136	+2,7	0,00005
Q72NQ9	Gama-glutamil fosfato redutase	+1,2	0,00007
O83780	Proteína não caracterizada TP_0802	-2,2	0,00017721
Q0SNQ3	Undecaprenil-difosfatase	+1,3	0,00029897
Q08137	Proteína C da superfície externa	+1,5	0,00034443
B0SS41	histidinol desidrogenase	-1,6	0,0011854
B0SE83	Tiamina-fosfato sintase	-1,5	0,0030247
Q73Q17	Proteína GrpE	+1,2	0,0057811
B0SDC5	biotina sintase	-1,4	0,0065939
P61656	2-desidro-3-desoxifosfooctonato aldolase	-1,1	0,014386
Q44845	Proteína de membrana externa putativa BBA52	+1,7	0,02295
P70844	Proteína não caracterizada BBD22	+1,2	0,046046
Q04NG3	Adenina fosforibosiltransferase	NS	NS
Q0SN15	Proteína ribossômica 30S S8	NS	NS
<i>Sinergistetes</i>			
D1BAA5	Enzima de reparo de NAD(P)H-hidrato bifuncional Nnr	+1,5	0,0012962
D5ECW5	subunidade A da DNA girase	NS	NS
D1B5U2	Proteína transmembranar transportadora de fator de acoplamento de energia EcFt	NS	NS

Razão (caso/controle): razão dos valores médios de abundância, sendo (-) e (+) mostrando, respectivamente, diminuição e aumento na abundância relativa nos indivíduos doentes em

relação aos saudáveis; *: valor de p, quando $\leq 0,05$ no teste T; NS: Valores estatisticamente não significativos.

6.4- Análise estatística dos dados proteômicos

A PCA de proteomas humanos e bacterianos mostrou que os grupos caso e controle se comportaram de maneira diferente, como observado no artigo publicado (Apêndice 1). O VIP score (importância variável na projeção) de proteomas humanos e bacterianos foi realizado para detectar as 15 principais proteínas que afetaram as variações do grupo, tais como Cistatina-S, Alfa amilase, Lactotransferrina, Pseudoridina tRNA, Rubredoxina e Unidade Ribossomal 50S. (Figura 4 - Apêndice 1).

7 – DISCUSSÃO

7.1- Proteínas salivares humanas moduladas em resposta a gengivite

Nesta primeira etapa do estudo, foi possível detectar uma variedade de proteínas salivares humanas envolvidos com diversas funções biológicas, sendo a resposta imune a função mais expressiva. Grande parte destas identificações apresentou mudança em sua abundância relativa em resposta a gengivite. Destas, a maioria estava relacionada às funções imunológicas e de transporte, apresentando aumentado ou diminuição significativos em relação à gengivite, tais como as cadeias kappa e gama 2 pesada da imunoglobulina, Histatina-1, Anidrase carbônica 6 e Proteína 1 semelhante a TOM1. Proteínas com funções no metabolismo de carboidratos (alfa amilases), processo apoptótico (Proteína 5 contendo domínio de ligação ao nucleossomo) e que promovem a proteção da integridade dental (Fosfoproteína rica em prolina 1/2 ácida salivar) foram significativamente induzidas na saliva de indivíduos com gengivite, enquanto proteínas atuantes como inibidores de proteases foram igualmente expressas.

7.1.1 Anexina A1

Anexinas são proteínas de ligação ao Ca^{2+} , desempenhando um papel importante no processo inflamatório. A anexina A1 possui a capacidade de inibir a fosfolipase, dessa forma inibindo a produção de mediadores inflamatórios (FLOWER, 1988; RAYNAL & POLLARD, 1994). Nossos resultados indicam que anexina A1 diminuiu no grupo dos doentes em comparação ao saudável. Bostanci e colaboradores (2011) observaram níveis mais elevados de anexinas no fluido gengival crevicular (FGC) saudável quando comparado ao FGC com periodontite. Esse dado reafirma a função protetora da proteína Anexina A1, que estaria sendo depletada durante o quadro de gengivite no nosso estudo.

7.1.2 Fator de alongamento negativo E

O Fator de alongamento negativo E (NELF) é um complexo que tem como função regular negativamente o alongamento da transcrição pela RNA polimerase II (YU *et al.*, 2020). No estudo de Yu e colaboradores (2020) foi realizada a mutação da NELF em macrófagos, resultando no aumento da IL-10. O aumento da IL-10, uma proteína anti-inflamatória, amenizou a produção de proteínas pró-inflamatórias. Assim o estudo concluiu que a NELF possui a capacidade de restringir a transcrição de inibidores de inflamação. Em nosso estudo a NELF diminuiu em abundância em 2 vezes no grupo da gengivite, o efeito dessa diminuição pode estar promovendo um maior aspecto inflamatório na região bucal, provavelmente mediado por IL-10.

7.1.3 Proteína 5 contendo domínio de ligação de nucleossomo

A proteína 5 contendo domínio de ligação de nucleossomo de grupo de alta mobilidade (HMGN5), identificada em nosso estudo, é pertencente a uma família de proteínas que se ligam aos nucleossomos para formação da cromatina (GONZALEZ-ROMERO *et al.*, 2015). No estudo de Li e colaboradores, uma proteína da mesma família, com domínio de ligação nucleossômica 2 do grupo de alta mobilidade (HMGN2), foi estudada e apresentou função contra bactérias Gram-negativas, como a *Escherichia coli*. Em nosso estudo a HMGN5 apresentou um aumento nos voluntários com gengivite. Devido as proteínas serem da mesma família, talvez

possam possuir funções similares, indicando que HMGN5 possa estar sendo induzida em resposta ao aumento na concentração de bactérias devido ao biofilme dentário característico da gengivite (ARMITAGE, 2004; KIM *et al.*, 2013).

7.1.4 Cistatina

As cistatinas fazem parte de uma grande família de proteínas que são produzidas principalmente pela glândula sublingual e possuem efeitos antimicrobianos e antivirais (PUNK *et al.*, 2016). Aqui, a cistatina S diminuiu 1,6 vezes no grupo com gengivite. Por outro lado, as cistatinas D e SA aumentaram 1,6 vezes no grupo caso, enquanto a cistatina SN não apresentou diferença significativa. Estudos anteriores não foram claros quanto à variação dos níveis de cistatina na saliva em casos de doenças periodontais. No entanto, independentemente dos níveis de cistatinas estarem aumentados, causando uma melhora na resistência aos danos presentes na gengivite e na periodontite, ou diminuídos, tornando a ação das doenças mais nociva, essas proteínas desempenham um papel importante no diagnóstico e prognóstico das doenças periodontais (GONÇALVES *et al.*, 2010; ZEMOURI *et al.*, 2019).

7.1.5 Amilase

A alfa amilase desempenha um papel na manutenção da imunidade oral, atuando contra a adesão e proliferação bacteriana. Neste estudo, foi observado aumento da alfa amilase 1 no grupo gengivite. Segundo Saberi e colaboradores em 2020, a alfa amilase tem um papel protetor, aumentando em resposta à infecção. Outro estudo também relatou que um nível diminuído de alfa amilase foi positivamente correlacionado com diminuições na profundidade da bolsa periodontal (SANCHES *et al.*, 2013). Assim, quantidades elevadas de alfa-amilase na saliva podem ser indicativas da presença de doenças periodontais.

7.1.6 Lactotransferrina

A lactotransferrina é uma glicoproteína globular que é liberada em resposta à infecção bacteriana e está fortemente associada à doença periodontal. Devido à sua atividade antibacteriana, uma diminuição da lactotransferrina pode promover o crescimento bacteriano (RAMENZONI *et al.*, 2021a; RAMENZONI *et al.*, 2021b). Aqui, os níveis de lactotransferrina exibiram um aumento de 1,6 vezes no grupo caso, provavelmente representando uma resposta à maior formação de placa bacteriana na gengivite.

7.2 - Proteínas bacterianas secretadas diferencialmente na saliva em resposta a gengivite

Para a identificação das proteínas bacterianas, foram utilizados os bancos de dados dos seguintes filos bacterianos: *Actinobacteria*; *Bacteroidetes*; *Chlamydia*; *Chloroflexi*; *Firmicutes*; *Fusobacteria*; *Spirochaetes* e *Sinergistetes*. O filo *Fusobacteria* gerou maior quantidade de proteínas identificadas (n=29), seguido da *Chlamydia* (n=18) e *Spirochaetes* (n=13), sendo o filo *Sinergistetes* o menos abundante em nosso trabalho. Identificamos proteínas de diversas ordens bacterianas, dentre elas algumas estão relacionadas a doenças periodontais: *Bacteroidales*; *Flavobacteriales*; *Bacillales*; *Clostridiales*; *Fusobacteriales* e *Spirochaetales* (CHEN *et al.*, 2018).

Das 115 proteínas bacterianas identificadas 40 não apresentaram mudanças significativas. As demais mostraram alteração na abundância, sendo 50 proteínas aumentadas e 46 diminuídas na condição de gengivite. Dessa forma mais de 70% das proteínas bacterianas sofreram algum tipo de modulação, mostrando que a gengivite pode influenciar não só na mudança da microbiota oral, mas também na expressão bacteriana, o que também pode ser usado como indicador para avaliar a saúde bucal ou o desenvolvimento de doenças periodontais.

Algumas das proteínas aqui identificadas pertencem a bactérias previamente relatadas como envolvidas em doenças periodontais. Socransky (2005) mostrou que alguns complexos bacterianos são responsáveis, inclusive, pelo desenvolvimento da doença, bem como pela proteção contra ela. Em nossos dados, uma proteína do complexo vermelho *Porphyromonas gingivalis* (6_7-dimetil-8-ribityllumazine sintase) foi identificada, e 39 eram do *Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum*, que é do

complexo laranja. Os complexos vermelho e laranja estão intimamente associados à ocorrência de doenças periodontais (HAFFAJEE *et al.*, 1998).

7.2.1 Proteínas de *Actinobacteria*

A maior parte das proteínas de actinobactérias que foram identificadas são de membros da ordem *Corynebacteriales*, mais especificamente de micobactérias. Duas proteínas deste grupo foram significativamente aumentadas na saliva de indivíduos com gengivite, a proteína de membrana não caracterizada ML0467 e a nucleosídeo trifosfato pirofosfatase, o que pode indicar um aumento de espécies deste grupo na gengivite. No entanto, as identificações com base em dados de espectrometria de massas não permitem que conclusões mais profundas em termos de espécie, ou mesmo gênero, sejam fidedignas, devido à baixa cobertura de peptídeos sequenciados, ambiguidade das identificações principalmente em regiões homólogas das proteínas e possibilidade de ausência de dados proteicos no banco utilizado.

7.2.2 N-acetilmurâmico 6-fosfato de *Bacterioidetes*

O N-acetilmurâmico 6-fosfato eterase ou MurQ é uma enzima que recicla a camada de peptidoglicano bacteriana, convertendo o MurNAc 6-fosfato em GlcNAc 6-fosfato e ácido láctico (BORISOVA *et al.*, 2017). O PGN é frequentemente recuperado e reciclado pela bactéria. Essa reciclagem acontece por duas vias, sendo uma delas realizada pela N-acetilmurâmico 6-fosfato eterase (JIANG *et al.*, 2006). Em nosso estudo a MurQ de *Bacterioidetes* apresentou um aumento no grupo dos doentes, esse aumento pode indicar uma maior reciclagem e consequente estabilidade da parede bacteriana, além de um aumento na multiplicação celular.

7.2.3 Proteínas de *Chlamydiae*

A proteína TC_0109 UPF0098 é uma proteína ainda não caracterizada, porém revisada, encontrada em nosso estudo na ordem *Chlamydiales* com um aumento de mais de 11 vezes, despertando interesse para estudos futuros quanto a sua função.

De fato, dentro do filo *Chlamydiae*, todas as identificações foram relativas a proteínas de *Chlamydiales*, com exceção de duas da ordem *Parachlamydiales*.

A proteína carreadora de acila (ACP) de *Protochlamydia amoebophila* (*Parachlamydiales*), identificada com um aumento na expressão de quase 50% no grupo gengivite, é uma proteína de transporte altamente conservada. Está presente em mamíferos, fungos e bactérias. A ACP é uma proteína monomérica, sendo necessária para a produção de diversos produtos, como endotoxinas, além de lactonas de homosserina aciladas as quais estão envolvidas no *quorum sensing*. Esses processos tornam a ACP uma proteína essencial para a patogênese e colonização bacteriana (BYERS & GONG, 2007; HUANG *et al.*, 2017).

7.2.4 Proteínas de *Fusobacteria*

A proteína GrpE, detectada como aumentada em *Fusobacteria* na condição gengivite, atua na resposta ao choque térmico e ao choque osmótico. GrpE é considerada uma proteína constitutiva, evitando que proteínas desnaturadas pelo estresse consigam se agregar (HARRISON, 2003; BRACHER & VERGHESE., 2015). O aumento da GrpE na gengivite pode ser uma resposta bacteriana as condições adversas encontradas na região bucal em estado inflamatório anormal que pode prejudicar a sobrevivência bacteriana.

A endonuclease Cas1 associada a CRISPR também apresentou um aumento no grupo da gengivite, o que pode permitir que a bactéria resista de forma mais apropriada a uma infecção viral. O sistema CRISPR-Cas é um mecanismo da imunidade bacteriana adaptativa. O CRISPR-Cas atua integrando as sequências de vírus no *locus* CRISPR da célula, conseguindo com que a bactéria possa reconhecer e eliminar as infecções com mais eficácia (RATH *et al.*, 2015; CHEN & OLSEN *et al.*, 2019). Chen e Olsen, em 2019, sugerem que o CRISPR-Cas pode desempenhar um papel imunológico na modulação bacteriana na periodontite. Segundo o estudo, *P. gingivalis* (filó *Bacteroidetes*), uma bactéria fundamental para a disbiose bucal, pode usar esse mecanismo para se proteger de possíveis infecções virais, principalmente dentro das bolsas periodontais, onde a presença de vírus é maior. Em nosso estudo o aumento desta proteína em *Fusobacteriales* pode estar sinalizando que as bactérias

ativam este mecanismo de imunidade em resposta às condições adversas durante a o processo de gengivite.

Ainda no filo *Fusobacteria*, a subunidade PdxS da piridoxal 5'-fosfato sintase apresentou um aumento significativo nos voluntários com gengivite. Ela catalisa a formação do piridoxal 5'-fosfato (PLP), estando relacionada com as funções exercidas pela PLP, como a resistência ao estresse e a virulência (XIE *et al.*, 2017). PLP é a forma ativada da vitamina B6, sendo necessária para o funcionamento de mais de 160 enzimas. A vitamina B6 é importante para viabilidade dos organismos vivos, sendo absorvido por animais, porém as plantas, fungos e bactérias conseguem sintetizar a PLP. PLP também foi observado como sendo importante para a tolerância ao estresse, além do aspecto da virulência bacteriana como visto na *A. pleuropneumoniae* (XIE *et al.*, 2017). O aumento de PdxS em condições bucais de gengivite pode indicar a indução nas bactérias bucais de um mecanismo de proteção ou da virulência durante o desenvolvimento desta doença periodontal.

Outra proteína de *Fusobacteriales* identificada foi a MntP, uma bomba de efluxo de manganês. O manganês é um nutriente de suma importância, sendo cofator de enzimas, além de fornecer proteção contra espécies reativas de oxigênio (ROS). Muitas bactérias necessitam do manganês para realizar interações de simbiose e de patogenia em células eucarióticas. (ZEINERT *et al.*, 2018). No estudo de Waters e colaboradores 2011, foi observado que a deleção da MntP leva a um aumento da sensibilidade ao manganês e um aumento do manganês intracelular. Zeinet e colaboradores 2018, observaram que a MntP consegue alterar a resistência celular as ROS, aumentando a resistência bacteriana contra um ambiente mais severo. O manganês possui a capacidade de desintoxicar RPS, através da estimulação de enzimas antioxidantes como catalases e peroxidases (WATERS *et al.*, 2011). A diminuição da MntP observada em resposta a gengivite pode levar a um aumento do manganês intracelular, elevando na resistência aos ROS, tornando as bactérias mais resistentes ao ambiente desfavorável.

A proteína de ligação ao DNA de fita simples da *Fusobacteria* foi detectada quase duas vezes maior no grupo de gengivite. A proteína pode estar ligada a um provável aumento na abundância de *Fusobactérias* na patologia da gengivite. Este filo

faz parte do complexo laranja, que, juntamente com o complexo vermelho, causa doenças periodontais.

Capítulo 2 – Segundo grupo de estudo

8 - RESULTADOS

8.1 – Dados demográficos

Após o estudo piloto iniciado durante minha Dissertação de mestrado, buscamos recrutar mais voluntários. Tínhamos o objetivo de realizar novas análises para duas novas doenças fortemente relacionadas a obesidade, DMT2 e SM, para compreender como o ganho de peso corporal influenciaria no desenvolvimento destas patologias.

Nesta segunda fase do projeto, portanto, realizamos a avaliação de dados antropométricos, clínicos e a coleta de amostras de saliva e sangue de 103 voluntários, os quais foram divididos segundo o seu IMC em peso normal (n=29 indivíduos), sobrepeso (n=25) e obeso (n=15). Além disso, alguns já apresentavam diagnóstico prévio de DMT2 (11 indivíduos) e 23 indivíduos foram posteriormente determinados com SM, após os resultados de exame de sangue, com base nos fatores de risco determinados pela NCEP/ATPIII. O grupo SM não possui nenhum voluntário com DMT2 diagnosticada, tendo 8 voluntários com sobrepeso e 15 com obesidade

(Figura 2). O grupo da DMT2, possui 5 voluntários obesos, 5 com sobrepeso e 1 com peso normal.

As características demográficas da segunda população estudada também foram levantadas, incluindo idade, sexo e raça, sendo a variável idade e escolaridade as únicas com diferença significativa entre os grupos (Tabela 6). Todas as avaliações seguiram as categorias de acordo com o IMC e presença das doenças.

Figura 2. Distribuição dos voluntários da segunda população estudada, de acordo com o IMC e presença de DMT2 e SM.

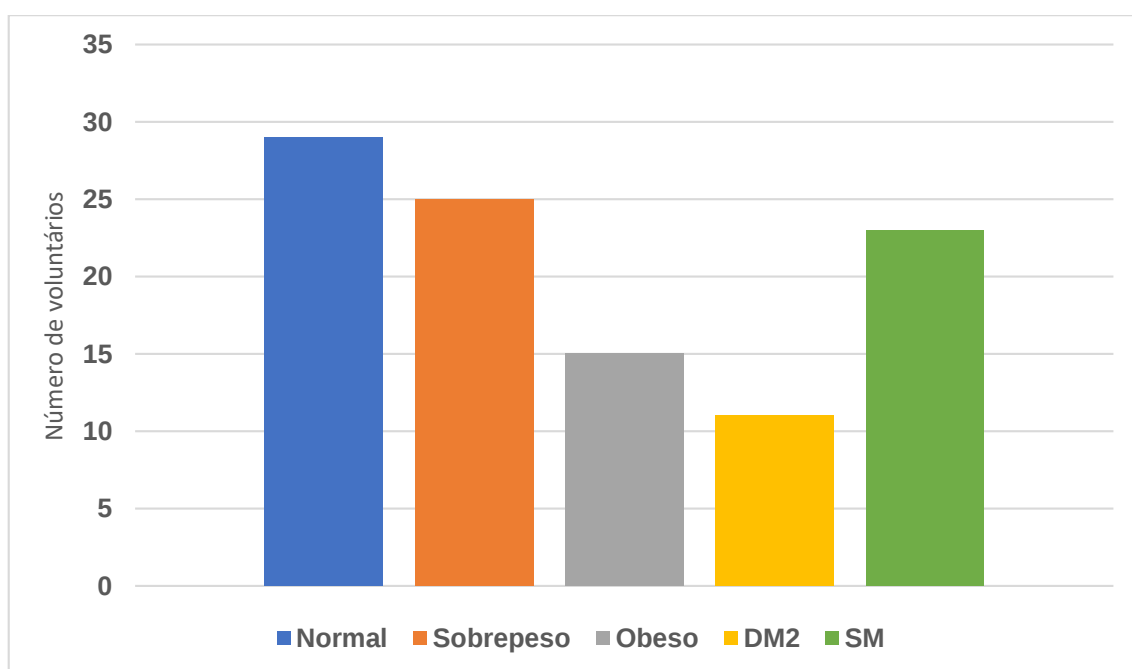


Tabela 6. Dados demográficos dos 103 voluntários estudados.

Variáveis		Peso normal (N=29)	Sobrepeso (N=25)	Obeso (N=15)	DMT2 (N=11)	SM (N=23)	Valor de p
Idade Média ($\pm dp$)		35,5 $\pm$ 13,2	35,8 $\pm$ 16,8	37,3 $\pm$ 13,7	61,4 $\pm$ 15,6	44 $\pm$ 16,4	0,001 [†]
Sexo	Masculino	8	10	7	2	9	NS*
	Feminino	21	15	8	9	14	NS*
Raça (%)							
Branca		13	4	3	5	6	NS*
Preta		3	4	5	3	9	NS*

Pardo	13	16	7	3	8	NS*
Escolaridade (%)						
Fundamental	1	1	2	5	5	0,001*
Médio	8	14	7	4	14	0,001*
Superior	20	10	6	2	4	0,001*
†Anova; *Teste Qui-quadrado. NS: Valores estatisticamente não significantes						

8.2.1 - Dados antropométricos do segundo grupo amostral

Os dados de IMC, altura, peso, circunferência de cintura, circunferência de quadril e relação cintura-quadril dos novos voluntários foram verificados e relacionados para as cinco categorias estudo (Tabela 7). As variáveis analisadas são importantes não só para qualificar nossos voluntários segundo o IMC, mas também avaliar o impacto desses parâmetros no desenvolvimento da DMT2 e SM. Todos as variáveis, com exceção da altura, apresentaram diferenças significativas entre as categorias de IMC e presença de DMT2 e SM, após teste estatístico ANOVA. Como foram analisados mais de 2 grupos, foi utilizado a correção de Bonferroni (Apêndice 3). Com isso, observamos um aumento gradual dos valores de IMC, peso, circunferência de cintura e quadril e RCQ, do grupo de peso normal até obesos, sendo que os valores encontrados para indivíduos com SM e DMT2 são um pouco maiores ou muito próximos aos valores do grupo de obesos. A análise Bonferroni nos mostrou que em relação a idade, os grupos SM e DMT2 apresentaram diferença significativa com os grupos peso normal (PN), sobrepeso e obeso, e os 3 últimos grupos não apresentaram diferenças significativas entre si. Em relação a massa, o grupo DMT2 apresentou diferença significativa em relação ao PN e obeso, já o grupo SM apresentou diferença significativa somente com o PN e sobrepeso, além disso ocorreu um aumento significativo entre todos dos grupos do IMC. Na CC, CQ e RCQ não ocorreu diferença significativa entre os grupos SM, DMT2 e obeso.

Tabela 7. Dados antropométricos do segundo grupo amostral (n=103)

Parâmetros	Peso normal (N=29)	Sobrepeso (N=25)	Obeso (N=15)	DMT2 (N=11)	SM (N=23)	Valor de p*
IMC (Kg/m ²)	21,9	27,4	32,9	30,6	31,5	0,001

	± 1,7	± 1,5	± 4,2	± 4,2	± 4,7	
Altura (m)	1,64 ± 0,07	1,66 ± 0,09	1,67 ± 0,1	1,57 ± 0,1	1,65 ± 0,1	NS
Peso (Kg)	58,8 ± 6,9	75,3 ± 9,6	92,2 ± 15,2	76,7 ± 17,2	86,4 ± 18,5	0,001
CC (cm)	74,5 ± 7,2	87,7 ± 8,3	98,8 ± 8,01	100,4 ± 8,8	100,6 ± 12	0,001
CQ (cm)	94,7 ± 5,6	104,2 ± 4,4	115,1 ± 12,4	108,9 ± 9,6	110,9 ± 7,3	0,001
RCQ	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,03	0,9 ± ,08	0,001
*Valor de p quando $\leq 0,05$ em teste Anova; NS: Diferença estatística não significativa; CC: circunferência de cintura; CQ: circunferência de quadril; RCQ: relação cintura-quadril.						

8.3 - Dados clínicos do segundo grupo amostral

Realizamos testes sanguíneos e aferição da pressão arterial em todos os novos voluntários, com o objetivo de verificar a condição clínica dos voluntários e para determinar quais indivíduos apresentavam SM, tendo três de seus fatores avaliados pelo teste sanguíneo e um pela aferição da pressão arterial. Além disso, foi possível confirmar a presença de DMT2 em alguns voluntários, a qual foi avaliada pela glicemia, uma vez que nossos voluntários diabéticos já possuíam o diagnóstico da doença. Todos os parâmetros analisados no estudo apresentaram diferenças significativas, com exceção da creatina, ureia, LDL e colesterol. Os valores de pressão sistólica e diastólica também foram significativamente distintos entre os grupos (Tabela 8).

A análise de Bonferroni (Apêndice 2), nos mostrou que a pressão arterial sistólica e diastólica não apresentaram diferença significativa entre os grupos SM, DMT2 e obeso, não havendo diferença da pressão entre esses grupos. Na glicemia, não houve alteração dentro dos grupos do IMC, Peso normal, sobrepeso e obeso, e também do grupo SM em relação ao IMC e como já era esperado o nível de glicemia da DMT2 é significativamente diferente em relação a todos os grupos. Na insulina a SM apresentou diferença significativa com todos os grupos, com exceção da DMT2 e a ela não apresentou diferença significativa com nenhum dos grupos. No HOMA- β a SM só mostrou significância entre os grupos PNS e DMT2, já o grupo DMT2 apresentou diferença significativa somente com a SM, não havendo diferença

significativa entre os grupos do IMC. No HOMA-IR não ocorreu diferença dentro dos grupos do IMC, já a SM e DMT2 apresentaram diferença significativa com todos os grupos do IMC, porém não apresentaram diferença significativa entre si. Nos dados do triglicerídeo a DMT2 apresentou diferença significativa com todos os grupos, com exceção da Síndrome Metabólica, a SM apresentou diferença significativa com o PN e o sobrepeso, os grupos do IMC não apresentaram diferenças significantes entre si. No HDL só foi observado diferenças significativas entre a SM e DMT2 com o PN, não ocorrendo diferença dentro do grupo do IMC.

Tabela 8. Dados clínicos do segundo grupo amostral categorizado de acordo com IMC e doenças (n=103)

Parâmetros	Peso normal (N=29)	Sobrepeso (N=25)	Obeso (N=15)	DMT2 (N=11)	SM (N=23)	Valor de p^*
Glicemia	90±7,8	89±6	90±10	167±72	96±7,2	0,001
Insulina	7±3	10±5	10±6	12±3	18±8	0,001
HOMA-β	104±61	141±71	147±73	62±39	211±137	0,001
HOMA-IR	1±0,8	2±1	2±1	4±1	4±2	0,001
Creatina	0,8±1,5	0,9±0,1	0,8±0,1	0,8±0,1	0,8±0,1	NS
Ureia	24±6	23±5	23±6	27±7	28±6	NS
Colesterol	193±43	186±44	193±35	203±74	217±41	NS
Triglicerídeo	89±39	92±55	96±53	190±13 1	154±78	0,001
HDL	65±13	58±14	54±10	44±11	50±14	0,001
VLDL	18±8	18±11	19±10	38±26	31±15	0,001
LDL	109±38	110±40	120±32	120±58	135±37	NS
CT/HDL	3±0,7	3±1	4±1	5±4	4,5±1	0,001
VLDL/HDL	0,3±0,1	0,3±0,2	0,3±0,2	1,1±1,2	0,6±0,4	0,001
LDL/HDL	1,7±0,6	2±0,8	2,3±0,8	3,1±3	2,8±1,2	0,005
PS	112±9	118±14	125±13	139±13	129±16	0,001
PD	72±6	75±8	81±7	81,3±8	83±6	0,001

*Valor de p quando $\leq 0,05$ em teste ANOVA; NS: Diferença estatística não significativa; HDL (*High Density Lipoproteins*); VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*); LDL (*Low Density Lipoproteins*); CT (Colesterol Total); HOMA-IR (*Homeostases Model Assessment-Insulin Resistance*); HOMA- β (*Homeostases Model Assessment- β*); PS: Pressão arterial sistólica; PD: Pressão arterial diastólica.

8.4 Análise comparativa dos grupos Controle x SM e Controle x DMT2

Como forma de verificar a relação da Síndrome Metabólica e da DMT2 nas condições clínicas, antropométricas, sem a influência do ganho de massa corporal, realizamos uma comparação unindo os voluntários dos grupos Normal, Sobrepeso e Obeso dentro de um grupo Controle, contra o grupo SM (Tabela 9) ou DMT2 (Tabela 10). Verificamos que 15 variáveis apresentavam diferenças significativas entre os grupos de estudo quando SM foi a doença caso, sendo os valores de RCQ, pressão sistólica, creatinina, ureia e HDL estatisticamente similares. As variáveis glicemia, insulina, HOMA-IR, HOMA- β e pressão diastólica apresentaram diferença significativa para ambas as comparações e pressão sistólica apresentou diferença significativa somente na comparação ControlexDMT2, enquanto o HDL não apresentou diferença significativa nas duas comparações. Na análise comparativa entre grupos Controle x DMT2, 13 parâmetros foram estatisticamente diferentes, sendo exceção a massa corporal e os valores de creatinina, ureia, Colesterol total, HDL, LDL e LDL/HDL.

Tabela 9. Dados clínicos e antropométricos do grupo Controle e SM (n=92)

Parâmetros	Controle	SM	Valor de p
Massa	72,1 $\pm$ 16,4	86,4 $\pm$ 18,5	0,001 ^{&}
Cintura	84,5 $\pm$ 12,2	100,6 $\pm$ 12,1	<0,001 ^{&}
Quadril	102,6 $\pm$ 10,6	110,9 $\pm$ 7,2	<0,001 ^{&}
RCQ	0,8 $\pm$ 0,08	0,9 $\pm$ 0,08	NS*
PS	75,1 $\pm$ 8,2	83 $\pm$ 6,4	NS*
PD	117,4 $\pm$ 12,7	129,5 $\pm$ 5,9	<0,001 ^{&}
Creatina	0,8 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	NS*
Ureia	23,9 $\pm$ 5,7	28,1 $\pm$ 6,6	NS*
Glicemia	89,9 $\pm$ 7,8	96,3 $\pm$ 7,2	0,002 ^{&}
Insulina	9,1 $\pm$ 5,1	18,1 $\pm$ 8,8	<0,001 ^{&}
HOMA-B	126,9 $\pm$ 69,7	211,4 $\pm$ 137,1	0,001 ^{&}
HOMA-IR	2,1 $\pm$ 1,2	4,2 $\pm$ 1,9	<0,001 ^{&}
HDL	60,5 $\pm$ 13,7	50,9 $\pm$ 14,1	NS*
CT	190,8 $\pm$ 41,8	217,2 $\pm$ 41,2	0,004 ^{&}
Triglicerídeos	91,7 $\pm$ 48,1	154,5 $\pm$ 78,3	<0,001 ^{&}
VLDL	18,3 $\pm$ 9,6	30,9 $\pm$ 15,6	<0,001 ^{&}
LDL	111,9 $\pm$ 37,6	135,4 $\pm$ 36,8	0,005 ^{&}
CT/HDL	3,3 $\pm$ 0,9	4,5 $\pm$ 1,5	<0,001 ^{&}
VLDL/HDL	0,3 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,4	<0,001 ^{&}
LDL/HDL	1,9 $\pm$ 0,8	2,8 $\pm$ 1,2	<0,001 ^{&}

*Valor de p quando em Teste T; [&]Valor de p em Teste Anova; NS: Diferença estatística não significativa; HDL (*High Density Lipoproteins*); VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*); LDL (*Low Density Lipoproteins*); CT (*Colesterol Total*); HOMA-IR

(*Homeostases Model Assessment-Insulin Resistance*); HOMA- β (*Homeostases Model Assessment- β*); PS: Pressão arterial sistólica; PD: Pressão arterial diastólica.

Tabela 10. Dados clínicos e antropométricos do grupo Controle e DMT2 (n=80)

Parâmetros	Controle	DMT2	Valor de P
Massa	72,1±16,4	76,7±17,2	NS ^{&}
Cintura	84,5±12,3	100,4±8,8	<0,001 ^{&}
Quadril	102,6±10,6	108,9±9,6	0,028 ^{&}
RCQ	0,8±0,08	0,9±0,03	0,004 [*]
Creatina	0,8±0,1	0,8±0,1	NS [*]
Ureia	23,9±5,7	27,7±7,1	NS [*]
PS	117,4±12,7	137,9±13,6	<0,001 ^{&}
PD	75,1±8,2	81,2±8,5	0,025 ^{&}
Glicemia	89,9±7,8	167,4±72,1	<0,001 ^{&}
Insulina	9,1±5,1	12,4±3,7	0,011 ^{&}
HOMA-B	126,9±69,7	62,4±39,6	0,003 ^{&}
HOMA IR	2,1±1,2	4,8±1,5	<0,001 ^{&}
CT	190,8±41,9	203,1±74,6	NS ^{&}
Triglicerídeos	91,7±48,1	190,3±131,1	<0,001 ^{&}
HDL	60,5±13,7	44,9±11,2	NS [*]
VLDL	18,3±9,6	38,1±26,2	<0,001 ^{&}
LDL	111,9±37,6	120,1±58,7	NS ^{&}
CT/HDL	3,3±0,9	5,1±4,1	0,005 ^{&}
VLDL/HDL	0,3±0,2	1,1±1,2	<0,001 ^{&}
LDL/HDL	1,9±0,8	3,1±2,9	NS ^{&}

*Valor de p quando em Teste T; & Valor de p em Menn-Witney; NS: Diferença estatística não significativa; HDL (*High Density Lipoproteins*); VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*); LDL (*Low Density Lipoproteins*); CT (*Colesterol Total*); HOMA-IR (*Homeostases Model Assessment-Insulin Resistance*); HOMA- β (*Homeostases Model Assessment- β*); PS: Pressão arterial sistólica; PD: Pressão arterial diastólica.

8.5 Análise comparativa dos grupos obeso, DMT2 e SM

Além de realizarmos a análise conjunta dos grupos 5 grupos separados, Controle x SM e Controle x DMT2, também foi realizada a comparação entre o grupo

SMxDMT2, ObesoxSM e ObesoxDMT2, com a finalidade de analisar mudanças clínicas e metabólicas influenciadas pelo desenvolvimento das doenças, sem relação com o ganho de massa corporal. Nessa comparação foram analisados somente as seguintes variáveis: massa; cintura; quadril; RCQ; PA sistólica; PA diastólica; glicemia; insulina; HOMA-β; HOMA-IR; creatina; ureia; colesterol total; triglicerídeos; HDL; VLDL; LDL; CTHDL; VLDLHDL e LDLHDL, variáveis impactadas pelo aumento da massa corporal, SM e pela DMT2 (Ostrowska *et al.*, 2020).

Quando realizamos a comparação entre o grupo DMT2 e SM, somente 3 das 20 variáveis apresentaram diferença significativa entre os grupos. Somente RCQ, HOMA-β e glicemia apresentaram diferença significativa (Tabela 11).

Ao realizarmos a comparação entre o grupo Obeso e DMT2 observamos que somente as variáveis glicemia, HOMA-β, triglicerídeos, HDL, VLDL e VLDLHDL apresentaram diferença significativas (Tabela 12). Quando obesos foram comparados com indivíduos com SM, foram 7 das variáveis analisadas que apresentaram diferenças significativas, glicemia, insulina, HOMAIR, triglicerídeos, VLDL, CT/HDL, VLDL/HDL (Tabela 13).

Tabela 11. Dados clínicos e antropométricos do grupo SM e DMT2 (n=34)

Parâmetros	SM	DMT2	Valor de p
Massa	86,4 ± 18,5	76,7 ± 17,2	NS ^{&}
Cintura	100,6 ± 12	100,4 ± 8,8	NS*
Quadril	110,9 ± 7,2	108,9 ± 9,6	NS*
RCQ	0,9 ± 0,8	0,9 ± 0,38	0,005*
PD	83 ± 6,4	81,2 ± 8,5	NS*
PS	129,5 ± 15,9	137,9 ± 13,6	NS ^{&}
CT	217,2 ± 41,2	203,1 ± 74,6	NS*
HDL	50,9 ± 14,03	44,9 ± 11,2	NS*
LDL	135,3 ± 36,8	120,1 ± 58	NS*
HOMA-β	211,4 ± 137,01	62,4 ± 39,6	<0,001 ^{&}
HOMAIR	4,2 ± 1,9	4,7 ± 1,4	NS ^{&}
Glicemia	96,3 ± 7,2	167,4 ± 72,06	<0,001 ^{&}
Insulina	18,03 ± 8,8	12,3 ± 3,6	NS ^{&}
Creatina	0,9 ± 0,10	0,8 ± 0,12	NS*
Ureia	28,04 ± 6,6	27,7 ± 7,04	NS ^{&}
Triglicerídeos	154,5 ± 78,3	190,3 ± 131,1	NS ^{&}
VLDL	30,9 ± 15,6	38,07 ± 26,2	NS ^{&}

CT/HDL	4,54 ± 1,5	5,1 ± 4,1	NS ^{&}
VLDL/HDL	0,6 ± 0,4	1,06 ± 1,27	NS ^{&}
LDL/HDL	2,8 ± 1,1	3,1 ± 2,9	NS ^{&}

*Teste T; &: Menn-Witney; NS: Diferença estatística não significativa; HDL (High Density Lipoproteins); VLDL (Very Low Density Lipoproteins); LDL (Low Density Lipoproteins); CT (Colesterol Total); Homeostases Model Assessment-Insulin Resistance (HOMA-IR); Homeostases Model Assessment- β (HOMA- β) PS (Pressão arterial sistólica); PD: Pressão arterial diastólica.

Tabela 12. Dados clínicos e antropométricos do grupo Obeso e DMT2 (n=26)

Parâmetros	Obeso	DMT2	Valor de p
Massa	92,2 ± 15,2	76,7 ± 17,2	NS*
Cintura	98,8 ± 8,1	100,4 ± 8,8	NS*
Quadril	115,1 ± 12,4	108,9 ± 9,7	NS ^{&}
RCQ	0,8 ± 0,09	0,9 ± 0,03	NS*
Os	125,1 ± 13,1	137,9 ± 13,6	NS*
PD	81,6 ± 7,5	81,2 ± 8,5	NS*
Glicemia	90,6 ± 10,1	167,4 ± 72,1	<0,001 ^{&}
Insulina	10,8 ± 6,4	12,3 ± 3,7	NS*
HOMA- β	147,2 ± 73,4	62,4 ± 39,6	0,05*
HOMAIR	2,4 ± 1,7	4,7 ± 1,4	NS*
Creatinina	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	NS*
Ureia	23,6 ± 6,1	27,7 ± 7,1	NS*
CT	193,6 ± 35,6	203,1 ± 74,6	NS ^{&}
Triglicerídeos	96,2 ± 53,6	190,3 ± 131,1	0,03 ^{&}
HDL	54,2 ± 10,3	44,9 ± 11,2	0,038*
VLDL	19,2 ± 10,7	38,1 ± 26,2	0,03 ^{&}
LDL	120,1 ± 31,9	120,1 ± 58,7	NS ^{&}
CT/HDL	3,7 ± 1,1	5,1 ± 4,1	NS ^{&}
VLDL/HDL	0,3 ± 0,2	1,1 ± 1,2	0,01 ^{&}
LDL/HDL	2,3 ± 0,8	3,1 ± 2,9	NS ^{&}

*Teste T; &: Menn-Witney; NS: Diferença estatística não significativa; HDL (High Density Lipoproteins); VLDL (Very Low Density Lipoproteins); LDL (Low Density Lipoproteins); CT (Colesterol Total); Homeostases Model Assessment-Insulin Resistance (HOMA-IR); Homeostases Model Assessment- β (HOMA- β) PS (Pressão arterial sistólica); PD: Pressão arterial diastólica.

Tabela 13. Dados clínicos e antropométricos do grupo Obeso e SM (n=38)

Parâmetros	Obeso	SM	Valor de p
Cintura	98,8 ± 8,0	100,6 ± 12,02	NS*
RCQ	0,9 ± 0,09	0,9 ± 0,08	NS*

Massa	92,8 ± 15,3	86,5 ± 18,5	NS ^{&}
Quadril	115,1 ± 12,5	111,0 ± 7,3	NS ^{&}
OS	125,1 ± 13,1	129,6 ± 15,9	NS ^{&}
PD	81,6 ± 7,5	83,0 ± 6,4	NS [*]
Glicemia	90,6 ± 10,1	96,3 ± 7,3	0,012 ^{&}
Insulina	10,9 ± 6,5	18,0 ± 8,8	0,004 ^{&}
HOMAB	147,2 ± 73,5	211,4 ± 137,1	NS ^{&}
HOMAIR	2,5 ± 1,7	4,2 ± 1,9	0,001 ^{&}
Creatinina	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	NS ^{&}
Ureia	23,7 ± 6,1	28,0 ± 6,6	NS [*]
CT	193,6 ± 35,6	217,2 ± 41,3	NS [*]
Triglicerídeos	96,2 ± 53,6	154,6 ± 78,3	0,005 ^{&}
HDL	54,2 ± 10,3	50,9 ± 14,1	NS [*]
VLDL	19,2 ± 10,7	30,9 ± 15,7	0,005 ^{&}
LDL	120,2 ± 31,9	135,4 ± 36,9	NS [*]
CT/HDL	3,7 ± 1,0	4,5 ± 1,5	0,038 ^{&}
VLDL/HDL	0,4 ± 0,2	0,7 ± 0,4	0,007 ^{&}
LDL/HDL	2,3 ± 0,9	2,9 ± 1,2	NS ^{&}
*Teste T; &: Menn-Witney; NS: Diferença estatística não significante; HDL (High Density Lipoproteins); VLDL (Very Low Density Lipoproteins); LDL (Low Density Lipoproteins); CT (Colesterol Total); Homeostases Model Assessment-Insulin Resistance (HOMA-IR); Homeostases Model Assessment- β (HOMA- β) PS (Pressão arterial sistólica); PD: Pressão arterial diastólica.			

8.6- Identificação de proteínas plasmáticas

Em nosso estudo foram identificadas 203 polipeptídeos plasmáticas em todos os indivíduos estudados. Com estes dados, foram realizadas comparações Controle x DMT2 e Controle x SM, que não levaram em consideração o IMC dos voluntários no grupo controle, além das análises comparativas com os 5 grupos de estudo (Tabelas 14, 15 e 16). A análise de Controle X Caso e com os 5 grupos de estudo nos permitiu avaliar como o aumento do IMC pode impactar na alteração das proteínas e dessa forma analisar melhor os potenciais biomarcadores para a SM e DMT2.

Na tabela 14 das 203 proteínas, 112 apresentaram diferença significativas quando comparado os 5 grupos de estudo de forma separada. Na tabela 15, comparação Controle x SM, foram identificadas 91 proteínas significativamente diferentes entre os grupos. Na tabela 16, 82 das 203 proteínas apresentaram diferenças significativas quando comparamos o grupo Controle x DMT2.

Tabela 14. Proteínas plasmáticas identificadas nos 5 grupos de estudo (n=103).

Acesso	Descrição	Varição	Maior abundância	Menor abundância	Valor de p
Q86U70	Ligação de domínio LIM 1	2,1	Obeso	SM	<0,001
E9PD43	Fator de alongamento negativo E	1,8	Normal	DM	<0,001
P23381	Triptofano-tRNA ligase, citoplasmática	1,7	Normal	DM	<0,001
O75145	Liprin-alfa-3	2,3	Normal	SM	<0,001
Q9H5P4	Proteína 7 contendo domínio PDZ	4,3	sobrepeso	DM	<0,001
H0YAG5	28S proteína ribossomal S18c_mitocondrial	2,1	SM	Normal	<0,001
Q13428	Proteína de Melaço	1,2	SM	sobrepeso	<0,001
Q13029	Proteína de dedo de zinco de domínio PR 2	2,3	SM	sobrepeso	<0,001
Q9UM54	Miosina-VI não convencional	2,3	SM	Normal	<0,001
O14678	Transportador lisossômico de cobalamina ABCD4	8,8	Normal	DM	<0,001
P01871	Constante pesada de imunoglobulina mu	1,6	Normal	DM	<0,001
O75153	Homólogo de proteína de mitocôndria agrupada	6,2	sobrepeso	SM	<0,001
C9JNV9	Corepressor do receptor nuclear 2	1,9	SM	Normal	<0,001
P21675	Subunidade 1 do fator de iniciação da transcrição TFIID	1,9	SM	Normal	<0,001
Q6P179	Aminopeptidase 2 do retículo endoplasmático	2	SM	Normal	<0,001
Q10571	Ativador de transcrição MN1	2,2	sobrepeso	DM	<0,001
Q86YL7	Podoplanina	3,1	Normal	SM	<0,001
Q9H4A9	Dipeptidase 2	2,5	Normal	SM	<0,001
A0A0G2JSA8	Mucina-20	3,1	SM	sobrepeso	<0,001
Q9BPX7	UPF0415 proteína C7orf25	3,1	Normal	SM	<0,001
Q7Z3K3	Elemento transponível Pogo com domínio ZNF	2,3	Normal	SM	<0,001
Q5XG85	Proteína UPF0633 putativa MGC21881	1,3	Normal	SM	<0,001
Q8NDZ4	Domínio de proteína quinase divergente 2A	1,7	SM	Normal	<0,001
P02686	Proteína básica de mielina	2,1	sobrepeso	SM	<0,001
Q8IUR7	Proteína 8 contendo repetição de tatu	2	SM	Normal	<0,001
Q9NXF1	Proteína expressa no testículo 10	5,1	sobrepeso	SM	<0,001
Q9UPQ3	Arf-GAP com repetição GTPase_ANK e proteína 1 contendo domínio PH	1,9	DM	Normal	<0,001
P04004	Vitronectina	1,4	SM	Normal	<0,001
P01859	Imunoglobulina gama constante pesada 2	1,9	SM	sobrepeso	<0,001
P02042	Subunidade delta da hemoglobina	1,5	Obeso	DM	<0,001

P01860	Imunoglobulina gama constante pesada 3	1,8	SM	sobrepeso	<0,001
P02768	Albumina	1,8	Obeso	sobrepeso	<0,001
P02790	Hemopexina	2	SM	Normal	<0,001
Q9ULQ1	Proteína de canal de cálcio de dois poros 1	1,6	SM	Normal	<0,001
Q8IUR0	Subunidade 5 do complexo de partículas de proteína de tráfego	2	Normal	SM	<0,001
P12035	Queratina _ citoesqueleto tipo II 3	1,5	Normal	DM	<0,001
Q14671	Pumilio homólogo 1	2,9	Normal	SM	<0,001
G3V1N2	alfa-globina	1,8	Obeso	sobrepeso	<0,001
P69905	Subunidade alfa da hemoglobina	2,3	Obeso	DM	<0,001
O75879	Subunidade B_mitocondrial de glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase	2,3	Normal	SM	<0,001
Q9UH99	Proteína 2 contendo o domínio SUN	1,8	Normal	SM	<0,001
P69892	Subunidade da hemoglobina gama-2	1,4	Obeso	DM	<0,001
P01861	Imunoglobulina gama constante pesada 4	1,8	SM	sobrepeso	<0,001
Q99627	Subunidade 8 do complexo sinalossoma COP9	1,8	Normal	DM	<0,001
E7EVA0	Proteína associada a microtúbulos	1,5	DM	SM	<0,001
P27816	Proteína 4 associada a microtúbulos	1,5	DM	SM	<0,001
P02774	Gc-globulina	1,2	SM	DM	<0,001
Q96MU6	Proteína dedo de zinco 778	1,4	Obeso	sobrepeso	<0,001
P01023	Alfa-2-macroglobulina	1,2	DM	Normal	<0,001
Q5VVJ2	Deubiquitinase MYSM1	1,9	DM	Obeso	<0,001
H0YMF8	Transportador de amônio Rh tipo C	3,2	Normal	SM	0,001
P02671	Cadeia alfa do fibrinogênio	1,4	SM	Normal	0,001
P02656	Apolipoproteína C-III	1,3	SM	Normal	0,001
Q9NRD9	Dupla oxidase 1	1,3	SM	Normal	0,001
P42336	Fosfatidilinositol 4_5-bifosfato 3-quinase subunidade catalítica isoforma alfa	1,4	SM	sobrepeso	0,001
P29122	Proteína convertase subtilisina/kexina tipo 6	1,7	Obeso	SM	0,001
Q5T5J6	Proteína de transcrição SWT1	2,2	SM	Normal	0,001
Q9BY07	Cotransportador de bicarbonato de sódio eletrogênico 4	1,2	Normal	SM	0,001
O95834	Proteína tipo 2 associada a microtúbulos do equinodermo	1,4	Obeso	sobrepeso	0,001
A6NHC0	Calpaína-8	2,7	Normal	SM	0,001
Q86YE8	Proteína dedo de zinco 573	1,4	Normal	DM	0,002
P19652	Alfa-1-glicoproteína ácida 2	2	SM	Normal	0,002
Q15059	Proteína 3 contendo bromodomínio	2,1	Obeso	Normal	0,002
O75081	Proteína CBFA2T3	3	DM	SM	0,002
E5RJ23	Regulador da sinalização da proteína G 22	5,1	SM	Normal	0,002

F8VRS8	Subunidade 2 do complexo de transcrição CCR4-NOT	5,1	SM	Normal	0,002
P49796	Regulador da sinalização da proteína G 3	1,7	Normal	SM	0,002
C9JBD0	Proteína 1 contendo domínio KRAB	4	SM	Normal	0,002
P02647	Apolipoproteína A-I	1,8	SM	Normal	0,003
P11142	Proteína cognata de choque térmico de 71 kDa	1,3	Obeso	DM	0,003
Q9H8H0	Proteína Nucleolar 11	8,7	Obeso	Normal	0,003
Q8N7Z5	Proteína contendo domínio de repetição de anquirina 31	1,8	SM	DM	0,004
Q8TAG9	Componente complexo de exocisto 6	1,6	SM	Normal	0,004
Q8NBN3	Proteína transmembranar 87A	2,8	Obeso	sobrepeso	0,004
H0YEL3	Próton tipo V subunidade ATPase a	2,2	SM	Normal	0,004
P02787	sorotransferrina	1,1	SM	Normal	0,005
P01876	Imunoglobulina pesada constante alfa 1	1,5	DM	Normal	0,005
Q5JWS5	Proteína centrossomal 250kDa	4,2	SM	Normal	0,005
P52797	cDNA FLJ57652_ altamente semelhante ao Ephrin-A3	6,1	SM	Normal	0,005
Q6ZU64	Proteína associada a cílios e flagelos 65	6	SM	Normal	0,005
O00327	Proteína tipo translocadora nuclear do receptor de hidrocarboneto arílico 1	2,2	Obeso	SM	0,005
P53602	Difosfomevalonato descarboxilase	1,4	Obeso	SM	0,005
Q3V6T2	Girdin	2,1	sobrepeso	DM	0,005
P19827	Inter-alfa-tripsina inibidor de cadeia pesada H1	2,2	Normal	Obeso	0,005
P00450	ceruloplasmina	1,5	SM	Obeso	0,006
P01009	Alfa-1-antitripsina	1,5	SM	Normal	0,006
Q9UHV5	Rap guanina fator de troca de nucleotídeos tipo 1	1,5	sobrepeso	DM	0,007
E9PJ46	Proteína dedo de zinco 707	1,5	sobrepeso	DM	0,007
Q96QR1	Secretoglobina família 3A membro 1	1,3	Obeso	DM	0,007
P52741	Proteína dedo de zinco 134	1,5	DM	Normal	0,007
Q96N67	Dedicador da proteína citocinese 7	1,7	SM	sobrepeso	0,008
Q7RTU9	estereocilina	2,2	sobrepeso	SM	0,008
P21580	Proteína 3 induzida pelo fator de necrose tumoral alfa	2,3	SM	sobrepeso	0,008
Q969G3	Regulador dependente de actina associado à matriz relacionado a SWI/SNF da subfamília E da cromatina membro 1	1,5	Normal	SM	0,008
B1ALY4	Proteína 3 de ligação ao trato de polipirimidina	4,6	SM	Normal	0,009
D6RIF9	E3 ubiquitina-proteína transferase RMND5B	3,1	DM	Normal	0,009
P0DP25	calmodulina-3	1,5	sobrepeso	DM	0,009

P14324	Farnesil pirofosfato sintase	1,4	Obeso	Normal	0,011
Q8IVP9	Proteína dedo de zinco 547	3,1	Obeso	Normal	0,011
Q9NQ48	Proteína semelhante ao fator de transcrição de zíper de leucina 1	1,3	Obeso	sobrepeso	0,012
Q96NL3	Proteína dedo de zinco 599	1,4	Normal	DM	0,012
Q8IXQ3	Proteína não caracterizada C9orf40	3,6	sobrepeso	Obeso	0,015
P01834	Constante kappa de imunoglobulina	1,3	SM	Normal	0,016
P63272	Fator de alongamento de transcrição SPT4	2,1	Normal	SM	0,016
Q8N8X9	Proteína mab-21-like 3	2,5	DM	sobrepeso	0,017
Q96DI7	U5 ribonucleoproteína nuclear pequena proteína de 40 kDa	1,9	Obeso	SM	0,017
Q9NVE5	Ubiquitina carboxil-terminal hidrolase 40	1,9	sobrepeso	Obeso	0,017
P00738	Haptoglobina	1,4	DM	Normal	0,018
Q8N7X0	Androglobina	1,4	DM	sobrepeso	0,018
Q5D1E8	Endoribonuclease ZC3H12A	2,2	DM	Obeso	0,019
P01011	Alfa-1-antiquimotripsina	2,1	SM	Normal	0,020
J3QQJ7	Homólogo de proteína indutora de hidrocefalia	1,5	Obeso	sobrepeso	0,022
Q99490	Arf-GAP com repetição GTPase_ ANK e proteína 2 contendo domínio PH	1,3	SM	Obeso	0,022
A0A0U1R RG3	ácido graxo sintase	1,5	DM	Normal	0,023
Q96R27	Receptor olfativo 2M4	2	Obeso	sobrepeso	0,023
Q3T906	N-acetilglucosamina-1-fosfotransferase subunidades alfa/beta	1,7	Normal	DM	0,024
Q9NSN8	Gama-1-sintrofina	1,4	Obeso	DM	0,027
Q8NFA0	Ubiquitina carboxil-terminal hidrolase 32	1,3	sobrepeso	DM	0,027
E9PSF8	Fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinase tipo 1 alfa	2,0	Normal	SM	0,030
O95861	3'(2')_5'-bifosfato nucleotidase 1	1,2	sobrepeso	DM	0,030
P49810	Presenilina-2	1,2	sobrepeso	DM	0,030
H0YGV6	Proteína NLRC5	3	DM	SM	0,031
M0R1L0	Prolil hidroxilase EGLN2	1,4	sobrepeso	Obeso	0,032
Q9NQC7	Ubiquitina carboxil-terminal hidrolase CYLD	1,3	Obeso	SM	0,032
Q96EP0	E3 ubiquitina-proteína ligase RNF31	1,3	SM	sobrepeso	0,032
O75880	Proteína SCO1 homóloga_ mitocondrial	1,8	SM	DM	0,032
Q15643	Proteína 11 de interação com o receptor da tireoide	1,9	Normal	SM	0,033
M0R055	Proteína tipo ELAV 1	1,4	SM	DM	0,035
P49756	Proteína de ligação ao RNA 25	1,4	SM	DM	0,035
C9J5H7	Repetição de anquirina e proteína contendo domínio de dedo de zinco 1	1,4	sobrepeso	Normal	0,035
Q15773	Leucemia mielóide fator 2	2,4	SM	Normal	0,036

O60282	Isoforma 5C da cadeia pesada de cinesina	1,5	Normal	SM	0,038
P00797	renina	1,6	SM	DM	0,039
Q9UHQ4	Proteína associada ao receptor de células B 29	1,3	Normal	SM	0,040
P01877	Imunoglobulina pesada constante alfa 2	1,3	DM	Normal	0,041
P01024	Complemento C3	1,2	SM	sobrepeso	0,042
P28068	Antígeno de histocompatibilidade HLA classe II _ cadeia beta do DM	1,4	DM	sobrepeso	0,044
P0CG04	Imunoglobulina lambda constante 1	2,0	DM	Obeso	0,045
Q96M96	FYVE_ RhoGEF e proteína 4 contendo domínio PH	1,2	DM	SM	0,047
Q2MV58	Tectônica-1	2,6	Normal	DM	0,049
Q2KHM9	Proteína moonraker	NS	sobrepeso	SM	NS
P00739	Proteína relacionada à haptoglobina	NS	DM	SM	NS
H0Y5M8	Transportador de monocarboxilato 10	NS	DM	SM	NS
C9JWU5	Proteína quinase preferencialmente expressa em músculo estriado	NS	SM	sobrepeso	NS
C9JGB6	Adseverin	NS	DM	Normal	NS
Q5TCS8	Adenilato quinase 9	NS	DM	sobrepeso	NS
Q8NEN0	Proteína 2 contendo repetição de tatu	NS	Normal	SM	NS
Q8WXA9	Splicing regulador de proteína rica em glutamina/lisina 1	NS	DM	Normal	NS
P00751	Fator de complemento B	NS	Normal	sobrepeso	NS
P56747	Claudin-6	NS	DM	Normal	NS
P23759	Proteína de caixa pareada Pax-7	NS	Normal	sobrepeso	NS
P02679	Cadeia gama de fibrinogênio	NS	DM	Normal	NS
P26374	Rab proteínas geranilgeraniltransferase componente A 2	NS	Normal	Obeso	NS
Q92545	Proteína transmembrana 131	NS	Normal	sobrepeso	NS
J3KRR8	U3 pequeno homólogo da proteína 6 associada ao RNA nucleolar	NS	sobrepeso	Normal	NS
J3QLT8	Receptor de netrina DCC	NS	sobrepeso	Normal	NS
Q6NSJ0	Glicosidase reguladora da miogênese	NS	Obeso	Normal	NS
Q5VT25	Serina/treonina-proteína quinase MRCK alfa	NS	SM	Normal	NS
O75290	Proteína dedo de zinco 780A	NS	Normal	DM	NS
Q9H1N7	Transportador 2 de adenosina 3'-fosfo 5'-fosfosulfato	NS	DM	sobrepeso	NS
Q9BRP9	Proteína não caracterizada putativa MGC13053	NS	DM	sobrepeso	NS
F8WER9	alfa-1_2-Manosidase	NS	SM	Normal	NS
Q9BXU3	Proteína 13A expressa no testículo	NS	SM	Normal	NS

Q9H857	Proteína 2 contendo o domínio 5'-nucleotidase	NS	SM	Normal	NS
P04217	Alfa-1B-glicoproteína	NS	DM	SM	NS
O60884	DnaJ homólogo subfamília A membro 2	NS	sobrepeso	Obeso	NS
Q8TBY8	Proteína 1 de ligação ao fator 1 modulada por poliamina	NS	SM	Normal	NS
P49321	Proteína espermática autoantigênica nuclear	NS	SM	sobrepeso	NS
P02652	Apolipoproteína A-II	NS	Obeso	sobrepeso	NS
P38159	Proteína do motivo de ligação ao RNA cromossomo X	NS	Obeso	DM	NS
Q9HC52	Proteína Chromobox homóloga 8	NS	Obeso	sobrepeso	NS
H0Y7Z1	Fibronectina	NS	sobrepeso	Normal	NS
Q9P2R6	O dipeptídeo arginina-ácido glutâmico repete a proteína	NS	sobrepeso	SM	NS
Q05519	Fator de splicing rico em serina/arginina 11	NS	DM	SM	NS
P01857	Imunoglobulina pesada constante gama 1	NS	SM	DM	NS
P13688	Molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembrionário 1	NS	Normal	DM	NS
M0R3A7	Receptor de oxisteróis LXR-beta	NS	sobrepeso	Normal	NS
P02766	Transtirretina	NS	SM	Obeso	NS
O94955	Proteína 3 contendo domínio BTB relacionado a Rho	NS	Obeso	sobrepeso	NS
Q15276	Proteína efetora 1 de ligação a GTPase Rab	NS	Obeso	sobrepeso	NS
O75533	Fator de emenda 3B subunidade 1	NS	DM	Obeso	NS
Q04637	Fator de iniciação da tradução eucariótica 4 gama 1	NS	DM	SM	NS
Q5BJE1	Proteína contendo domínio espiral enrolado 178	NS	sobrepeso	Normal	NS
P38398	Proteína de suscetibilidade ao câncer de mama tipo 1	NS	SM	Normal	NS
Q12840	Isoforma 5A da cadeia pesada de cinesina	NS	Normal	sobrepeso	NS
H0YBY1	Tireoglobulina	NS	sobrepeso	Normal	NS
P01591	cadeia J de imunoglobulina	NS	SM	sobrepeso	NS
H3BS76	Proteína 1 contendo domínio de disbindina	NS	DM	SM	NS
Q5R3E6	Proteína quinase 13 ativada por mitogênio	NS	DM	sobrepeso	NS
Q9BZG1	Proteína relacionada a Ras Rab-34	NS	Normal	SM	NS
A0RZB6	Chaperona do retículo endoplasmático	NS	Obeso	sobrepeso	NS
Q15762	antígeno CD226	NS	sobrepeso	Normal	NS
Q92870	Família B de ligação à proteína precursora de beta-amiloide A4 membro 2	NS	Obeso	SM	NS
P02675	Cadeia beta do fibrinogênio	NS	DM	SM	NS
O43795	Miosina-Ib não convencional	NS	Normal	Obeso	NS

P32927	Subunidade comum beta do receptor de citocina	NS	Obeso	Sobrepeso	NS
Q03721	Canal dependente de voltagem de potássio subfamília C membro 4	NS	SM	DM	NS
O75970	Proteína de domínio PDZ múltiplo	NS	DM	SM	NS
Q9UL45	Biogênese do complexo de organelas relacionadas ao lisossomo 1 subunidade 6	NS	Normal	Sobrepeso	NS
P49419	Alfa-aminoadípico semialdeído desidrogenase	NS	Obeso	Sobrepeso	NS
P02765	Alfa-2-HS-glicoproteína	NS	sobrepeso	DM	NS
Q99986	Serina/treonina-proteína quinase VRK1	NS	Normal	DM	NS
Q9NWH9	Modulador de transcrição do tipo SAFB	NS	Obeso	Normal	NS

Comparação dos 5 grupos separados: *: Valor de p quando $\leq 0,05$ em Teste Anova; NS: Valores estatisticamente não significativos,

Tabela 15. Proteínas plasmáticas identificadas na comparação ControlexSM (n=92)

Acesso	Descrição	Razão Caso/Controle	Valor de P*
H0YAG5	Proteína ribossômica 28S S18c_ mitocondrial	+1,7	<0,0001
O95861	3'(2')_5'-bifosfato nucleotidase 1	NS	NS
Q9H857	Proteína 2 contendo domínio 5'-nucleotidase	+1,7	0,04
Q9H1N7	Transportador de adenosina 3'-fosfo 5'-fosfosulfato 2	NS	NS
Q5TCS8	Adenilato quinase 9	+1,5	0,05
C9JGB6	Adseverin	NS	NS
P02768	Albumina	NS	NS
F8WER9	alfa-1_2-manosidase	+1,4	0,05
P02763	Alfa-1-glicoproteína ácida 1	+1,5	<0,001
P01011	Alfa-1-antitripsina	+1,7	0,003
P01009	Alfa-1-antitripsina	+1,3	<0,001
P04217	Alfa-1B-glicoproteína	NS	NS
P02765	Alfa-2-HS-glicoproteína	NS	NS
P01023	Alfa-2-macroglobulina	NS	NS
P49419	Semialdeído desidrogenase alfa-aminoadípico	NS	NS
G3V1N2	Alfa-globina	NS	NS
Q9UBD6	Transportador de amônio Rh tipo C	-2,7	0,002
Q92870	Membro 2 da família B de ligação à proteína precursora de beta-amiloide A4	NS	NS
Q8N7X0	Androglobina	NS	NS
C9J5H7	Repetição de anquirina e proteína 1 contendo domínio de dedo de zinco	NS	NS
Q8N7Z5	Proteína 31 contendo domínio de repetição de anquirina	+1,6	<0,001

P02647	Apolipoproteína A-I	+1,6	<0,001
P02652	Apolipoproteína A-II	NS	NS
P02656	Apolipoproteína C-III	+1,3	<0,001
Q9UPQ3	Arf-GAP com repetição GTPase_ANK e proteína 1 contendo domínio PH	+1,4	0,01
Q99490	Arf-GAP com repetição GTPase_ANK e proteína 2 contendo domínio PH	+1,3	0,003
Q9P2R6	O dipeptídeo do ácido arginina-glutâmico repete a proteína	-1,7	0,01
Q8NEN0	Proteína 2 contendo repetição de tatu	-1,1	0,026663
Q8IUR7	Proteína 8 contendo repetição de tatu	+1,6	<0,001
O00327	Proteína semelhante ao translocador nuclear do receptor de hidrocarboneto aril 1	-1,9	0,002
Q9UHQ4	proteína associada ao receptor de células B 29	-1,2	0,03
Q9UL45	Biogênese de organelas relacionadas ao lisossomo complexo 1 subunidade 6	NS	NS
P38398	Proteína de suscetibilidade ao câncer de mama tipo 1	NS	NS
Q15059	Proteína 3 contendo bromodomínio	NS	NS
P0DP24	Calmodulina-2	NS	NS
A6NHC0	Calpaína-8	-2,4	0,002
P13688	Molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembrionário 1	NS	NS
F8VQF4	Subunidade 2 do complexo de transcrição CCR4-NOT	+3,6	<0,001
Q15762	Antígeno CD226	NS	NS
Q5JWS6	Proteína Centrossomal 250kDa	+3,3	<0,001
Q96L14	Proteína semelhante a Cep170	NS	NS
P00450	Ceruloplasmina	+1,3	0,006
Q9HC52	homólogo de proteína Chromobox 8	NS	NS
Q6ZU64	Proteína 65 associada a cílios e flagelos	+4,1	<0,001
P56747	Claudina-6	NS	NS
O75153	Homólogo de proteína de mitocôndrias agrupadas	-5	<0,001
Q5BJE1	Proteína contendo domínio de bobina enrolada 178	NS	NS
P01024	Complemento C3	+1,1	0,03
P00751	Fator complementar B	NS	NS
Q99627	Subunidade 8 do complexo de sinalossoma COP9	-1,6	0,008
P32927	Subunidade comum beta do receptor de citocinas	NS	NS
Q96N67	Dedicador da proteína citocinese 7	+1,5	0,002
Q5VVJ2	Deubiquitinase MYSM1	NS	NS
Q9H4A9	Dipeptidase 2	-2,2	<0,001
P53602	Difosfomevalonato descarboxilase	-1,3	0,01
Q8NDZ4	Domínio de proteína quinase divergente 2A	+1,4	<0,001
O60884	Subfamília homóloga de DNA A membro 2	NS	NS
Q9NRD9	Dupla oxidase 1	+1,3	<0,001
H3BS76	Proteína 1 contendo domínio de disbindina	NS	NS
Q96EP0	E3 ubiquitina-proteína ligase RNF31	NS	NS
Q96G75	E3 ubiquitina-proteína transferase RMND5B	NS	NS

O95834	Proteína 2 associada a microtúbulos de equinoderme	NS	NS
Q15717	Proteína 1 semelhante a ELAV	NS	NS
Q9BY07	Cotransportador de bicarbonato de sódio eletrogênico 4	-1,2	<0,001
Q6P179	Retículo endoplasmático aminopeptidase 2	+1,7	<0,001
A0RZB6	Chaperona do retículo endoplasmático	NS	NS
Q5D1E8	Endoribonuclease ZC3H12A	NS	NS
P52797	Efrina-A3	4,1	<0,001
Q04637	Fator de iniciação de tradução eucariótica 4 gama 1	-1,2	0,03
Q8TAG9	Componente do complexo de exocisto 6	+1,4	0,05
P14324	Farnesil pirofosfato sintase	NS	NS
P49327	Ácido graxo sintase	+1,3	0,05
P02671	Cadeia alfa de fibrinogênio	+1,3	<0,001
P02675	Cadeia beta de fibrinogênio	NS	NS
P02679	Cadeia gama de fibrinogênio	NS	NS
P02751	Fibronectina	NS	NS
Q96M96	FYVE_ RhoGEF e proteína 4 contendo domínio PH	-1,1	0,03
Q9NSN8	Gama-1-sintrofina	-1,3	0,03
Q3V6T2	Girdina	NS	NS
O75879	Glutamil-tRNA(Gln) amidotransferase subunidade B_ mitocondrial	-2	<0,001
P00738	Haptoglobina	NS	NS
P00739	Proteína relacionada à haptoglobina	NS	NS
P11142	Proteína cognata de choque térmico de 71 kDa	-1,2	0,04
P69905	Subunidade alfa da hemoglobina	-1,8	0,02
P68871	Subunidade beta da hemoglobina	NS	NS
P69891	Subunidade de hemoglobina gama-1	NS	NS
P02790	Hemopexina	+1,7	<0,001
P28068	Antígeno de histocompatibilidade HLA classe II_ cadeia beta DM	NS	NS
Q4G0P3	Homólogo de proteína indutora de hidrocefalia	NS	NS
P01876	Alfa 1 constante pesada de imunoglobulina	NS	NS
P01877	Alfa 2 constante pesada de imunoglobulina	NS	NS
P01857	Imunoglobulina constante pesada gama 1	NS	NS
P01859	Imunoglobulina constante pesada gama 2	+1,7	<0,001
P01860	Imunoglobulina constante pesada gama 3	+1,6	<0,001
P01861	Imunoglobulina constante pesada gama 4	+1,6	<0,001
P01871	Mu constante pesada de imunoglobulina	NS	NS
P01591	Cadeia J de imunoglobulina	+1,8	<0,001
P01834	constante kappa de imunoglobulina	+1,2	0,002
P0CG04	Imunoglobulina lambda constante 2	NS	NS
P19827	Cadeia pesada do inibidor de interalfa-tripsina H1	NS	NS
P12035	Queratina_ tipo II citoesquelético 3	-1,2	0,02
Q12840	Isoforma de cadeia pesada de cinesina 5A	NS	NS
O60282	Isoforma de cadeia pesada de cinesina 5C	-1,4	0,006
C9JBD0	proteína 1 contendo domínio KRAB	+2,3	0,002
Q9NQ48	Proteína semelhante ao fator de transcrição de zíper de leucina 1	NS	NS

Q86U70	Proteína 1 de ligação ao domínio LIM	-2	<0,001
O75145	Liprina-alfa-3	-1,8	<0,001
O14678	Transportador de cobalamina lisossomal ABCD4	-3,5	0,004
E7EVA0	Proteína associada a microtúbulos	-1,2	0,00048143
P27816	Proteína 4 associada a microtúbulos	-1,2	0,001
Q5R3E6	Proteína quinase 13 ativada por mitógeno	NS	NS
H0Y3W8	Transportador de monocarboxilato 10	NS	NS
Q8N307	Mucina-20	+2,4	<0,001
O75970	Proteína de múltiplos domínios PDZ	NS	NS
P02686	Proteína básica de mielina	-1,8	<0,001
Q15773	Leucemia mielóide fator 2	+1,2	<0,001
Q6NSJ0	Glicosidase reguladora da miogênese	NS	NS
Q3T906	Subunidades alfa/beta de N-acetilglucosamina-1-fosfotransferase	NS	NS
P18615	Fator de alongamento negativo E	-1,3	0,001
J3QLT8	Receptor de netrina DCC	NS	NS
P49321	Proteína espermática autoantigênica nuclear	NS	NS
C9JNV9	Correpressor do receptor nuclear 2	+1,7	<0,001
Q9H8H0	Proteína nuclear 11	NS	NS
Q96R27	Receptor olfativo 2M4	NS	NS
M0R3A7	Receptor de oxiesteróis LXR-beta	NS	NS
P23759	Proteína de caixa emparelhada Pax-7	NS	NS
Q9H5P4	Proteína 7 contendo domínio PDZ	NS	NS
P42336	Fosfatidilinositol 4_5-bifosfato 3-quinase subunidade catalítica alfa isoforma	+1,2	0,04
E9PSF8	Fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinase tipo 1 alfa	NS	NS
Q86YL7	Podoplanina	-2,5	<0,001
Q7Z3K3	Elemento transponível Pogo com domínio ZNF	-2,2	<0,001
Q8TBY8	Proteína 1 de ligação ao fator 1 modulada por poliamina	NS	NS
B1ALY4	Proteína de ligação ao trato de polipirimidina 3	+3,3	<0,001
Q03721	Subfamília C de canal dependente de voltagem de potássio membro 4	NS	NS
Q13029	Proteína 2 do dedo de zinco do domínio PR	+1,8	<0,001
P49810	Presenilina	NS	NS
Q96KS0	Prolil hidroxilase EGLN2	NS	NS
P29122	Proteína convertase subtilisina/kexina tipo 6	-1,4	0,028911
O75081	Proteína CBFA2T3	NS	NS
Q8N8X9	Proteína mab-21-like 3	NS	NS
Q2KHM9	Moonraker de proteína	+1,2	0,014365
Q86WI3	Proteína NLRC5	NS	NS
O75880	Proteína SCO1 homóloga_ mitocondrial	NS	NS
Q14671	Pumilio homólogo 1	NS	NS
Q9BRP9	Proteína não caracterizada putativa MGC13053	NS	NS
A6NN06	Proteína UPF0633 putativa MGC21881	-1,2	<0,001
Q15276	Proteína efetora de ligação à GTPase Rab 1	NS	NS
P26374	Proteínas Rab geranilgeraniltransferase componente A 2	NS	NS
Q9UHV5	Fator de troca de nucleotídeos de guanina rap semelhante a 1	NS	NS
Q9BZG1	Proteína relacionada a Ras Rab-34	NS	NS

P49796	Regulador da sinalização da proteína G 3	-1,6	<0,001
E5RJ23	Regulador da sinalização da proteína G 22	+3,6	<0,001
P00797	Renina	NS	NS
O94955	Proteína 3 contendo domínio BTB relacionada a Rho	NS	NS
P38159	Proteína do motivo de ligação ao RNA_ cromossomo X	NS	NS
P49756	Proteína de ligação a RNA 25	NS	NS
Q9NWH9	Modulador de transcrição tipo SAFB	NS	NS
Q96QR1	Membro da família 3A da secretoglobina 1	NS	NS
Q05519	Fator de splicing rico em serina/arginina 11	NS	NS
Q5VT25	Serina/treonina proteína quinase	+1,2	0,05
Q99986	Serina/treonina-proteína quinase VRK1	NS	NS
P02787	Sorotransferrina	1,1	0,02
O75533	Fator de emenda 3B subunidade 1	NS	NS
Q8WXA9	Splicing regulador de glutamina/proteína rica em lisina 1	NS	NS
Q7RTU9	Estereocilina	-1,8	0,03
C9JWU5	Proteína quinase expressa preferencialmente no músculo estriado	NS	NS
Q9UH99	proteína 2 contendo domínio SUN	-1,7	0,002
Q969G3	Regulador dependente de actina associado a matriz relacionado a SWI/SNF do membro 1 da subfamília de cromatina E	-1,4	0,001
Q2MV58	Tectônica-1	NS	NS
Q9NXF1	Proteína 10 expressa nos testículos	-3,6	0,01
Q9BXU3	Proteína 13A expressa em testículos	+1,3	0,05
P01266	Tireoglobulina	NS	NS
Q15643	Proteína 11 que interage com o receptor da tireoide	-1,7	0,005
Q8IUR0	Subunidade 5 do complexo de partículas de proteína de tráfego	-1,7	0,0016
P63272	Fator de alongamento de transcrição SPT4	NS	NS
P21675	Subunidade 1 do fator de iniciação da transcrição TFIID	+1,6	<0,001
Q10571	Ativador transcricional MN1	NS	NS
Q5T5J6	Proteína transcricional SWT1	+2	<0,001
Q92545	Proteína transmembranar 131	NS	NS
Q8NBN3	Proteína transmembranar 87A	NS	NS
P02766	Transtirretina	+1,2	0,01
Q13428	Proteína de melaço	+1,2	0,003
P23381	Triptofano-tRNA ligase, citoplasmática	-1,4	<0,001
P21580	Proteína 3 induzida pelo fator de necrose tumoral alfa	+1,8	0,001
Q9ULQ1	Proteína de canal de cálcio de dois poros 1	+1,5	<0,001
J3KRR8	U3 homólogo da proteína 6 associada ao RNA nucleolar pequeno	NS	NS
Q96DI7	U5 ribonucleoproteína nuclear pequena proteína de 40 kDa	NS	NS
Q9NVE5	Ubiquitina carboxil-terminal hidrolase 40	NS	NS
Q9NQC7	Ubiquitina carboxil-terminal hidrolase CYLD	NS	NS
Q8IXQ3	Proteína não caracterizada C9orf40	NS	NS
O43795	Miosina-Ib não convencional	NS	NS

Q9UM54	Miosina-VI não convencional	+1,7	<0,001
Q9BPX7	UPF0415 proteína C7orf25	-2,4	0,0002
P02774	Proteína de ligação à vitamina D	NS	NS
P04004	Vitronectina	+1,4	<0,001
H0YEL3	subunidade ATPase do próton tipo V	+2	<0,001
P52741	Proteína de dedo de zinco 134	NS	NS
Q8IVP9	Proteína de dedo de zinco 547	NS	NS
Q86YE8	Proteína de dedo de zinco 573	NS	NS
Q96NL3	Proteína de dedo de zinco 599	NS	NS
E9PJ46	Proteína de dedo de zinco 707	NS	NS
Q96MU6	Proteína de dedo de zinco 778	NS	NS
O75290	Proteína de dedo de zinco 780A	NS	NS

Razão caso/controle: razão dos valores médios de abundância, sendo (-) e (+) mostrando, respectivamente, diminuição e aumento da expressão proteica no grupo ControlexSM;*: Valor de p quando $\leq 0,05$ em Teste t: Valores estatisticamente não significantes.

Tabela 16. Proteínas plasmáticas identificadas na comparação ControlexDMT2 (n=80)

Acesso	Descrição	Razão Caso/Controle	Valor de P*
O95861	3'(2')_5'-bifosfato nucleotidase 1	NS	NS
P49327	Ácido graxo sintase	+1,4	0,014
Q5TCS8	Adenilato quinase 9	+1,6	0,009
C9JGB6	Adseverin	NS	NS
P02768	Albumina	NS	NS
P01876	Alfa 1 constante pesada de imunoglobulina	+1,4	<0,001
P01877	Alfa 2 constante pesada de imunoglobulina	+1,3	0,005
F8WER9	alfa-1_2-manosidase	NS	NS
P01011	Alfa-1-antiquimotripsina	NS	NS
P01009	Alfa-1-antitripsina	NS	NS
P04217	Alfa-1B-glicoproteína	NS	NS
P02763	Alfa-1-glicoproteína ácida 1	NS	NS
P02765	Alfa-2-HS-glicoproteína	NS	NS
P01023	Alfa-2-macroglobulina	+1,1	0,001
Q8N7X0	Androglobina	+1,2	0,028
P00797	Renina	NS	NS
Q15762	Antígeno CD226	NS	NS
P28068	Antígeno de histocompatibilidade HLA classe II_ cadeia beta DM	+1,3	0,004
P02647	Apolipoproteína A-I	NS	NS
P02652	Apolipoproteína A-II	NS	NS
P02656	Apolipoproteína C-III	+1,2	0,002
Q9UPQ3	Arf-GAP com repetição GTPase_ANK e proteína 1 contendo domínio PH	+1,7	<0,001
Q99490	Arf-GAP com repetição GTPase_ANK e proteína 2 contendo domínio PH	NS	NS
Q10571	Ativador transcricional MN1	NS	NS

Q9UL45	Biogênese de organelas relacionadas ao lisossomo complexo 1 subunidade 6	NS	NS
P02671	Cadeia alfa de fibrinogênio	+1,2	<0,001
P02675	Cadeia beta de fibrinogênio	NS	NS
P02679	Cadeia gama de fibrinogênio	+1,1	0,002
P01591	Cadeia J de imunoglobulina	NS	NS
P19827	Cadeia pesada do inibidor de interalfa-tripsina H1	NS	NS
P0DP24	Calmodulina-2	-1,5	0,030
A6NHC0	Calpaína-8	-1,2	0,024
P00450	Ceruloplasmina	NS	NS
A0RZB6	Chaperona do retículo endoplasmático	NS	NS
P56747	Claudia-6	NS	NS
P01024	Complemento C3	NS	NS
Q8TAG9	Componente do complexo de exocisto 6	NS	NS
P01834	constante kappa de imunoglobulina	NS	NS
C9JNV9	Correpressor do receptor nuclear 2	NS	NS
Q9BY07	Cotransportador de bicarbonato de sódio eletrogênico 4 O	NS	NS
Q96N67	Dedicador da proteína citocinese 7	NS	NS
P53602	Difosfomevalonato descarboxilase	-1,2	0,033
Q9H4A9	Dipeptidase 2	-1,3	0,008
Q8NDZ4	Domínio de proteína quinase divergente 2ª	NS	NS
Q9NRD9	Dupla oxidase 1	+1,1	0,030
Q96EP0	E3 ubiquitina-proteína ligase RNF31	NS	NS
Q96G75	E3 ubiquitina-proteína transferase RMND5B	-2,2	<0,001
P52797	Efrina-A3	-1,2	0,024
Q7Z3K3	Elemento transponível Pogo com domínio ZNF	-1,4	0,004
Q5D1E8	Endoribonuclease ZC3H12A	+1,5	0,041
Q7RTU9	Estereocilina	NS	NS
P14324	Farnesil pirofosfato sintase	NS	NS
P00751	Fator complementar B	NS	NS
P18615	Fator de alongamento negativo E	-1,5	<0,001
O75533	Fator de emenda 3B subunidade 1	+1,4	0,006
Q04637	Fator de iniciação de tradução eucariótica 4 gama 1	NS	NS
Q05519	Fator de splicing rico em serina/arginina 11	+1,3	0,032
Q9UHV5	Fator de troca de nucleotídeos de guanina rap semelhante a 1	NS	NS
P02751	Fibronectina	+1,2	0,029
P42336	Fosfatidilinositol 4_5-bifosfato 3-quinase subunidade catalítica alfa isoforma	NS	NS
E9PSF8	Fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinase tipo 1 alfa	NS	NS
Q96M96	FYVE_ RhoGEF e proteína 4 contendo domínio PH	NS	NS
Q9NSN8	Gama-1-sintrofina	-1,3	0,016
Q3V6T2	Gc-globulina	-1,3	0,037
Q6NSJ0	Girdin	-1,4	0,031
O75879	Glicosidase reguladora da miogênese	NS	NS
O75879	Glutamil-tRNA(Gln) amidotransferase subunidade B_ mitocondrial	NS	NS
P00738	Haptoglobina	+1,2	0,050

P02790	Hemopexina	+1,3	0,021
Q5VVJ2	Deubiquitinase MYSM1	-1,4	0,008
Q9HC52	homólogo de proteína Chromobox 8	NS	NS
O75153	Homólogo de proteína de mitocôndrias agrupadas	NS	NS
Q4G0P3	Homólogo de proteína indutora de hidrocefalia	NS	NS
P01857	Imunoglobulina constante pesada gama 1	-1,2	0,019
P01859	Imunoglobulina constante pesada gama 2	NS	NS
P01860	Imunoglobulina constante pesada gama 3	-2,4	0,022
P01861	Imunoglobulina constante pesada gama 4	NS	NS
P01871	Imunoglobulina constante pesada um	-1,5	<0,001
P0CG04	Imunoglobulina lambda constante 2	+1,7	<0,001
Q12840	Isoforma de cadeia pesada de cinesina 5 ^a	NS	NS
O60282	Isoforma de cadeia pesada de cinesina 5C	NS	NS
Q15773	Leucemia 84ator84de fator 2	NS	NS
Q86U70	Proteína 1 de ligação ao domínio LIM	-1,3	<0,001
O75145	Liprina-alfa-3	-1,6	<0,001
Q92870	Membro 2 da família B de ligação à proteína precursora de beta-amiloide A4	NS	NS
Q96QR1	Membro da família 3 ^a da secretoglobina 1	-1,2	0,019
O43795	Miosina-Ib não convencional	+1,2	0,004
Q9UM54	Miosina-VI não convencional	NS	NS
Q9NWH9	Modulador de transcrição tipo SAFB	NS	NS
P13688	Molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembrionário 1	NS	NS
Q2KHM9	Moonraker de proteína	NS	NS
Q8N307	Mucina-20	+1,6	0,010
Q9P2R6	O dipeptídeo do ácido arginina-glutâmico repete a proteína	NS	NS
Q86YL7	Podoplanina	-1,1	0,008
P49810	Presenilina	+1,8	0,05
Q96KS0	Proil hidroxilase EGLN2	NS	NS
P29122	Proteína convertase subtilisina/kexina tipo 6	-1,6	0,011
H3BS76	Proteína 1 contendo domínio de disbindina	NS	NS
C9JBD0	proteína 1 contendo domínio KRAB	NS	NS
Q8TBY8	Proteína 1 de ligação ao fator 1 modulada por poliamina	NS	NS
Q15717	Proteína 1 semelhante a ELAV	NS	NS
Q9NXF1	Proteína 10 expressa nos testículos	NS	NS
Q15643	Proteína 11 que interage com o receptor da tireoide	+1,2	0,004
Q9BXU3	Proteína 13 ^a expressa em testículos	NS	NS
O95834	Proteína 2 associada a microtúbulos de equinoderme	-1,2	0,018
Q9H857	Proteína 2 contendo domínio 5'-nucleotidase	NS	NS
Q9UH99	proteína 2 contendo domínio SUN	-1,3	<0,001
Q8NEN0	Proteína 2 contendo repetição de tatu	NS	NS
Q13029	Proteína 2 do dedo de zinco do domínio PR	NS	NS
Q15059	Proteína 3 contendo bromodomínio	+1,4	0,035
O94955	Proteína 3 contendo domínio BTB relacionada a Rho	NS	NS

Q8N7Z5	Proteína 31 contendo domínio de repetição de anquirina	+2,2	0,017
P27816	Proteína 4 associada a microtúbulos	+1,2	0,002
Q6ZU64	Proteína 65 associada a cílios e flagelos	+1,33	0,040
Q9H5P4	Proteína 7 contendo domínio PDZ	-3,6	<0,001
Q8IUR7	Proteína 8 contendo repetição de tatu	NS	NS
E7EVA0	Proteína associada a microtúbulos	NS	NS
P02686	Proteína básica de mielina	NS	NS
O75081	Proteína CBFA2T3	+1,2	<0,001
Q5JWS6	Proteína Centrosomal de 170 kDa	NS	NS
P11142	Proteína Centrossomal 250kDa	-1,2	<0,001
Q5BJE1	Proteína cognata de choque térmico de 71 kDa	+1,6	0,020
Q5BJE1	Proteína contendo domínio de bobina enrolada 178	NS	NS
P69892	Subunidade de hemoglobina gama-2	-1,3	0,002
P23759	Proteína de caixa emparelhada Pax-7	NS	NS
Q9ULQ1	Proteína de canal de cálcio de dois poros 1	NS	NS
P52741	Proteína de dedo de zinco 134	+1,2	0,015
Q8IVP9	Proteína de dedo de zinco 547	NS	NS
Q86YE8	Proteína de dedo de zinco 573	-1,1	0,015
Q96NL3	Proteína de dedo de zinco 599	-1,3	<0,001
E9PJ46	Proteína de dedo de zinco 707	-1,7	<0,001
Q96MU6	Proteína de dedo de zinco 778	NS	NS
O75290	Proteína de dedo de zinco 780 ^a	-1,3	0,044
P49756	Proteína de ligação a RNA 25	NS	NS
B1ALY4	Proteína de ligação ao trato de polipirimidina 3	-1,6	0,002
Q13428	Proteína de melão	+1,1	0,018
O75970	Proteína de múltiplos domínios PDZ	NS	NS
P38398	Proteína de suscetibilidade ao câncer de mama tipo 1	NS	NS
P38159	Proteína do motivo de ligação ao RNA_ cromossomo X	-1,3	0,019
Q15276	Proteína efetora de ligação à GTPase Rab 1	NS	NS
P49321	Proteína espermática autoantigênica nuclear	NS	NS
Q8N8X9	Proteína mab-21-like 3	+1,2	0,019
Q9UHQ4	proteína associada ao receptor de células B 29	+1,7	<0,001
Q8IXQ3	Proteína não caracterizada C9orf40	NS	NS
Q8IXQ3	Proteína não caracterizada putativa MGC13053	+1,3	0,007
Q9BRP9	Proteína NLRC5	+1,3	0,044
Q86WI3	Proteína nuclear 11	NS	NS
Q9H8H0	Proteína quinase 13 ativada por mitógeno	NS	NS
Q5R3E6	Proteína quinase expressa preferencialmente no músculo estriado	NS	NS
Q5VT25	Serina/treonina-proteína quinase	NS	NS
P00739	Proteína relacionada à haptoglobina	NS	NS
Q9BZG1	Proteína relacionada a Ras Rab-34_ isoforma NARR	NS	NS
H0YAG5	proteína ribossômica 28S S18c_ mitocondrial	NS	NS
O75880	Proteína SCO1 homóloga_ mitocondrial	NS	NS
Q9NQ48	Proteína semelhante ao fator de transcrição de zíper de leucina 1	-1,6	0,016

O00327	Proteína semelhante ao translocador nuclear do receptor de hidrocarboneto aril 1	NS	NS
Q5T5J6	Proteína transcricional SWT1	+1,3	0,038
Q92545	Proteína transmembranar 131	NS	NS
Q8NBN3	Proteína transmembranar 87 ^a	NS	NS
A6NN06	Proteína UPF0633 putativa MGC21881	NS	NS
P26374	Proteínas Rab geranilgeraniltransferase componente A 2	NS	NS
Q14671	Pumilio homólogo 1	-1,4	0,031
P12035	Queratina_ tipo II citoesquelético 3	-1,4	<0,001
J3QLT8	Receptor de netrina DCC	NS	NS
Q60644	Receptor de oxiesteróis LXR-beta	NS	NS
Q96R27	Receptor olfativo 2M4	NS	NS
E5RJ23	Regulador da sinalização da proteína G 22	NS	NS
P49796	Regulador da sinalização da proteína G 3	NS	NS
Q969G3	Regulador dependente de actina associado a matriz relacionado a SWI/SNF do membro 1 da subfamília de cromatina E	NS	NS
C9J5H7	Repetição de anquirina e proteína 1 contendo domínio de dedo de zinco	+1,6	<0,001
Q6P179	Retículo endoplasmático aminopeptidase 2	NS	NS
P49419	Semialdeído desidrogenase alfa-aminoadípico	NS	NS
Q99986	Serina/treonina-proteína quinase VRK1	NS	NS
P02787	Sorotransferrina	NS	NS
Q8WXA9	Splicing regulador de glutamina/proteína rica em lisina 1	+1,2	0,002
Q03721	Subfamília C do canal dependente de voltagem de potássio membro 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KCNC4 PE=1 SV=1	+1,4	0,036
O60884	Subfamília homóloga de DNA A membro 2	NS	NS
P21675	Subunidade 1 do fator de iniciação da transcrição TFIID	+1,2	0,037
F8VQF4	Subunidade 2 do complexo de transcrição CCR4-NOT	NS	NS
Q8IUR0	Subunidade 5 do complexo de partículas de proteína de tráfego	NS	NS
Q99627	Subunidade 8 do complexo de sinalossoma COP9	NS	NS
H0YEL3	Subunidade alfa da hemoglobina	-1,9	0,004
P69905	subunidade ATPase do próton tipo V	NS	NS
P68871	Subunidade beta da hemoglobina	-1,3	0,001
P32927	Subunidade comum beta do receptor de citocinas	NS	NS
Q3T906	Subunidades alfa/beta de N-acetilglucosamina-1-fosfotransferase	-1,6	0,002
P63272	Transcription elongation 86ator SPT4	NS	NS
Q2MV58	Tectônica-1	NS	NS
P01266	Tireoglobulina	NS	NS
Q9H1N7	Transportador de adenosina 3'-fosfo 5'-fosfosulfato 2	+1,6	0,022
Q9UBD6	Transportador de amônio Rh tipo C	NS	NS
O14678	Transportador de cobalamina lisossomal ABCD4	-5,1	<0,001
H0Y3W8	Transportador de monocarboxilato 10	-1,5	<0,001

P02766	Transtirretina	NS	NS
P23381	Triptofano-tRNA ligase, citoplasmática	NS	NS
J3KRR8	U3 homólogo da proteína 6 associada ao RNA nucleolar pequeno	+1,8	0,008
Q96DI7	U5 ribonucleoproteína nuclear pequena proteína de 40 kDa	NS	NS
Q9NVE5	Ubiquitina carboxil-terminal hidrolase 40	NS	NS
Q9NQC7	Ubiquitina carboxil-terminal hidrolase CYLD	NS	NS
P21580	Proteína 3 induzida pelo fator de necrose tumoral – Alfa	NS	NS
Q9BPX7	UPF0415 proteína C7orf25	-1,9	<0,001
P04004	Vitronectina	+1,2	<0,001
Razão caso/controle: razão dos valores médios de abundância, sendo (-) e (+) mostrando, respectivamente, diminuição e aumento da expressão proteica nos indivíduos doentes (DMT2) em relação aos saudáveis; *: Valor de p quando $\leq 0,05$ em Teste t; NS: Valores estatisticamente não significantes.			

8.7- Identificação de proteínas salivares

Assim como foi realizado no plasma, também fizemos a identificação de proteínas salivares. A análise por meio da espectrometria de massas identificou 62 proteínas na comparação com todos os grupos (Tabela 17) e 64 proteínas nas duas comparações realizadas: ControlexDMT2 (Tabela 18) e ControlexSM (Tabela 19).

Ao analisarmos a comparação com todos os 5 grupos de estudo (Tabela 17) observamos que 39 proteínas apresentavam diferenças significativas. Na tabela 18, onde realizamos a comparação Controle x SM, 24 das 64 proteínas apresentavam abundância relativa significativamente diferente. Na comparação Controle x DMT2 (Tabela 19), 23 das 64 proteínas apresentaram diferença significativa nos grupos estudos.

Tabela 17. Proteínas salivares identificadas nos 5 grupos de estudo (n=103).

Acesso	Descrição	Variação	Maior abundância	Menor abundância	Anova (p)
A0A087WT02	Receptor de células T alfa variável 9-2	1,8	Sobrepeso	SM	<0,001
Q9BYX7	Proteína tipo beta-actina putativa 3	2,6	Obeso	Sobrepeso	<0,001
P0CG38	Membro da família de domínio de anquirina POTE I	2	Normal	Obeso	<0,001
P23280	Anidrase carbônica 6	2,5	DM	Normal	<0,001
P69905	Subunidade alfa da hemoglobina	5,1	SM	Obeso	<0,001

Q6ZMP0	Proteína 4 contendo domínio de trombospondina tipo 1	2,1	Normal	DM	<0,001
Q8TAX7	Mucina-7	5	Normal	DM	<0,001
P07737	Profilina-1	3,2	SM	Normal	<0,001
P02788	Lactotransferrina	1,8	DM	SM	<0,001
P09471	Proteína G(o) de ligação ao nucleotídeo guanina subunidade alfa	1,5	Normal	Obeso	<0,001
Q3LHN0	Proteína associada à queratina 25-1	6,7	DM	Sobrepeso	<0,001
P68871	Subunidade beta da hemoglobina	7,1	SM	Obeso	<0,001
P01036	Cistatina-S	2,5	Normal	SM	<0,001
P05109	Proteína S100-A8	1,6	DM	Normal	<0,001
P06870	Caliceína-1	1,3	DM	Normal	<0,001
Q7Z444	GTPase ERAs	3	SM	Sobrepeso	<0,001
P27338	Amina oxidase [contendo flavina] B	1,6	DM	Normal	<0,001
P12273	Proteína induzida por prolactina	1,3	Obeso	SM	0,001222
P06702	Proteína S100-A9	2,1	SM	Sobrepeso	0,001289
P0DP02	Imunoglobulina pesada variável 3-30-3	2,2	Obeso	Normal	0,001693
P01833	Receptor de imunoglobulina polimérica	1,7	DM	Sobrepeso	0,002263
P02768	albumina sérica	1,5	Normal	Obeso	0,002733
Q8N4F0	Membro 2 da família B contendo dobra BPI	2	Obeso	Normal	0,004758
Q96DA0	Proteína de grânulo de zimogênio 16 homólogo B	2	Obeso	Normal	0,005584
P18615	Fator de alongamento negativo E	1,7	Sobrepeso	DM	0,00599
P04745	Alfa-amilase 1	1,6	Normal	Obeso	0,006383
P04264	Queratina _ citoesqueleto tipo II 1	3,1	Normal	Sobrepeso	0,006832
P01857	Imunoglobulina pesada constante gama 1	1,5	SM	Normal	0,00763
P04080	Cistatina-B	1,4	Obeso	Sobrepeso	0,012434
P25311	Zinco-alfa-2-glicoproteína	1,1	DM	Sobrepeso	0,01862
P19961	Alfa-amilase 2B	1,6	SM	Obeso	0,023752
P59666	Neutrófilo defensina 3	1,9	Obeso	Sobrepeso	0,029736
P01860	Imunoglobulina gama constante pesada 3	1,7	SM	Normal	0,03247
Q562R1	Proteína tipo beta-actina 2	1,7	DM	Obeso	0,034144
Q6P5S2	Proteína homóloga LEG1	4,3	Obeso	SM	0,044583
Q9BRV8	Supressor de IKBKE 1	1,4	Obeso	SM	0,04469
Q5VVJ2	Deubiquitinase MYSM1	1,4	Sobrepeso	SM	0,04494
P09228	Cistatina-SA	1,7	Obeso	SM	0,046547
P04406	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	2,8	DM	Normal	0,048541
Q18PE1	Proteína Dok-7	6	Normal	SM	NS
Q6ZMN8	Ciclina-I2	1,7	DM	Normal	NS
P60709	Actina _ citoplasmática 1	NS	SM	DM	NS
Q5XKK7	Proteína FAM219B	NS	SM	Obeso	NS
Q9HC44	Proteína tipo vasculina 1	NS	DM	SM	NS
B9A064	Polipeptídeo tipo 5 de imunoglobulina lambda	NS	Obeso	Sobrepeso	NS

Q5TGJ6	Proteína 1 semelhante ao fator de crescimento derivado do hepatoma	NS	DM	Sobrepeso	NS
P01861	Imunoglobulina gama constante pesada 4	NS	Normal	SM	NS
Q96CG3	Proteína de interação TRAF com proteína A contendo domínio FHA	NS	Normal	Obeso	NS
P01037	Cistatina-SN	NS	DM	SM	NS
Q16623	Sintaxina-1A	NS	Normal	DM	NS
P68133	Actina, músculo esquelético alfa	NS	Obeso	Sobrepeso	NS
P01834	Constante kappa de imunoglobulina	NS	DM	Normal	NS
Q16878	Cisteína dioxigenase tipo 1	NS	DM	Normal	NS
P55263	Adenosina quinase	NS	Normal	SM	NS
P01591	cadeia J de imunoglobulina	NS	DM	Normal	NS
P0DOY3	Imunoglobulina lambda constante 3	NS	Obeso	Sobrepeso	NS
P01871	Constante pesada de imunoglobulina mu	NS	Normal	Sobrepeso	NS
P01877	Imunoglobulina pesada constante alfa 2	NS	DM	Obeso	NS
Q96H86	Proteína dedo de zinco 764	NS	DM	SM	NS
P01876	Imunoglobulina pesada constante alfa 1	NS	DM	Normal	NS
P31025	Lipocalina-1	NS	Normal	SM	NS
Q86Y33	Proteína do ciclo de divisão celular 20 homólogo B	NS	Obeso	SM	NS
Comparação dos 5 grupos separados: *: Valor de p quando $\leq 0,05$ em Teste Anova; NS: Valores estatisticamente não significativos.					

Tabela 18. Proteínas salivares identificadas na comparação ControlexSM (n=92)

Acesso	Descrição	Razão Caso/Controle	Valor de P*
P63267	Actina, músculo liso gama-entérico	NS	NS
P60709	Actina_citoplasmática 1	NS	NS
P19961	Alfa-amilase 2B	NS	NS
Q562R1	Proteína tipo beta-actina 2	+1,4	0,016
Q8N4F0	BPI que contém o membro da família B 2	NS	NS
P23280	Anidrase carbônica 6	+1,7	<0,001
Q9Y2G2	Proteína 8 contendo domínio de recrutamento de caspase	NS	NS
Q9HC52	homólogo de proteína Chromobox 8	+1,7	0,002
Q6ZRS4	Proteína 129 contendo domínio de bobina enrolada	-1,5	0,050
Q6ZMN8	Ciclina-l2	NS	NS
P04080	Cistatina-B	NS	NS
P01036	Cistatina-S	-2,4	<0,001

P09228	Cistatina-AS	NS	NS
P01037	Cistatina-SN	-2,1	<0,001
Q9UP65	Fosfolipase A2 gama citosólica	NS	NS
Q8TEA8	D-aminoacil-tRNA desacilase 1	NS	NS
Q07507	Dermatopontina	NS	NS
A6NDY0	Proteína 2 de ligação de poliadenilato embrionário	-3,2	0,003
O95954	Formimidoiltransferase-ciclodeaminase	+1,2	0,012
Q05329	Glutamato descarboxilase 2	-2,1	0,021
P04406	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	NS	NS
P69905	Subunidade alfa da hemoglobina	+5,2	<0,001
P68871	Subunidade beta da hemoglobina	+3,6	<0,001
Q5VVJ2	Deubiquitinase MYSM1	-1,7	<0,001
O43364	Proteína Homeobox Hox-A2	NS	NS
P01876	Alfa 1 constante pesada de imunoglobulina	NS	NS
P01877	Alfa 2 constante pesada de imunoglobulina	NS	NS
P01857	Imunoglobulina constante pesada gama 1	+1,3	0,020
P01860	Imunoglobulina constante pesada gama 3	+1,4	<0,001
P01861	Imunoglobulina constante pesada gama 4	NS	NS
P01871	Mu constante pesada de imunoglobulina	NS	NS
P01780	Variável pesada de imunoglobulina 3-7	NS	NS
P01591	Cadeia J de imunoglobulina	NS	NS
P01834	constante kappa de imunoglobulina	NS	NS
P0DOX7	Cadeia leve kappa de imunoglobulina	NS	NS
P0DOY3	Imunoglobulina lambda constante 3	NS	NS
P0DOX6	Cadeia pesada de imunoglobulina mu	NS	NS
Q9H1B7	Tipo de proteína de ligação ao fator 2 regulador do interferon	NS	NS
P03956	colagenase intersticial	+2,1	0,017
P06870	Calicreína-1	+1,2	0,001
P04264	Queratina_ tipo II citoesqueleto 1	NS	NS
Q3LHN0	Proteína 25-1 associada à queratina	NS	NS
P02788	Lactotransferrina	NS	NS
P31025	Lipocalina-1	-1,4	0,003
O15165	Proteína 4 contendo domínio do receptor de lipoproteína de baixa densidade classe A	+1,3	0,026
Q5SRD1	Subunidade de translocase de membrana interna de importação mitocondrial Tim23	+1,2	0,010
P59665	defensina 1 de neutrófilos	NS	NS
Q8NG83	Receptor olfativo 2M3	-1,3	0,001
Q8IUK5	Proteína 1 contendo domínio plexina	NS	NS
P01833	Receptor de imunoglobulina polimérico	NS	NS
Q6S8J3	Membro da família E do domínio de anquirina POTE	NS	NS
P0CG38	POTE membro da família do domínio anquirina I	NS	NS

P07737	Profilin-1	+1,3	<0,001
P12273	Proteína induzida por prolactina	-1,3	0,002
Q6P5S2	Homólogo de proteína LEG1	NS	NS
P05109	Proteína S100-A8	+1,3	0,011
P06702	Proteína S100-A9	+1,6	<0,001
Q6ZRM9	Proteína não caracterizada putativa FLJ46235	NS	NS
P02768	Albumina sérica	NS	NS
P02814	Proteína 3B regulada por andrógeno da glândula submandibular	NS	NS
Q9HC44	Proteína tipo vasculina 1	-1,8	0,009
Q9Y4P8	Proteína 2 de interação com fosfoinositida de domínio de repetição WD	NS	NS
P25311	Zinco-alfa-2-glicoproteína	NS	NS
Q96DA0	Proteína granular de zimogênio 16 homólogo B	NS	NS

Razão caso/controle: razão dos valores médios de abundância, sendo (-) e (+) mostrando, respectivamente, diminuição e aumento da expressão proteica nos indivíduos doentes (SM) em relação aos saudáveis; *: Valor de p quando $\leq 0,05$ em Teste t; NS: Valores estatisticamente não significantes.

Tabela 19. Proteínas salivares identificadas na comparação ControlexDMT2 (n=80)

Acesso	Descrição	Razão Caso/Controle	Valor de P*
P63267	Actina, músculo liso gama-entérico	NS	NS
P60709	Actina_citoplasmática 1	-1,2	0,03
P19961	Alfa-amilase 2B	NS	NS
Q562R1	Proteína tipo beta-actina 2	+1,7	<0,001
Q8N4F0	BPI que contém o membro da família B 2	NS	NS
P23280	Anidrase carbônica 6	+2,1	<0,001
Q9Y2G2	Proteína 8 contendo domínio de recrutamento de caspase	+1,6	0,01
Q9HC52	homólogo de proteína Chromobox 8	+1,4	0,02
Q6ZRS4	Proteína 129 contendo domínio de bobina enrolada	NS	NS
Q6ZMN8	Ciclina-l2	+1,5	0,001
P04080	Cistatina-B	NS	NS
P01036	Cistatina-S	NS	NS
P09228	Cistatina-as	+1,3	0,04
P01037	Cistatina-SN	NS	NS
Q9UP65	Fosfolipase A2 gama citosólica	+5,1	<0,001
Q8TEA8	D-aminoacil-tRNA desacilase 1	NS	NS
Q07507	Dermatopontina	NS	NS
A6NDY0	Proteína 2 de ligação de poliadenilato embrionário	-1,8	0,03
O95954	Formimidoltransferase-ciclodeaminase	NS	NS
Q05329	Glutamato descarboxilase 2	-2,1	0,008
P04406	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	NS	NS

P69905	Subunidade alfa da hemoglobina	NS	NS
P68871	Subunidade beta da hemoglobina	NS	NS
Q5VVJ2	Deubiquitinase MYSM1	-1,7	<0,001
O43364	Proteína Homeobox Hox-A2	NS	NS
P01876	Alfa 1 constante pesada de imunoglobulina	NS	NS
P01877	Alfa 2 constante pesada de imunoglobulina	NS	NS
P01857	Imunoglobulina constante pesada gama 1	NS	NS
P01860	Imunoglobulina constante pesada gama 3	NS	NS
P01861	Imunoglobulina constante pesada gama 4	NS	NS
P01871	Mu constante pesada de imunoglobulina	NS	NS
P01780	Variável pesada de imunoglobulina 3-7	NS	NS
P01591	Cadeia J de imunoglobulina	NS	NS
P01834	constante kappa de imunoglobulina	+1,3	0,04
P0DOX7	Cadeia leve kappa de imunoglobulina	+1,3	0,05
P0DOY3	Imunoglobulina lambda constante 3	NS	NS
P0DOX6	Cadeia pesada de imunoglobulina mu	NS	NS
Q9H1B7	Tipo de proteína de ligação ao fator 2 regulador do interferon	NS	NS
P03956	colagenase intersticial	NS	NS
P06870	Calicreína-1	+1,3	<0,001
P04264	Queratina_ tipo II citoesqueleto 1	NS	NS
Q3LHN0	Proteína 25-1 associada à queratina	+2,1	0,005
P02788	Lactotransferrina	NS	NS
P31025	Lipocalina-1	NS	NS
O15165	Proteína 4 contendo domínio do receptor de lipoproteína de baixa densidade classe A	NS	NS
O14925	Subunidade de translocase de membrana interna de importação mitocondrial Tim23	+1,3	<0,001
P59665	defensina 1 de neutrófilos	NS	NS
Q8NG83	Receptor olfativo 2M3	+1,2	0,005
Q8IUK5	Proteína 1 contendo domínio plexina	NS	NS
P01833	Receptor de imunoglobulina polimérico	+1,4	<0,001
Q6S8J3	Membro da família E do domínio de anquirina POTE	-1,3	<0,001
P0CG38	POTE membro da família do domínio anquirina I	NS	NS
P07737	Profilin-1	+2	0,01
P12273	Proteína induzida por prolactina	-1,3	0,001
Q6P5S2	Homólogo de proteína LEG1	NS	NS
P05109	Proteína S100-A8	+1,2	0,05
P06702	Proteína S100-A9	NS	NS
Q6ZRM9	Proteína não caracterizada putativa FLJ46235	NS	NS
P02768	Albumina sérica	-1,4	0,01
P02814	Proteína 3B regulada por andrógeno da glândula submaxilar	NS	NS
Q9HC44	Proteína tipo vasculina 1	NS	NS
Q9Y4P8	Proteína 2 de interação com fosfoinositida de domínio de repetição WD	NS	NS
P25311	Zinco-alfa-2-glicoproteína	+1,1	<0,001
Q96DA0	Proteína granular de zimogênio 16 homólogo B	-1,5	0,055132
Razão caso/controle: razão dos valores médios de abundância, sendo (-) e (+) mostrando, respectivamente, diminuição e aumento da expressão proteica nos indivíduos doentes			

(DMT2) em relação aos saudáveis; *: Valor de p quando $\leq 0,05$ em Teste t; NS: Valores estatisticamente não significantes.

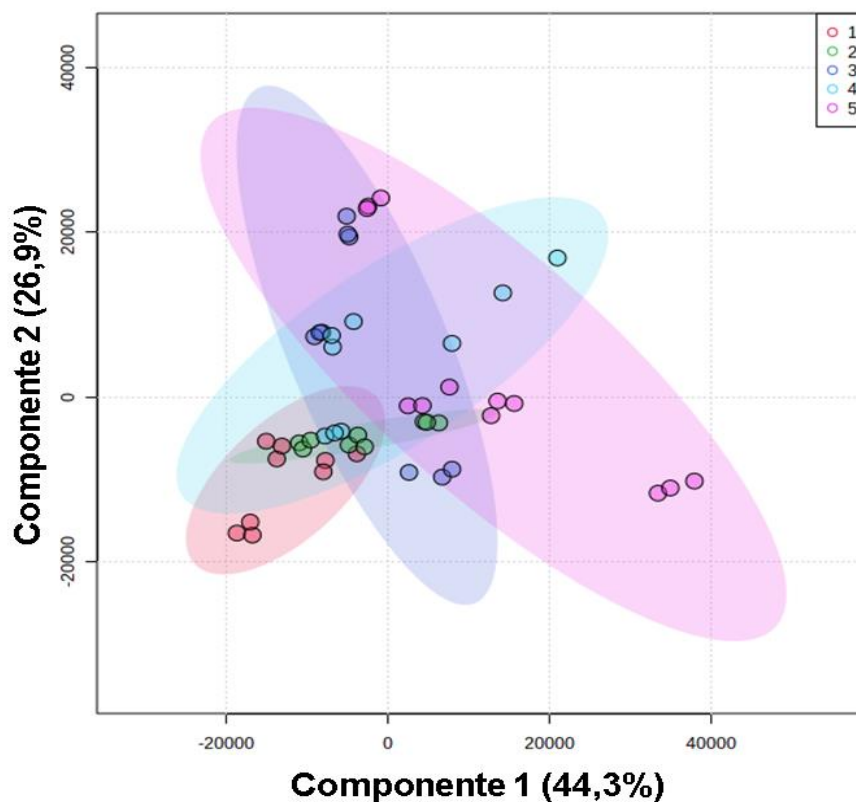
8.8- Análises estatísticas das proteínas identificadas nas amostras plasmáticas e salivares

Através da ferramenta online MetaboAnalyst realizamos as análises estatísticas do nosso estudo. Das 203 proteínas plasmáticas identificadas no estudo, 107 apresentaram alteração igual ou superior a 1,5 (induzidas ou reprimidas) na comparação entre todos os grupos. Vinte e oito identificadas com alteração igual ou superior a 1,5 na comparação ControlexDMT2. Já na comparação ControlexSM, foram identificadas 53 proteínas com abundâncias relativas diferentes estatisticamente.

Na identificação das proteínas salivares, 37 de 64 proteínas foram identificadas com modificação igual ou superior a 1,5 na comparação de todos os grupos, 8 proteínas na comparação ControlexDMT2, enquanto na comparação ControlexSM foram identificadas 12 modificações.

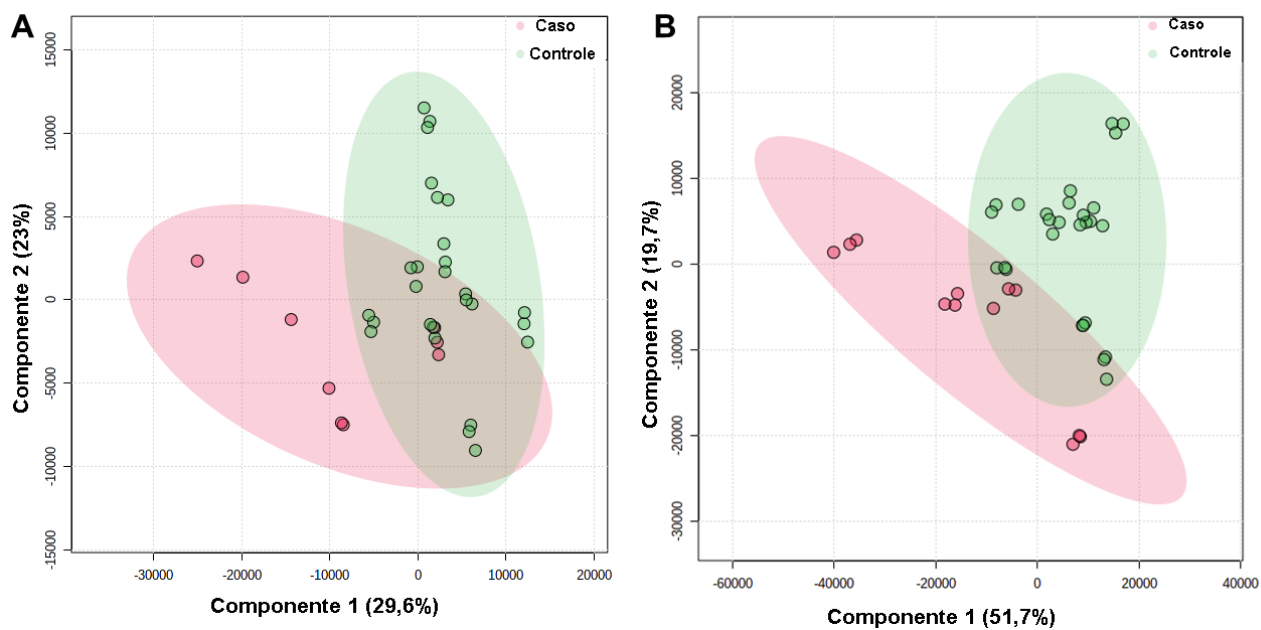
Para visualizar as diferenças entre todas as proteínas do grupo Caso e Controle foi realizado as análises Discriminante de Mínimos Quadrados Parcial Supervisionada (PLS-DA) e *Heatmap*. A análise PLS-DA com os dados de proteoma plasmático mostrou que os 5 grupos estudados (Figura 3) se sobrepõem entre si, estando o grupo DMT2 mais afastado dos demais. O mesmo ocorreu quando comparamos os dados de ControlexSM e ControlexDMT2 (Figura 4A e 4B). Porém quando comparamos Controle x Caso é possível observar uma melhor separação entre os grupos, tanto para SM quanto para DMT2 em relação aos 5 grupos separados.

Figura 3. PLS-DA cluster das amostras plasmáticas dos 5 grupos estudados.



Legenda: 1: Normal; 2: Sobrepeso; 3: Obeso; 4: SM; 5: DMT2

Figura 4. PLS-DA cluster das amostras plasmáticas dos grupos ControlexSM (A) e ControlexDMT2 (B).

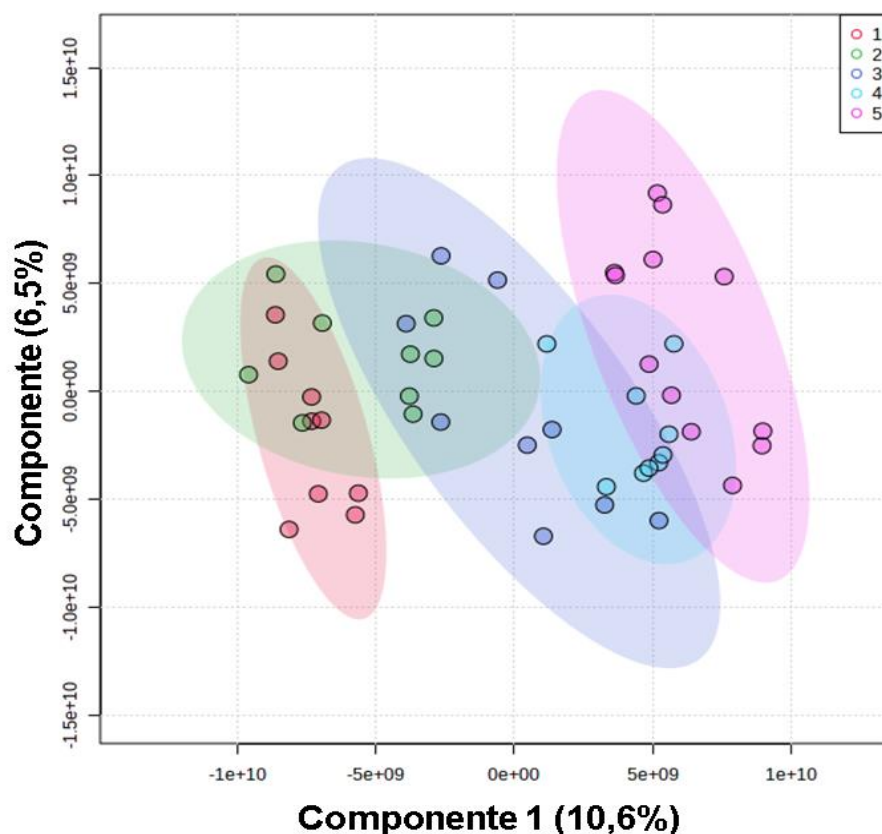


Legenda: A) Caso: SM; B) Caso: DMT2

Nas amostras salivares só foi possível realizar o PLS-DA da comparação entre os 5 grupos (Figura 5), e no ControlexDM (Figura 6), sendo que ambas as comparações mostraram que os grupos se comportam de forma diferente, principalmente na comparação entre os 5 grupos de estudo, onde cada grupo ficou bem delimitado. Isso mostra que as proteínas salivares conseguem diferenciar bem os 5 grupos estudados. Além disso, em comparação às amostras plasmáticas, podemos observar que a saliva pode ser uma fonte que reflete melhor as diferenças entre os grupos estudados.

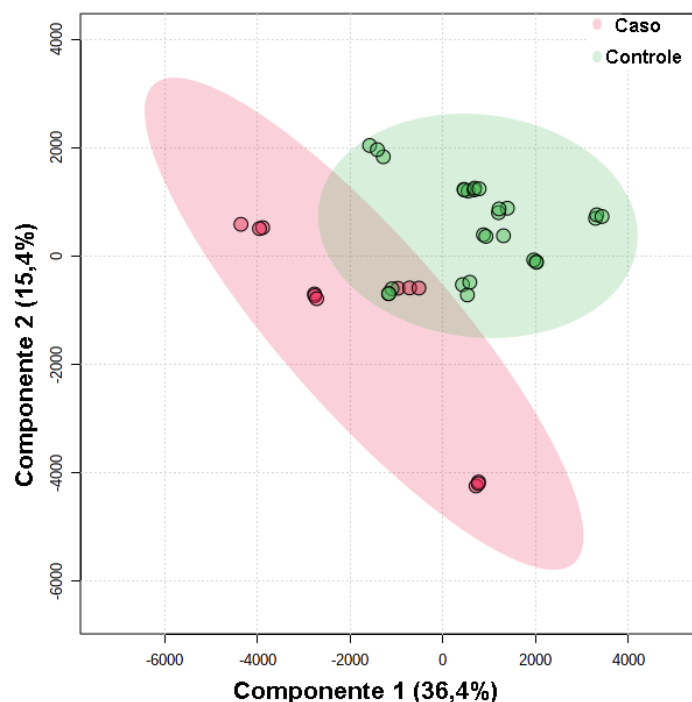
A análise dos grupos, através do PLS-DA, na comparação ControlexSM não foi possível de ser realizada, pois a modelagem do PLS-DA não é adequada para essa matriz de dados, uma vez que ocorreu uma inversão entre os valores do componente 1 e 2, o que inviabiliza a análise.

Figura 5. PLS-DA cluster das amostras salivares dos 5 grupos da pesquisa.



Legenda: 1: Normal; 2: Sobrepeso; 3: Obeso; 4: SM; 5: DMT2

Figura 6. PLS-DA cluster das amostras salivares do grupo ControlexDMT2.



Legenda: Caso: DMT2; Controle: Saudáveis

Com base no PLS-DA foi realizado a análise de VIP score (*Variable importance in projection score*) que mede a importância de uma variável para a diferenciação dos grupos estudados, avaliando a contribuição de cada variável. Essa análise foi realizada na comparação das amostras plasmáticas entre todos os grupos (Figura 7), e nas duas comparações entre grupos casos e controles (Figura 8A e 8B).

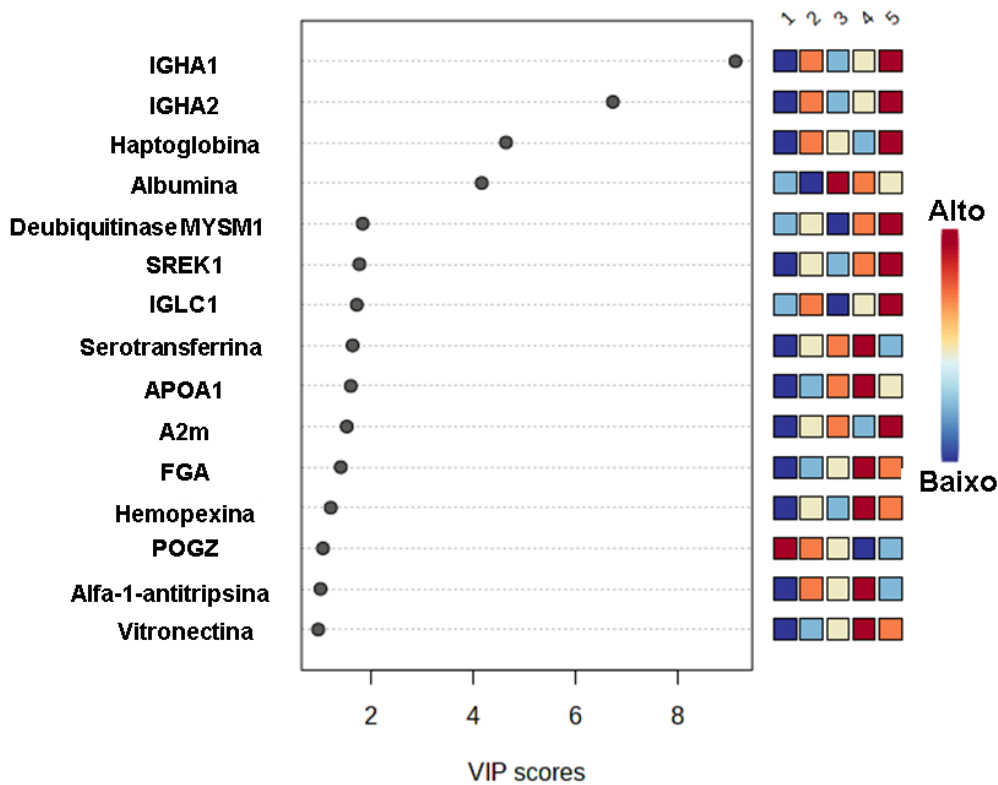
As proteínas que mais contribuíram para as separações entre os cinco grupos (Figura 7) nas amostras plasmáticas foram as proteínas IGHA1 e 2, Haptoglobulina e Albumina. Na comparação Controle x SM (Figura 8A), as proteínas que mais influenciaram na separação dos grupos foram: Alfa-1-antitripsina, Apolipoproteína A-I e Seroalbumina. Quando comparamos Controle x DMT2 (Figura 8B), as proteínas IGHA1 e 2, Haptoglobulina e IGLC2, foram as que mais contribuíram para a separação dos grupos.

Nas amostras salivares foi realizado o Vip score para as amostras dos 5 grupos de estudo (Figura 9) e para comparação ControlexDMT2 (Figura 10) na amostra de saliva. Não foi possível fazer o VIP score para a comparação ControlexSM da amostra

salivar, pois como foi dito anteriormente a modelagem do PLS-DA não era adequada para esses dados.

Ao compararmos os 5 grupos de estudo (Figura 9) separados das amostras salivares, as proteínas Calicreína 1, S100-A8, CDO1 apresentaram grande impacto na diferenciação dos 5 grupos. Na comparação Controle x DMT2 (Figura 10), as proteínas WIP2I, IGKC e PIGR tiveram grande impacto na diferenciação dos grupos Controle e DMT2.

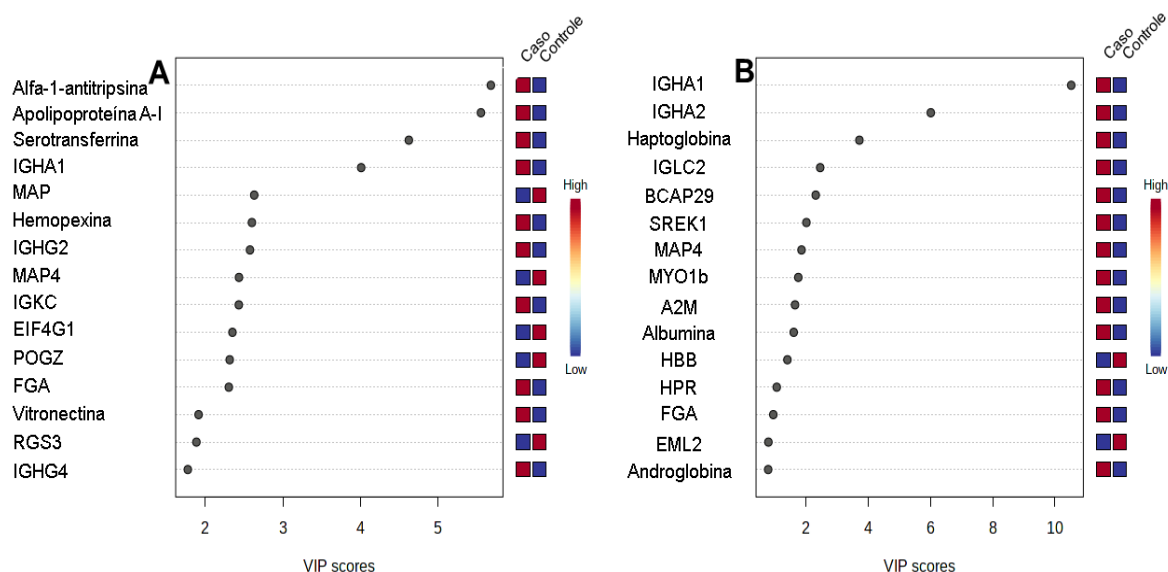
Figura 7. Vip score das quinze proteínas plasmáticas mais importantes para a diferenciação entre os 5 grupos estudados.



Legenda: 1: Normal; 2: Sobrepeso; 3: Obeso; 4: SM; 5: DMT2

IGHA1: Imunoglobulina pesada constante alfa 1; IGHA2: Imunoglobulina pesada constante alfa 2
 MYSM1: Deubiquitinase MYSM1; SREK1: Splicing regulador de proteína rica em glutamina/lisina
 1; IGLC1: Imunoglobulina lambda constante 1; ST: sorotransferrina; APOA1: Apolipoproteína A-
 I; A2M: Alfa-2-macroglobulina; FGA: Cadeia alfa do fibrinogênio; POGZ: Elemento transponível
 Pogo com domínio ZNF

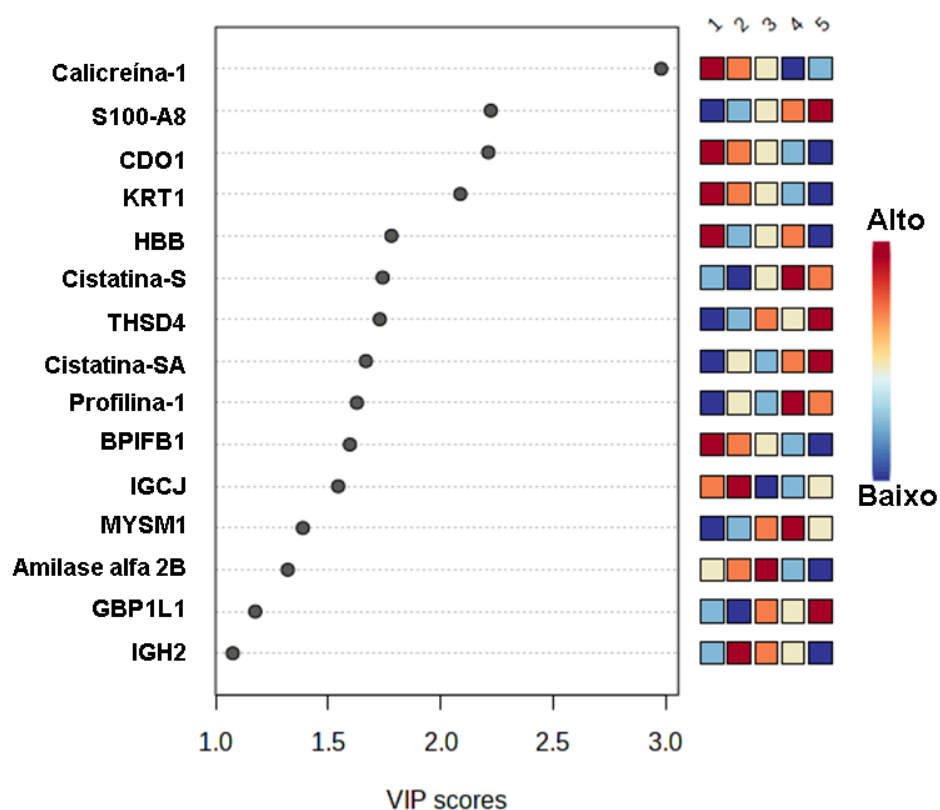
Figura 8. Vip score. A) 15 proteínas mais importantes para a diferenciação entre os grupos ControlexSM na amostra plasmática e B) 15 proteínas mais importantes que diferenciam os grupos ControlexDMT2 na amostra plasmática.



Legenda: A) Caso: SM; B) Caso: DMT2

MAP: Proteína associada a microtúbulos; MAP4: Proteína 4 associada a microtúbulos; IGKC: Imunoglobulina constante kappa; EIF4G1: Fator de iniciação de tradução eucariótica 4 gama 1; POGOZ: Elemento transponível Pogo com domínio ZNF; FGA: Cadeia alfa de fibrinogênio; RGS3: Regulador da sinalização da proteína G 3; IGHG4: Imunoglobulina constante pesada gama 4; IGHG1: Alfa 1 constante pesada de imunoglobulina; IGHG2: Alfa 2 constante pesada de imunoglobulina; IGLC2: Imunoglobulina lambda constante 2; BCAP29: Proteína associada ao receptor de células B 29; SREK1: Splicing regulador de glutamina/proteína rica em lisina 1; MAP4: Proteína 4 associada a microtúbulos; MYO1b: Miosina-Ib não convencional; A2m: Alfa-2-macroglobulina; HBB: Subunidade beta da hemoglobina; HPR: Proteína relacionada à haptoglobina; EML2: Proteína 2 associada a microtúbulos de equinoderme

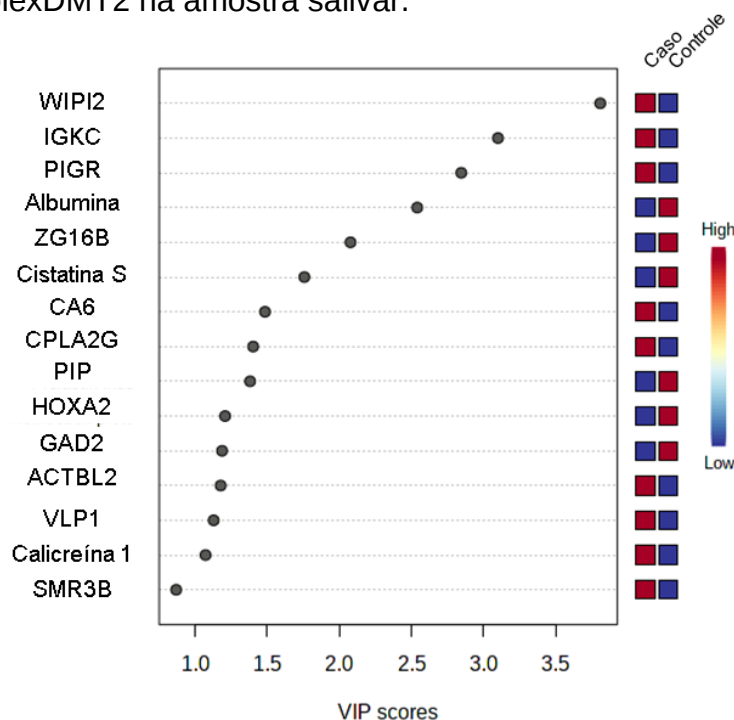
Figura 9. Vip score. Quinze proteínas mais importantes que diferenciam os 5 grupos de estudo na amostra salivar.



1: Normal; 2: Sobrepeso; 3: Obeso; 4: SM; 5: DMT2

CDO1: Cisteína dioxigenase tipo 1; KRT1: Queratina_ tipo II citoesqueleto 1; HBB: subunidade beta da hemoglobina; THSD4: proteína 4 contendo domínio de trombospondina tipo 1; BPIFB1: membro 2 da família B contendo a dobra BPI; IGCJ: cadeia J de imunoglobulina; MYSM1: Deubiquitinase MYSM1; GBP1L1: proteína tipo vascular 1; IGH2: Imunoglobulina pesada constante alfa 2.

Figura 10. Vip score. Quinze proteínas mais importantes que diferenciam os grupos ControlexDMT2 na amostra salivar.



Legenda: Caso: DMT2

WIPI2: Proteína 2 de interação com fosfoinositida de domínio de repetição WD; IGKC: Imunoglobulina constante kappa; PIGR: Receptor de imunoglobulina polimérico; ZG16B: Proteína granular de zimogênio 16 homólogo B; CA6: Anidrase carbônica 6; CPLA2G: Fosfolipase A2 gama citosólica; PIP: Proteína induzida por prolactina; HOXA2: Proteína Homeobox Hox-A2; GAD2: Glutamato descarboxilase 2; ACTBL2: Proteína tipo beta-actina 2; VLP1: Proteína tipo vasculina 1; SMR2B: Proteína 3B regulada por andrógeno da glândula submaxilar.

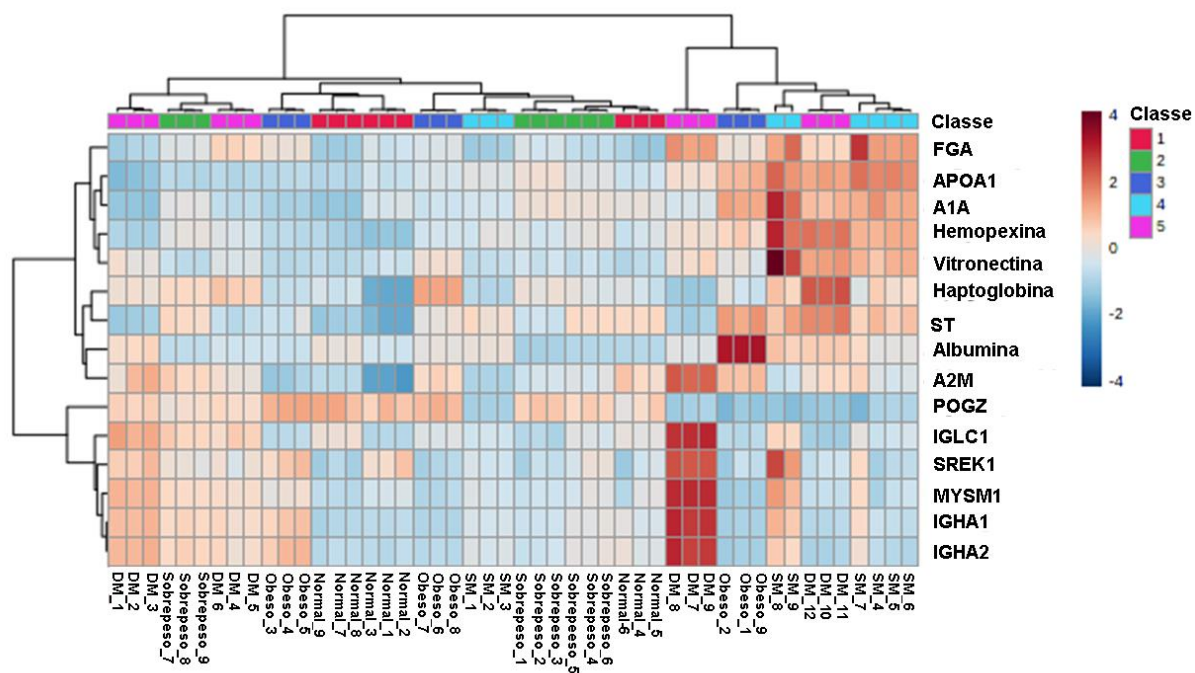
Assim como o PLS-DA, os gráficos de *Heatmap* também foram usados para visualizar diferenças entre os grupos. Todos os gráficos de *Heatmap*, com exceção da Figura 16, foram realizados com base não Vip socorre. O heatmap em comparação ao VIP score, nos permite uma melhor visualização de como as proteínas são modificadas dentro de cada grupo.

A análise da Figura 11 nos mostra que os grupos se dividem em vários clusters, onde os grupos DMT2 e SM se agruparam em mesmo cluster, se tendo proteínas como FGA, APOAI e Hemopexina mais abundantes nos grupos SM destacando dos demais amostras. Nessa análise temos dois clusters principais, onde na direita a maior

parte dos voluntários com SM e metade dos diabéticos se encontram. Na comparação Controle x SM (Figura 12), podemos observar que as proteínas TF, VTN, FGA e APOA1 estão mais abundantes no grupo SM, do que no Controle. Na figura 12 as amostras se separam em 2 clusters principais, estando a maior parte do grupo controle separada do caso. Na figura 13, Controle x DMT2, as proteínas A2M, IGLC2 e MAP4 apresentaram um aumento no grupo com DMT2 em comparação ao Controle. A maior parte do grupo controle se apresenta a parte do caso, apresentando características mais distintas.

Em nossas amostras salivares, a análise dos 5 grupos separados (Figura 14), mostrou um agrupamento das amostras do Peso Normal e Sobrepeso, apresentando um aumento da Calicreína-1 e KRT1. Dois clusters principais são observados, onde no da direita há do grupo sobrepeso e obeso, além de todas as amostras da SM e DMT2. Na comparação Controle x SM (Figura 15), realizada com base no Test T já que não foi possível fazer a análise de PLS-DA e consequentemente de VIP score, o agrupamento dos voluntários com SM nos mostrou um aumento Lipocalina 1 e Cistatina SN, se separando em dois clusters, um com as amostras de voluntários controle e outro com o caso. Na comparação Controle x DMT2 (Figura 16) foi observado uma diminuição das GAD 2 e albumina na DMT2 em mais de dois clusters. Metade das amostras de DMT2 se agruparam em um cluster separado das demais amostras.

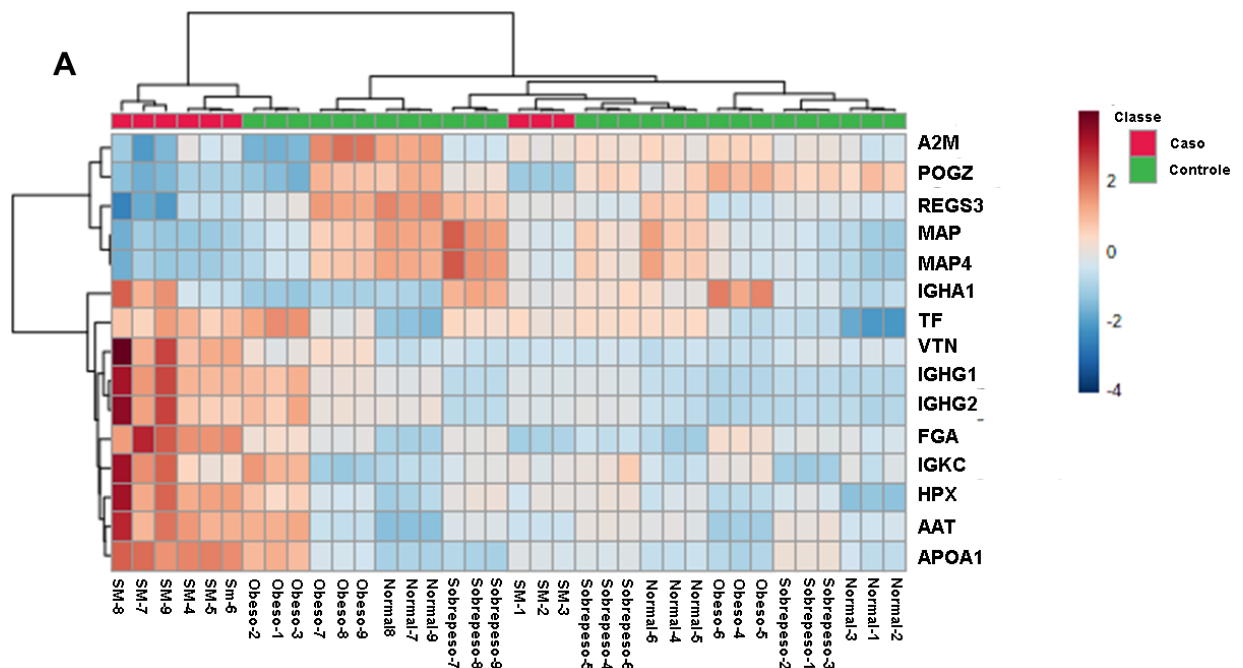
Figura 11. Heatmap mostrando as 15 proteínas plasmáticas dos grupos 5 grupos estudados, baseadas na análise de Vip score.



Legenda: 1: Normal; 2: Sobrepeso; 3: Obeso; 4: SM; 5: DMT2

IGHA1: Imunoglobulina pesada constante alfa 1; IGHA2: Imunoglobulina pesada constante alfa 2; MYSM1: Deubiquitinase MYSM1; SREK1: Splicing regulador de proteína rica em glutamina/lisina 1; IGLC1: Imunoglobulina lambda constante 1; ST: sorotransferrina; APOA1: Apolipoproteína A-I; A2M: Alfa-2-macroglobulina; FGA: Cadeia alfa do fibrinogênio; POGZ: Elemento transponível Pogo com domínio ZNF.

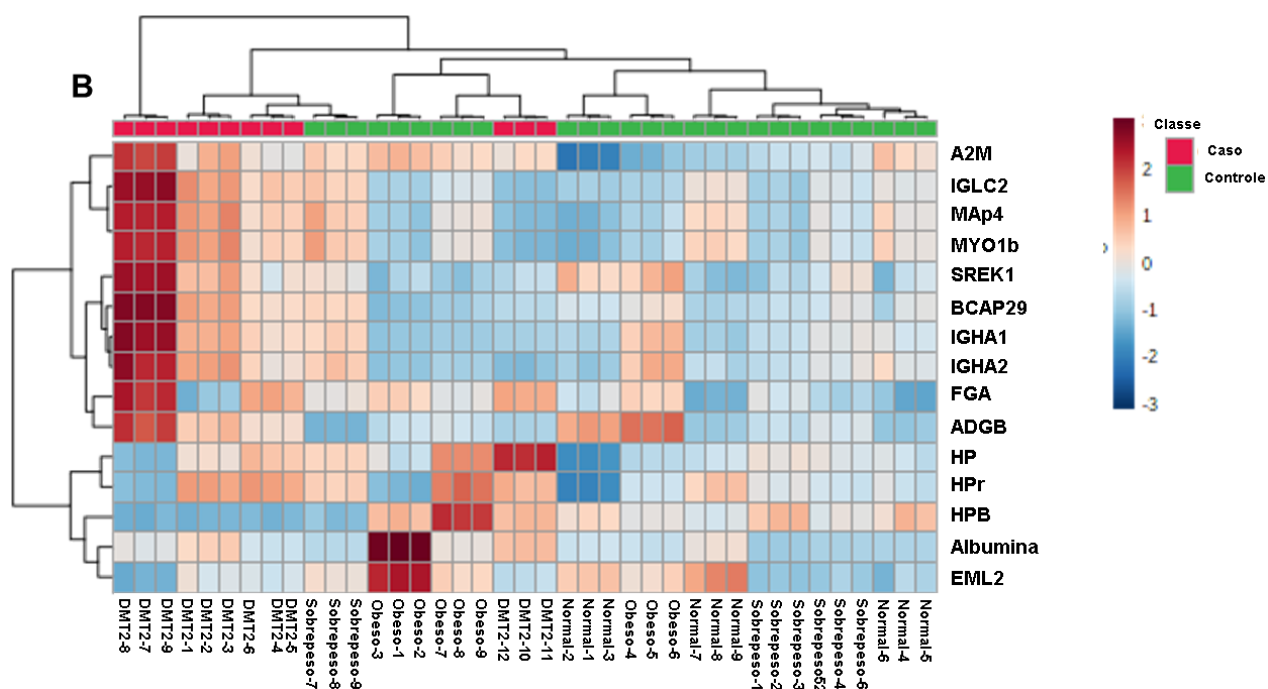
Figura 12. Heatmap mostrando as 15 proteínas plasmáticas dos grupos ControlexSM, baseadas na análise de Vip score



Legenda: Caso: SM

IGHA1: Alfa 1 constante pesada de imunoglobulina; AAT: Alfa-1-antitripsina APOA1: Apolipoproteína A-I; HPX:Hemopexina; VTN: Vitronectina; TF: Serotransferrina; MAP: Proteína associada a microtúbulos; IGHG2: Imunoglobulina constante pesada gama 2; MAP4: Proteína 4 associada a microtúbulos; IGKC: Imunoglobulina constante kappa; EIF4G1: Fator de iniciação de tradução eucariótica 4 gama 1; POGOZ: Elemento transponível Pogo com domínio ZNF; FGA: Cadeia alfa de fibrinogênio; RGS3: Regulador da sinalização da proteína G 3; IGHG4: Imunoglobulina constante pesada gama 4.

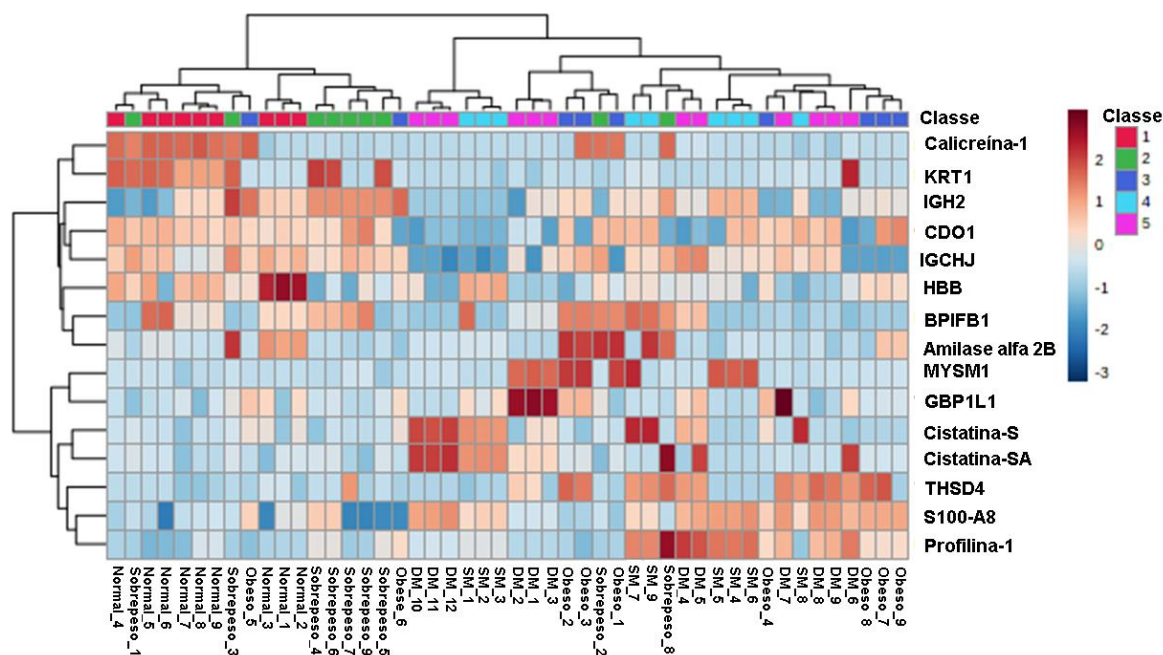
Figura 13. Heatmap mostrando as 15 proteínas plasmáticas dos grupos ControlexDMT2, baseadas na análise de Vip score



Legenda: Caso: DMT2

IGHA1: Alfa 1 constante pesada de imunoglobulina; IGHA2: Alfa 2 constante pesada de imunoglobulina; IGLC2: Imunoglobulina lambda constante 2; BCAP29: Proteína associada ao receptor de células B 29; SREK1: Splicing regulador de glutamina/proteína rica em lisina 1; MAP4: Proteína 4 associada a microtúbulos; MYO1b: Miosina-Ib não convencional; A2m: Alfa-2-macroglobulina; HBB: Subunidade beta da hemoglobina; HPR: Proteína relacionada à haptoglobina; FGA: Cadeia alfa de fibrinogênio; EML2: Proteína 2 associada a microtúbulos de equinoderme HP: Haptoglobina; ADGB: Androglobin.

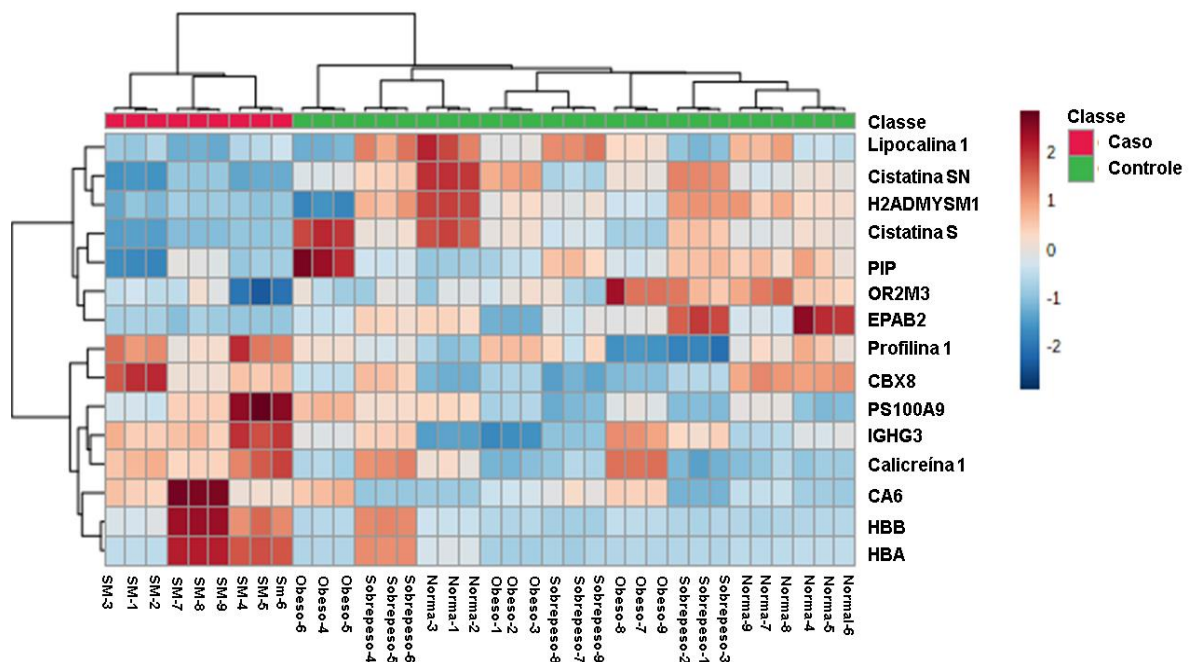
Figura 14. Heatmap mostrando as 15 proteínas salivares dos grupos 5 grupos estudados, baseadas na análise de Vip score.



Legenda: 1: Normal; 2: Sobrepeso; 3: Obeso; 4: SM; 5: DMT2

CDO1: Cisteína dioxigenase tipo 1; KRT1: Queratina_ tipo II citoesqueleto 1; HBB: subunidade beta da hemoglobina; THSD4: proteína 4 contendo domínio de trombospondina tipo 1; BPIFB1: membro 2 da família B contendo a dobra BPI; IGCJ: cadeia J de imunoglobulina; MYSM1: Deubiquitinase MYSM1; GBP1L1: proteína tipo vascular 1; IGH2: Imunoglobulina pesada

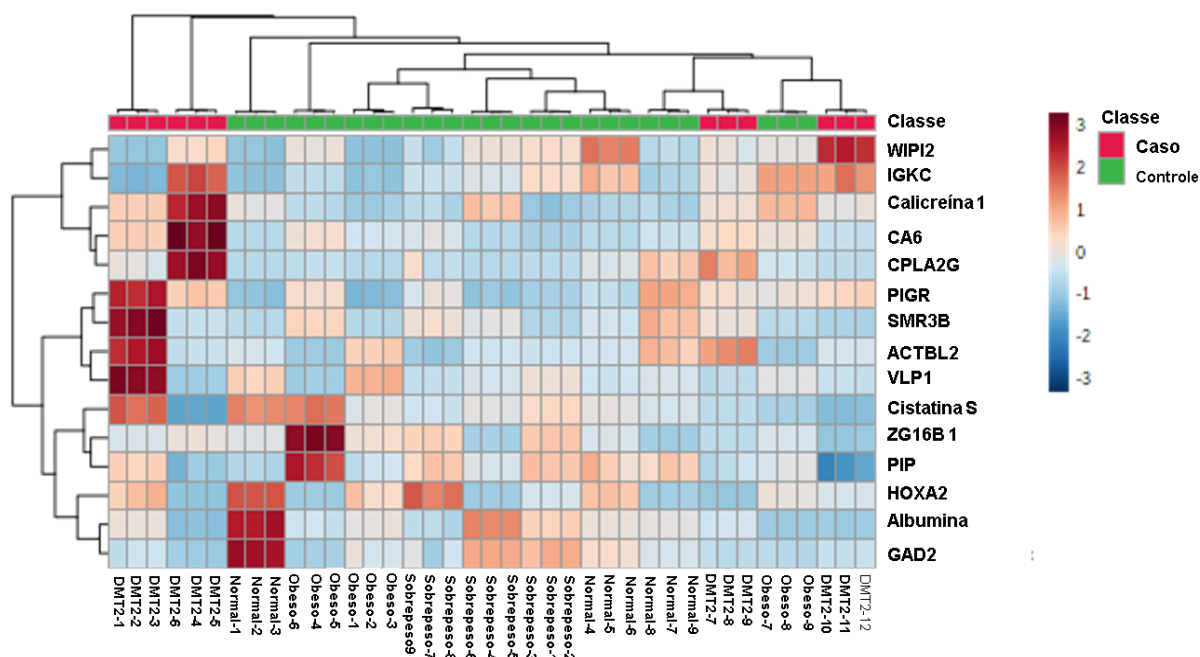
Figura 15. Heatmap mostrando as 15 proteínas salivares dos grupos ControlexSM, baseadas na análise de Teste T.



Legenda: Caso: SM

H2ADMYSM: Histona H2A deubiquitinase MYSM1; PIP: Proteína induzida por prolactina; OR2M3: Receptor olfativo 2M3; EPAB2: Proteína de ligação de poliadenilato embrionário 2; CBX8: homólogo 8 da proteína Chromobox; PS100A9: proteína S100-A9; IGHG3: Imunoglobulina constante pesada gama 3; CA6: Anidrase carbônica 6; HBB: subunidade beta da hemoglobina;

Figura 16. Heatmap mostrando as 15 proteínas salivares dos grupos ControlexDMT2, baseadas na análise de Vip socre



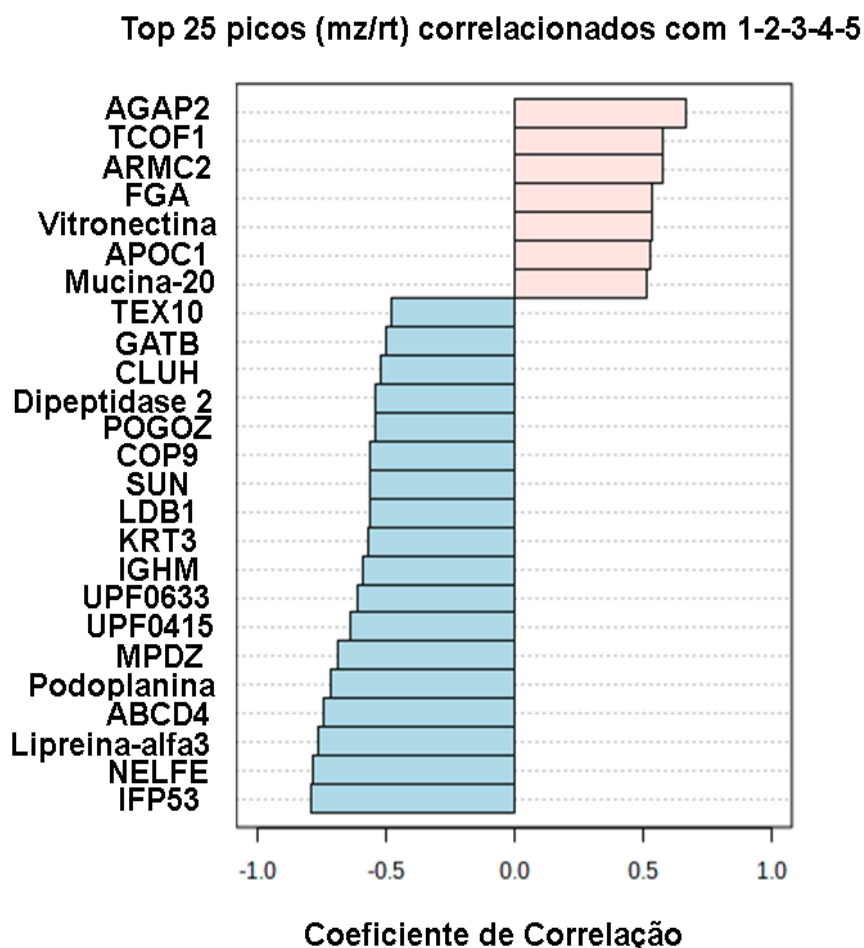
Legenda: Caso: DMT2

WIPI2: Proteína 2 de interação com fosfoinositida de domínio de repetição WD; IGKC: Imunoglobulina constante kappa; PIGR: Receptor de imunoglobulina polimérico; ZG16B: Proteína granular de zimogênio 16 homólogo B; CA6: Anidrase carbônica 6; CPLA2G: Fosfolipase A2 gama citosólica; PIP: Proteína induzida por prolactina; HOXA2: Proteína Homeobox Hox-A2; GAD2: Glutamato descarboxilase 2; ACTBL2: Proteína tipo beta-actina 2; VLP1: Proteína tipo vascular 1; SMR2B: Proteína 3B regulada por andrógeno da glândula submaxilar.

A análise de *Pattern Hunter* foi aplicada para identificar proteínas que seguem um padrão específico para os grupos de estudo. A comparação com as proteínas plasmáticas dos 5 grupos (Figura 17) mostrou que AGAP2, TCOF1, NELFE e ABCD4, são proteínas importantes na separação das amostras de SM e DMT2. Na comparação Controle x SM (Figura 18A), as proteínas LDB1, CLUH, Mucina-20 e NCOR2, foram destacadas como os principais fatores para diferenciar indivíduos doentes dos saudáveis. Na Figura 18B, comparação Controle x DMT2, as proteínas E3UPT, Liprina- alfa3 e Vitronectina, apresentaram grande impacto na distinção do grupo DMT2. Todas estas proteínas que se destacaram em cada análise comparativa como fatores de diferenciação entre os grupos mostram um potencial na utilização como bioindicadores.

Ao realizarmos as comparações salivares, podemos observar que as proteínas S 100-A8, Profilina 1 e Calicreína-1 apresentaram um padrão de alterações específicas de acordo com o IMC e pela presença da SM e DMT2 (Figura 19). Na comparação Controle x SM (Figura 20A), as proteínas Cistatina S/SN e HBA, foram destacadas como impactantes na distinção da SM, tendo as duas Cistatinas aumentado no Controle e a HBA diminuído a SM. Quando comparamos a DMT2 com o Controle (Figura 20B), a MYSM1, POTEE e PIR mostraram padrão específico para presença da DMT2, tendo a MYSM1 e POTEE aumentado no Controle e a PIR diminuído na DMT2.

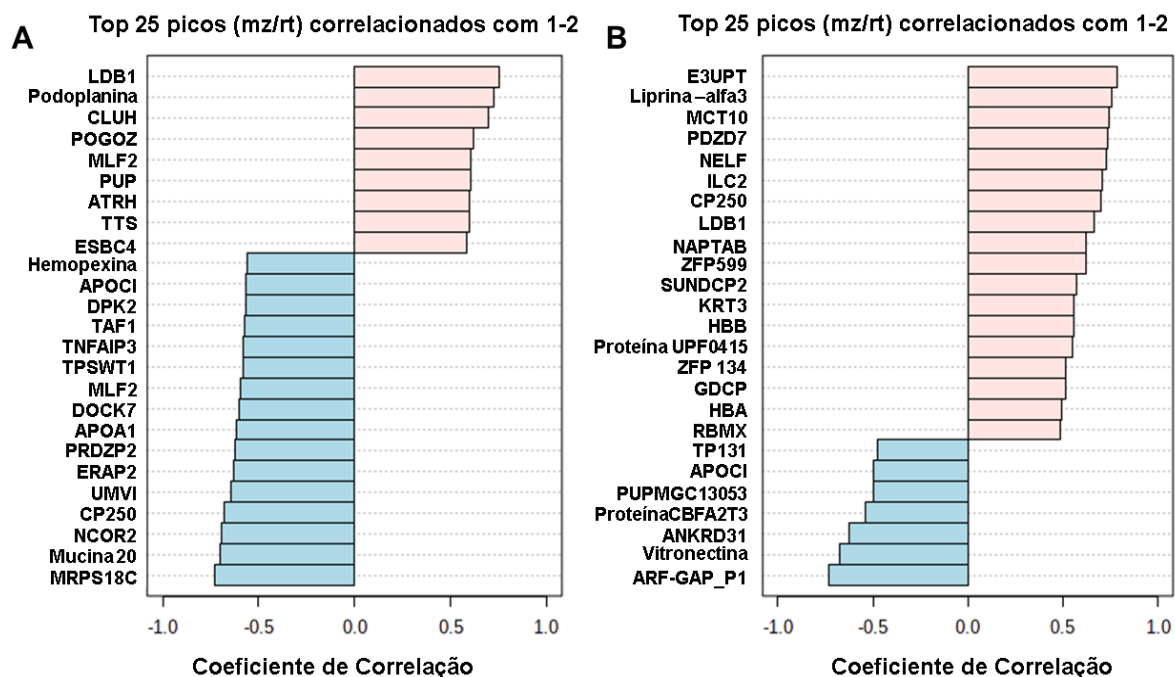
Figura 17. Análise de *Pattern Hunter* das 25 melhores proteínas plasmáticas dos 5 grupos estudados, usando Correlação de Pearson r.



Legenda: 1: Normal; 2: Sobrepeso; 3: Obeso; 4: SM; 5: DMT2

AGAP2: Arf-GAP com repetição GTPase_ ANK e proteína 1 contendo domínio PH; TCOF1: Proteína de Melaço; ARMC2: Proteína 8 contendo repetição de tatu; FGA: Cadeia alfa do fibrinogênio; TEX10: Proteína expressa no testículo 10; GATB: Subunidade B_mitocondrial de glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase; CLUH: Homólogo de proteína de mitocôndria agrupada; POGOZ: Elemento transponível Pogo com domínio ZNF; COP9: Subunidade 8 do complexo sinalossoma COP9; SUN: Proteína 2 contendo o domínio SUN; LDB1: Ligação de domínio LIM 1; KRT3: Queratina _ citoesqueleto tipo II 3; IGHM: Constante pesada de imunoglobulina um; UPF0633: Proteína UPF0633 putativa MGC21881; UPF0415: UPF0415 proteína C7orf25; MPDZ: Proteína 7 contendo domínio PDZ; ABCD4: Transportador lisossômico de cobalamina ABCD4; NELFE: Fator de alongamento negativo E; IFP53: Triptofano-tRNA ligase, citoplasmática.

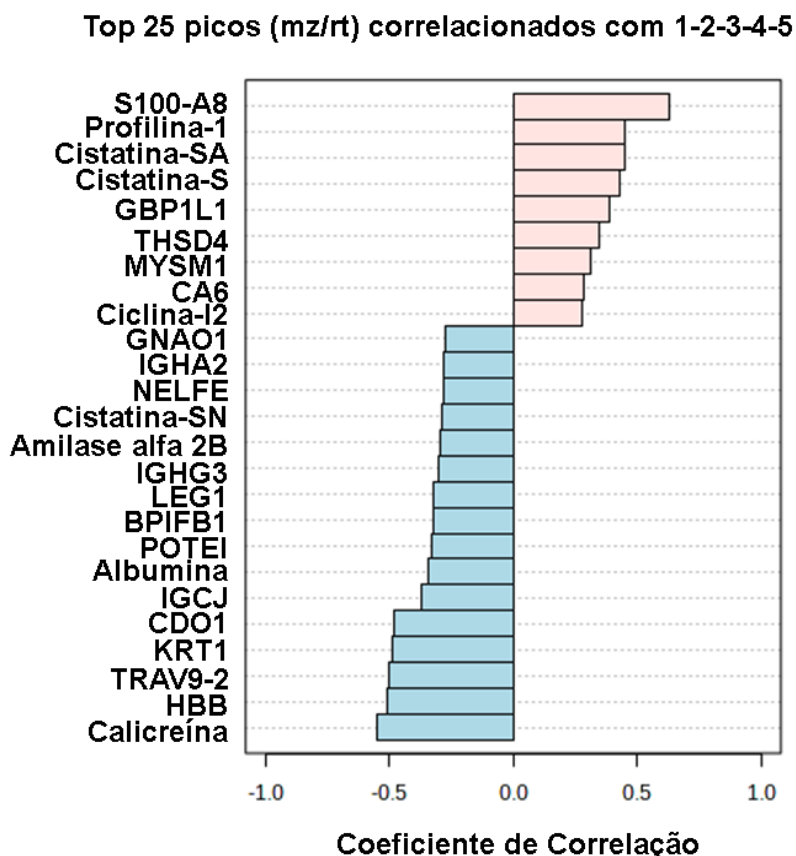
Figura 18. Análise de *Pattern Hunter* das 25 melhores proteínas, usando Correlação de Spearman. Amostra plasmática ControlexSM (A) e ControlexDMT2 (B).



Legenda: A) Caso: SM; B) Caso: DMT2

APOA1: Apolipoproteína A-I; "MRPS18C: Proteína ribossômica 28S S18c_ mitocondrial"; ANKRD1: Repetição de anquirina e proteína 1 contendo domínio de dedo de zinco; APOCIII: Apolipoproteína C-III; ARF-GAP: Arf-GAP com repetição GTPase_ ANK e proteína 1 contendo domínio PH; BCAP29: proteína 29 associada ao receptor de células B; CP250: proteína centrossomal 250kDa
DIPK2A: Domínio de proteína quinase divergente 2ª; DOCK7: Dedicador da proteína citocinese 7; E3UPT: E3 ubiquitina-proteína transferase RMND5B; ERAP2: aminopeptidase 2 do retículo endoplasmático; ESBC4: Cotransportador de bicarbonato de sódio eletrogênico 4; FGA: cadeia alfa do fibrinogênio; GDCP: proteína contendo o domínio GLOBIN; HBA: subunidade alfa da hemoglobina; HBB: subunidade beta da hemoglobina; IGHA1: Imunoglobulina pesada constante alfa 1; ILC2: Imunoglobulina lambda constante 2; KRT3: Queratina_ tipo II citoesqueleto 3; LDB1: ligação de domínio LIM 1; Liprin-alfa-3; MCT10: Transportador de monocarboxilato 10; MLF2: Fator de leucemia mielóide 2; NAPTAB: N-acetilglucosamina-1-fosfotransferase subunidades alfa/beta; NCOR2: Corepressor do receptor nuclear 2; NELFE: Fator de alongamento negativo E; PDZD7: proteína 7 contendo domínio PDZ; POGOZ: Elemento transponível Pogo com domínio ZNF; PRDZP2: proteína dedo de zinco de domínio PR 2; Proteína UPF0415: proteína UPF0415 C7orf25; RBMX: RNA-binding motif protein_ X cromossomo; SUNDCP2: proteína 2 contendo o domínio SUN; TAF1: Subunidade 1 do fator de iniciação da transcrição TFIID; TMEM87A: proteína transmembranar 87ª; TNFAIP3: proteína 3 induzida pelo fator de necrose tumoral alfa; TPSWT1: Proteína de transcrição SWT1; Transportador de amônio Rh tipo C; TTS: triptofanil-tRNA sintetase; UMVI: Miosina-VI não convencional; Vitronectina; ZFP 599: Proteína dedo de zinco 599; ZFP 707: Proteína dedo de zinco 707

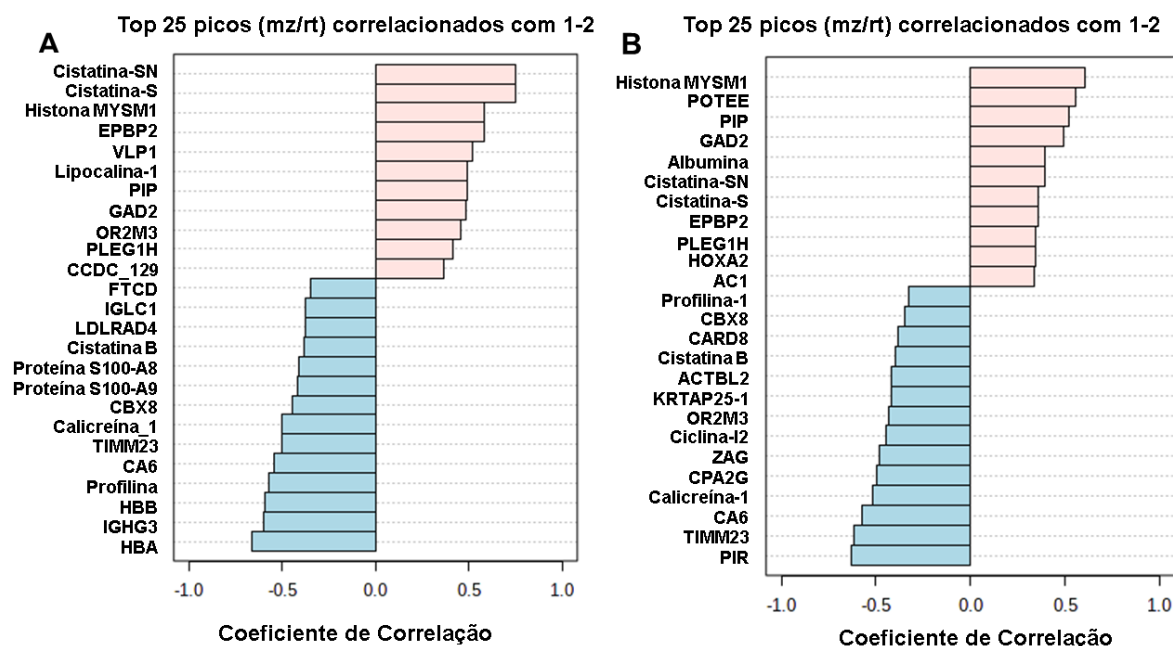
Figura 19. Análise de *Pattern Hunter* das 25 melhores proteínas salivares dos 5 grupos estudados, usando Correlação de Pearson r.



Legenda: 1: Normal; 2: Sobrepeso; 3: Obeso; 4: SM; 5: DMT2

GBP1L1: proteína tipo vasculina 1; THSD4: proteína 4 contendo domínio de trombospondina tipo 1; MYSM1: Deubiquitinase MYSM1; CA6: Anidrase carbônica; GNAO1: Proteína G(o) de ligação ao nucleotídeo guanina subunidade alfa; IGH2: Imunoglobulina pesada constante alfa 2; NELFE: Fator de alongamento negativo E; IGHG3: Imunoglobulina gama constante pesada 3; LEG1: Proteína homóloga LEG1; BPIFB1: membro 2 da família B contendo a dobra BPI; POTEI: membro da família de domínio de anquirina POTE I; IGCJ: cadeia J de imunoglobulina; CDO1: Cisteína dioxigenase tipo 1; KRT1: Queratina_ tipo II citoesqueleto 1; TRAV9-2: receptor de células T alfa variável 9-2; HBB:

Figura 20. Análise de *Pattern Hunter* das 25 melhores proteínas, usando Correlação de Spearman. Amostra salivar ControlexSM (A) e ControlexDMT2 (B).



Legenda: A) Caso: SM; B) Caso: DMT2

CARD8: Proteína 8 contendo domínio de recrutamento de caspase; AC1: Actina_ citoplasmática 1; ACTBL2: Proteína tipo beta-actina 2; CA6: anidrase carbônica 6; Calicreína-1; CBX8: homólogo 8 da proteína Chromobox; CCDC_129: Proteína 129 contendo domínio espiral enrolado; CPA2G: Fosfolipase citosólica A2 gama; EPBP2: Proteína de ligação de poliadenilato embrionário 2; FTCD: Formimidoiltransferase-ciclodaminase; GAD2: Glutamato descarboxilase 2; HBA: subunidade alfa da hemoglobina; HBB: subunidade beta da hemoglobina; Histona MYSM1: Histona H2A deubiquitinase MYSM1; HOXA2: Proteína Homeobox Hox-A2; IGHG3: gama constante pesada de imunoglobulina 3; IGLC1: cadeia leve de imunoglobulina lambda-1; KRTAP25-1: proteína associada à queratina 25-1; LDLRAD4: proteína 4 contendo o domínio do receptor de lipoproteína de baixa densidade classe A; OR2M3: Receptor olfativo 2M3; PIP: Proteína induzida por prolactina; PIR: Receptor de imunoglobulina polimérica; PLEG1H: Homólogo da proteína LEG1; POTE: membro da família de domínio de anquirina POTE E; PIP: Proteína induzida por prolactina; TIMM23: Subunidade de translocase de membrana interna de importação mitocondrial Tim23; VLP1: Proteína tipo vasculina 1; ZAG: zinco-alfa-2-glicoproteína.

9 - DISCUSSÃO

9.1 - Dados antropométricos e demográficos da segunda população de estudo dos 5 grupos de estudo.

A avaliação dos dados demográficos nos indicou que os parâmetros idade e nível de escolaridade apresentaram diferenças significativas entre os grupos avaliados. Podemos observar que a idade avançada é um fator diretamente relacionado com o aumento do IMC, com tendência ao sobrepeso e obesidade, além da presença de DMT2 e SM. Segundo a IDF a DMT2 apresenta alta taxa de prevalência em pessoas com mais de 65 anos (IDF, 2017), mostrando que o envelhecimento impacta em certo grau no desenvolvimento da DMT2 e provavelmente da SM também, visto que a DMT2 é um dos fatores de risco para esta síndrome.

Já a escolaridade mostrou uma relação inversa tanto com o aumento de IMC, quanto a presença das comorbidades estudadas. Observando a tabela 3 verificamos que com o aumento no nível de escolaridade a quantidade de voluntários com sobrepeso, obesidade, DMT2 e SM diminuiu, mostrando que o nível de escolaridade apresenta de certa forma um efeito protetor. A relação inversa do nível de escolaridade e o desenvolvimento da DMT2, SM, além do aumento de peso provavelmente se deve ao melhor acesso a alimentos saudáveis e maior facilidade a serviços de saúde e atividades físicas, dificultando o ganho de peso e consequente desenvolvimento das doenças associadas (TANG *et al.*, 2003; RATHMANN *et al.*, 2015). Como esperado, todos os dados antropométricos apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados. Confirmamos o aumento das medidas corporais dos grupos obeso, DMT2 e SM em relação ao peso normal e sobrepeso (BULLO *et al.*, 2007; GRUNDY *et al.* 2005).

9.2 – Dados clínicos da segunda população de estudo dos 5 grupos de estudo

A análise dos dados sanguíneos mostrou que a maioria os parâmetros foram significativamente diferentes entre os grupos, com exceção da creatina, colesterol total e da ureia. Os níveis de glicemia, insulina, HOMA- β , HOMA-IR, VLDL, LDL,

CT/HDL, VLDL/HDL, LDL/HDL, PS e PD foram estatisticamente maiores nos grupos de sobrepeso, obeso, DMT2 e SM, em comparação com o grupo de peso normal. A única variável que apresentou diminuição foi o HDL, diminuindo nos grupos citados em comparação com o normal. Esses resultados reforçam a ideia de que o aumento de peso, a SM e a DMT2 levam à alteração dos processos metabólicos e pressão sanguínea do indivíduo, impactando negativamente na saúde de humana (DEFRONZO, 2009; BULLO *et al*, 2007; HAJER *et al*. 2007).

9.3- Análise dos dados clínicos da comparação ControlexSM e ControlexDMT

Nossa análise com os grupos Peso normal, sobrepeso e obeso agrupados em um único grupo, controle, em relação às duas doenças estudadas, mostrou que a maior parte das variáveis apresentou diferenças significativas entre os grupos. Observamos que os dados clínicos impactam na SM e DMT2 como glicemia, insulina, HOMA-IR, HOMA-B, pressão sistólica e diastólica, apresentando diferenças significativas entre os grupos. Dessa forma ao analisarmos os dados sanguíneos dos voluntários, podemos observar que agrupar os voluntários em um único grupo, Controle, ou separa-los de acordo com o IMC não tem grande impacto nos dados sanguíneos.

9.4- Análise dos dados clínicos dos grupos obeso, DMT2 e SM

Foram realizadas comparações para avaliar as similaridades e diferenças existentes entre os grupos, obeso, SM e DMT2, sem a influência da diferença metabólica relativa ao ganho de peso.

A análise realizada entre o grupo SM e DMT2 mostrou que somente as variáveis, RCQ, HOMA- β e glicemia apresentaram diferença significativa entre os grupos. Os voluntários com SM em nosso estudo não possuem diagnóstico de DMT2. Os níveis de glicemia no grupo DMT2 são maiores que no SM, o que já era esperado. Os níveis de HOMA- β , marcador da função das células betas pancreáticas, apresentaram níveis superiores no grupo SM do que no DMT2. Os níveis mais elevados de HOMA- β no grupo SM indica um aumento na produção das células betas

pancreáticas. Nas condições de hiperglicemia para evitar o aumento da tolerância a glicose o organismo eleva a secreção de insulina, mantendo um estado de hiperinsulinemia crônica (REAVEN, 1988).

Na comparação entre os grupos obeso e SM sete variáveis apresentaram diferenças significativas: VLDL/HDL; CT/HDL; VLDL; Triglicerídeos; HOMA-IR; Insulina e Glicemia. Como os voluntários do grupo obeso não possuíam SM, a presença de diferença significativas em variáveis que compõem o SM já eram esperadas. Porém 3 dos fatores que compõem a SM (CC, pressão arterial e HDL) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Isso indica que, apesar do grupo obeso incluir indivíduos aparentemente saudáveis, estes apresentaram 3 dos 5 fatores de risco para a SM, indicando que os voluntários obesos estão possivelmente em processo de desenvolvimento desta doença.

Na última comparação realizada ObesoxDMT2, seis variáveis apresentam diferenças significativas entre os dois grupos: Glicemia; HOMA- β ; Triglicerídeos; HDL; VLDL e VLDL/HDL. Observamos que os níveis de triglicerídeos e VLDL foram aumentados e o de HDL diminuídos na DMT2, em relação aos obesos. Segundo estudo de Reaven, 1993, há uma relação entre a DMT2 e os níveis baixos de HDL e elevados de triglicerídeos e VLDL, assim como mostrado em nosso estudo. Outra variável importante para a comparação dos grupos, o HOMA- β , mostrou estar mais elevado no grupo obeso do que no DMT2, podendo chegar a quase 10 vezes de diferença na funcionalidade das células beta pancreáticas.

Segundo DeFronzo e colaboradores, os pacientes com DMT2 apresentam um baixo nível de massa celular de células beta pancreáticas, além de um baixo nível de funcionalidade dessas células. O estresse ocasionado pelo aumento na produção de insulina pode levar posteriormente a uma perda na massa celular das células beta e consequentemente na produção de insulina, tornando o paciente além de resistente a insulina, deficiente na produção da mesma. Já em indivíduos com obesidade acontece o contrário da DMT2. O aumento de peso nestes indivíduos, que mesmo não possuindo DMT2, leva a uma resistência à insulina, acarretando em um aumento na massa celular de células beta e na funcionalidade das mesmas, gerando uma hiperinsulinemia crônica com a função de restabelece os níveis glicêmicos.

Esses dados mostram que apesar de não possuir a doença, o grupo obeso se assemelha aos grupos DM2 e SM em diversas características clínicas, tais como pressão sistólica e diastólica e HOMA-IR. Além disso, a análise de HOMA- β mostrou que indivíduos sem a presença de DM2, incluindo tanto o grupo obeso quanto o grupo com SM, podem estar em um estado de transição metabólica para desenvolvimento da DM2, provavelmente de forma reversível.

9.5- Análise comparativa dos proteomas salivares e plasmáticos

Nosso estudo permitiu a identificação de 203 proteínas plasmáticas e 64 salivares. Analisar as proteínas plasmáticas e salivares nos permitiu observar alterações que podem indicar potenciais marcadores biológicos para SM e DM2 ou entender melhor como alterações em determinadas proteínas influenciam no desenvolvimento das doenças.

9.5.1 Proteínas plasmáticas

Em nossa análise das proteínas plasmáticas, foram identificadas 203 proteínas, para todas as comparações realizadas no estudo. Das 203 proteínas identificadas, 112, 91 e 82 foram diferencialmente expressas na comparação com todos os grupos, Controle x SM e Controle x DM2, respectivamente.

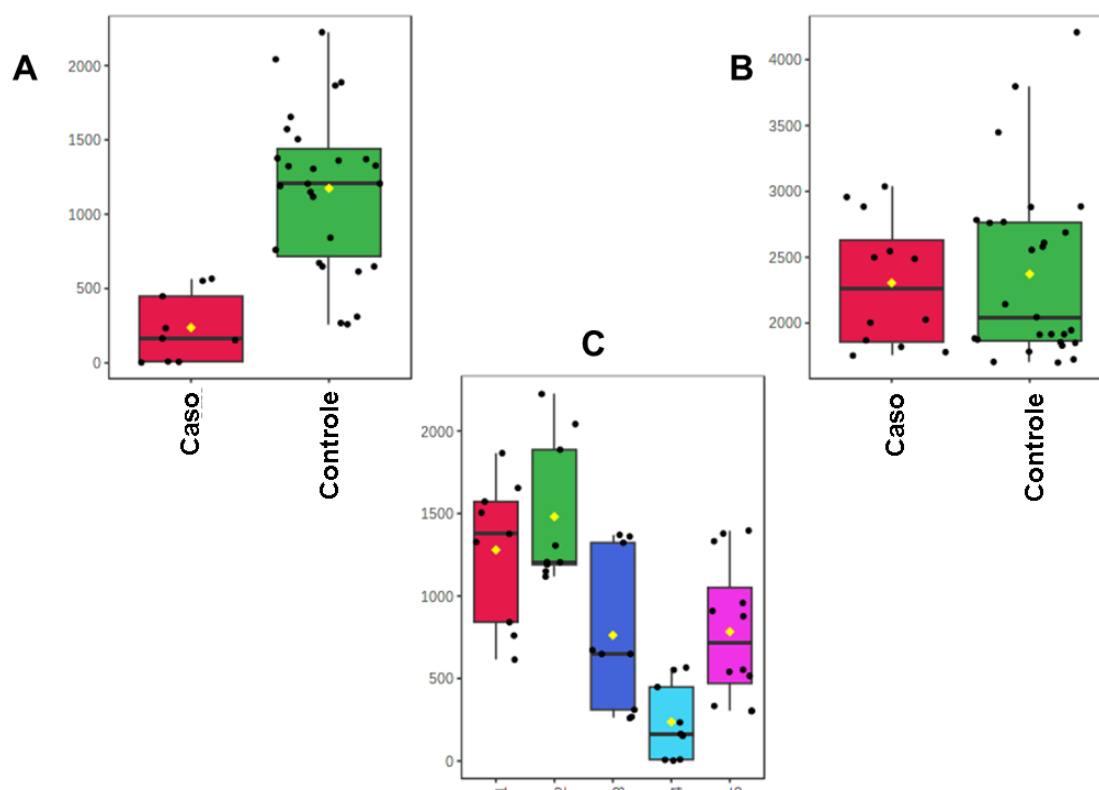
Abaixo, serão explanadas considerações sobre algumas proteínas plasmáticas que tiveram impacto na diferenciação dos grupos de estudo, dentre elas proteínas que foram avaliadas como potenciais biomarcadores pelos testes PLS-DA e *Pattern Hunter*, além de outras proteínas relacionadas às doenças estudadas.

9.5.1.1 Homólogo de proteína de mitocôndrias agrupadas (CLUH)

A proteína Homóloga de mitocôndrias agrupadas (CLUH) é uma proteína que possui como função mais conhecida a ligação específica de mRNAs de proteínas mitocondriais codificadas no núcleo, desempenhando um papel vital na biogênese mitocondrial (CHO *et al.*, 2019). A expressão de CLUH influencia em diversos fatores

ligados a mitocôndria, incluindo, cetogênese, ciclo do ácido tricarboxílico, degradação de aminoácidos e oxidação de ácidos graxos (SCHATTON *et al.*, 2017). Células com deficiência em CLUH apresentam mudanças metabólicas, influenciando no metabolismo glicolítico, na oxidação e ciclo do TCA (WAKIM *et al.*, 2017). Estudos mostram que, em doenças metabólicas como obesidade, diabetes e hepatoesteatose a função mitocondrial dos adipócitos é reduzida (CHO *et al.*, 2019). No estudo de Cho e colaboradores, foi verificado que a diminuição de CLUH levou a redução na transcrição de genes ligados a biogênese mitocondrial e termogênese, principalmente em Tecido Adiposo Marrom. Até o momento não encontramos nenhum estudo que relacione diretamente a CLUH com DMT2 e SM. Em nosso trabalho, a proteína CLHU apresentou uma diminuição de 5 vezes na SM (Figura 21A) em relação ao grupo controle, porém não apresentou diferença significativa na DMT2 (Figura 21B). Na comparação entre todos os grupos de estudo (Figura 21C), ocorreu uma diminuição 6,2 vezes, sendo mais abundante no grupo sobrepeso e menos nos indivíduos com SM. Além disso, as médias de abundância de CLHU no plasma de obesos e doentes com SM e DMT2 foram relativamente mais baixas, comparadas às de indivíduos com peso normal e sobrepeso. Dessa forma, a depleção desta proteína no plasma sanguíneo pode estar relacionada a uma deficiência funcional nos adipócitos dos voluntários com as doenças metabólicas estudadas, sendo primordial realizar estudos direcionados sobre as causas ou consequências da modulação destas proteínas no desenvolvimento da DMT2 e SM.

Figura 21. Abundância relativa no plasma da Proteína CLHU nos grupos. A) ControlexSM; B) ControlexDMT2; C) comparação com os 5 grupos de estudo.



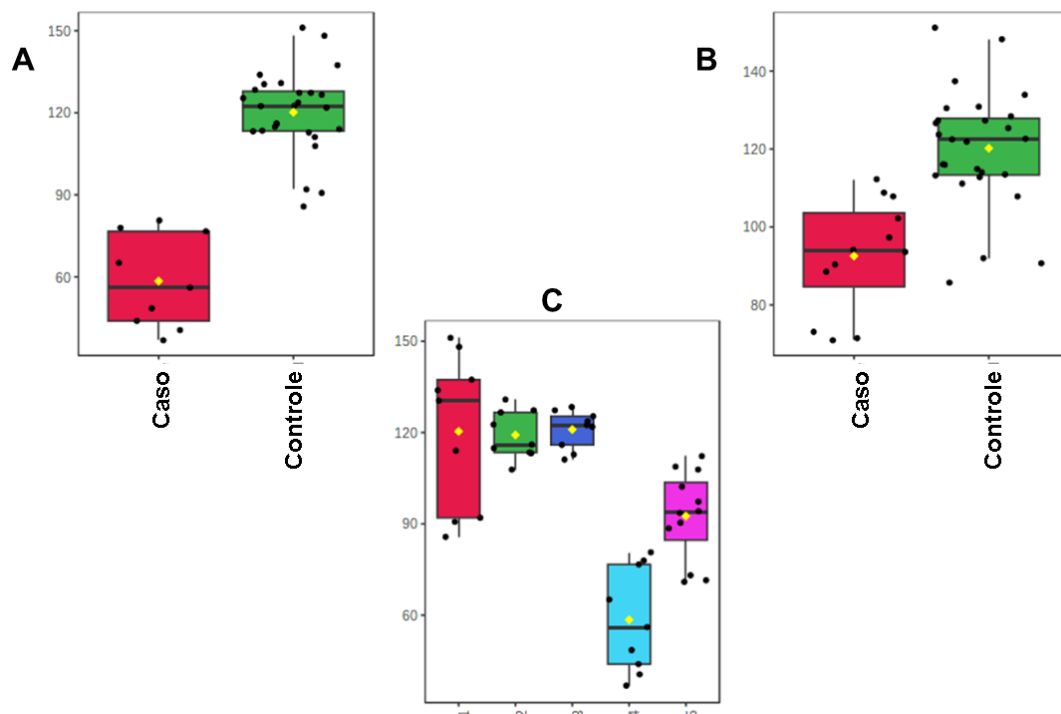
Legenda: 1: Normal; 2: Sobrepeso; 3: Obeso; 4: SM; 5: DMT2

9.5.1.2 Proteína 1 de ligação ao domínio LIM

A proteína de ligação ao domínio LIM1, também conhecida como LDB1, é uma proteína nuclear necessária para a maturação de precursores endócrinos do pâncreas (HUNTER *et al.*, 2013). Estudos relacionaram o co-regulador translacional LDB1 com a maturação e desenvolvimento das células β pancreáticas, regulando genes essenciais para as células β , como SLC2a2, Pdx1 e MafA (LIU *et al.*, 2022). Liu e colaboradores, em 2022, levantaram a hipótese que a LDB1 é sensível ao estresse promovido por citocinas e pelo nível nutricional das células β , podendo contribuir para a função das células β . Os autores trataram linhagens de células β com palmitato ou um coquetel de citocinas pró-inflamatórias e elevados níveis de glicose. A adição de palmitato e citocinas levou a uma redução na expressão proteica de LDB1, porém o tratamento com glicose não alterou a produção da proteína. De acordo com os

resultados os autores sugerem que LDB1 é sensível ao estresse celular e que estabilizar a proteína pode preservar a função celular. Em nosso trabalho foi observado uma diminuição de 2 vezes no grupo com SM e 1,3 (Figura 22A) vezes na DMT2 (Figura 22B), em relação ao controle. Na comparação com todos os grupos (Figura 22C) há uma clara diminuição da LDB1 do grupo normal para os grupos SM e DMT2, porém, a LDBI não se altera em relação ao IMC, mostrando que o IMC não impacta a alteração da LDB1. Nossos dados corroboram o do estudo de Liu, podendo a LDB1 ser um potencial biomarcador de dano celular para as células β pancreáticas, perda de função celular e um indicador de desenvolvimento de SM e DMT2.

Figura 22. Abundância relativa no plasma da Proteína 1 de ligação ao domínio LIM nos grupos estudados. A) ControlexSM; B) ControlexDMT2; C) comparação entre os 5 grupos.

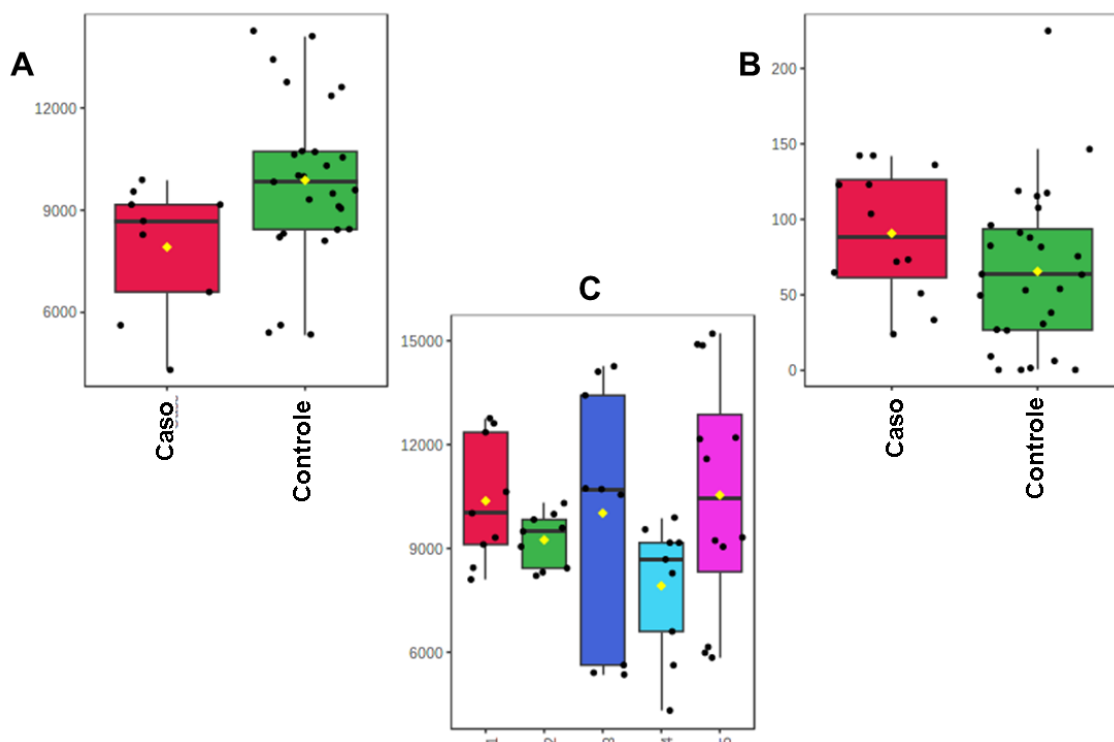


Legenda: 1: Normal; 2:Sobrepeso; 3: Obeso; 4: SM; 5: DMT2

9.5.1.3 Fator de iniciação de tradução eucariótica 4 – gama 1

O Fator de iniciação de tradução eucariótica 4 - gama 1 (EIF4G1) é um componente do complexo de iniciação da tradução, atuando como uma proteína base para suas proteínas de ligação. Em ilhotas pancreáticas de pacientes e camundongos com DMT2 foi observado a diminuição de EIF4G1 e em camundongos pré-diabéticos a supressão da EIF4G1 gera uma hiperinsulinemia (LIEW *et al.*, 2014; JAISWAL *et al.*, 2019). No estudo de Jo e colaboradores de 2021, os autores testaram uma hipótese de que a EIF4G1 é essencial para a homeostase das células beta do pâncreas, utilizando camundongos nocaute (KO) para a proteína. A depleção da proteína levou a manifestação de intolerância a glicose, diminuição da secreção de insulina, aumento da proliferação celular e apoptose das células beta em camundongos. Com a reposição do gene EIF4G1 em células beta isoladas dos camundongos KO, ocorreu uma recuperação da produção de insulina, indicando um possível papel na síntese de insulina. Em nosso trabalho também observamos uma diminuição de 1,2 vezes desta proteína no grupo SM (Figura 23A), porém não houve diferença significativa no grupo DMT2 (Figura 23B), em relação ao controle. Na comparação com os 5 grupos não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 23 C). As mudanças ocorridas na EIF4G1 ainda não estão claras, porém a proteína pode ter um papel no desenvolvimento da SM, doença caracterizada pela resistência à insulina.

Figura 23. Abundância relativa no plasma do Fator de iniciação de tradução eucariótica 4- gama 1 nos grupos estudados. A) ControlexSM; B) ControlexDMT2; C) comparação entre os 5 grupos.



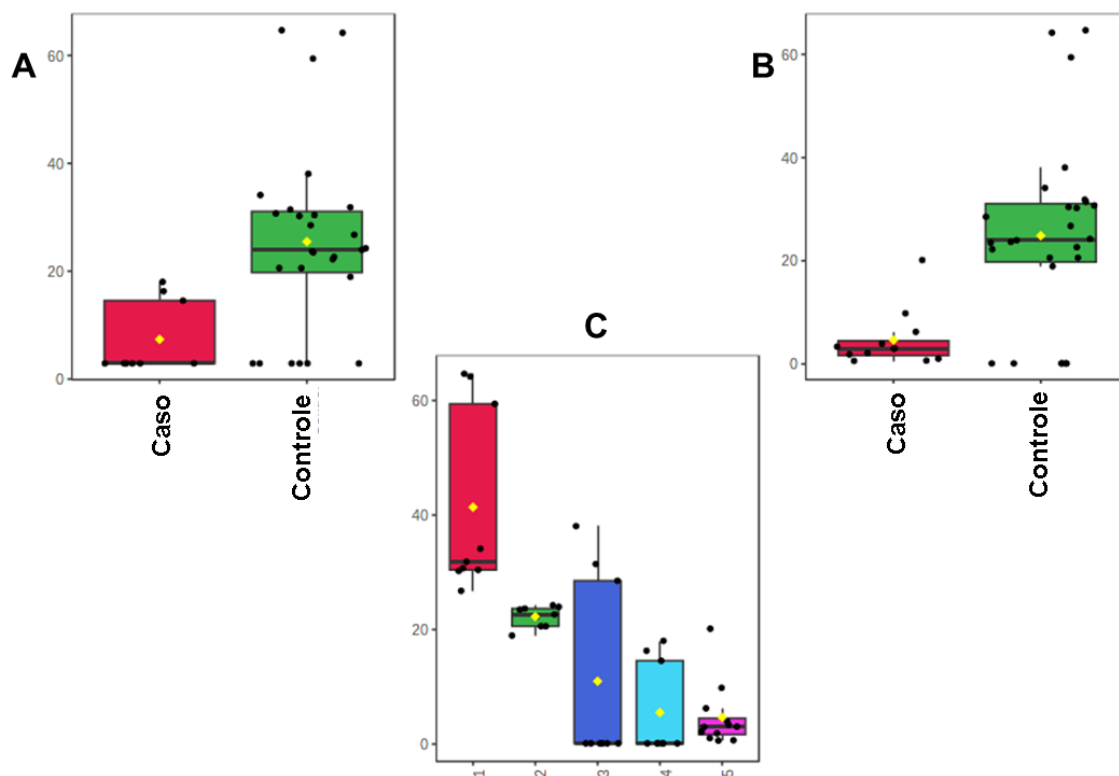
Legenda: 1: Normal; 2: Sobrepeso; 3: Obeso; 4: DM; 5: DMT2

9.5.1.4 Transportador de cobalamina lisossomal ABCD4

Os transportadores ABCD são proteínas que compõem uma superfamília que são ligadas a membranas de quase todos os organismos. Existem quatro proteínas ABCD identificadas em humanos, ABCD1-4 (SHANI *et al.*, 1997; DASSA & BOUIGE, 2001). O Transportador de cobalamina lisossomal ABCD4 (ABCD4) está localizado na membrana lisossomal, estando supostamente ligado ao transporte de vitamina B12, cobalamina, do lúmen lisossomal para o citosol (COELHO *et al.*, 2012). A cobalamina é um micronutriente importante para a saúde humana. A vitamina B12 entra nas células de mamíferos através da endocitose seguido de exportação via lisossomo para o citoplasma. A associação da cobalamina com fatores que podem levar a Síndrome Metabólica já vem sendo investigados (KITAI *et al.*, 2021). Em estudos anteriores foi observado que baixos níveis de cobalamina estavam

associados a obesidade, doenças cardiovasculares e resistência à insulina (LIZ *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2022). O estudo de Kitai e colaboradores de 2021 conseguiu comprovar que a proteína ABCD4 consegue transportar a cobalamina do lisossomo para o citoplasma. Nossos dados apresentaram uma diminuição na quantidade de ABCD4 de 3,5 vezes na SM (Figura 24^a), e de 5,1 vezes na DMT2 (Figura 24B), em relação ao controle. Quando comparamos os 5 grupos (Figura 24C) podemos observar uma diminuição de até quase 9 vezes, sendo esta proteína aumentada no grupo normal e progressivamente reduzida de acordo com o IMC, até chegar a valor muito baixos em obesos, SM e DMT2, mostrando como o IMC impacta nos níveis plasmáticos da ABCD4. As alterações observadas na literatura e em nosso trabalho indicam que a proteína ABCD4 pode ser um potencial biomarcador para o desenvolvimento destas doenças metabólicas, apresentando uma diminuição gradativa com o aumento do IMC e o desenvolvimento da SM e da DMT2.

Figura 24. Abundância relativa no plasma do Transportador de cobalamina lisossomal ABCD4 em A) ControlexSM; B) ControlexDMT2; C) comparação com os 5 grupos de estudo.



Legenda: 1: Normal; 2: Sobrepeso; 3: Obeso; 4: DM; 5: DMT2

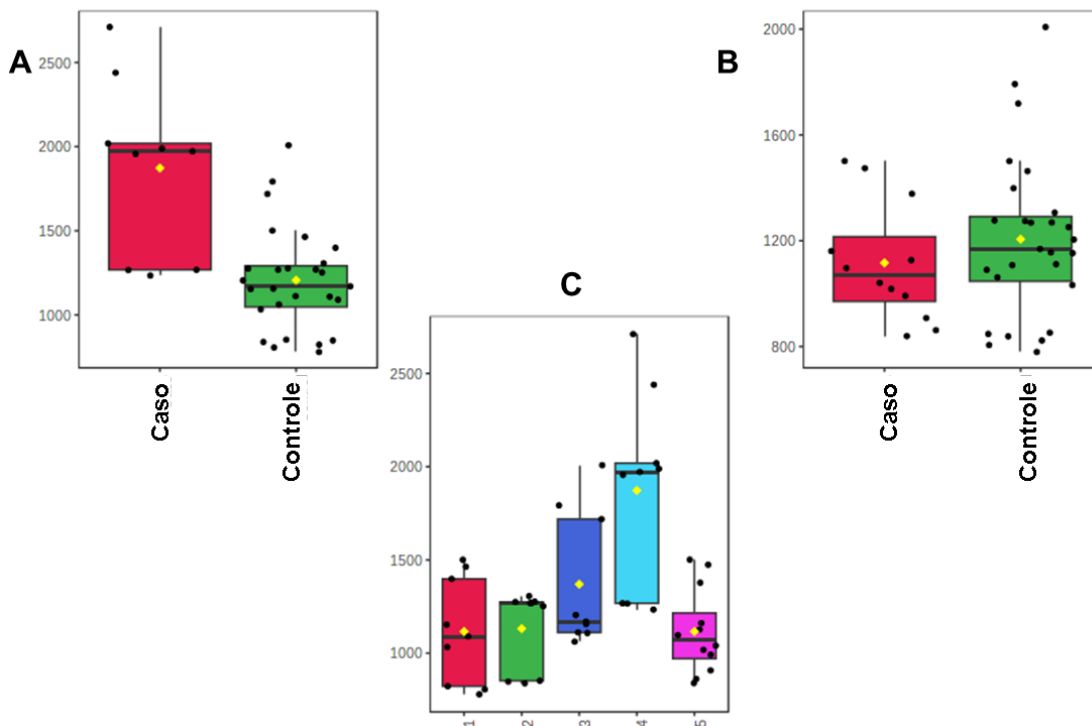
9.5.1.5 Proteína de canal de cálcio de dois poros 1

As proteínas de canais de poros (TPC) são membros da superfamília de canais iônicos controlados por voltagem permeáveis a cálcio, com o ser humano possuindo duas isoformas, o TPC1 e TPC2 (RUTTER *et al.*, 2015). A secreção de insulina e a Resistência à Insulina dependem da homeostase do cálcio. Alterações na concentração do cálcio podem afetar a secreção de insulina, já que o começo da exocitose da insulina depende do influxo de cálcio, através de canais dependentes de voltagem (SHIMODAIRA *et al.*, 2015). Dois outros estudos analisaram a influência da TPC2 na resistência à insulina. No estudo de Cane e colaboradores em 2015, os autores utilizaram camundongos KO para TPC2. Os autores observaram que a TPC 2 não é totalmente necessária para a secreção de insulina, enquanto a expressão de TPC1 aumenta na ausência de TPC2. Já no estudo de He e colaboradores de 2018, camundongos KO para TPC2 apresentaram maior sensibilidade a insulina em machos. Apesar dos poucos estudos sobre o impacto das TPCs na resistência insulina, há na literatura uma correlação entre o aumento das TPCs e resistência à insulina, inclusive a TPC1 que foi identificada em nosso trabalho (CANE *et al.*, 2015; HE *et al.*, 2018). Em nossos dados foi observado o aumento do nível desta proteína na SM (Figura 25A), porém não houve diferença significativa na DMT2 (Figura 25B) contra o grupo controle. Quando comparado todos os grupos (Tabela 25C) ocorreu um aumento da proteína acompanhando o IMC e na SM, porém houve uma queda na DMT2. Como foi mostrado anteriormente na Tabela 5, com o aumento da massa corporal ocorre o aumento de variáveis como, glicemia, insulina, HOMA-IR e HOMA- β , acontecendo o mesmo nos grupos SM e DMT2. No grupo SM, 17 dos 23 voluntários apresenta RI, sendo quase 74% do grupo. Porém quando observamos o grupo DMT2, seu nível de insulina se compara ao nível do grupo sobrepeso e o nível de HOMA- β do grupo DMT2 é menor que o do grupo de Peso Normal. Já o grupo de SM apresenta os maiores valores para insulina, HOMA-IR e HOMA- β .

Ao compararmos os dados clínicos e o nível de TPC1 podemos observar o aumento da proteína condiz com os níveis elevados de insulina, de resistência à insulina e do valor de HOMA- β . Dessa forma, nossos dados podem corroborar o que

encontramos na literatura, sendo o TCP1 um potencial indicado de resistência à insulina.

Figura 25. Abundância relativa no plasma da Proteína de canal de cálcio de dois poros 1 em A) ControlexSM; B) ControlexDMT2; C) comparação com os 5 grupos de estudo.



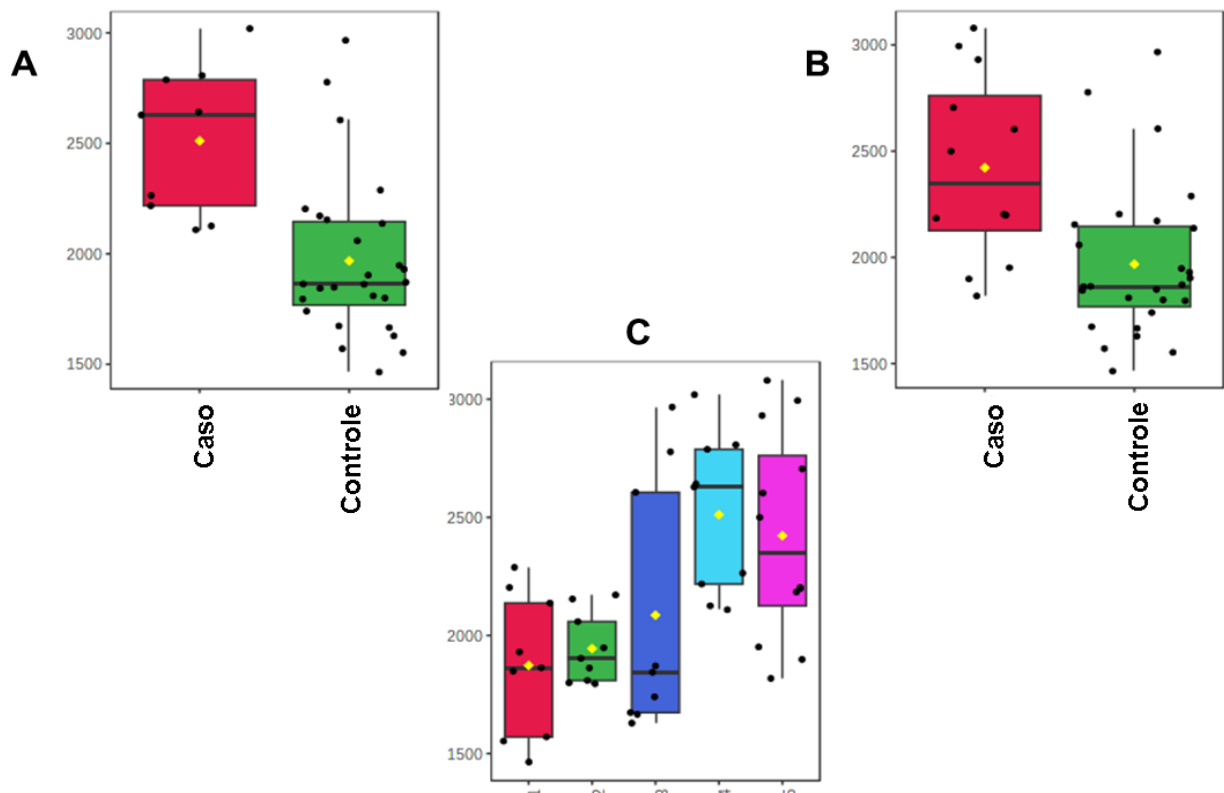
Legenda: 1: Normal; 2: Sobrepeso; 3: Obeso; 4: SM; 5: DMT2

9.5.1.6 Apolipoproteína C-III

Apolipoproteína C-III (ApoC3) é uma reguladora de lipoproteínas ricas em triglicerídeos, tendo um papel importante na conversão de triglicerídeos. Mutações que geram perda de função na proteína mostraram diminuição nos triglicerídeos plasmáticos, além da diminuição do risco de CVD (TASKINEN *et al.*, 2016). Em nosso estudo a APOC3 apresentou um aumento nas condições de doença nas 3 comparações apresentadas: ControlexSM (Figura 26A), ControlexDMT2 (Figura 26B) e na comparação dependente do IMC (Figura 26C). Em 2019, Kanter e colaboradores verificaram que camundongos com Diabetes tipo 1 apresentavam níveis elevados de APOC3 e que, em pacientes com Diabetes tipo 1, a APOC3 consegue prever eventos

cardiovasculares. Os autores observaram que o aumento de APOC3 em camundongos pode elevar os níveis de VLDL e IDL, além do desenvolvimento de aterosclerose, podendo a inibição de APOC3 reduzir o risco de doenças cardiovasculares. No estudo de Li e colaboradores de 2021, os autores acompanharam 1085 voluntários durante 5 anos, dos quais 97 desenvolveram DMT2, verificando que a ApoC3 foi positivamente associada ao desenvolvimento de DMT2. Como observado pelos dois estudos abordados acima, a ApoC3 pode vir a ser usada como biomarcador de risco para do desenvolvimento de CVD e principalmente de DMT2, podendo nesse último caso ser usado como um potencial biomarcador precoce para a DMT2 e Síndrome Metabólica, segundo mostram nossos dados.

Figura 26. Abundância relativa no plasma da Apolipoproteína C-III em A) ControlexSM; B) ControlexDMT2; C) comparação com os 5 grupos de estudo.

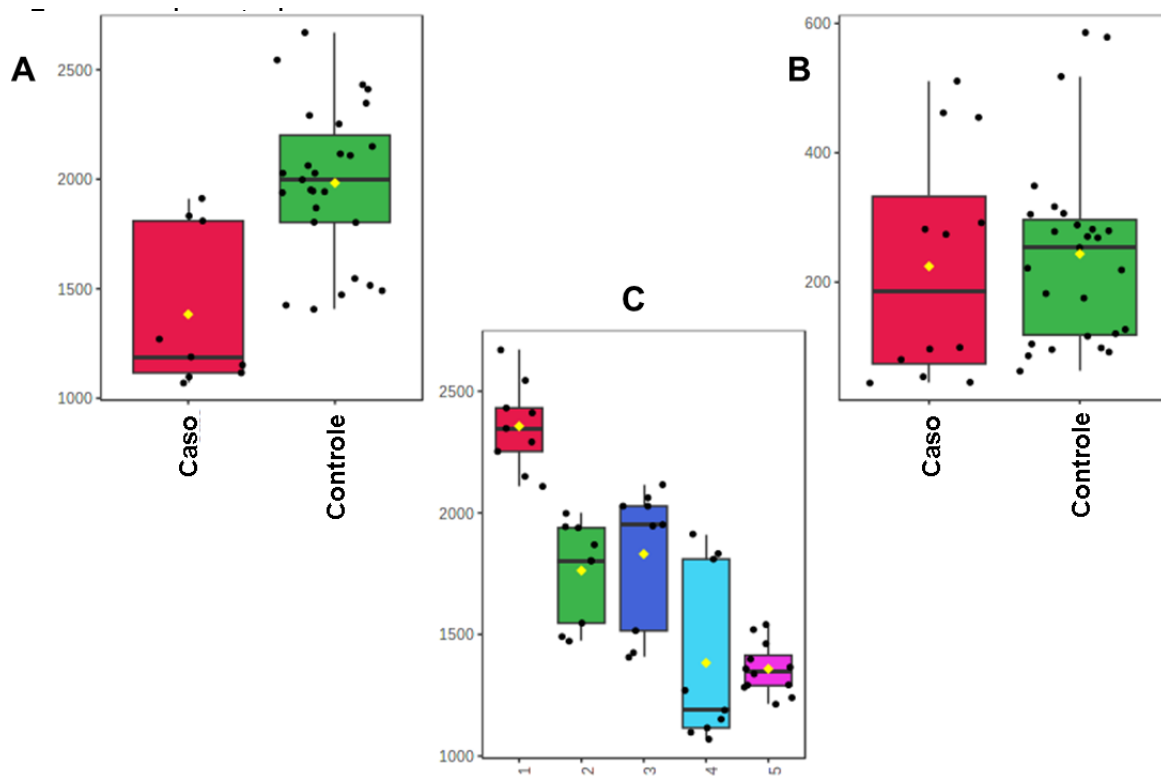


Legenda: 1: Normal; 2: Sobrepeso; 3: Obeso; 4: SM; 5: DMT2

9.5.1.7 Triptofano-tRNA ligase, citoplasmática

A proteína Triptofano-tRNA ligase, citoplasmática também conhecida como Triptofanil-tRNA sintetase 1 (WRS) é uma aminoacil-tRNA sintetase citosólica necessária para a síntese de proteínas. Em nosso trabalho a WRS apresentou uma diminuição significativa na condição de SM (Figura 27A) e DMT2 (Figura 27B) quando comparamos com o grupo controle. Também mostrou uma redução inversamente proporcional ao aumento do IMC e presença das doenças metabólicas, na comparação com os 5 grupos (Figura 27C), sendo similar apenas entre obesos e indivíduos com sobrepeso. Em 2020, Park e colaboradores descobriram que a WRS é liberada em lesões teciduais, atuando como uma citocina que promove renovação, facilitando o reparo de tecidos danificados. Estudos já mostram que a DMT2 de longo prazo pode afetar o funcionamento normal dos rins, artérias, coração e articulações. O aumento da secreção de insulina pelas células beta pancreáticas leva ao aumento da massa celular das células beta como uma tentativa de manter os níveis glicêmicos dentro do normal. Entretanto, esse esforço acaba por levar ao estresse e dano celular das células beta, culminando na diminuição da massa celular, o que piora do quadro de resistência à insulina. Esse quadro de resistência à insulina e dano celular não é exclusivo da DMT2, podendo ser observado também na SM e obesidade (WŁODARCZYK & NOWICKA, 2019; LI *et al.*, 2019; WEIR *et al.*, 2020). A literatura ainda não nos mostra relações entre a WRS e a obesidade, SM e DMT2, porém em ambas as doenças há a presença de resistência à insulina ou outros fatores que levam ao dano celular. A diminuição da WRS em nosso trabalho pode estar ligada ao dano celular resultante das duas doenças, se mostrando um possível marcador para avaliar a gravidade dessas doenças.

Figura 27. Abundância relativa no plasma da Triptofano-tRNA ligase, citoplasmática em A) ControlexSM; B) ControlexDMT2; C) comparação com os



Legenda: 1: Normal; 2: Sobrepeso; 3: Obeso; 4: SM; 5: DMT2

9.5.2 Proteínas salivares

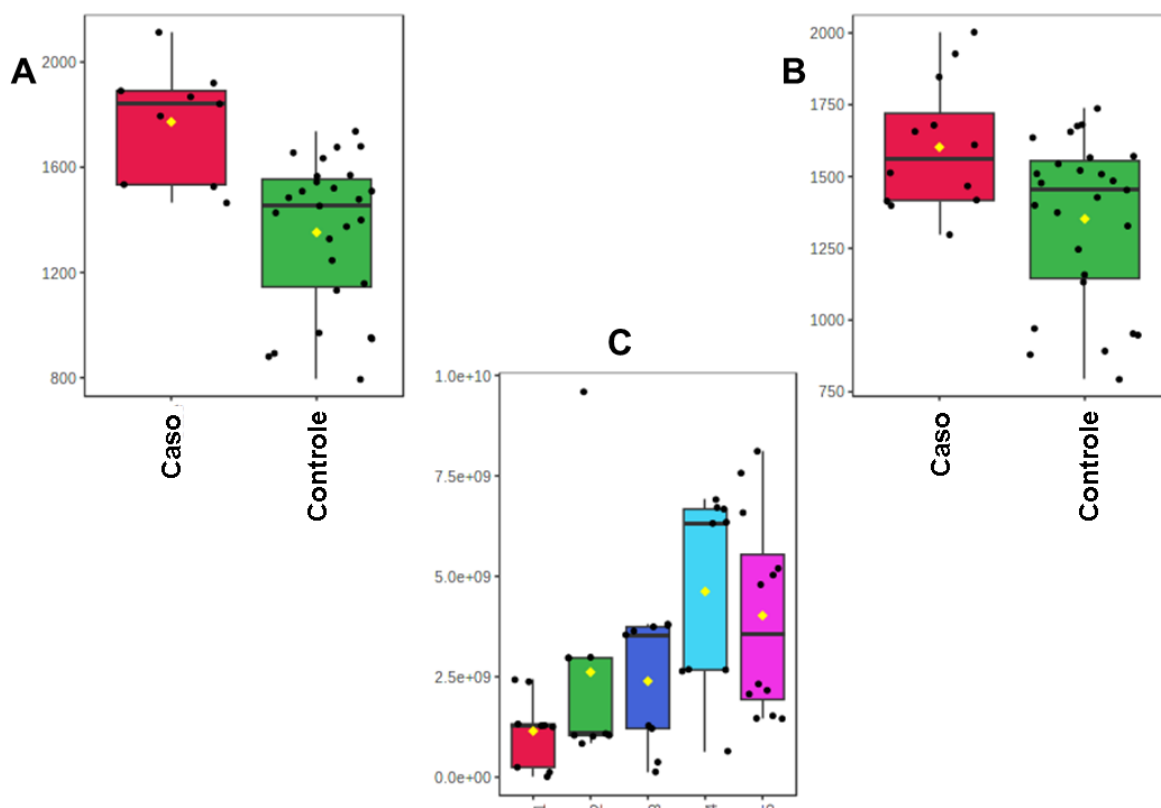
Em nosso estudo conseguimos identificar 64 proteínas, quando comparamos Controle x SM e Controle x DMT2, tendo 24 e 23 proteínas diferencialmente expressas respectivamente. Já na comparação com os 5 grupos separados, identificamos 62 proteínas, sendo 39 diferencialmente expressas. Assim como nas proteínas plasmáticas, a escolha das proteínas salivares a seguir foram feitas com base nas análises de VIP score e Pattern Hunter.

9.5.2.1 Profilina 1

A profilina 1 é uma proteína altamente conservada com função de ligação à actina, desempenhando um papel no rearranjo do citoesqueleto (ALKAM *et al.*, 2017). Alguns estudos vêm verificando relações entre a Profilina 1 e CVD. Em 2021, no

estudo de Ni e colaboradores, foi observada que a interrupção da expressão de Profilina 1 através de shRNA, atenuou anormalidades endoteliais, principalmente no desenvolvimento de aterosclerose. Dessa forma um aumento na produção de Profilina 1 pode configurar um aumento de risco para o desenvolvimento de aterosclerose. Também em 2021, Xiao e colaboradores verificaram que os níveis de Profilina 1 estavam aumentados em pacientes com doença arterial coronariana, principalmente em pacientes com DMT2, além de aumentar a liberação de mediadores pró-aterogênicos. A Profilina 1 mostrou-se aumentada em 1,3 vezes na SM (Figura 28A) e 2 vezes na DMT2 (Figura 28B), em relação ao controle. Além disso, houve um aumento de até 3,2 vezes no grupo com SM, na comparação com todos os grupos (Figura 28C). A alteração da Profilina 1 pode influenciar no desenvolvimento da SM através de um dos seus fatores de risco, doenças cardiovasculares. Assim como, em indivíduos com DMT2, que apresentam maiores riscos para (PETRIE *et al.*, 2018). Novos estudos são necessários para verificar a relação entre a Profilina 1 e as doenças estudadas aqui, porém os dados sugerem que a Profilina 1 pode ser um potencial indicador para doenças cardiovasculares e doenças metabólicas associadas.

Figura 28. Abundância relativa da proteína salivar Profilina 1 em A) ControlexSM; B) ControlexDMT2; C) comparação com os 5 grupos de estudo.



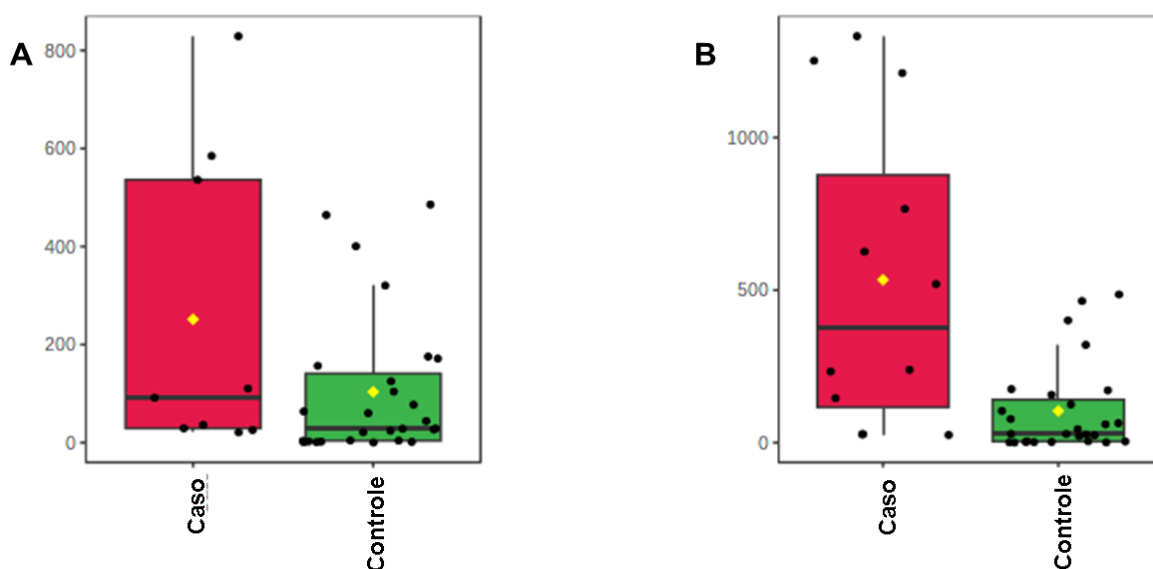
Legenda: 1: Normal; 2: Sobre peso; 3: Obeso; 4: SM; 5: DMT2

9.5.2.2 Fosfolipase A2 gama citosólica

A proteína Fosfolipase A2 gama citosólica (PLA2G4C) pertence a superfamília da fosfolipase A2 (PLA2), possuindo diferentes grupos de enzimas com a capacidade de catalisar a hidrólise da ligação éster em variados fosfolípidios, resultando em ácido graxos livre (BURKE & DENNIS, 2009). Alterações na secreção de PLA2G4C vem sendo estudadas ao longo dos anos devido ao seu papel na biodisponibilidade de ácidos graxos, influenciando em mudanças metabólicas. No estudo de Balzano-Nogueira e colaboradores, de 2021, certas alterações foram verificadas na expressão de ROS intracelular e anormalidades no metabolismo de lipídios antes do desenvolvimento de Diabetes tipo 1. O estudo revelou que o aumento de ROS pode elevar os níveis de PLA2, inclusive a PLA2G4C. Apesar do estudo não se tratar da

DMT2, um dos focos do nosso trabalho, a associação da proteína em questão com a Diabetes do tipo 1 pode indicar que a proteína possa apresentar modulação semelhante na DMT2. O estudo de Boi e colaboradores, de 2022, também mostra que o aumento de PLA2G4C está presente em condições pró-inflamatórias. O trabalho desse autor verificou que o aumento da interleucina 1 β , uma citocina pró-inflamatória relacionada a DMT1 e DMT2 (GOUDA *et al.*, 2018), induz uma maior secreção de PLA2G4C e que a inibição de PLA2G4C reduz o processo inflamatório. Em nosso trabalho a PLA2G4C não apresentou diferença significativa na SM (Figura 29A), porém apresentou um aumento de 5,1 vezes na DMT2 (Figura 29B) em comparação ao controle. No entanto, na comparação entre os 5 grupos, PLA2G4C não foi detectada, provavelmente por estar ausente em réplicas de algum dos proteomas estudados. Esse resultado indica a relação da PLA2G4C não só com a Diabetes tipo 1, mas também com DMT2, podendo ser um alvo potenciais biomarcadores para a DMT2.

Figura 29. Abundância relativa da proteína salivar Fosfolipase A2 gama citosólica em A) ControlexSM; B) ControlexDMT2.

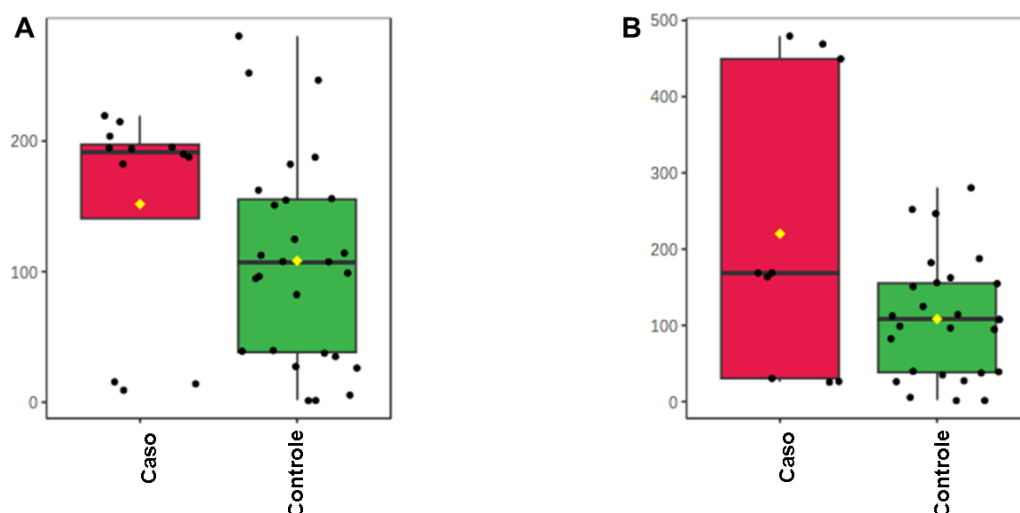


9.5.2.3 Colagenase intersticial

A proteína Colagenase Intersticial ou Matrix Metaloproteinase 1 (MMP1) pertence a uma grande família de endopeptidases que degradam proteínas da Matrix Extracelular. Existem 23 Metaloproteinases de matriz (MMPs), sendo divididas em MMPs ligada a membranas e do tipo solúvel como a MMP1 (ITOH, 2006; Thrailkill *et al.*, 2009). Em nosso estudo a MMP1 apresentou um aumento de mais de 2 vezes na SM (Figura 30A), porém não apresentou diferença significativa entre DMT2 e grupo controle (Figura 30B). E não foi identificada na comparação dos 5 grupos.

A relação da obesidade e resistência à insulina com MMPs foi estudada por Li e colaboradores em 2020, onde observaram diminuição do metabolismo lipídico e energético, além de resistência à insulina. No estudo de No Guo e colaboradores, 2022, foi observado que a obesidade aumenta a expressão de MMP14 e que sua inibição aumentou a sensibilidade a insulina. A MMP1 pertence a um grupo de proteínas com diversos membros, sendo alguns mais estudados que outros. Ambos os estudos citados acima, avaliaram a relação da MMP14 com a obesidade e suas complicações. Apesar disso o aumento da MMP1 no SM em nosso estudo sugere que esta proteína poderia exercer função similar à de outro membro das MMPs, podendo ser usado como um indicador para a resistência à insulina e acompanhamento dos desdobramentos da obesidade. De acordo com a análise Bonferroni dos dados clínicos, o HOMA-IR do grupo obeso não apresentou diferenças significativas com os grupos de peso normal e sobrepeso, sendo diferente apenas em relação as doenças estudadas.

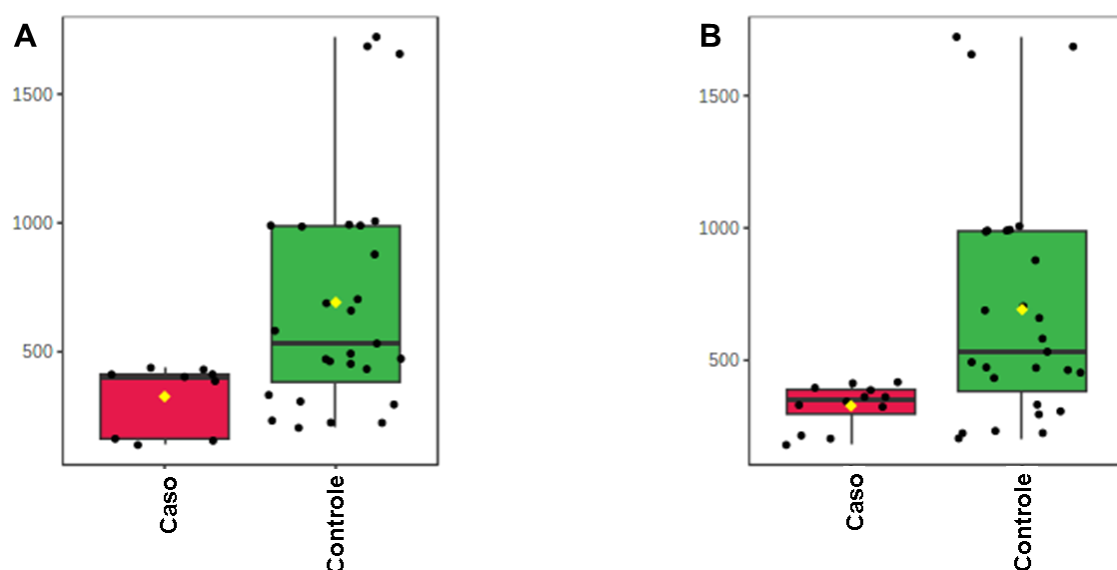
Figura 30. Abundância relativa da proteína salivar Colagenase intersticial em A) ControlexSM; B) ControlexDMT2.



9.5.2.4 Glutamato Descarboxilase 2

A Glutamato Descarboxilase 2 ou GAD2 é uma proteína que catalisa a produção do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA), além de regular a liberação de Dopamina (CHEN et al., 2012). Em nosso trabalho a GAD2 teve uma diminuição de 2,1 vezes tanto na SM (Figura 31A) quanto na DMT2 (Figura 31B), em relação com grupo controle, porém não foi identificada na comparação com todos os grupos. No estudo de Hwang e colaboradores em 2019, foi observado que o GABA exerce um papel importante em camundongos obesos. Foi relatado que o GABA age como um protetor contra a resistência à insulina em camundongos obesos e diminui a resposta inflamatória no tecido adiposo. Apesar de nossos dados não apresentarem os níveis de GABA, a diminuição de GAD2 pode estar influenciando na diminuição de GABA na SM e DMT2. Assim a diminuição da GAD2 também pode vir a ser usada como um bioindicador de predição das comorbidades associadas à obesidade.

Figura 31. Abundância relativa média da proteína salivar Glutamato Descarboxilase 2 em A) ControlexSM; B) ControlexDMT2.

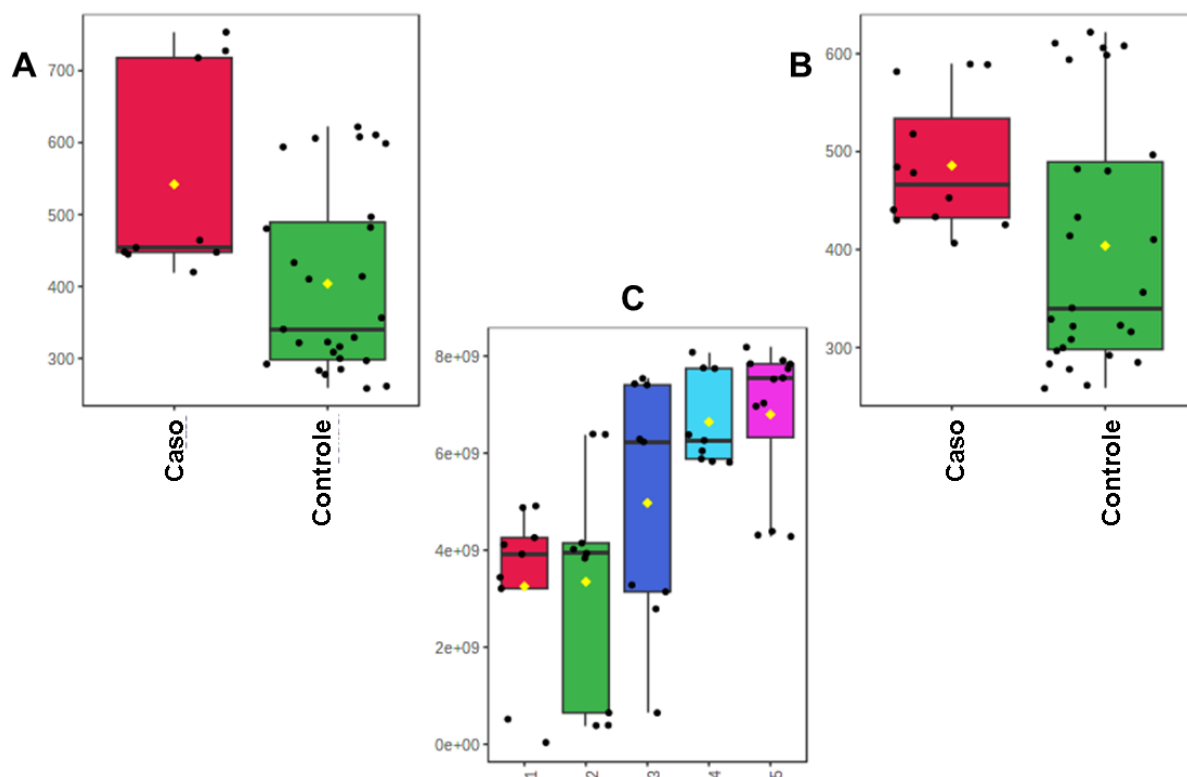


9.5.2.5 Proteína S100-A8/9

As proteínas S100-A8 e A9 são pequenas proteínas que se ligam ao cálcio e fazem parte dos Padrões Moleculares Associados a Dano (DAMP), sendo encontradas em meio extracelular de forma elevada em processos inflamatórios (INOUE *et al.*, 2018). Em nosso estudo ocorreu um aumento significativo das S100-A8 (Figura 32A) e A9 (Figura 33A) na SM, contra o grupo controle, porém na DMT2 (Figura 32B e 33B) só na S100-A8. Na comparação com todos os grupos houve um aumento nas condições de obesidade, SM e DMT2 (Figura 32C), sendo de até 1,6 vezes em relação do grupo normal para o DMT2 (Figura 33C). Alguns estudos já relacionam o aumento de das proteínas S100-A8/9 com Diabetes e doenças cardiovasculares, doenças relacionadas a obesidade. Em 2018, Inoue e colaboradores verificaram que o cultivo de células pancreáticas com palmitato e alta taxa de glicose aumentaram a expressão de S100-A8, induzindo a liberação de citocinas inflamatórias e a inflamação pancreática. Em 2020, Wang e colaboradores verificaram que níveis elevados de S100-A8/9 estão associados com CVD, especificamente trombose. Os níveis elevados das proteínas em nosso estudo podem

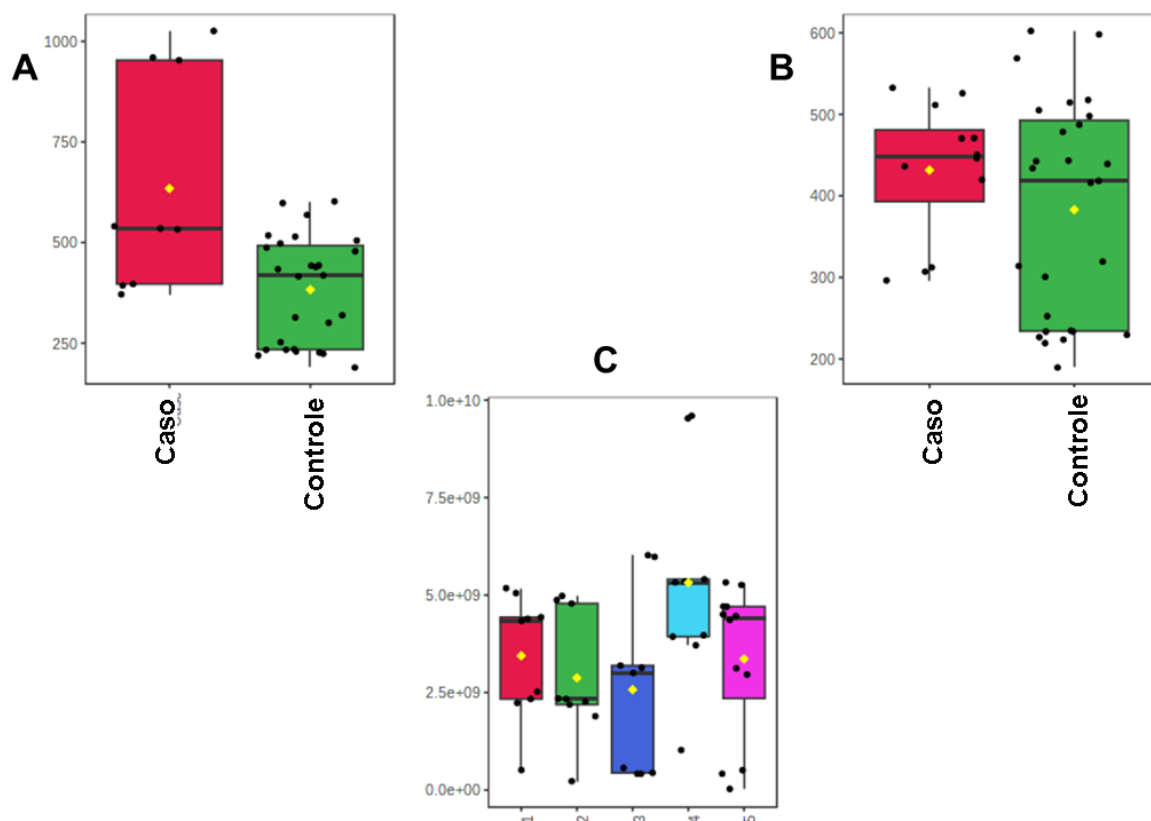
indicar que o aumento da inflamação, prejudicial ao bom funcionamento das células pancreáticas, além de possíveis indicações de problemas cardiovasculares.

Figura 32. Abundância da Proteína salivar S100-A8 em A) ControlexSM; B) ControlexDMT2; C) comparação com os 5 grupos de estudo.



Legenda: 1: Normal; 2: Sobrepeso; 3: Obeso; 4: SM; 5: DMT2

Figura 33. Abundância da Proteína salivar S100-A9 em A) ControlexSM; B) ControlexDMT2; C) comparação com os 5 grupos de estudo.



Legenda: 1: Normal; 2: Sobrepeso; 3: Obeso; 4: SM; 5: DMT2

10- CONCLUSÃO

Na primeira parte do estudo analisamos os dados de amostras salivares de voluntários saudáveis contra voluntários com gengivite, com foco na identificação de proteínas humanas e bacterianas. Analisar o proteoma humano e o metaproteoma bacteriano nos permitiu ter um entendimento mais amplo dos mecanismos de patogênese da gengivite, entendendo como o corpo humano é afetado pela doença e como a microbiota oral responde a um ambiente adverso inflamatório ocasionado pela resposta do hospedeiro. Conseguimos verificar que proteínas responsáveis pela defesa contra bactérias estão diminuídas, como Anexina, Histatina e Fator de alongamento negativo E, provavelmente facilitando a infecção e o desenvolvimento da

gingivite. Os dados de metaproteoma bacteriano nos mostraram que proteínas responsáveis por resistência a antibióticos, proteção contra ROS, produção do *quorum sensing*, choque osmótico e virulência bacteriana estão aumentados na gengivite, podendo dificultar o tratamento da doença. A junção das análises do proteoma salivar humano e metaproteoma bacteriano nos permitiu observar com maior profundidade a interação entre a microbiota oral e o ser humano, podendo assim tornar mais fácil o tratamento das doenças periodontais.

Na segunda parte do estudo, analisamos voluntários separados em 5 categorias diferentes: normal, sobrepeso, obeso, SM e DMT2, em um número amostral consideravelmente maior. Nossos dados clínicos e antropométricos nos permitiram observar como o aumento do IMC está relacionado à estas. Diversos parâmetros clínicos e antropométricos indicaram alterações substanciais, tanto em comparações com todos os grupos separadamente, quanto nas comparações ControlexDoença.

Nossas análises do proteoma salivar e plasmáticos nos mostraram como o aumento do IMC, a SM e DMT2 impactam na alteração das proteínas. Proteínas como ABCD4, APOC3, WRS, Profilina 1 e S100-A8 apresentaram alterações graduais com o aumento do peso e ainda com a presença de SM e DMT2. Tais alterações nos mostram que essas proteínas acompanham o aumento do IMC e desenvolvimento das doenças estudadas, podendo ser usadas como potenciais bioindicadores preditivos futuramente, em testes bioquímicos, para diagnóstico precoce de SM e DMT2.

A identificação da Proteína 1 de ligação ao domínio LIM também nos permitiu verificar que algumas proteínas não são impactadas pelo aumento da massa corporal, porém apresentam uma clara alteração na SM e DMT2, podendo também ser usado como um indicador para a SM e DMT2, porém não relacionado ao aumento de peso.

O aumento em nosso número de voluntários na parte 2 do estudo nos permitiu observar as alterações proteicas com maior precisão estatística e de forma mais conclusiva. Apesar do menor número de voluntários na parte 1 do projeto, nossos dados podem ajudar a fornecer maior clareza sobre como ocorre o processo patológico da gengivite.

Novos estudos são necessários para validar os potenciais biomarcadores identificados, assim como o estudo do metaboloma plasmático e salivar os quais permitirão um ainda melhor entendimento do processo patológico da SM, DMT2 e gengivite, além de complementar nossos resultados.

11-REFERÊNCIA

ABDEL-MONEIM, A., MAHMOUD, R., ALLAM, G. et al. Relationship between Cytokines and Metabolic Syndrome Components: Role of Pancreatic-Derived Factor, Interleukin-37, and Tumor Necrosis Factor- α in Metabolic Syndrome Patients. *Ind J Clin Biochem*, 2022.

ABESO. Mapa da obesidade. 2022. Disponível em: < <https://abeso.org.br/obesidade-e-sindrome-metabolica/mapa-da-obesidade/> >. Acesso em 04 de dezembro de 2022.

AGARWAL, Nisheeth e RAGHUNAND, Tirumalai R e BISHAI, William R. Regulation of the expression of whiB1 in *Mycobacterium tuberculosis*: role of cAMP receptor protein. *Microbiology (Reading, England)*, v. 152, n. Pt 9, p. 2749–2756, Set 2006.

AITKEN, Juan Pablo e colab. alpha-2-macroglobulin in saliva is associated with glycemic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *Disease markers*, v. 2015, p. 128653, 2015.

ALBERTI, K G M M e colab. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*, v. 120, n. 16, p. 1640–1645, Out 2009.

AL-GOBLAN, ABDULLAH S et al. “Mechanism linking diabetes mellitus and obesity.” *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy* v. 7, p. 587-91, 4 Dec. 2014,

ALKAM D, FELDMAN EZ, SINGH A, Kiaei M. Profilin1 biology and its mutation, actin(g) in disease. *Cell Mol Life Sci*, 74(6):967–81, 2017.

AL-MANSOORI, L., AL-JABER, H., PRINCE, M.S. et al. Role of Inflammatory Cytokines, Growth Factors and Adipokines in Adipogenesis and Insulin Resistance. *Inflammation* 45, 31–44 2022.

AR, PRABHAKAR e colab. Diagnostic applications of saliva in dentistry. *International journal of clinical pediatric dentistry*, v. 2, n. 3, p. 7–13, Set 2009.

ARMITAGE, G. C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology*, 1999.

ARMITAGE, G. C. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontology* 2000, v. 34, n. 1, p. 9–21, Fev 2004.

AROOR, Annayya R e colab. Maladaptive immune and inflammatory pathways lead to cardiovascular insulin resistance. *Metabolism: clinical and experimental*, v. 62, n. 11, p. 1543–1552, Nov 2013.

ASHTON, Nicholas W e colab. Human single-stranded DNA binding proteins are essential for maintaining genomic stability. *BMC molecular biology*, v. 14, p. 9, Abr 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA (ABESO). Diretrizes Brasileiras de Obesidade 2009- 2010. 2009.

Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120:1640–1645

BALZANO-NOGUEIRA L, Ramirez R, ZAMKOVAYA T, DAILEY J, ARDISSONE AN, CHAMALA S, SERRANO-QUÍLEZ J, RUBIO T, HALLER MJ, CONCANNON P, ATKINSON MA, SCHATZ DA, TRIPLETT EW, CONESA A. Integrative analyses of TEDDY Omics data reveal lipid metabolism abnormalities, increased intracellular ROS and heightened inflammation prior to autoimmunity for type 1 diabetes. *Genome Biol*, 21;22(1):39, 2021.

BARCA JM, DALLA Rosa I, MANERO F, LE MAO M, CHUPIN S et al. CLUH couples mitochondrial distribution to the energetic and metabolic status. *J Cell Sci* 130: 1940 – 1951, 2017.

BARNESS, Lewis A e OPITZ, John M e GILBERT-BARNESS, Enid. *Obesity: Genetic, molecular, and environmental aspects*. [S.l: s.n.], 2007.

BOI, R., EBEFORS, K., HENRICSSON, M. et al. Modified lipid metabolism and cytosolic phospholipase A2 activation in mesangial cells under pro-inflammatory conditions. *Sci Rep* 12, 7322, 2022.

BORISOVA, Marina e GISIN, Jonathan e MAYER, Christoph. The N-Acetylmuramic Acid 6-Phosphate Phosphatase MupP Completes the Pseudomonas Peptidoglycan Recycling Pathway Leading to Intrinsic Fosfomycin Resistance. *mBio*, v. 8, n. 2, Mar 2017.

BOSTANCI, N e colab. Application of label-free absolute quantitative proteomics in human gingival crevicular fluid by LC/MS E (gingival exudatome). *Journal of proteome research*, v. 9, n. 5, p. 2191–2199, Maio 2010.

BOSTROM, P e colab. A PGC1 alpha dependent myokine that drives brown fat like development of white fat and thermogenesis. *Nature*, 2012.

BRACHER, Andreas e VERGHESE, Jacob. The nucleotide exchange factors of Hsp70 molecular chaperones. *Frontiers in molecular biosciences*, v. 2, p. 10, 2015.

BULLO, M e colab. Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet 2. *Public Health Nutr.*, 2007.

BURKE JE, DENNIS EA. Phospholipase A2 biochemistry. *Cardiovasc Drugs Ther*, 23(1):49-59, 2009.

BUYSE, Marc e colab. Integrating biomarkers in clinical trials. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. [S.l: s.n.], 2011.

BYERS, David M e GONG, Huansheng. Acyl carrier protein: structure-function relationships in a conserved multifunctional protein family. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, v. 85, n. 6, p. 649–662, Dez 2007.

CALABRO, Paolo e GOLIA, Enrica e YEH, Edward T H. Role of C-reactive protein in acute myocardial infarction and stroke: possible therapeutic approaches. *Current pharmaceutical biotechnology*, v. 13, n. 1, p. 4–16, Jan 2012.

CANCELLO, R; HENEGAR, C; VIGUERIE, N; TALEB, S; POITOU, C; ROUAULT, C; COUPAYE, M; PELLOUX, V; HUGOL, D; BOUILLOT, JL; BOULOUMIÉ, A; BARBATELLI, G; CINTI, S; SVENSSON, PA; BARSH, GS; ZUCKER, JD; BASDEVANT, A; LANGIN, D; CLÉMENT, K. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes*, v;54, n 8, :2277-86, 2005.

CARNIELLI, Carolina Moretto e colab. Combining discovery and targeted proteomics reveals a prognostic signature in oral cancer. *Nature Communications*, 2018.

CERNOOKA, Elina e colab. Structural Basis for DNA Recognition of a Single-stranded DNA-binding Protein from Enterobacter Phage Enc34. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 15529, Nov 2017.

CHAFFEE, Benjamin W. e WESTON, Scott J. Association Between Chronic Periodontal Disease and Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Periodontology*, 2010.

CHAHINE, Lama M e STERN, Matthew B e CHEN-PLOTKIN, Alice. Blood-based biomarkers for Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*, v. 20 Suppl 1, p. S99-103, Jan 2014.

CHANG, Jung-Su e colab. Interleukin 10 and clustering of metabolic syndrome components in pediatrics. *European journal of clinical investigation*, v. 44, n. 4, p. 384–394, Abr 2014.

CHANG, Yu-Hung e colab. Visfatin in overweight/obesity, type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular diseases: a meta-analysis and systemic review. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 2011.

CHEDRAUI, Peter e colab. Angiogenesis, inflammation and endothelial function in postmenopausal women screened for the metabolic syndrome. *Maturitas*, v. 77, n. 4, p. 370–374, Abr 2014.

CHEN KC, LIN YC, CHAO WC, CHUNG HK, CHI SS, LIU WS, WU WT. Association of genetic polymorphisms of glutamate decarboxylase 2 and the dopamine D2 receptor with obesity in Taiwanese subjects. *Ann Saudi Med*, 32(2):121-6, 2012.

CHEN, C., HEMME, C., BELENO, J. et al. Oral microbiota of periodontal health and disease and their changes after nonsurgical periodontal therapy. *ISME J* v 12, 1210–1224, 2018.

CHEN, Tsute e OLSEN, Ingar. *Porphyromonas gingivalis* and its CRISPR-Cas system. *Journal of oral microbiology*, v. 11, n. 1, p. 1638196, 2019.

CHO E, JUNG W, JOO HY, PARK ER, KIM MY, KIM SB, KIM KS, LIM YB, LEE KH, SHIN HJ. Cluh plays a pivotal role during adipogenesis by regulating the activity of mitochondria. *Sci Rep*, 2;9(1):6820, 2019.

COELHO, D., KIM, J. C., MIOUSSE, I. R., FUNG, S., DU MOULIN, M., BUERS, I., SUORMALA, T., BURDA, P., FRAPOLLI, M., STUCKI, M., NURNBERG, P., THIELE, H., ROBENEK, H., HOHNE, W., LONGO, N., et al. Mutations in ABCD4 cause a new inborn error of vitamin B12 metabolism. *Nat. Genet.* 44, 1152–1155, 2012.

CSONGRÁDI, É.; KÁPLÁR, M.; NAGY, B.; KOCH, C.; JUHÁSZ, A.; BAJNOK, L.; VARGA, Z.; SERES, I.; KARÁNYI, Z.; MAGYAR, M.; et al. Adipokines as atherothrombotic risk factors in obese subjects: Associations with haemostatic markers and common carotid wall thickness. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2017, 27, 571–580.

DA, SILVA-BOGHOSSIAN., C. M., DO SOUTO., R. M., LUIZ, R. R., and COLOMBO, A. P. V. Association of red complex, *A. actinomycetemcomitans* and nonoral bacteria with periodontal diseases. *Archives of Oral Biology*, 56, 9, 899-906, 2021.

DASSA, E., and BOUIGE, P. The ABC of ABCs: A phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res. Microbiol.* 152, 211–229, 2001.

DAVOLI, April e HOCEVAR, Barbara A e BROWN, Thomas L. Progression and treatment of HER2-positive breast cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, v. 65, n. 4, p. 611–623, Mar 2010.

De SIQUEIRA VALADARES, L.T., de SOUZA, L.S.B., SALGADO JÚNIOR, V.A. et al. Prevalence of metabolic syndrome in Brazilian adults in the last 10 years: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* 22, 327, 2022.

DE SPIEGELEER, M., DE PAEPE, E., VAN MEULEBROEK, L. et al. Paediatric obesity: a systematic review and pathway mapping of metabolic alterations underlying early disease processes. *Mol Med* 27, 145, 2021.

DEFRONZO, R A e FERRANNINI, E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes care*, v. 14, n. 3, p. 173–194, Mar 1991.

DEFRONZO, R A. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. Diabetes. United States: [s.n.], Abr 2009.

DHANDA, N e TAHERI, S. A narrative review of obesity and hearing loss. International Journal of Obesity. [S.l: s.n.], 2017.

DIRETRIZES BRASILEIRAS DE OBESIDADE/ABESO. Diretrizes brasileiras de obesidade 2016/ABESO. 4.ed. - São Paulo, SP., 2016.

EBERHARD, J e colab. Experimental gingivitis induces systemic inflammatory markers in young healthy individuals: a single-subject interventional study. PLoS ONE. [S.l: s.n.], 2013.

ENRIORI, Pj e colab. Leptin resistance and obesity. Obesity, 2006.

ESPES D, LILJEBÄCK H, HILL H, ELKSNIS A, CABALLERO-CORBALAN J, CARLSSON PO. GABA induces a hormonal counter-regulatory response in subjects with long-standing type 1 diabetes. BMJ Open Diabetes Res Care. 2021 Oct;9(1):e002442. doi: 10.1136/bmjdr-2021-002442. PMID: 34635547; PMCID: PMC8506884.

FERNANDEZ-SANCHEZ, A e colab. Inflammation, oxidative stress, and obesity. Int J Mol Sci, 2011.

FESTA, A e colab. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). Circulation, v. 102, n. 1, p. 42–47, Jul 2000.

FLORIANO, Pierre N e colab. Use of saliva-based nano-biochip tests for acute myocardial infarction at the point of care: A feasibility study. Clinical Chemistry, 2009.

Flower RJ. Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. Br. J. Pharmacol, 94, 987-1015, 1988.

FONSECA-ALANIZ, Miriam Helena e colab. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. Jornal de Pediatria, 2007.

FRANCHINI, Roberto e colab. Poor oral hygiene and gingivitis are associated with obesity and overweight status in paediatric subjects. *Journal of Clinical Periodontology*, 2011.

GELONEZE, B; VASQUES, ACJ; STABE, CFC; PAREJA, JC; ROSADO, LEFPL; QUEIROZ, EC; TAMBASCIA, MA. HOMA1-IR and HOMA2-IR indexes in identifying insulin resistance and metabolic syndrome: Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS). *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, v 53, n 2, 281–287, 2009.

GENCO, Robert J e colab. A Proposed Model Linking Inflammation to Obesity, Diabetes, and Periodontal Infections. *Journal of Periodontology*, 2005.

GEYER PE, HOLDT LM, TEUPSER D, MANN M. Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. *Mol Syst Biol*, 26;13(9):942, 2017.

GOKHALE, Kunal M e TELVEKAR, Vikas N. Novel peptidomimetic peptide deformylase (PDF) inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chemical biology & drug design*, v. 97, n. 1, p. 148–156, Jan 2021.

GONÇALVES, LR; SOARES, MR; NOGUEIRA, FC; GARCIA, C; CAMISASCA, DR; DOMONT, G; FEITOSA, AC; PEREIRA DA; ZINGALI, RB; ALVES, G. Comparative proteomic analysis of whole saliva from chronic periodontitis patients. *Journal of proteomics*, v 73, n 7, 1334–1341, 2010.

GONG R, LIU Y, LUO G, YANG L. Dietary Magnesium Intake Affects the Vitamin D Effects on HOMA- β and Risk of Pancreatic β -Cell Dysfunction: A Cross-Sectional Study. *Front Nutr*, 29;9:84974, 2022.

GONZALEZ-ROMERO, Rodrigo e EIRIN-LOPEZ, Jose M e AUSIO, Juan. Evolution of high mobility group nucleosome-binding proteins and its implications for vertebrate chromatin specialization. *Molecular biology and evolution*, v. 32, n. 1, p. 121–131, Jan 2015.

GOPAL, Deepa M. e colab. Serum albumin concentration and heart failure risk: The health, aging, and body composition study. *American Heart Journal*, 2010.

GOUDA, W., MAGEED, L., ABD EL Dayem, S. M., ASHOUR, E. & AFIFY, M. Evaluation of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in type 1 diabetes mellitus. Bull. Natl. Res. Centre 42, 14, 2018.

GRUNDY, SM; CLEEMAN, JI; DANIELS, SR; DONATO, KA; ECKEL, RH; FRANKLIN, BA; GORDON, DJ; KRAUSS, RM; SAVAGE, PJ; SMITH, SCJR; SPERTUS, JA; COSTA, F. American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. Circulation, v 112,n 17,:2735-52, 2005.

GUO X, ASTHANA P, Gurung S, ZHANG S, WONG SKK, FALLAH S, CHOW CFW, CHE S, Zhai L, WANG Z, GE X, JIANG Z, WU J, ZHANG Y, WU X, XU K, LIN CY, KWAN HY, LYU A, ZHOU Z, BIAN ZX, WONG HLX. Regulation of age-associated insulin resistance by MT1-MMP-mediated cleavage of insulin receptor. Nat Commun, 29;13(1):3749, 2022.

HAFFAJEE; A. D., CUGINI, M. A; TANNER, A; POLLACK, R. P; SMITH, C; KENT, R. L., and SOCRANSKY, S. S. Subgingival microbiota in healthy, well- maintained elder and periodontitis subjects. Journal of clinical periodontology, 25, 5, 346-353, 1998.

HAJER, Gideon R e colab. Levels of homocysteine are increased in metabolic syndrome patients but are not associated with an increased cardiovascular risk, in contrast to patients without the metabolic syndrome. Heart (British Cardiac Society), v. 93, n. 2, p. 216–220, Feb 2007.

HARRISON, Celia. GrpE, a nucleotide exchange factor for DnaK. Cell stress & chaperones, v. 8, n. 3, p. 218–224, 2003.

HASTINGS JF, VASQUEZ E. Diabetes and tooth loss among working-age African Americans: a national perspective. Social Work in Public Health. 2017;32(7):443–51.

HE H, HOLL K, DEBEHNKE S, YEO CT, HANSEN P, GEBRE AK, LEONE-KABLER S, RUAS M, PARKS JS, PARRINGTON J, SOLBERG Woods LC. Tpcn2 knockout mice have improved insulin sensitivity and are protected against high-fat diet-induced weight gain. Physiol Genomics, 1;50(8):605-614, 2018.

Hospital Israelita Albert Einstein. Obesidade. Acesso em 10 de Abril de 2017. Disponível em <https://www.einstein.br/doencas-sintomas/obesidade>

HOTAMISLIGIL, G S e SHARGILL, N S e SPIEGELMAN, B M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. Science (New York, N.Y.), 1993.

HSU, P.-S.; WU, C.-S.; CHANG, J.-F.; LIN, W.-N. Leptin Promotes cPLA2 Gene Expression through Activation of the MAPK/NF- κ B/p300 Cascade. Int. J. Mol. Sci. 2015, 16, 27640–27658.

HUANG, Jiexue e colab. Genes of ACYL CARRIER PROTEIN Family Show Different Expression Profiles and Overexpression of ACYL CARRIER PROTEIN 5 Modulates Fatty Acid Composition and Enhances Salt Stress Tolerance in Arabidopsis. Frontiers in plant science, v. 8, p. 987, 2017.

HUANG, N e GIBSON 3RD, F C. Immuno-pathogenesis of Periodontal Disease: Current and Emerging Paradigms. Curr Oral Health Rep, 2014.

HUNTER CS, et al. Islet α -, β -, and δ -cell development is controlled by the Ldb1 coregulator, acting primarily with the islet-1 transcription factor. Diabetes, 62(3):875–886, 2013.

HUYNH, RA; MOHAN, C. Alzheimer's Disease: Biomarkers in the Genome, Blood, and Cerebrospinal Fluid. Front Neurol.v 20, n 8,102, 2017.

Hwang I, Jo K, Shin KC, Kim JI, Ji Y, Park YJ, Park J, Jeon YG, Ka S, Suk S, Noh HL, Choe SS, Alfadda AA, Kim JK, Kim S, Kim JB. GABA-stimulated adipose-derived stem cells suppress subcutaneous adipose inflammation in obesity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Jun 11;116(24):11936-11945. doi: 10.1073/pnas.1822067116. Epub 2019 Jun 3. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 Jul 7;117(27):16083. PMID: 31160440; PMCID: PMC6575165.

IDF Diabetes Atlas 8th ed. International Diabetes Federation, Brussels, Belgium, 2017.

IDF Diabetes Atlas. 10th ed. International Diabetes Federation, Brussels, Belgium, 2021.

IDF Diabetes Atlas. 6th ed. International Diabetes Federation, Brussels, Belgium, 2013.

INOUE H, SHIRAKAWA J, TOGASHI Y, TAJIMA K, OKUYAMA T, KYOHARA M, TANAKA Y, ORIME K, SAISHO Y, YAMADA T, SHIBUE K, KULKARNI RN, TERAUCHI Y. Signaling between pancreatic β cells and macrophages via S100 calcium-binding protein A8 exacerbates β -cell apoptosis and islet inflammation. *J Biol Chem*, 20;293(16):5934-5946, 2018.

INZUCCHI, Silvio E e colab. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centered approach: update to a position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes care*, v. 38, n. 1, p. 140–149, Jan 2015.

ITOH Y. MT1-MMP: a key regulator of cell migration in tissue. *IUBMB Life* 58:589–596, 2006.

IYER, Shankar Subramanian e CHENG, Gehong. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Critical reviews in immunology*, v. 32, n. 1, p. 23–63, 2012.

JAISWAL PK, KOUL S, PALANISAMY N, KOUL HK. Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 (EIF4G1): a target for cancer therapeutic intervention? *Cancer Cell Int*, 19:224, 2019.

JIANG, Haibo e KONG, Renqiu e XU, Xudong. The N-acetylmuramic acid 6-phosphate etherase gene promotes growth and cell differentiation of cyanobacteria under light-limiting conditions. *Journal of bacteriology*, v. 192, n. 8, p. 2239–2245, Abr 2010.

JO S, LOCKRIDGE A, MOHAN R, ESCH N, SCHLICHTING R, PANIGRAHY N, ESSAWY A, GUSTAFSON E, ALEJANDRO EU. Translational Factor eIF4G1 Regulates Glucose Homeostasis and Pancreatic β -Cell Function. *Diabetes*, 27:db200057, 2020.

JOOSTEN, Michel M e colab. beta2-microglobulin, cystatin C, and creatinine and risk of symptomatic peripheral artery disease. *Journal of the American Heart Association*, v. 3, n. 4, Jun 2014.

KAHN, Steven E e HULL, Rebecca L e UTZSCHNEIDER, Kristina M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, v. 444, n. 7121, p. 840–846, Dez 2006.

KANTER JE, SHAO B, KRAMER F, BARNHART S, SHIMIZU-ALBERGINE M, VAISAR T, GRAHAM MJ, CROOKE RM, MANUEL CR, HAEUSLER RA, mar D, BOMSZTYK K, HOKANSON JE, KINNEY GL, SNELL-BERGEON JK, HEINECKE JW, BORNFELDT KE. Increased apolipoprotein C3 drives cardiovascular risk in type 1 diabetes. *J Clin Invest*, 11;129(10):4165-4179, 2019.

KAPATRAL V, ANDERSON I, IVANOVA N, REZNIK G, LOS T, LYKIDIS A, BHATTACHARYYA A, BARTMAN A, GARDNER W, GRECHKIN G, ZHU L, VASIEVA O, CHU L, KOGAN Y, CHAGA O, GOLTSMAN E, BERNAL A, LARSEN N, D'SOUZA M, WALUNAS T, PUSCH G, HASELKORN R, FONSTEIN M, KYRPIDES N, OVERBEEK R. Genome sequence and analysis of the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* strain ATCC 25586. *J Bacteriol.* Apr, v.184, n. 7, p 2005-18, 2002.

KARMIRIS, K e colab. Circulating levels of leptin, adiponectin, resistin, and ghrelin in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2006.

KAWAI T, AUTIERI MV, SCALIA R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *Am J Physiol Cell Physiol*, 1;320(3):C375-C391, 2021.

KAYAL, Rayyan A. The role of osteoimmunology in periodontal disease. *BioMed Research International*, 2013.

KIM SW, CHOI JW, YUN JW, CHUNG IS, CHO HC, SONG SE, IM SS, SONG DK. Proteomics approach to identify serum biomarkers associated with the progression of diabetes in Korean patients with abdominal obesity. *PLoS One.* 10;14(9):e0222032, 2019.

KIM, Jeffrey J e KIM, Christine J e CAMARGO, Paulo M. Salivary biomarkers in the diagnosis of periodontal diseases. *Journal of the California Dental Association*, 2013.

KITAI K, KAWAGUCHI K, TOMOHIRO T, MORITA M, SO T, IMANAKA T. The lysosomal protein ABCD4 can transport vitamin B12 across liposomal membranes in vitro. *J Biol Chem*, 296:100654, 2021.

KIVIMÄKI M, STRANDBERG T, PENTTI J, NYBERG ST, FRANK P, JOKELA M, ERVASTI J, SUOMINEN SB, VAHTERA J, SIPILÄ PN, LINDBOHN JV, FERRIE JE. Body-mass index and risk of obesity-related complex multimorbidity: an observational multicohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 10(4):253-263, 2022.

KONRAD, Astrid e colab. Resistin is an inflammatory marker of inflammatory bowel disease in humans. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 2007.

KUMADA, M.; KIHARA, S.; OUCHI, N.; KOBAYASHI, H.; OKAMOTO, Y.; OHASHI, K.; MAEDA, K.; NAGARETANI, H.; KISHIDA, K.; MAEDA, N.; et al. Adiponectin Specifically Increased Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Through Interleukin-10 Expression in Human Macrophages. *Circulation* 2004, 109, 2046–2049.

LANDECK, Lilla e colab. Biomarkers and personalized medicine: Current status and further perspectives with special focus on dermatology. *Experimental Dermatology*, 2016.

LANN, Danielle e LEROITH, Derek. Insulin resistance as the underlying cause for the metabolic syndrome. *The Medical clinics of North America*, v. 91, n. 6, p. 1063–77, viii, Nov 2007.

LAU, Wayne Bond e colab. Role of Adipokines in Cardiovascular Disease. *Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society*, v. 81, n. 7, p. 920–928, Jun 2017.

LI J, ZHAO D, LIU J, et al. Association of apolipoprotein Cs with new-onset type 2 diabetes mellitus: findings from the Chinese multi-provincial cohort study. *BMJ Open*, 11:e052388, 2021.

LI L, KRZNAR P, ERBAN A, AGAZZI A, MARTIN-LEVILAIN J, SUPALE S, KOPKA J, ZAMBONI N, MAECHLER P. Metabolomics Identifies a Biomarker Revealing In Vivo Loss of Functional β -Cell Mass Before Diabetes Onset. *Diabetes*, 68(12):2272-2286, 2019.

LI X, ZHAO Y, CHEN C, YANG L, LEE HH, WANG Z, ZHANG N, KOLONIN MG, AN Z, GE X, SCHERER PE, SUN K. Critical Role of Matrix Metalloproteinase 14 in Adipose Tissue Remodeling during Obesity. *Mol Cell Biol*, 30;40(8):e00564-19, 2020.

LI Z, GUEANT-RODRIGUEZ RM, QUILLIOT D, SIRVEAUX MA, MEYRE D, GUEANT JL, BRUNAUD L. Folate and vitamin B12 status is associated with insulin resistance and metabolic syndrome in morbid obesity. *Clin Nutr*, 37(5):1700-1706, 2018.

LI, Heng e colab. Antibacterial mechanism of high-mobility group nucleosomal-binding domain 2 on the Gram-negative bacteria *Escherichia coli*. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, v. 18, n. 5, p. 410–420, Maio 2017.

LIU, J., LI, Y., LI, J., ZHENG, D., LIU, C. Sources of automatic office blood pressure measurement error: a systematic review. *Physiol Meas*, 43, 9, 2022.

LIEW CW, ASSMANN A, Templin AT, et al. Insulin regulates carboxypeptidase E by modulating translation initiation scaffolding protein eIF4G1 in pancreatic β cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111:E2319–E2328, 2014.

LIND, L., SUNDSTRÖM, J; ÄRNLÖV, J. Proteins associated with incident metabolic syndrome in population-based cohorts. *Diabetol Metab Syndr* 13, 131, 2021.

LIU Y, GENG T, WAN Z, LU Q, ZHANG X, QIU Z, LI L, ZHU K, LIU L, PAN A, Liu G. Associations of Serum Folate and Vitamin B12 Levels With Cardiovascular Disease Mortality Among Patients With Type 2 Diabetes. *JAMA Netw Open*. 4;5(1):e2146124, 2022

LIU Y, KEPPEL JD, SHALEV A, S HUNTER C. LDB1-mediated transcriptional complexes are sensitive to islet stress. *Islets*, 31;14(1):58-68, 2022.

LIU, J; LI, Y; LI, J; ZHENG, D; LIU, C. Sources of automatic office blood pressure measurement error: a systematic review. *Physiol Meas*, v 43, n 9, 2022.

LOPEZ NJ, QUINTERO A, CASANOVA PA, IBIETA CI, BAELUM V, LOPEZ R. Effects of periodontal therapy on systemic markers of inflammation in patients with metabolic syndrome: a controlled clinical trial. *J Periodontol*. 2012;83(3):267-278

LUMENG, Carey N e SALTIEL, Alan R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *The Journal of clinical investigation*, v. 121, n. 6, p. 2111–2117, Jun 2011.

MALACHIAS et al. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2016; 107: 7-13

MARTENS, L e colab. Association between overweight/obesity and periodontal disease in children and adolescents: a systematic review and meta-analysis. *European archives of paediatric dentistry: official journal of the European Academy of Paediatric Dentistry*, v. 18, n. 2, p. 69–82, Abr 2017.

MARTINEZ, Fernando O e HELMING, Laura e GORDON, Siamon. Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. *Annual Review of Immunology*, 2009.

MATSUMOTO-NAKANO, M. e colab. Molecular interactions of alanine-rich and proline-rich regions of cell surface protein antigen c in *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiology and Immunology*, 2008.

MATSUZAWA, Yuji. Therapy insight: Adipocytokines in metabolic syndrome and related cardiovascular disease. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*. [S.l.: s.n.], 2006.

MATTHEWS DR, HOSKER JP, RUDENSKI AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 28:412–419, 1985.

MAY, Holly C e colab. Thioredoxin-A is a virulence factor and mediator of the type IV pilus system in *Acinetobacter baumannii*. *PloS one*, v. 14, n. 7, p. e0218505, 2019.

MCDONALD, E E e colab. Histatin 1 resists proteolytic degradation when adsorbed to hydroxyapatite. *Journal of dental research*, v. 90, n. 2, p. 268–272, Fev 2011.

MCGHEE, David J M e colab. A Systematic Review of Biomarkers for Disease Progression in Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*, 2014.

MENEZES, Miriam Rose e colab. Pivotal role of inosine triphosphate pyrophosphatase in maintaining genome stability and the prevention of apoptosis in human cells. *PloS one*, v. 7, n. 2, p. e32313, 2012.

MIHALOPOULOS, N.L.; YAP, J.T.; BEARDMORE, B.; HOLUBKOV, R.; NANJEE, M.N.; HOFFMAN, J.M. Cold-Activated Brown Adipose Tissue is Associated with Less Cardiometabolic Dysfunction in Young Adults with Obesity. *Obesity* 2020, 28, 916–923.

MORITA T, YAMAZAKI Y, MITA A, et al. A cohort study on the association between periodontal disease and the development of metabolic syndrome. *J Periodontol.* 2010;81(4):512-519.

MOSCHEN, Alexander R e GERNER, Romana R e TILG, Herbert. Pre-B cell colony enhancing factor/NAMPT/visfatin in inflammation and obesity-related disorders. *Current pharmaceutical design*, 2010.

MURARKA, Pooja e colab. Functional characterization of the transcription regulator WhiB1 from *Gordonia* sp. IITR100. *Microbiology (Reading, England)*, v. 166, n. 12, p. 1181–1190, Dez 2020.

NAGAMPALLI, Raghavendra Sashi Krishna e colab. Human mitochondrial pyruvate carrier 2 as an autonomous membrane transporter. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 3510, 22 Dez 2018.

NAGHSH, Narges e colab. Relationship Between Periodontal Disease and Serum Factors in Patients Undergoing Hemodialysis. *The open dentistry journal*. United Arab Emirates: [s.n.], 2017.

NAKAMURA, Kazuto e FUSTER, José J e WALSH, Kenneth. Adipokines: A link between obesity and cardiovascular disease. *Journal of Cardiology*. [S.l: s.n.], 2014.

NI GH, CHENG JF, LI YJ, XIE QY, YANG TL, CHEN MF. Effect of profilin-1 on the asymmetric dimethylarginine-induced vascular lesion-associated hypertension. *Kaohsiung J Med Sci*, 38(2):149-156. doi: 10.1002/kjm2.12468, 2022.

NISHIDA, Nobuko e colab. Determination of Smoking and Obesity as Periodontitis Risks Using the Classification and Regression Tree Method. *Journal of Periodontology*, 2005.

NISHIMURA, Satoshi e colab. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature medicine*, v. 15, n. 8, p. 914–920, Ago 2009.

NOBBS, A H e JENKINSON, H F e JAKUBOVICS, N S. Stick to your gums: mechanisms of oral microbial adherence. *Journal of dental research*, v. 90, n. 11, p. 1271–1278, Nov 2011.

O'NEILL, S e O'DRISCOLL, L. Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, v. 16, n. 1, p. 1–12, Jan 2015.

ONAT, Altan e colab. Serum uric acid is a determinant of metabolic syndrome in a population- based study. *American journal of hypertension*, v. 19, n. 10, p. 1055–1062, Out 2006.

OPPENHEIM, Frank G e colab. Salivary proteome and its genetic polymorphisms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1098, p. 22–50, Mar 2007.

OSTROWSKA L, GORNOWICZ A, PIETRASZEWSKA B, BIELAWSKI K, BIELAWSKA A. Which salivary components can differentiate metabolic obesity? *PLoS One*. 29;15(6):e0235358, 2020.

OTVOS, L Jr. The short proline-rich antibacterial peptide family. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, v. 59, n. 7, p. 1138–1150, Jul 2002.

OUCHI, Noriyuki e colab. Protective Roles of Adipocytokines and Myokines in Cardiovascular Disease. *Circulation Journal*, 2016.

PARKKILA, S e colab. Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzymes VI, II, and I in human parotid and submandibular glands. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, v. 38, n. 7, p. 941–947, Jul 1990.

PÄRNÄNEN, P., LÄHTEENMÄKI, H., TERVAHARTIALA, T., RÄISÄNEN, I.T., SORSA T. Lingonberries-General and Oral Effects on the Microbiome and Inflammation. *Nutrients*, 13, 11, 3738, 2021.

PÄRNÄNEN, P., SORSA, T., TERVAHARTIALA, T., NIKULA-IJÄS, P. Isolation, characterization and regulation of moonlighting proteases from *Candida glabrata* cell wall. *Microb. Pathog*, 149, 104547, 2020.

PERLSTEIN, Meyer I e BISSADA, Nabil F. Influence of obesity and hypertension on the severity of periodontitis in rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 1977.

PETRIE JR, GUZIK TJ, TOUYZ RM. Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease: Clinical Insights and Vascular Mechanisms. *Can J Cardiol*, 34(5):575-584, 2018.

PICCO, Daniele de Cassia Rodrigues e colab. Children with a Higher Activity of Carbonic Anhydrase VI in Saliva Are More Likely to Develop Dental Caries. *Caries research*, v. 51, n. 4, p. 394–401, 2017.

PIHLSTROM, B L e MICHALOWICZ, B S e JOHNSON, N W. Periodontal diseases. *Lancet*, 2005.

POPKIN, Barry M. e ADAIR, Linda S. e NG, Shu Wen. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutrition Reviews*, 2012.

PORTER, Stacy A e colab. Abdominal subcutaneous adipose tissue: A protective fat depot? *Diabetes Care*, 2009.

PRADEEP, A R e colab. Gingival crevicular fluid and serum visfatin concentration: their relationship in periodontal health and disease. *Journal of periodontology*, 2011.

PRUNK, M; PERIŠIĆ; NANUT, M; SABOTIČ, J; KOS, J. Cystatins, cysteine peptidase inhibitors, as regulators of immune cell cytotoxicity. *Period. Biol.*, 118, 4, 353–62, 2016.

PUCCI, Giacomo e colab. Sex- and gender-related prevalence, cardiovascular risk and therapeutic approach in metabolic syndrome: A review of the literature. *Pharmacological research*, v. 120, p. 34–42, Jun 2017.

RAMENZONI, L. L., HOFER, D., SOLDNER, A., WIEDEMEIER, D., ATTIN, T., SCHMIDLIN, P.R. Origin of MMP-8 and Lactoferrin levels from gingival crevicular fluid, salivary glands and whole saliva. *BMC Oral Health* 21, 5, 21, 1, 385, 2021.

RAMENZONI, L. L; LEHNER, M. P; KAUFMANN, M. E; WIEDEMEIER, D; ATTIN, T; SCHMIDLIN, P. R. Oral diagnostic methods for the detection of periodontal disease. *Diagnostics (Basel)*. 11, 3, 571, 2021.

RAMIRES, Elyssia Karine Nunes Mendonça et al . Prevalence and Factors Associated with Metabolic Syndrome among Brazilian Adult Population: National Health Survey - 2013. *Arq. Bras. Cardiol.*, São Paulo, v. 110, n. 5, p. 455-466, maio 2018

RATH, Devashish e colab. The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, v. 117, p. 119–128, Out 2015.

RATHMANN, W e colab. Sex differences in the associations of socioeconomic status with undiagnosed diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the elderly population: the KORA Survey 2000. *European journal of public health*, v. 15, n. 6, p. 627–633, Dez 2005.

RATHNAYAKE N, AKERMAN S, KLINGE B, LUNDEGREN N, JANSSON H, TRYSELIUS Y, SORSA T, GUSTAFSSON A. Salivary biomarkers for detection of systemic diseases. *PLoS One*, 24;8(4):e61356, 2013.

RAYNAL, P e POLLARD, H B. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1197, n. 1, p. 63–93, Abr 1994.

REAVEN G. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37:1595–607, 1988.

REAVEN GM. Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. *Annu Rev Med*, 44:121-31, 1993.

REHMAN, Kanwal e colab. Role of Interleukin-6 in Development of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Mellitus. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, v. 27, n. 3, p. 229–236, 2017.

RIFAI, Nader e RIDKER, Paul M. Inflammatory markers and coronary heart disease. *Current opinion in lipidology*, v. 13, n. 4, p. 383–389, Ago 2002.

Robberecht, H; BRUYNE, TD; HERMANS, N. Biomarkers of the metabolic syndrome: influence of selected foodstuffs, containing bioactive components. *Phytochem Rev*, 17, 351–377, 2018.

ROMEO, Giulio R e LEE, Jongsoon e SHOELSON, Steven E. Metabolic syndrome, insulin resistance, and roles of inflammation-- mechanisms and therapeutic targets. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 32, n. 8, p. 1771–1776, Ago 2012.

RUTTER G.A., PULLEN T.J., HODSON D.J., MARTINEZ-SANCHEZ A., Pancreatic beta-cell identity, glucose sensing and the control of insulin secretion, *Biochem. J*, 466, 203–218, 2015.

SABERI, V. B.; YOUSEFI, F; YOUSEFI, T. QUIEQ, D. Assessment of mucin and alpha-amylase levels in gingival crevicular fluid of chronic periodontitis patients. *Oral Dis*, 28, 1, 210-215, 2020.

Saito T, Murakami M, Shimazaki Y, Matsumoto S, Yamashita Y. The Extent of Alveolar Bone Loss Is Associated With Impaired Glucose Tolerance in Japanese Men. *J Periodontol*. 2006;77(3):392–397.

SAITO T, MURAKAMI M, SHIMAZAKI Y, OOBAYASHI K, MATSUMOTO S, KOGA T. Association Between Alveolar Bone Loss and Elevated Serum CReactive Protein in Japanese Men. *J Periodontol*. 2003;74(12):1741–

SAITO T, MASAYUKI M et al. Brown adipose tissue as a regulator of energy expenditure and body fat in humans. *Diabetes and Metabolism Journal*. [S.l: s.n.] , 2013.

SAITO, Toshiyuki e SHIMAZAKI, Yoshihiro. Metabolic disorders related to obesity and periodontal disease. *Periodontology* 2000. [S.l: s.n.] , 2007.

SANCHEZ, G. A; MIOZZA, V. A; DELGADO, A; BUSCH, L. Relationship between salivary mucin or amylase and the periodontal status. *Oral Diseases*, 19, 6, 585–591, 2013.

SANTOS, E.O; JR, N.A; DIAS, G.M; MAZOTTO, A.M; VERMELHO, A; VORA, G.J; WILSON, B; BELTRAN, V.H; BOURNE, D.G; ROUX, F.R.L; THOMPSON, F.L. Genomic and proteomic analyses of the coral pathogen *Vibrio coralliilyticus* reveal a diverse virulence repertoire. *The ISME Journal*, v. 5, n. 9, p 1471-83, 2011

SATPATHY, Anurag e colab. Serum interleukin-1beta in subjects with abdominal obesity and periodontitis. *Obesity research & clinical practice*, v. 9, n. 5, p. 513–521, 2015.

SCHATTON, D. et al. CLUH regulates mitochondrial metabolism by controlling translation and decay of target mRNAs. *J. Cell Biol* 216,675–693, 2017.

SCHLESINGER, D H e HAY, D I. Complete covalent structure of a proline-rich phosphoprotein, PRP-2, an inhibitor of calcium phosphate crystal growth from human parotid saliva. *International journal of peptide and protein research*, v. 27, n. 4, p. 373–379, Abr 1986.

SERATA, Masaki e colab. Roles of thioredoxin and thioredoxin reductase in the resistance to oxidative stress in *Lactobacillus casei*. *Microbiology (Reading, England)*, v. 158, n. Pt 4, p. 953–962, Abr 2012.

SFASCIOTTI, Gian Luca. Childhood overweight-obesity and periodontal diseases: is there a real correlation? *Annali di Stomatologia*, 2016.

SHAH, Arti e MEHTA, Nehal e REILLY, Muredach P. Adipose inflammation, insulin resistance, and cardiovascular disease. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition*, 2008.

SHANI, N., JIMENEZ-SANCHEZ, G., STEEL, G., DEAN, M., and VALLE, D. Identification of a fourth half ABC transporter in the human peroxisomal membrane, *Hum. Mol. Genet.* 6, 1925–1931, 1997.

SHEN, Jinhua e colab. Leptin enhances TNF- α production via p38 and JNK MAPK in LPS-stimulated Kupffer cells. *Life Sciences*, 2005.

SHIMODAIRA M, NIWA T, NAKAJIMA K, KOBAYASHI M, HANYU N, NAKAYAMA T. The relationship between serum calcium level and early-phase insulin secretion in normoglycemic and pre-diabetic individuals. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 123:165–169, 2015.

SIERRA-JOHNSON, Justo e colab. Relation of increased leptin concentrations to history of myocardial infarction and stroke in the United States population. *The American journal of cardiology*, 2007.

SILVA CVF. Proteoma do plasma e da saliva em adultos jovens com obesidade e sobrepeso como possível biomarcador precoce de doença periodontal e risco cardiovascular. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) -UERJ-ZO, Rio de Janeiro, p. 108, 2019.

SILVA-BOGHOSSIAN, Carina M. e colab. Quantitative Proteomic Analysis of Gingival Crevicular Fluid in Different Periodontal Conditions. PLoS ONE, 2013.

SLODKOWSKA, Elzbieta A e ROSS, Jeffrey S. MammaPrint™ 70-gene signature: Another milestone in personalized medical care for breast cancer patients. Expert Review of Molecular Diagnostics. [S.l: s.n.], 2009.

SOCRANSKY, S. S., HAFFAJEE, A. D. Periodontal microbial ecology. Periodontology 2000, 38, 1, 135-187, 2005.

SOCRANSKY, Sigmund S. e HAFFAJEE, Anne D. Periodontal microbial ecology. Periodontology 2000, v. 38, n. 1, p. 135–187, Jun 2005.

SORSA, T., GURSOY, U. K., NWHATOR, S., HERNANDEZ, M., TERVAHARTIALA, T., LEPPILAHTI, J., GURSOY, M., KÖNÖNEN, E., EMINGIL, G., PUSSINEN, P. J., MÄNTYLÄ, P. Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP-8, in gingival crevicular fluid, mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases. Periodontology 2000, 70, 1, 142-63, 2016.

SOUSLOVA, Tatiana e colab. Personalized medicine in Alzheimer's disease and depression. Contemporary Clinical Trials. [S.l: s.n.], 2013.

SRIVASTAVA, A e MCKINNON, W e WOOD, M E. Risk of breast and ovarian cancer in women with strong family histories. Oncology (Williston Park, N.Y.), v. 15, n. 7, p. 889–902; discussion 902, 905–7, 911–13, Jul 2001.

STEVENS, Gretchen A e colab. National, regional, and global trends in adult overweight and obesity prevalences. Population Health Metrics, 2012.

STRIMBU, K e TAVEL, J A. What are biomarkers? Curr Opin HIV AIDS, 2010.

SUN Y, SUN M, LIU B, DU Y, RONG S, XU G, SNETSELAAR LG, BAO W. Inverse Association Between Serum Vitamin B12 Concentration and Obesity Among Adults in the United States. Front Endocrinol (Lausanne), 27;10:414, 2019.

SUVAN, Jean e colab. Association between overweight/obesity and periodontitis in adults. A systematic review. Obesity Reviews. [S.l: s.n.], 2011.

SZKARADKIEWICZ-KARPINSKA AK, SAK M, GOSLINSKA-KUZNIAREK O, SOKALSKI J, SZKARADKIEWICZ J. Human Salivary Acidic Proline-Rich Proteins (APRP-1/2) In Adult Patients With Dental Caries. *Dentistry* 7: 437, 2017.

TANG, Mei e CHEN, Yue e KREWSKI, Daniel. Gender-related differences in the association between socioeconomic status and self-reported diabetes. *International journal of epidemiology*, v. 32, n. 3, p. 381–385, Jun 2003.

TASKINEN MR, BOREN J. Why is apolipoprotein CIII emerging as a novel therapeutic target to reduce the burden of cardiovascular disease? *Curr Atheroscler Rep*, 18:59, 2016.

TASKINEN MR, BORÉN J. Why Is Apolipoprotein CIII Emerging as a Novel Therapeutic Target to Reduce the Burden of Cardiovascular Disease? *Curr. Atheroscler. Rep.* Springer; 2016.

THRAILKILL KM, CLAY B R, FOWLKES JL. Matrix metalloproteinases: their potential role in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Endocrine* 35:1–10, 2009.

TOPALIAN, Suzanne L. e colab. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *New England Journal of Medicine*, 2012.

TRAYHURN, PAUL e WOOD, I Stuart. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *British Journal of Nutrition*, 2004.

Uniprot. Golgin subfamily A member 8O: <<https://www.uniprot.org/uniprot/A6NCC3>> Acesso em 22 de fevereiro de 2021a.

Uniprot. Probable transcriptional regulatory protein FN1661. <<https://www.uniprot.org/uniprot/Q8RIE0>> Acesso em 4 de fevereiro de 2021b.

VAN DIJK, Susan J e colab. Plasma protein profiling reveals protein clusters related to BMI and insulin levels in middle-aged overweight subjects. *PLoS ONE*, 2010.

VERNOCHET, C. et al. Adipose tissue mitochondrial dysfunction triggers a lipodystrophic syndrome with insulin resistance, hepatosteatosis, and cardiovascular complications. *FASEB J*, 28, 4408–4419, 2014.

Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. Vigitel Brasil 2015 Saúde Suplementa. Disponível em <https://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2020/Abril/27/vigitel-brasil-2019-vigilancia-fatores-risco.pdf> >. Acesso em: 11 de janeiro. 2021.

VIGITEL Brasil 2020 : vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico : estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2019 [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2021

VOS, Seychelle M e colab. Direct control of type IIA topoisomerase activity by a chromosomally encoded regulatory protein. *Genes & development*, v. 28, n. 13, p. 1485–1497, Jul 2014.

WAN, Tao e colab. Structural basis of non-canonical transcriptional regulation by the sigmaA-bound iron-sulfur protein WhiB1 in *M. tuberculosis*. *Nucleic acids research*, v. 48, n. 2, p. 501–516, Jan 2020.

WANG X, GUAN M, ZHANG X, MA T, WU M, LI Y, CHEN X, ZHENG Y. The Association Between S100A8/A9 and the Development of Very Late Stent Thrombosis in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Clin Appl Thromb Hemost*, 26:1076029620943295, 2020.

WANG, Kun e colab. Comparative salivary proteomics analysis of children with and without dental caries using the iTRAQ/MRM approach. *Journal of translational medicine*, v. 16, n. 1, p. 11, Jan 2018.

WATERS, Lauren S e SANDOVAL, Melissa e STORZ, Gisela. The *Escherichia coli* MntR miniregulon includes genes encoding a small protein and an efflux pump required for manganese homeostasis. *Journal of bacteriology*, v. 193, n. 21, p. 5887–5897, Nov 2011.

WEIR GC. Glucolipotoxicity, β -Cells, and Diabetes: The Emperor Has No Clothes. *Diabetes*, 69(3):273-278, 2020.

WEISBERG, SP; MCCANN, D; DESAI, M; ROSENBAUM, M; LEIBEL, RL; FERRANTE, AWJR. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, v112, n 12,1796-808, 2003.

WEISS, Thomas W e ARNESEN, Harald e SELJEFLOT, Ingebjorg. Components of the interleukin-6 transsignalling system are associated with the metabolic syndrome, endothelial dysfunction and arterial stiffness. *Metabolism: clinical and experimental*, v. 62, n. 7, p. 1008–1013, Jul 2013.

WILLIS, Joanna C D e LORD, Graham M. Immune biomarkers: The promises and pitfalls of personalized medicine. *Nature Reviews Immunology*. [S.l: s.n.], 2015.

WŁODARCZYK M, NOWICKA G. Obesity, DNA Damage, and Development of Obesity-Related Diseases. *Int J Mol Sci*, 6;20(5):1146, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION 2020. Disponível em < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>>. Acesso em 04 de dezembro de 2022

WORLD HEALTH ORGANIZATION 2021. Disponível em < <https://www.who.int/news-room/facts-in-pictures/detail/6-facts-on-obesity>>. Acesso em 20 de janeiro de 2023

WORLD HEALTH ORGANIZATION 2021b. Cardiovascular diseases.. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>. Acesso em 04 de dezembro de 2022

WU, Y e colab. Initial comparison of proteomic profiles of whole unstimulated saliva obtained from generalized aggressive periodontitis patients and healthy control subjects. *Journal of Periodontal Research*, 2009.

XIAO ZL, MA LP, YANG DF, YANG M, LI ZY, Chen MF. Profilin-1 is involved in macroangiopathy induced by advanced glycation end products via vascular remodeling and inflammation. *World J Diabetes*. 15;12(11):1875-1893, 2021.

XIE, Fang e colab. Pyridoxal phosphate synthases PdxS/PdxT are required for *Actinobacillus pleuropneumoniae* viability, stress tolerance and virulence. *PloS one*, v. 12, n. 4, p. e0176374, 2017.

YOSHIZAWA, JM; SCHAFER, CA; SCHAFER, JJ; FARRELL, JJ; PASTER, BJ; WONG, DT. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clinical microbiology reviews*, v 26, n 4 781–791, 2013.

YU, Li e colab. Negative elongation factor complex enables macrophage inflammatory responses by controlling anti-inflammatory gene expression. *Nature communications*, v. 11, n. 1, p. 2286, Maio 2020.

ZEINERT, Rilee e colab. Structure-function analysis of manganese exporter proteins across bacteria. *The Journal of biological chemistry*, v. 293, n. 15, p. 5715–5730, Abr 2018.

ZEMOURI, C; JAKUBOVICS, N. S; CRIELAARD, W; ZAURA, E; DODDS, M; SCHELKLE, B; LOOS, B.G. Resistance and resilience to experimental gingivitis: a systematic scoping review. *BMC Oral Health*, 19, 1, 212, 2019.

ZHANG, Y e colab. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 1994.

ZIEGLER, Andreas e colab. Personalized medicine using DNA biomarkers: A review. *Human Genetics*. [S.l: s.n.], , 2012.

ZODY, M., GARBER, M., SHARPE, T. et al. Analysis of the DNA sequence and duplication history of human chromosome 15. *Nature* 440, 671–675 2006.

ZWAKA, Thomas P e HOMBACH, Vinzenz e TORZEWSKI, Jan. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: Implications for atherosclerosis. *Circulation*, 2001.

ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(De acordo com as normas da Resolução nº 466, do Conselho Nacional de Saúde de 12/12/2012)

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “Proteoma do plasma e da saliva em adultos jovens com obesidade e sobrepeso como possível biomarcador precoce de doença periodontal e cardiovascular”. Você foi selecionado por ordem de chegada e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição (Unigranrio).

Os objetivos deste estudo são estudar as associações entre o exame clínico das gengivas, sua massa corporal (peso), pressão sanguínea arterial e a identificação do perfil das proteínas presentes no sangue e na saliva.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em responder a um questionário sobre dados pessoais e de saúde geral e bucal, ser examinado pelo dentista (gengivas e dentes), fornecer amostras de sangue, ser pesado e medido (altura e circunferência da cintura e do quadril).

Os riscos relacionados com sua participação são mínimos.

Os benefícios relacionados com a sua participação um melhor conhecimento do seu estado de saúde bucal e geral e encaminhamento para tratamento das necessidades encontradas.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Os resultados de seus exames serão confidenciais, ou seja, somente o pesquisador terá acesso a suas informações e serão utilizados somente para o objetivo do presente estudo.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o senhor (a), podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento com os pesquisadores responsáveis Carlos Vinicius Ferreira da Silva no telefone 974807050 ou no e-mail cviniciusbio@gmail.com, ou com Carina Maciel da Silva Boghossian no telefone 26727776 ou e-mail carinabogho@unigranrio.edu.br, ou com Eidy de Oliveira Santos no telefone 2333-6961 ou e-mail eidyos@gmail.com.

Pesquisador Responsável: Carlos Vinicius Ferreira da Silva

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UNIGRANRIO, localizada na Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160 – CEP 25071-202 TELEFONE (21).2672-7733 – ENDEREÇO ELETRÔNICO: cep@unigranrio.com.br

Rio de Janeiro, _____ de _____ de 20____.

Sujeito da pesquisa

UNIVERSIDADE DO GRANDE
RIO PROFESSOR JOSÉ DE
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Proteômica de saliva e plasma sanguíneo para detecção de biomarcadores de comorbidades associadas a obesidade

Pesquisador: CARLOS VINICIUS FERREIRA DA SILVA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 14961519.6.0000.5283

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE UNIGRANRIO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.402.791

Apresentação do Projeto:

A obesidade é um estado crônico relacionado a múltiplas comorbidades como hipertensão, diabetes tipo 2, síndrome metabólica, doenças periodontais e cardiovasculares. A obesidade acarreta um aumento na liberação de proteínas denominadas adipocinas, que podem ser encontradas no plasma sanguíneo e na saliva, criando um processo inflamatório prolongado e de baixa intensidade. O processo inflamatório apresentado na obesidade aumenta o risco para doenças cardiovasculares e periodontais. O objetivo do presente estudo é analisar o proteoma do plasma e da

saliva de adultos jovens com obesidade e sobrepeso em comparação com indivíduos com peso normal, e determinar possíveis biomarcadores para as Diabetes tipo 2 e Síndrome Metabólica. A população de estudo será constituída por 75 voluntários provenientes do laboratório de análises clínicas da Unigranrio, Campus I, com idades acima de 18. Os indivíduos serão categorizados conforme suas medidas antropométricas nos grupos:

Normal, Sobrepeso e Obeso, além de indivíduos diagnosticados diabetes tipo 2 e síndrome metabólica. Os indivíduos deverão responder a questionários anamnésicos, e serão submetidos a exame periodontal, mensuração de medidas antropométricas, aferição da pressão arterial sistêmica e coleta de saliva e sangue periférico. As proteínas extraídas das amostras de saliva e sangue serão analisadas por espectrometria de massas (LC-ESI-MS/TOF).

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160

Bairro: 25 de Agosto

CEP: 25.071-202

UF: RJ

Município: DUQUE DE CAXIAS

Telefone: (21)2672-7733

Fax: (21)2672-7733

E-mail: cep@unigranrio.com.br

Continuação do Parecer: 3.402.791

Objetivo da Pesquisa:

Determinar o proteoma do plasma e da saliva de adultos jovens com obesidade e sobrepeso, e analisar possíveis biomarcadores para síndrome metabólica e DM. Assim como confirmar os possíveis biomarcadores observados nas análises realizadas no mestrado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos - Os riscos são mínimos, pois serão realizados procedimentos de exame de rotina e coleta de sangue e saliva seguindo normas de biossegurança.

Benefícios - Os benefícios para o participante serão um melhor conhecimento de seu estado de saúde bucal e geral e encaminhamento para tratamento das necessidades encontradas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a prevalência de sobrepeso e obesidade em adultos com idade a partir de 18 anos foram de cerca 39% e 13% respectivamente em 2016. Estes números têm aumentado ao longo do tempo, tendo dobrado nas últimas 4 décadas. Este cenário dramático pode representar um impacto importante na saúde pública devido às comorbidades associadas. As consequências comuns da obesidade

são doenças cardiovasculares, diabetes, desordens musculoesqueléticas e alguns cânceres. Além disto, existe evidência de que há uma associação entre obesidade e um risco maior para periodontite em diferentes populações. Nesse quadro, a medicina personalizada ganhou espaço, buscando fatores fisiológicos, ambientais e histórico médico de um indivíduo para utilização no tratamento. Diante deste cenário é de extrema relevância buscar biomarcadores capazes de relacionar as complicações associadas à obesidade.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos apresentados estão de acordo com o que determina a Resolução 466 do CNS de 12/12/2012.

Recomendações:

Dada a relevância do projeto, recomendo que os resultados da pesquisa, favoráveis ou não, sejam divulgados em eventos científicos e publicações na forma de artigos e textos em revista indexadas pelo Qualis.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O estudo atende aos requisitos da Resolução 466 do CNS de 12/12/2012.

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160

Bairro: 25 de Agosto

CEP: 25.071-202

UF: RJ

Município: DUQUE DE CAXIAS

Telefone: (21)2672-7733

Fax: (21)2672-7733

E-mail: cep@unigranrio.com.br

UNIVERSIDADE DO GRANDE
RIO PROFESSOR JOSÉ DE
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



Continuação do Parecer: 3.402.791

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado (a) Pesquisador (a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da UNIGRANRIO atendendo o previsto na Resolução 466/12 do CNS/MS APROVOU o referido projeto na reunião ocorrida em 19 de junho de 2019. Caso o (a) pesquisador (a) altere a pesquisa será necessário que o projeto retorne ao Sistema Plataforma Brasil para uma futura avaliação e emissão de novo parecer. Lembramos que o (a) pesquisador (a) deverá encaminhar o relatório da pesquisa após a sua conclusão, como um compromisso junto a esta instituição e o Sistema Plataforma Brasil.

Cordialmente,
CEP/Unigranrio.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1356680.pdf	22/05/2019 15:09:34		Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	22/05/2019 15:08:59	CARLOS VINICIUS FERREIRA DA	Aceito
Cronograma	cronogramacepVinicius.docx	17/05/2019 16:34:09	CARLOS VINICIUS FERREIRA DA	Aceito
Outros	cartadeanuencia.jpg	15/05/2019 09:20:26	CARLOS VINICIUS FERREIRA DA	Aceito
Orçamento	orcamento.jpg	15/05/2019 09:18:17	CARLOS VINICIUS FERREIRA DA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	15/05/2019 08:49:31	CARLOS VINICIUS FERREIRA DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	15/05/2019 08:48:56	CARLOS VINICIUS FERREIRA DA SILVA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160
Bairro: 25 de Agosto **CEP:** 25.071-202
UF: RJ **Município:** DUQUE DE CAXIAS
Telefone: (21)2672-7733 **Fax:** (21)2672-7733 **E-mail:** cep@unigranrio.com.br

UNIVERSIDADE DO GRANDE
RIO PROFESSOR JOSÉ DE
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



Continuação do Parecer: 3.402.791

Não

DUQUE DE CAXIAS, 19 de Junho de 2019

Assinado por:
Renato Cerqueira Zambrotti
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160

Bairro: 25 de Agosto

CEP: 25.071-202

UF: RJ

Município: DUQUE DE CAXIAS

Telefone: (21)2672-7733

Fax: (21)2672-7733

E-mail: cep@unigranrio.com.br

Página 04 de 04

ANEXO 3: CARTA DE ACEITE

04/02/2023 11:44

ScholarOne Manuscripts

Clinical Applications

Decision Letter (prca.202200098.R1)

From: proteomics@wiley.com

To: cviniciusbio@gmail.com, yousade@gmail.com, sandra.scapin@gmail.com, carinabogho@yahoo.com.br, eidyos@gmail.com

CC:

Subject: Accept Decision on Manuscript - prca.202200098.R1

Body: 31-Jan-2023

Dear Dr. da Silva,

It is a pleasure to provisionally accept your manuscript prca.202200098.R1 "Comparative proteomics of saliva of healthy and gingivitis individuals from Rio de Janeiro" as a "Rapid Communication" for publication in Proteomics Clinical Applications.

Final comments of the reviewer(s)
Reviewer: 2

Comments to the Author
Revisions are ok done.
Ok for publication now.

!!!! !!!!! !!!!!

Please note that the journal is adapting a new reference style - the EndNote styles is attached

Example:

Spang, A., Stairs, C.W., Dombrowski, N., Eme, L., Lombard, J., Caceres, E. F., ... Ettema, T. J. G. (2019). Proposal of the reverse flow model for the origin of the eukaryotic cell based on comparative analyses of Asgard archaeal metabolism. *Nature Microbiology*, 4, 1138-1148.

!!!! !!!!! !!!!!

With the acceptance of your manuscript the final uploaded version in ScholarOne will be used for copy-editing and the subsequent production process.

Collection of Copyright Transfer Agreement (CTA) form: Your article cannot be published until the publisher has received the appropriate signed license agreement. Within the next few days the corresponding author will receive an email from Wiley's Author Services system which will ask them to log in and will present them with the appropriate license for completion.

As the next step, your paper will go into production and you will receive a galley proof by e-mail in due course. Once you have corrected the proof, the paper will then be published online via Wiley Online Library ahead of its appearance in the printed journal.

Thank you for supporting Proteomics Clinical Applications. I look forward to seeing more of your work in the future.

Sincerely,

Dr. Lucie Kalvodova
Proteomics Clinical Applications
Editor

This journal accepts artwork submissions for Cover Images. This is an optional service you can use to help increase article exposure and showcase your research. For more information, including artwork guidelines, pricing, and submission details, please visit the Journal Cover Image page at www.wileyauthors.com/eo/covers.

P.S. - You can help your research get the attention it deserves! Wiley Editing Services offers professional video abstract and infographic creation to help you promote your research at www.wileyauthors.com/eo/promotion. And, check out Wiley's free Promotion Guide for

04/02/2023 11:44

ScholarOne Manuscripts

best-practice recommendations for promoting your work at
www.wileyauthors.com/eeo/guide.

Date Sent: 31-Jan-2023

File 1: [* APA-with-numerical-bracketed-citations.ens](#)

 Close Window

© Clarivate | © ScholarOne, Inc., 2023. All Rights Reserved.

APÊNDICE 1: CORREÇÃO DE BONFERRONI

Comparações múltiplas							
Bonferroni							
Variável dependente			Significância	Variável dependente			Significância
Idade	1	2	1,000	HOMAIR	1	2	,996
		3	1,000			3	,513
		4	,508			4	,000
		5	,000			5	,000
	2	1	1,000		2	1	,996
		3	1,000			3	1,000
		4	,694			4	,000
		5	,000			5	,000
	3	1	1,000		3	1	,513
		2	1,000			2	1,000
		4	1,000			4	,004
		5	,002			5	,001
	4	1	,508		4	1	,000
		2	,694			2	,000
		3	1,000			3	,004
		5	,023			5	1,000
	5	1	,000		5	1	,000
		2	,000			2	,000
		3	,002			3	,001
		4	,023			4	1,000
Altura	1	2	1,000	Creatinina	1	2	1,000
		3	1,000			3	1,000
		4	1,000			4	1,000
		5	,495			5	1,000
	2	1	1,000		2	1	1,000
		3	1,000			3	1,000
		4	1,000			4	1,000
		5	,136			5	1,000
	3	1	1,000		3	1	1,000
		2	1,000			2	1,000
		4	1,000			4	1,000

	4	5	,071		4	5	1,000
		1	1,000			1	1,000
		2	1,000			2	1,000
		3	1,000			3	1,000
		5	,234			5	1,000
	5	1	,495		5	1	1,000
		2	,136			2	1,000
		3	,071			3	1,000
		4	,234			4	1,000
Massa	1	2	,000	Ureia	1	2	1,000
		3	,000			3	1,000
		4	,000			4	,330
		5	,003			5	1,000
	2	1	,000		2	1	1,000
		3	,002			3	1,000
		4	,048			4	,145
		5	1,000			5	,682
	3	1	,000		3	1	1,000
		2	,002			2	1,000
		4	1,000			4	,338
		5	,042			5	,981
	4	1	,000		4	1	,330
		2	,048			2	,145
		3	1,000			3	,338
		5	,492			5	1,000
	5	1	,003		5	1	1,000
		2	1,000			2	,682
		3	,042			3	,981
		4	,492			4	1,000
Cintura	1	2	,000	Colesteroltotal	1	2	1,000
		3	,000			3	1,000
		4	,000			4	,655
		5	,000			5	1,000
	2	1	,000		2	1	1,000
		3	,003			3	1,000
		4	,000			4	,252
		5	,002			5	1,000

	3	1	,000		3	1	1,000
		2	,003			2	1,000
		4	1,000			4	1,000
		5	1,000			5	1,000
	4	1	,000		4	1	,655
		2	,000			2	,252
		3	1,000			3	1,000
		5	1,000			5	1,000
	5	1	,000		5	1	1,000
		2	,002			2	1,000
		3	1,000			3	1,000
		4	1,000			4	1,000
Quadril	1	2	,000	Triglicerídeos	1	2	1,000
		3	,000			3	1,000
		4	,000			4	,009
		5	,000			5	,001
	2	1	,000		2	1	1,000
		3	,000			3	1,000
		4	,029			4	,023
		5	,909			5	,002
	3	1	,000		3	1	1,000
		2	,000			2	1,000
		4	1,000			4	,121
		5	,455			5	,008
	4	1	,000		4	1	,009
		2	,029			2	,023
		3	1,000			3	,121
		5	1,000			5	1,000
	5	1	,000		5	1	,001
		2	,909			2	,002
		3	,455			3	,008
		4	1,000			4	1,000
RCQ	1	2	,131	HDL	1	2	,405
		3	,028			3	,069
		4	,000			4	,001
		5	,000			5	,000
	2	1	,131		2	1	,405

		3	1,000			3	1,000
		4	,067			4	,551
		5	,063			5	,059
	3	1	,028		3	1	,069
		2	1,000			2	1,000
		4	1,000			4	1,000
		5	,705			5	,779
	4	1	,000		4	1	,001
		2	,067			2	,551
		3	1,000			3	1,000
		5	1,000			5	1,000
	5	1	,000		5	1	,000
		2	,063			2	,059
		3	,705			3	,779
		4	1,000			4	1,000
P.Arterials	1	2	,678	VLDL	1	2	1,000
		3	,028			3	1,000
		4	,000			4	,009
		5	,000			5	,001
	2	1	,678		2	1	1,000
		3	1,000			3	1,000
		4	,058			4	,023
		5	,001			5	,002
	3	1	,028		3	1	1,000
		2	1,000			2	1,000
		4	1,000			4	,121
		5	,153			5	,008
	4	1	,000		4	1	,009
		2	,058			2	,023
		3	1,000			3	,121
		5	,856			5	1,000
	5	1	,000		5	1	,001
		2	,001			2	,002
		3	,153			3	,008
		4	,856			4	1,000
P.Arterial.D	1	2	1,000	LDL	1	2	1,000
		3	,001			3	1,000

		4	,000			4	,236
		5	,006			5	1,000
	2	1	1,000		2	1	1,000
		3	,065			3	1,000
		4	,003			4	,313
		5	,190			5	1,000
	3	1	,001		3	1	1,000
		2	,065			2	1,000
		4	1,000			4	1,000
		5	1,000			5	1,000
	4	1	,000		4	1	,236
		2	,003			2	,313
		3	1,000			3	1,000
		5	1,000			5	1,000
	5	1	,006		5	1	1,000
		2	,190			2	1,000
		3	1,000			3	1,000
		4	1,000			4	1,000
Glicemia	1	2	1,000	CTHDL	1	2	1,000
		3	1,000			3	1,000
		4	1,000			4	,016
		5	,000			5	,006
	2	1	1,000		2	1	1,000
		3	1,000			3	1,000
		4	1,000			4	,170
		5	,000			5	,042
	3	1	1,000		3	1	1,000
		2	1,000			2	1,000
		4	1,000			4	1,000
		5	,000			5	,320
	4	1	1,000		4	1	,016
		2	1,000			2	,170
		3	1,000			3	1,000
		5	,000			5	1,000
	5	1	,000		5	1	,006
		2	,000			2	,042
		3	,000			3	,320

		4	,000			4	1,000
Insulina	1	2	,747	VLDLHDL	1	2	1,000
		3	,505			3	1,000
		4	,000			4	,056
		5	,141			5	,000
	2	1	,747		2	1	1,000
		3	1,000			3	1,000
		4	,000			4	,283
		5	1,000			5	,001
	3	1	,505		3	1	1,000
		2	1,000			2	1,000
		4	,004			4	,762
		5	1,000			5	,007
	4	1	,000		4	1	,056
		2	,000			2	,283
		3	,004			3	,762
		5	,110			5	,308
	5	1	,141		5	1	,000
		2	1,000			2	,001
		3	1,000			3	,007
		4	,110			4	,308
HOMAB	1	2	1,000	LDLHDL	1	2	1,000
		3	1,000			3	1,000
		4	,000			4	,018
		5	1,000			5	,034
	2	1	1,000		2	1	1,000
		3	1,000			3	1,000
		4	,059			4	,205
		5	,136			5	,209
	3	1	1,000		3	1	1,000
		2	1,000			2	1,000
		4	,277			4	1,000
		5	,152			5	1,000
	4	1	,000		4	1	,018
		2	,059			2	,205
		3	,277			3	1,000
		5	,000			5	1,000

	5	1	1,000		5	1	,034
		2	,136			2	,209
		3	,152			3	1,000
		4	,000			4	1,000
Legenda: 1: Normal; 2:Sobrepeso; 3: Obeso; 4: SM; 5: DMT2; *. A diferença média é significativa no nível 0.05.							

APÊNDICE 2: ARTIGO ACEITO NA REVISTA PROTEOMICS CLINICAL APPLICATION

PROTEOMICS - Clinical Applications



Comparative proteomics of saliva of healthy and gingivitis individuals from Rio de Janeiro

Journal:	<i>Clinical Applications</i>
Manuscript ID	prca.202200098
Wiley - Manuscript type:	Rapid Communication
Date Submitted by the Author:	16-Nov-2022
Complete List of Authors:	da Silva, Carlos Vinicius; UERJ, biochemistry Bacila Sade, Youssef; Inmetro Naressi Scapin, Sandra Mara; Inmetro da Silva-Boghossian, Carina Maciel ; Unigranrio de Oliveira Santos, Eidy; UERJ, biochemistry
Keywords:	Biomarker, Saliva, Gingivitis, Proteomic, Inflammation

SCHOLARONE™
Manuscripts

Salivary proteomics during gingivitis and oral health: a comparative study with subjects from Rio de Janeiro.

Carlos Vinicius Ferreira da Silva^{1,4}; Youssef Bacila Sade²; Sandra Mara N. Scapin²; Carina M. da Silva-Boghossian³; Eidy de Oliveira Santos^{1,4*}

1 Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Campus Zona Oeste (UERJ-ZO), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

2 Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), Duque de Caxias, RJ, Brasil.

3 Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

4 Programa da Pós-graduação em Biomedicina Translacional, Unigranrio-INMETRO-UERJ-ZO, Duque de Caxias, Brasil.

*Corresponding author:

e-mail: eidyos@gmail.com

Keywords: Biomarker, Saliva, Gingivitis, Proteomic, Inflammation

Clinical significance

Gingivitis is a disease that is etiologically linked to the increase in bacterial plaque, as well as the presence of pathogenic bacteria. Here, we present a study of the changes in human and bacterial proteins during gingivitis compared with the healthy state, which provides information regarding how bacteria and the host interact in this oral pathogenesis. Moreover, we improved the knowledge about saliva proteins related to this periodontitis process, to identify both new putative biomarkers for diagnosis and better treatment strategies.

Abstract

In this work, we identified human and bacterial proteomes in the saliva from volunteers with gingivitis or healthy. The reported population consisted of 18 volunteers (six with gingivitis and 12 healthy controls). Proteomics characterization was performed using a quantitative mass spectrometry method. A total of 74 human and 116 bacterial proteins were identified in saliva.

The major functional category that was modified in the human proteome was the immune response, followed by transport and protease inhibition. In the bacterial proteome, most of the proteins identified were from the Fusobacteria phylum, followed by Chlamydiae and Spirochaetes. We observed statistically relevant differences in the data between the groups. The 15 most important human proteins affecting the variation between case and control groups included cystatin S, alpha amylase, lactotransferrin, and negative elongation factor E. We found that bacterial proteins from *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* related to the red and orange complexes were closely correlated with the occurrence of periodontal diseases.

1 | INTRODUCTION

Periodontal diseases are listed among the most common diseases worldwide, but still receive little attention [1]. In this context, clinical conditions can be described as healthy, gingivitis, and periodontitis [2]. Gingivitis is regarded as a reversible and non-destructive inflammation of the marginal tissues [3], with presence of plaque accumulation, gingival edema, erythema, and bleeding on probing [4]. In contrast, periodontitis is characterized by destructive inflammation, in which there is irreversible loss of alveolar bone and periodontal ligament [3]. Both diseases are linked to the inflammatory response [5].

The etiological factor of periodontal diseases is the presence of pathogenic bacteria in the supragingival biofilm [6]. The presence of a pathogenic biofilm and its interaction with periodontal tissues affect the modulation of immune responses, which that can be detected in the saliva [7]. In response to the boosted bacterial biofilm, an inflammatory process is induced and initially installed in the gums, causing gingivitis, which, if left untreated, can progress into periodontitis in some cases. These processes can induce the alteration of saliva proteins, such as DMBT1, mucin 5B, mucin 7, and lactoferrin [1]. The elevation of the levels of matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in periodontal diseases, mainly periodontitis, is a well-known biomarker of disease activity. MMP-8 degrades extracellular matrix components, and an increase in its activity may lead to the loss of periodontal tissue; moreover, its levels decrease after periodontitis treatment, becoming an ideal protein to be used in point-of-care diagnostics (PoCT), which are rapid diagnostic tests performed at points of care, such as doctors' offices and pharmacies. Studies have also observed that oral bacteria have the ability to convert proMMP-8 into its activated form, leading to a rise in the level of MMP-8 in periodontal diseases, confirming its value as a biomarker of periodontal breakdown [8-10].

The imbalance of the oral microbiota in response to the installation of bacterial plaque can trigger several changes in the oral ecosystem, consequently leading to dysbiosis. Bacterial protein expression may play a key role in the establishment and maintenance of pathogenesis in periodontal diseases [11]. Research about the oral bacterial proteomes provides a better understanding of the dynamics of the bacterial community between the healthy and unhealthy state of the oral environment. Furthermore, proteomics may offer clues regarding how bacterial interactions occur in the biofilm [12].

In this study, we performed a quantitative analysis using mass spectrometry to characterize the bacterial and human proteomes in the saliva of Brazilian young adult volunteers from Rio de Janeiro. We observed two groups, healthy individuals and patients with gingivitis. Unlike other studies, we decided to analyze not only the human salivary proteome, to understand the changes that occur in it during gingivitis, but also the bacterial proteome present in the saliva of both groups. This analysis will provide a broader view of the broad mechanisms underlying this periodontal disease. Our objective was to improve the knowledge about the dynamism of the host–bacteria interaction during the establishment of periodontal disease.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Experimental design

This study was approved by the Ethic in Human Research Committee of Unigranrio (#2.160.823). Eighteen young adults were included and categorized according to gingivitis diagnosis into the healthy (control group, six individuals) and gingivitis (case group, 12 individuals) cohorts. All participants gave written informed consent before entering the study, which was carried out in accordance with the ethical criteria established in the 1964 Declaration of Helsinki and its subsequent amendments.

The volunteers were between 18 and 35 years of age. Participants were excluded if they had one of the following conditions: use of antibiotics and probiotics in the last 6 months; glucose intolerance ≥ 100 mg/dL; hypertension (HTN $\geq 135/90$); CDV (acute myocardial infarction, heart failure, endocarditis, cardiac arrhythmias, myocarditis, and atherosclerosis); hematological, psychiatric, or inflammatory bowel diseases; gestation and lactation; and smoking. These criteria were established to avoid the impact of these conditions on the salivary proteome.

2.2 | Clinical evaluation

Clinical examinations were performed by calibrated examiners and included anthropometric examination (BMI, height, weight, waist circumference, hip circumference, and waist–hip ratio measurements). The volunteers were weighed and measured on the same scale using a stadiometer (Mod. 104A, Balmak). Weight was recorded in kg and height in cm. BMI was calculated by dividing the weight (kg) by the squared height (m²). Waist circumference, hip circumference, and waist–hip ratio were measured with the aid of a clinical measuring tape. Blood pressure was measured using the oscillometric method (OMRON). After 5 min of rest, three sequential measurements were performed, with intervals of 3 min, to calculate the mean blood pressure levels. Values with differences above 10 mmHg in systolic blood pressure and 5 mmHg in diastolic blood pressure were discarded, to exclude measurement errors as suggested by [13]. Laboratory examination of total cholesterol (mg/dl), HDL (mg/dl), triglycerides (mg/dl), LDL (mg/dl), glucose (mg/dl), HOMA-IR, and Insulin (mcUI/ml) were performed at the clinical analysis laboratory of Unigranrio, Duque de Caxias, Brazil.

2.3 | Oral examination

The oral health examinations were performed by qualified examiners from the Unigranrio Dental Laboratory and included dichotomized records of the presence or absence of a supragingival biofilm (SB), gingival bleeding, and bleeding on probing (BOP), as well as measurements of probing depth (PD) and clinical attachment level (CAL), in mm. The presence of a dental biofilm was confirmed by visualization of the dental surfaces after drying using an air jet in the field under relative isolation. Periodontal probing was performed at six sites per dental element using a North Carolina millimeter periodontal probe (Hu-Friedy; Chicago). The second sites were examined: distobuccal angle, buccal face, mesiobuccal angle, mesiopalatine or mesiolingual angle, palatal or lingual face, and distopalatal or distolingual angle. During periodontal probing, PS and NCI were recorded simultaneously. Third molars were not included in the clinical evaluation.

All volunteers underwent clinical evaluation of their periodontal status according to the following criteria: periodontal health (PH), ≤10% of the sites with BOP, without PD or CAL >3 mm, although PD or CAL = 4 mm in up to 5% of sites without BOP was allowed; and gingivitis (G), >10% of sites with BOP, without PD or CAL >3 mm, although DP or CAL = 4 mm in up to 5% of sites without BOP was allowed [14].

2.4 | Sample collection and preparation

Saliva was collected after 12 h of fasting and 1 h without consuming any liquids [15]. Two milliliters of ultrapure water were used by the participants to rinse the mouth for 5 min, which

were then it collected using a sterile tube. Next, each sample was mixed with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 1 mM ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA; Sigma–Aldrich). Samples were kept on ice and rapidly centrifuged at $17,146 \times g$ for 10 min at 10°C, to separate the microbial fraction. Supernatants were transferred to 1.5-mL sterile tubes and mixed with 1 mM Protease Inhibitor Cocktail (Sigma–Aldrich). Saliva supernatants were submitted to precipitation with 20% trichloroacetic acid (TCA), for protein extraction, as described previously [16]. Proteins were recovered by suspending the precipitated pellets in 300 µL of ammonia bicarbonate (50 mM). All biological materials were stored at –80°C.

2.5 | Protein processing for mass spectrometry

The extracted proteins were measured using the Bradford reagent and spectrophotometer (Epoch Microplate Spectrophotometer; BioTek, Highland Park, USA). Bovine serum albumin (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) was used as standard for the calibration curve [17]. The saliva and plasma proteomes were submitted to trypsin digestion (shotgun method) individually. For this, 50 µg of each sample were treated with 8 M urea (1:1), and proteins were reduced via the use of dithiothreitol (5 mM for 25 min at 56°C) and diluted with iodoacetamide (14 mM for 30 min at 22°C in the dark). The urea present in the samples was diluted to a final concentration of 1.6 M using 60 mM ammonium bicarbonate, followed by the addition of 1 mM calcium chloride. Sequencing-grade Modified Trypsin (Promega, Madison, WI, USA) was added at a ratio of 1:50 (enzyme:substrate); the reaction was incubated for 16 h at 37°C, and finished using 0.4% formic acid [18]. The digested samples were filtered using Oasis HLB 1cc columns (Waters Corporation, Milford, MA, USA), to remove urea from the samples.

2.6 | High-performance liquid chromatography–mass spectrometry analysis (HPLC-MS)

Two pools were prepared using the collected samples from the control (6) and case (12) groups, to be analyzed together by MS. All peptidome pools were analyzed via direct injection into the mass spectrometer, for the comparative evaluation of the mass profiles of peptides present in plasma and saliva. The pooled samples were run once and in sequence, for normalization, and then analyzed in three analytical replicates, for quantitative evaluation.

The tryptic peptidome pools from saliva were analyzed on a nanoUPLC instrument followed by an Electrospray Quadrupole Time-of-flight mass spectrometer (ESI-Q-TOF Synapt HDMS G1; Waters Corporation) in Inmetro, Rio de Janeiro, Brazil. The chromatographic mobile phase A consisted of 0.1% formic acid in water (v/v), whereas mobile phase B was 0.1% formic acid

in acetonitrile (v/v). Sample desalting was performed on a nanoACQUITY UPLC Symmetry C18 Trap Column (5 μm , 20 mm $\times$ 180 μm) using a 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ flow rate for 3 min. Chromatographic separation was achieved using a nanoACQUITY UPLC HSS T3 reversed-phase column (1.8 μm , 100 mm $\times$ 100 μm). A constant flow rate of 0.6 $\mu\text{L}/\text{min}$ was used, and the following linear gradient was applied: 7%–40% B from 0 to 19.9 min, 40%–85% B from 19.9 to 23.9 min, constant 85% B for an additional 4 min, and then the column was re-equilibrated to the initial conditions from 27.9 to 29.9 min and rinsed for an additional 7 min. The mass spectrometry assay was performed using a positive nano electrospray (nanoESI+) ionization source. The acquisition mode was MSe, with data independent acquisition and parallel fragmentation of all parent ions, and alternated acquisition at low and high energy. At low energy, continuum spectra from 50 to 2000 Da were acquired with a scan time of 0.8 s, a source temperature of 80°C, a desolvation temperature of 100°C, a 35 V sampling cone, a capillary of 3.0 kV, and a constant collision energy of 6 V. At high energy, all parameters were the same, but the collision energy was ramped from 15 to 55 V during the scan time. The mass spectrometer was previously calibrated using a 300 fmol/ μL solution of human (Glu1)-fibrinopeptide B (Waters Corporation). This solution was used in the reference spray during analyses and scanned every 30 s at a flow rate of 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$. Mass calibration of the acquired data was corrected considering the doubly charged precursor ion of (Glu1)-fibrinopeptide B (785.8426 Da).

2.7 | Statistical rationale

The Kolmogorov–Smirnov normality test was performed on the research sample set to determine the normal distribution of the study samples. The Kolmogorov–Smirnov normality test showed that the demographic and clinical data followed a normal trend, as assessed via an independent *t*-test together with a chi-squared test to evaluate the data, using the statistical program SPSS Statistics 22 (IBM Brazil, São Paulo, Brazil).

To identify and detect variations in the proteomes, MS data were used in searches against a database of human proteins and eight bacterial phyla, i.e., Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Chlamydiae, Fusobacterium, Firmicutes, Synergistetes, and Spirochaetes, from UNIPROT (<https://www.uniprot.org/>) using the Progenesis tool (Waters). Any non-tryptic peptide passing from the filter criterion were discarded. Analysis was performed based on the ion-matching requirements: minimal fragment ion matches per peptides, 3; minimal fragment ion matches per protein, 7; minimal peptide matches per protein, 1; trypsin missed cleavages, 1; and carbamidomethylation of cysteines as a fixed modification and oxidation of methionine as a variable modification [19]. Polypeptides were identified if they matched at least one unique

and specific peptide from experimental data. Identification was classified as real when detected in at least two analytical replicates. The false discovery rate in all data was <1%. Protein abundance values were estimated based on the average of the abundances of the first three matched peptides.

For quantitative analysis, variances were tested by *t*-test using the MetaboAnalyst 5.0 program (<https://www.metaboanalyst.ca/home.xhtml>) with the level of significance set to 5% or less for statistically acceptable differences between normalized abundances. To assess the differences between the groups, we used the MetaboAnalyst 5.0 program to perform a heatmap analysis, partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA), Volcano plot, and a principal component analysis (PCA). A Venn diagram was employed at the Bioinformatics & Evolutionary Genomics website (bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/).

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | Proteomics and clinical findings in gingivitis

The saliva proteomes were analyzed using quantitative mass spectrometry (LC-ESI Q/TOF) via a gel-independent method. In addition to human proteome assessment, bacterial proteins referring to eight bacterial phyla were also analyzed. Eighteen young adults were categorized according to the diagnosis of gingivitis into the healthy (H, control) cohort, with 12 individuals, and the gingivitis (G, case) cohort, with six individuals.

The demographic and clinical data of the volunteers were collected (Supplementary Table 1). With the exception of for periodontal disease and triglycerides, none of the clinical data showed significant differences between the studied groups. The control group had a higher level of triglycerides, which was in discordance with the literature and can be explained by the presence of outliers in the control group [20]. As expected, periodontal evaluation (Supplementary Table 2) of PD, SB, CAL, gingival bleeding, and BOP revealed significant differences between the groups. The levels of PD, CAL, and BOP were higher in the case group, whereas SB was decreased in the gingivitis group. Despite this unexpected SB data, the remaining periodontal evaluations were able to diagnose our volunteers regarding the presence or absence of gingivitis.

The proteomics analysis identified a total of 71 human polypeptides (Figure 1), with 39 exhibiting differential amounts (Supplementary Table 3). Among them, 30 (42.2%) were classified into immune response function, eight (11.2%) into transport, four (5.6%) into protease inhibition, and 32 (40.8%) into other functions (Supplementary Figure 1). More than half (53.3%) of the immune response proteins exhibited quantitative variation, indicating

putative changes related to gingivitis. The Volcano plot analysis showed that the levels of 17 proteins were changed by 1.5-fold or more (Figure 1).

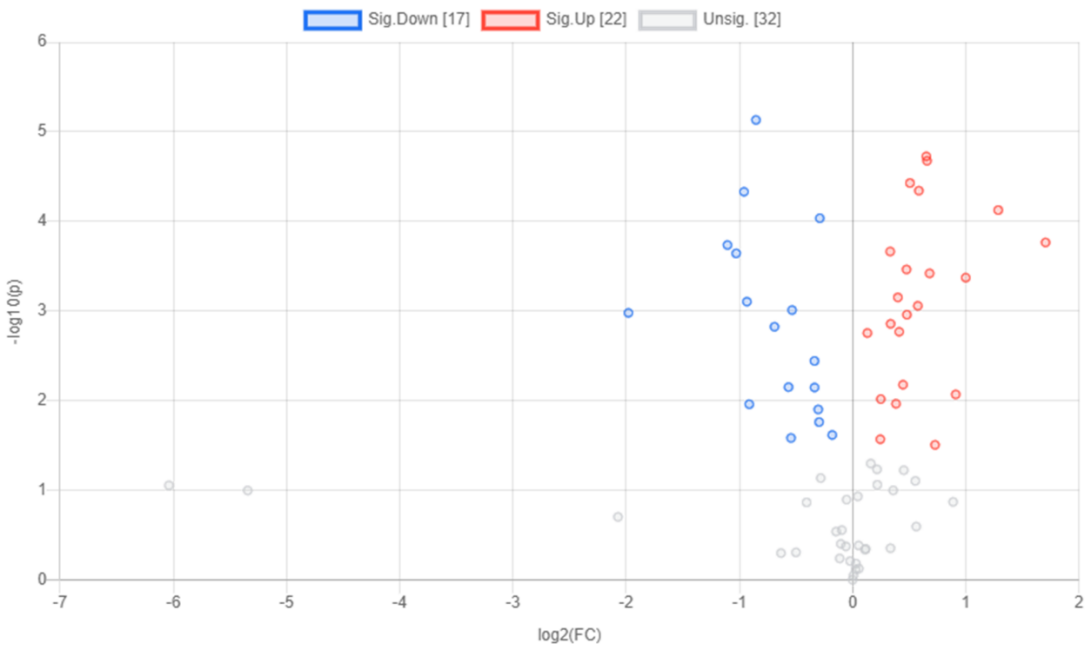


Figure 1. Volcano graph analysis depicting the distribution of 71 human with a change of 1.5 or more.

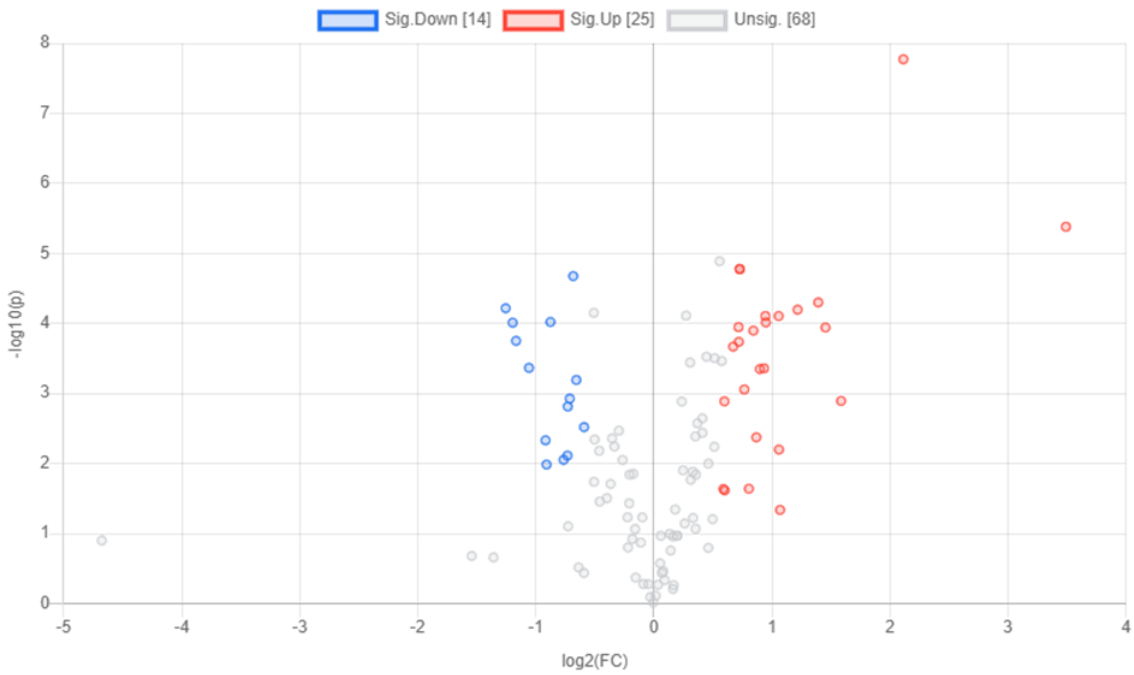


Figure 2. Volcano graph analysis depicting the distribution of 116 bacterial saliva polypeptides with a change of 1.5 or more.

A total of 116 bacterial proteins (Supplementary Table 4) were identified in the saliva samples. For identification, we used the UNIPROT database of eight bacterial phyla that are well characterized in the literature: Actinobacteria, Bacteroidetes, Chlamydiae, Chloroflexi, Firmicutes, Fusobacterium, Spirochaetes, and Synergistetes (Deo and Deshmukh., 2019). The largest number of bacterial proteins identified was from the Fusobacterium phylum (39 proteins; 33.6%), followed by Chlamydiae (17; 14.6%), Spirochaetes (13; 12.1%), and Bacteroidetes (12; 11.2%). Regarding bacterial orders, the most abundant were: Fusobacteriales (39 proteins; 34%), Chlamydiales (15; 13%), and Spirochaetales (8; 7%) (Supplementary Figure 2). The Volcano plot (Figure 2) revealed that the levels of 39 proteins exhibited differences of 1.5 or more (P -value ≤ 0.005).

Some of the proteins identified here belong to bacteria previously reported as being involved in periodontal diseases. Socransky (2005) showed that some bacterial complexes are responsible even for the development of the disease, as well as protection against it. In our data, one protein from the red-complex-related *Porphyromonas gingivalis* was identified, and 36 were from the *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum*, which is from the orange complex. The red and orange complexes are closely associated with the occurrence of periodontal diseases [21].

The PCA of human and bacterial proteomes showed that the case and control groups behaved differently (Figure 3). The VIP PLS-DA score (variable importance in projection) of human and bacterial proteomes was obtained to detect the 15 main proteins that affected the group variations (Figure 4). Cystatin S, serum albumin, and alpha amylase were the human proteins that most impacted the group distinctions. Among the bacterial proteins, the greatest effect on the case/control group features were biased toward tRNA pseudouridine synthase B (from *Chloroflexi*), 50S ribosomal protein L7/L12 (*Bacteroidetes*), and the electron transfer subunit of dihydroorotate dehydrogenase B (NAD(+)) (*Fusobacteria*). A heatmap graph was prepared based on the 15 proteins analyzed based on the VIP score, to compare the amounts of bacterial and human proteins within the groups (Supplementary Figures 3 and 4).

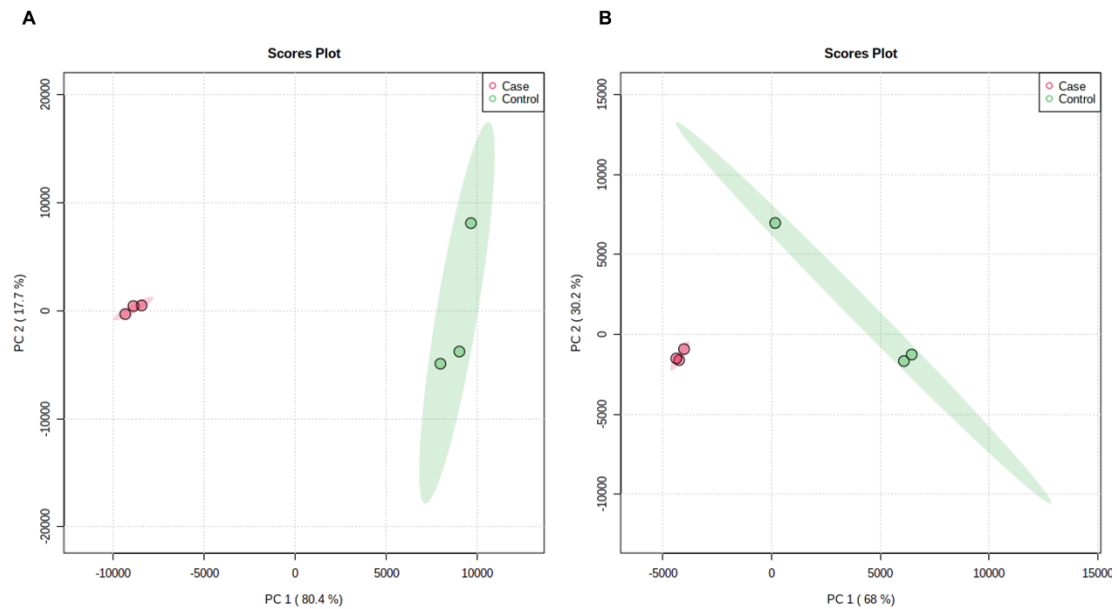


Figure 3. PCA analysis of case and control groups of human and bacterial proteins.

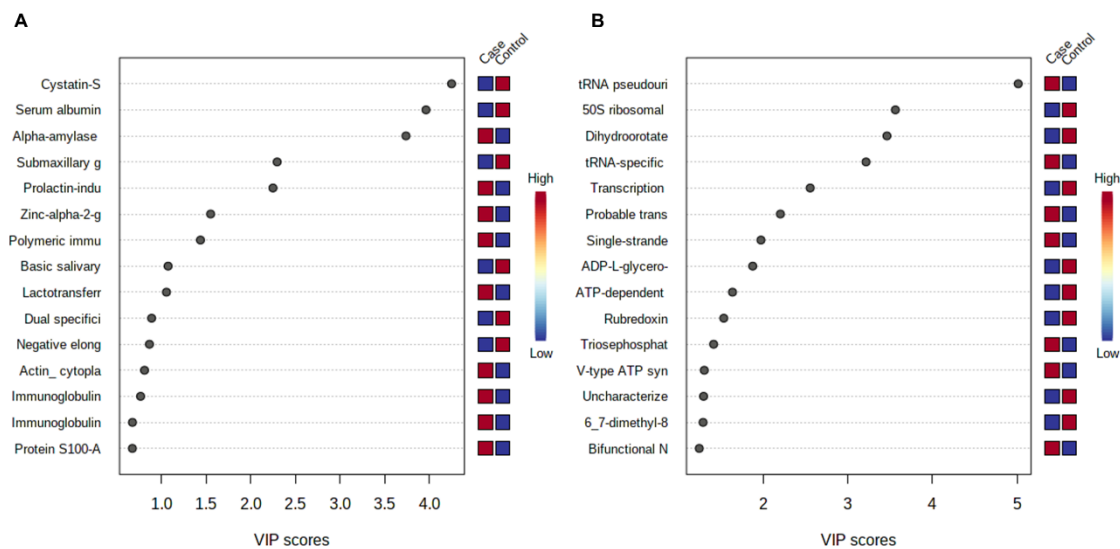


Figure 4: VIP score with the 15 main human and bacterial proteins that affected the groups variation in this study.

Cystatins are part of a large family of proteins that are produced mainly by the sublingual glandule and have antimicrobial and antiviral effects [22]. Here, cystatin S was decreased by 1.5-fold in the gingivitis group. In contrast, cystatins D and SA were increased by 1.6-fold in the case group, whereas cystatin SN did not present a significant difference. Previous studies were not clear regarding the variation of cystatin levels in the saliva in cases of periodontal

diseases. However, regardless of whether the levels of cystatins are increased, causing an improvement in the resistance to the damage present in gingivitis and periodontitis, or decreased, making the actions of the diseases more harmful, these proteins play an important role in the diagnosis and prognosis of periodontal diseases [15, 23].

Alpha amylase plays a role in the maintenance of oral immunity by acting against bacterial adhesion and proliferation. In this study, an expressive increase in alpha amylase was observed in the gingivitis group (more than 3.5-fold change). According to Saberi et al. (2020) [24], alpha amylase has a protective role, increasing in response to infection. Another study also reported that a decreased alpha amylase level was positively correlated with decreases in the pocket depth and CAL [25]. Thus, elevated amounts of alpha amylases in the saliva may be indicative of the presence of periodontal diseases.

Lactotransferrin is a globular glycoprotein that is released in response to bacterial infection and is strongly associated with periodontal disease. Because of its antibacterial activity, a decrease in lactotransferrin can promote bacterial growth [26-24]. Here, lactotransferrin levels exhibited a 1.6-fold increase in the case group, probably representing a response to the greater bacterial plaque formation in gingivitis.

Annexins are Ca^{2+} -binding proteins that play an important role in the inflammatory process. Annexin A1 can inhibit phospholipase, thus inhibiting the production of inflammatory mediators [28]. Previous studies indicated that annexin A1 is decreased in the control group compared with the healthy cohort [29]. Bostanci et al. (2010) [30] observed higher levels of annexins in healthy crevicular gingival fluid (FGC) compared with FGC with periodontitis. This reaffirms a certain protective level of the annexin A1 protein, which can reduce the harmful effects of inflammation in gingivitis and periodontitis.

The negative elongation factor E (NELF) is a complex that functions to negatively regulate the elongation of transcription by RNA polymerase II [31]. In the study reported by Yu et al. (2020) [32], *NELF* mutation was introduced in macrophages, resulting in an increase in IL-10, an anti-inflammatory protein, which slowed down the production of pro-inflammatory proteins. The authors concluded that NELF can restrict the transcription of inhibitors of inflammation. In our study, NELF exhibited a 2-fold decrease in the gingivitis group. Thus, it may promote a greater inflammatory aspect in the oral region, probably mediated by IL-10.

Among the 15 bacterial proteins identified in this study to have a major impact on the differences between groups, some of them have been poorly studied in relation to periodontal

diseases, such as tRNA-specific 2-thiouridylase MnmA, transcription anti-termination protein NusB, and probable transcriptional regulatory protein FN1661.

Here, the single-stranded DNA-binding protein from the *Fusobacteria* was detected at a level that was more than two times greater in the gingivitis group, being the protein with seventh greatest impact on the case/control proteome variation. It may be linked to a probable increase in *Fusobacteria* abundance in the gingivitis pathology. This phylum is part of the orange complex, which, together with the red complex, causes periodontal diseases.

The UPF0098 (TC_0109) protein has not been characterized, but is revised. Here, this Chlamydiales protein was upregulated by more than 11 times in the gingivitis group, thus becoming of interest for future studies regarding its function. Within the phylum Chlamydiae, all identifications were related to proteins from Chlamydiales, with the exception of two proteins from the order Parachlamydiales. Among the former, thioredoxin reductase showed a more than 2-fold increase in the gingivitis group. This protein plays a role in cellular redox processes, protecting the cell against oxidative stress and repairing proteins [32-33], which indicates another bacterial defense mechanism that is probably activated in response to inflammatory factors released into the saliva during gingivitis.

Acyl carrier protein (ACP), which was upregulated (by 50% more) in the gingivitis group, is a highly conserved transport protein. In ACP batteries, it acts as a monomeric protein that is necessary for the production of several molecules, such as endotoxins, in addition to acylated homoserine lactones, which are involved in quorum sensing. These processes render ACP an essential protein for bacterial pathogenesis and colonization [34].

The GrpE protein, which was upregulated in *Fusobacteria* in the gingivitis condition, acts on the response to thermal shock and osmotic shock. GrpE is considered as a constitutive protein, and prevents the aggregation of proteins denatured by stress [35]. The upregulation of GrpE in gingivitis may be a bacterial response to adverse conditions in an inflammatory oral state that can impair bacterial survival.

The CRISPR-associated Cas1 endonuclease was also upregulated by more than 2-fold in the gingivitis group. The CRISPR-Cas system is an adaptive bacterial immunity that works by integrating viral sequences into the *CRISPR* locus of the cell, thus enabling the bacterium to recognize and eliminate viral infections more effectively [36]. Chen and Olsen (2019) [36] suggested that CRISPR-Cas may play an immunological role in bacterial modulation in periodontitis. Those authors suggested that *P. gingivalis* (phylum Bacteroidetes), which is a key bacterium in oral dysbiosis, can use this mechanism to protect itself from possible viral

infections, especially within the periodontal pockets, where the presence of viruses is enhanced. In our study, the upregulation of this protein in Fusobacteriales may have provided the same protection effect to these bacteria during adverse conditions in gingivitis.

Moreover, in Fusobacteria, the PdxS subunit of pyridoxal 5'-phosphate synthase was significantly upregulated in the volunteers with gingivitis. It catalyzes the formation of pyridoxal 5'-phosphate (PLP), the functions of which include stress resistance and virulence, as observed in *A. pleuropneumoniae* by [37]. The upregulation of PdxS in the oral conditions of gingivitis may indicate the induction in bacteria of a protective mechanism or an increase in virulence during periodontal disease.

4 | CONCLUDING REMARKS

Our study provided knowledge about human and bacterial proteins related to the gingivitis disease, especially in the Brazilian population, in which proteomics studies are scarce. Despite the fact that this study included a low number of volunteers and an imbalance in relation to the number of men and women, our data showed a clear and significant distinction between the case and control groups. We identified proteins from the host and oral microbiomes that were responsible for these features, such as cystatin S, alpha amylase, lactotransferrin, and NELF E. Bacterial proteins from species of red and orange complexes for the occurrence of periodontal diseases were identified as being upregulated in the gingivitis group. Studies of the modulation of these proteins during gingivitis may provide new knowledge about biomarkers for this pathology.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful for all volunteers that participated of this study and the National Institute of Metrology, Quality and Technology (Inmetro) for the support in MS analysis. We thank the funding agencies CAPES and FAPERJ for financial resources and grants.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The mass spectrometry raw data are available in PRIDE with the dataset identifier PXD036719 (<https://www.ebi.ac.uk/pride/>)

REFERENCES

1. Bostanci, N., Selevsek, N., Wolski, W., Grossmann, J., Bao, K., Wahlander, A., Trachsel, C., Schlapbach, R., Öztürk, V. Ö., Afacan, B., Emingil, G., Belibasakis, G. N. (2018). Targeted proteomics guided by label-free quantitative proteome analysis in saliva reveal transition signatures from health to periodontal disease. *Mol. Cell. Proteomics*, 17, 7, 1392-1409.
2. Armitage, G. C. (2004). Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 34, 9-21.
3. Eberhard, J., Grote, K., Luchtefeld, M., Heuer, W., Schuett, H., Divchev, D., Scherer, R., Schmitz-Streit, R., Langfeldt, D., Stumpp, N., Staufenbiel, I., Schieffer, B., Stiesch, M. (2013). Experimental gingivitis induces systemic inflammatory markers in young healthy individuals: a single subject interventional study. *Plos One*, 8, 2, e55265.
4. Kim, J. J., Kim, C. J., Camargo, P. M. (2013). Salivary biomarkers in the diagnosis of periodontal diseases. *Journal of the California Dental Association*, 41, 2, 119-24.
5. Kayal, R. A. (2013). The role of osteoimmunology in periodontal disease. *BioMed Research International* 2013, 639368
6. Socransky, S. S., Haffajee, A. D. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000, 38, 1, 135-187.
7. Tsuchida, S., Satoh, M., Takiwaki, M., Nomura, F. (2018). Current status of proteomic technologies for discovering and identifying gingival crevicular fluid biomarkers for periodontal disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 20, 1, 86.
8. Sorsa, T., Gursoy, U. K., Nwhator, S., Hernandez, M., Tervahartiala, T., Leppilahti, J., Gursoy, M., Könönen, E., Emingil, G., Pussinen, P. J., Mäntylä, P. (2016). Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP-8, in gingival crevicular fluid, mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases. *Periodontology* 2000, 70, 1, 142-63.
9. Pärnänen, P., Sorsa, T., Tervahartiala, T., Nikula-Ijäs, P. (2020) Isolation, characterization and regulation of moonlighting proteases from *Candida glabrata* cell wall. *Microb. Pathog*, 149, 104547.
10. Pärnänen, P., Lähteenmäki, H., Tervahartiala, T., Räisänen, I.T., Sorsa T. (2021). Lingonberries-General and Oral Effects on the Microbiome and Inflammation. *Nutrients*, 13, 11, 3738.
11. Bao, K., Li, X., Poveda, L., Qi, W., Selevsek, N., Gumus, P., Emingil G., Grossmann, J., Diaz, P. I., Hajishengallis, G., Bostanci, N and Belibasakis, G. N. (2020) Proteome and

microbiome mapping of human gingival tissue in health and disease. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 10, 588155.

12. Overmyer, K. A., Rhoads, T. W., Merrill, A. E., Ye, Z., Westphall, M. S., Acharya, A., Shukla, S. K., Coon, J. J. (2021). Proteomics, lipidomics, metabolomics, and 16S DNA sequencing of dental plaque from patients with diabetes and periodontal disease. *Mol Cell Proteomics*, 20, 100126.

13. Liu, J., Li, Y., Li, J., Zheng, D., Liu, C. (2022). Sources of automatic office blood pressure measurement error: a systematic review. *Physiol Meas*, 43, 9.

14. Da, Silva-Boghossian., C. M., do Souto., R. M., Luiz, R. R., and Colombo, A. P. V. (2011). Association of red complex, *A. actinomycetemcomitans* and nonoral bacteria with periodontal diseases. *Archives of Oral Biology*, 56, 9, 899-906.

15. Gonçalves, L. D. R., Soares, M. R., Nogueira, F. C. S., Garcia, C., Camisasca, D. R., Domont, G., Feitosa, A.C., Pereira, D.de.A., Zingali, R.B., Alves G. (2010). Comparative proteomic analysis of whole saliva from chronic periodontitis patients. *J. Proteomics*, 73, 1334–1341.

16. Santos, E. O., Alves, N., Dias G .M., Mazotto, A. M., Vermelho, A., Vora, G. J, Wilson, B., Beltran, V.H., Bourne, D.G., Le Roux, F., Thompson, F.L. (2011). Genomic and proteomic analyses of the coral pathogen *Vibrio coralliilyticus* reveal a diverse virulence repertoire. *ISME J*, 5, 1471–1483.

17. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248–254

18. Carnielli, C.M., Macedo, C.C.S., De, Rossi, T., Granato, D.C., Rivera, C., Domingues, R.R, et al (2018). Combining discovery and targeted proteomics reveals a prognostic signature in oral cancer. *Nature Commun.*, 9, 3598.

19. Nagampalli, R. S. K., Quesñay, J. E. N., Adamoski, D., Islam, Z., Birch, J., Sebinelli, H.G., Girard, R.M.B.M., Ascensão, C.F.R., Fala, A.M., Pauletti, B.A., Consonni, S.R., Oliveira, J.F., Silva, A.C.T., Franchini, K.G., Leme, A.F.P., Silber, A.M, Ciancaglini, P., Dias I.M.S.M.G, Ambrosio, A.L.B. Human mitochondrial pyruvate carrier 2 as an autonomous membrane transporter. *Scientific Reports* 8, 3510 (2018).

20. Kim, S. R., Nam, S. H. (2020). Association between periodontal disease and levels of triglyceride and total cholesterol among Korean adults. *Healthcare (Basel)*, 8, 3, 337.

- 21.Haffajee., A. D., Cugini, M. A., Tanner, A., Pollack, R. P., Smith, C., Kent, R. L., and Socransky, S. S. (1998). Subgingival microbiota in healthy, well- maintained elder and periodontitis subjects. *Journal of clinical periodontology*, 25, 5, 346-353.
- 22.Prunk, M., Perišić., Nanut, M., Sabotič, J., Kos, J. (2016). Cystatins, cysteine peptidase inhibitors, as regulators of immune cell cytotoxicity. *Period. Biol.*, 118, 4, 353–62.
- 23.Zemouri, C., Jakubovics, N. S., Crielaard, W., Zaura, E., Dodds, M., Schelkle, B., Loos, B.G. (2019). Resistance and resilience to experimental gingivitis: a systematic scoping review. *BMC Oral Health*, 19, 1, 212.
- 24.Saberi, V. B., Yousefi, F., Yousefi, T., Qujeq, D. (2020). Assessment of mucin and alpha-amylase levels in gingival crevicular fluid of chronic periodontitis patients. *Oral Dis*, 28, 1, 210-215.
- 25.Sanchez, G. A., Miozza, V. A., Delgado, A., Busch, L. (2013). Relationship between salivary mucin or amylase and the periodontal status. *Oral Diseases*, 19, 6, 585–591.
- 26.Ramenzoni, L. L., Lehner, M. P., Kaufmann, M. E., Wiedemeier, D., Attin, T., Schmidlin, P. R. (2021b). Oral diagnostic methods for the detection of periodontal disease. *Diagnostics (Basel)*. 11, 3,571
- 27.Ramenzoni, L. L., Hofer, D., Solderer, A., Wiedemeier, D., Attin, T., Schmidlin, P.R. (2021a). Origin of MMP-8 and Lactoferrin levels from gingival crevicular fluid, salivary glands and whole saliva. *BMC Oral Health* 21, 5, 21, 1, 385.
- 28.Raynal, P and Pollard, H. B. (1994). Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1197, 1, 63–93.
- 29.Da, Silva-Boghossian C. M., Colombo, A. P. V., Tanaka, M., Rayo, C., Xiao, Y., Siqueira, W.L. (2013) Quantitative Proteomic Analysis of Gingival Crevicular Fluid in Different Periodontal Conditions. *PLoS ONE*, 8, 10, e75898.
- 30.Bostanci, N., Heywood, W., Mills, K., Parkar, M., Nibali, I., Donos, N (2010). Application of label-free absolute quantitative proteomics in human gingival crevicular fluid by LC/MS E (gingival exudatome). *Journal of proteome research*, 9, 5, 2191–2199
- 31.Yu, Li., Zhang, B., Deochand, D., Sacta, M.A., Coppo, M., Shang, Y., Guo, Z., Zeng, X., Rollins, D.A., Tharmalingam, B., Li, R., Chinenov, Y., Rogatsky, I., Hu, X. (2020). Negative

elongation factor complex enables macrophage inflammatory responses by controlling anti-inflammatory gene expression. *Nature Communications*, 11, 1, 2286.

32. Serata, M., Iino, T., Yasuda, E., Sako, T. (2012). Roles of thioredoxin and thioredoxin reductase in the resistance to oxidative stress in *Lactobacillus casei*. *Microbiology (Reading)*. 158, 4, 953-962.

33. May, H.C., Yu, J.J., Zhang, H., Wang, Y., Cap, A.P., Chambers, J.P., Guentzel, M.N., Arulanandam, B.P. (2019) Thioredoxin-A is a virulence factor and mediator of the type IV pilus system in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS ONE*, 14, 7, e0218505.

34. Huang, J., Xue, C., Wang, H., Wang, L., Schmidt, W., Shen, R., Lan P. 2017. Genes of acyl carrier protein family show different expression profiles and overexpression of acyl carrier protein 5 modulates fatty acid composition and enhances salt stress tolerance in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 8:987

35. Bracher, A., Verghese, J. (2015) The nucleotide exchange factors of Hsp70 molecular chaperones. *Front. Mol. Biosci.* 2:10

36. Chen T, Olsen I. *Porphyromonas gingivalis* and its CRISPR-Cas system. *J Oral Microbiol.* 2019 Jul 3;11(1):1638196.

37. Xie F, Li G, Wang Y, Zhang Y, Zhou L, Wang C, Liu, S., Liu, S., Wang, C. (2017) Pyridoxal phosphate synthases PdxS/PdxT are required for *Actinobacillus pleuropneumoniae* viability, stress tolerance and virulence. *PLoS ONE*, 12, 4, e0176374.

APÊNDICE 3: RELEVANCE OF OBESITY AND OVERWEIGHT TO SALIVARY AND PLASMA PROTEOMES OF HUMAN YOUNG ADULTS FROM BRAZIL



Brazilian Journal of Development | 13981
ISSN: 2525-8761

Relevance of obesity and overweight to salivary and plasma proteomes of human young adults from Brazil

Relevância da obesidade e sobrepeso para os proteomas salivares e plasmáticos de adultos jovens humanos do Brasil

DOI:10.34117/bjdv8n2-363

Recebimento dos originais: 07/01/2022

Aceitação para publicação: 22/02/2022

Carlos Vinicius Ferreira da Silva

Mestre em Ciências Médicas pela Biotrans/RJ

Instituição: Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste

E-mail: cviniciusbio@gmail.com

Youssef Bacila Sade

Doutor em Biofísica pela UFRJ/RJ

Instituição: Inmetro Rio de Janeiro

E-mail: yousade@gmail.com

Sandra Mara Naressi Scapin

Doutora em Genética e Biologia Molecular

Instituição: Inmetro Rio de Janeiro

E-mail: sandra.scapin@gmail.com

Paulo Emilio Correa Leite

Doutor em Neuroimunologia pela UFF/RJ

Instituição: Inmetro Rio de Janeiro

E-mail: leitepec@gmail.com

Carina Maciel da Silva-Boghossian

Doutora em Odontologia pela UFRJ/RJ

Instituição: UFRJ Rio de Janeiro

E-mail: carinabogho@yahoo.com.br

Eidy de Oliveira Santos

Doutora em Genética

Instituição: Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste

E-mail: eidyos@gmail.com

ABSTRACT

Obesity is a chronic condition related to multiple comorbidities such as hypertension, type 2 diabetes, periodontal and cardiovascular diseases. Obesity can lead to a metabolic change, creating a prolonged and low-intensity inflammatory process. This study aims to analyze the plasma and saliva proteomes of young adults with obesity and overweight comparing to normal weight individuals, to reveal if the rise on body mass influences the proteomic profiles. The reported population consisted of 18 students and/or employees of Rio de Janeiro State, Brazil, aged between 18 and 35 years. Individuals were categorized according to their anthropometric measures in the Normal Weight, Overweight and Obese