

SESSIONE “PREMIO H.M. GOLDMAN 2018”

Rimini, 15 marzo 2018

XX CONGRESSO NAZIONALE SidP

STUDIO DELLA VARIAZIONE DEL FINGERPRINTING METABOLICO NELLA PARODONTITE CRONICA E AGGRESSIVA ATTRAVERSO L'ANALISI SPETTROSCOPICA RMN DI CAMPIONI DI SALIVA

STUDY OF THE DIFFERENTIAL METABOLIC FINGERPRINTING IN CHRONIC AND AGGRESSIVE PERIODONTITIS THROUGH RMN SPECTROSCOPIC ANALYSIS OF SALIVA SAMPLES

Giacomo Baima*, **Federica Romano***, **Valeria Manavella ***, **Gaia Meoni†**, **Leonardo Tenori†‡**, **Mario Aimetti***

** C.I.R. Dental School, Dipartimento di Scienze Chirurgiche, Università di Torino, Italia.*

†Centro di Risonanza Magnetica (CERM), Università di Firenze, Sesto Fiorentino, Italia.

‡Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Università di Firenze, Sesto Fiorentino, Italia.

Riassunto

Obiettivi di questo studio sono stati analizzare la capacità della metabolomica basata sulla risonanza magnetica nucleare (RMN) nel discriminare il “fingerprinting” metabolico della parodontite cronica generalizzata (PCG) da quello della forma aggressiva generalizzata (PAGG) in campioni di saliva e identificare i metaboliti associati alla malattia.

Gli spettri metabolomici sono stati acquisiti da prelievi di saliva non stimolata di pazienti affetti da PCG (n = 33) o PAGG (n = 28) e confrontati con quelli di individui in condizione di salute parodontale (S, n = 39). Il clustering dei soggetti è stato ottenuto attraverso l'analisi delle componenti principali e delle correlazioni canoniche sui profili degli spettri RMN.

Mentre si è ottenuta una significativa accuratezza predittiva nella discriminazione di S da PCG e da PAGG (81% per entrambi), i profili salivari di PCG e PAGG risultavano proiettati nel medesimo spazio metabolico (valore predittivo del 60%). I pazienti parodontali presentavano un metabolismo distintivo con livelli più bassi ($P < 0,05$) di piruvato, gruppi N-acetilici e lattato e più alti ($P < 0,05$) di prolina, fenilalanina e tirosina rispetto al gruppo di controllo.

Sulla base dei risultati ottenuti, la metabolomica salivare non sembra evidenziare un'impronta metabolica discriminante tra PCG e PAGG.

Abstract

This investigation was planned to determine the ability of nuclear magnetic resonance-based (RMN) metabolomics to distinguish the spectral signature of generalized chronic (GCP) and generalized aggressive periodontitis (GAgP) by analysis of human saliva and to assess potential metabolites that can successfully discriminate periodontitis.

Spectra were acquired from unstimulated saliva samples of patients suffering from GCP (n = 33) or GAgP (n = 28) and compared to those from periodontally healthy subjects (HS, n=39). The clustering of patients was achieved by using a combination of Principal Component Analysis and Canonical Correlation Analysis.

While a significant predictive accuracy was achieved in discriminating HS from both GCP and GAgP (81% both), GAgP and GCP saliva samples were projected into the same metabolic

SESSIONE “PREMIO H.M. GOLDMAN 2018”

Rimini, 15 marzo 2018

XX CONGRESSO NAZIONALE SidP

space (60% predictive accuracy). Periodontitis patients exhibited a distinctive metabolism with significantly lower levels ($P < 0.05$) of pyruvate, N-acetyl groups and lactate and higher levels ($P < 0.05$) of proline, phenylalanine, and tyrosine compared to HS.

Based on these findings, metabolomics of saliva did not detect an unequivocal metabolic fingerprint differentiating CGP from GAgP.

Introduzione

La parodontite è una malattia infiammatoria cronica ad eziologia multifattoriale che causa la progressiva perdita dell'attacco parodontale e il riassorbimento dell'osso alveolare e, se non trattata, conduce alla perdita dell'elemento dentario (Kornman 2008). È ormai riconosciuto che il principale fattore iniziante la patologia sia la disbiosi a carico del biofilm batterico sottogengivale (Roberts e Darveau 2015), anche se estensione e gravità della distruzione tissutale sono principalmente imputabili alla risposta dell'ospite alla componente microbica (Bartold e Van Dyke 2013; Papapanou 2014).

La parodontite può avere presentazioni cliniche eterogenee. Il tradizionale schema classificativo oggi in uso (Armitage 1999) riconosce due principali forme cliniche di malattia, la parodontite cronica (PC) e la parodontite aggressiva (PAG), la cui diagnosi differenziale si basa principalmente sul rilievo di dati anamnestici, di parametri clinici e sull'analisi radiografica. Non esistono, infatti, caratteristiche microbiologiche o istopatologiche che permettano una discriminazione inequivocabile tra le due condizioni (Armitage 2010; Ji e Choi 2015). Per questo motivo la ricerca si è indirizzata negli ultimi anni verso l'analisi dei network e pathway biochimici coinvolti nell'insorgenza e nella progressione della malattia parodontale, indicando una serie di potenziali biomarkers che potrebbero essere utili per differenziare tra i suoi diversi fenotipi (Buduneli e Kinane 2011; Loos e Papapanou 2013). Tra i fluidi biologici la saliva è particolarmente promettente in quanto può riflettere processi fisiologici e/o patologici a carico dell'intero organismo (Zhang et al. 2016; Rathnayake et al. 2017). Inoltre, il prelievo è rapido, non invasivo e di facile accettazione per il paziente (Kinney et al. 2011).

I recenti progressi in ambito tecnologico hanno reso possibile un miglioramento nella comprensione dei sistemi biologici e un avanzamento nella ricerca sul fluido salivare grazie alle scienze omiche. Tra di esse, la metabolomica potrebbe avere notevoli potenzialità nella discriminazione tra PC e PAG. Essa, attraverso l'identificazione e la quantificazione di molecole a basso peso molecolare (< 1500 Da) presenti in linee cellulari, organi o organismi, si propone di individuare quello che è il fenotipo individuale (German et al. 2005). Tale “metabotipo”, nonostante vada incontro a continue modifiche in seguito alle interazioni con l'ambiente esterno e all'alternarsi dei cicli fisiologici, mostra una porzione stabile nel tempo e caratteri fortemente individuo-specifici (Clark e Haselden 2008). Grazie all'analisi statistica multivariata dei dati acquisiti mediante risonanza magnetica nucleare (RMN) e spettrometria di massa, è già stato possibile differenziare i soggetti affetti da malattie parodontali da quelli sani utilizzando campioni di fluidi orali (Barnes et al. 2011; Aimetti et al. 2012; Ozek et al. 2016).

Rimane da esplorare la possibilità di impiegare l'analisi metabolomica basata sulla RMN per discriminare i profili metabolici di PC e PAG. Obiettivi di questo studio pilota sono stati, dunque, analizzare l'accuratezza dell'analisi metabolomica salivare nel discriminare tra i “fingerprinting” metabolici della parodontite cronica generalizzata (PCG) e aggressiva generalizzata (PAGG) e identificare i metaboliti associati ad un quadro clinico di parodontite rispetto ad una condizione di salute parodontale (S).

SESSIONE “PREMIO H.M. GOLDMAN 2018”

Rimini, 15 marzo 2018

XX CONGRESSO NAZIONALE SidP

Materiali e Metodi

Il Comitato Etico Istituzionale (numero 1503/2016) ha approvato il protocollo di questo studio trasversale che è stato condotto in accordo alla dichiarazione di Helsinki e correttamente riportato secondo le linee guida STROBE. Tutti i partecipanti hanno firmato il consenso informato.

Disegno dello studio e selezione del campione

Sono stati reclutati in modo consecutivo 100 pazienti, bilanciati per genere ed abitudine al fumo, nel periodo compreso tra gennaio e settembre 2017 tra quelli inviati per una visita di consulenza presso il C.I.R. Dental School, Università di Torino. La numerosità campionaria è stata stabilita sulla base dell'ampiezza campionaria di studi precedenti e in considerazione della natura pilota di questa sperimentazione.

I criteri di esclusione prevedevano: assunzione di antibiotici nei 3 mesi precedenti, terapia parodontale negli ultimi 6 mesi, alterazioni della funzionalità salivare, malattie sistemiche che possono influire sulle condizioni parodontali o sul profilo immunologico, gravidanza e allattamento.

Valutazione parodontale e prelievo della saliva

La diagnosi di malattia parodontale è stata stabilita sulla base dei criteri dell'American Academy of Periodontology (Armitage 1999), attraverso un esame clinico e radiografico sistematico da parte di due clinici esperti e calibrati. Le misure cliniche sono state rilevate su 6 siti per dente mediante una sonda parodontale (PCP-UNC 15, Hu-Friedy) e arrotondate al millimetro più prossimo. Includevano la presenza di placca (PI 0/1), la presenza di sanguinamento al sondaggio (BoP 0/1), la profondità di sondaggio (PD), la recessione gengivale (REC) e il livello di attacco clinico (CAL). Sono stati registrati anche il full mouth plaque score (FMPS) e il full mouth bleeding score (FMBS). Per la riproducibilità intra-esaminatore (misure ripetute due volte a distanza di 24 h nello stesso paziente) ed inter-esaminatore (rispetto al direttore del progetto) sono stati selezionati 15 pazienti che non hanno preso parte allo studio. La percentuale di accordo, con uno scarto di ± 1 mm, è stata per CAL e PD compresa tra il 94 e il 97%.

I pazienti con PCG dovevano avere almeno il 30% dei siti con PD >5 mm, placca visibile e BoP. La diagnosi di PAgG si è basata sui seguenti criteri: pazienti con età < 35 anni, aggregazione familiare dei casi, rapida progressione, presenza di almeno 6 primi molari o incisivi permanenti con almeno un sito con PD e CAL > 5 mm ed almeno 6 denti permanenti diversi dai primi molari e incisivi con almeno un sito con PD e CAL > 5 mm (Duarte et al. 2010).

Il gruppo controllo (S) comprendeva soggetti con PD e CAL ≤ 3 mm su tutti i siti, nessuna evidenza radiografica di perdita ossea alveolare e FMBS $< 15\%$.

I prelievi di saliva intera non stimolata sono stati effettuati tra le 8:00 e le 10:00 del mattino a distanza di almeno 24 ore dall'esame parodontale, per evitare contaminazioni ematiche, secondo la tecnica descritta da Silwood nel 1999. I pazienti sono stati istruiti a non mangiare, bere, fumare, lavarsi denti ed effettuare sciacqui con collutorio nell'ora precedente il prelievo e a lasciar fluire la saliva all'interno di una provetta sterile graduata per 10 minuti. Per ogni paziente è stato raccolto 1 ml di saliva, immediatamente congelato a -80°C ed inviato al CERM di Firenze per le analisi.

Preparazione dei campioni per la RMN

I campioni di saliva sono stati riportati a temperatura ambiente e centrifugati per rimuovere i detriti (5000g per 30 min a 4°C). Sono stati aggiunti a 300 μl di ciascun

SESSIONE “PREMIO H.M. GOLDMAN 2018”

Rimini, 15 marzo 2018

XX CONGRESSO NAZIONALE SidP

campione un totale di 300 µl di tampone di fosfato di sodio (70 mM Na₂ HPO₄; 20% (v/v) H₂O; 6,15 mM NaN₃; 6,64 mM sodio trimetilsilil [2,2,3, 3-2 H₄]; propionato (TMSP) a pH 7,4) e la miscela è stata omogeneizzata in una centrifuga per 30 s con l'aggiunta di NaN₃. Un totale di 450 µl di questa miscela è stato trasferito in una provetta per le analisi.

Acquisizione ed analisi delle immagini spettrali

Gli spettri dei campioni sono stati acquisiti con uno spettrometro Bruker (Bruker BioSpin srl) operante a 14,1T (600,13 MHz proton Larmor frequency) a una temperatura di stabilizzazione di circa 0,1 K. Per ciascun campione di saliva si è acquisito uno spettro ¹H-RMN utilizzando la sequenza pulsatile NOESY PRESAT (Bruker terminology: noesygpprd.comp) con 64 FID (*free induction decay*) raccolti in 65536 punti attorno a una larghezza spettrale di 12019 Hz, tempo di rilassamento di 4 s e tempo di miscela di 0,1 s.

Gli spettri ottenuti sono stati corretti per le distorsioni di fase, calibrati (segnale protonico di TMSP a 0,00 ppm) con il software TopSpin (Version 2.1; Bruker BioSpin) e allineati calibrando i picchi TMSP a 0,00 ppm. Ciascuno degli spettri monodimensionali compresi nei range 0,2-4,3 e 6,6-10,0 ppm è stato segmentato in raggruppamenti chimici di 0,02 ppm e le corrispondenti aree spettrali integrate utilizzando un software AMIX (Bruker BioSpin, version 3.8.4). L'area spettrale totale è stata calcolata sui rimanenti raggruppamenti e la normalizzazione dell'area totale eseguita sui dati prima dell'analisi di riconoscimento dei pattern (Holmes et al. 1994; Spraul et al. 1994).

Analisi statistica

Le analisi sono state eseguite in cieco utilizzando il pacchetto statistico R. Le differenze tra i gruppi sono state analizzate mediante l'analisi della varianza e test post hoc per i dati clinici. Per studiare i profili metabolomici dei pazienti con PCG, PAGG e S (Madsen et al. 2010) sono state utilizzate una combinazione dell'analisi delle componenti principali (PCA) e dell'analisi di correlazione canonica (CA) sui valori di PCA. L'algoritmo di riconoscimento dei pattern kNN (*K-nearest neighbors*, k = 5) è stato impiegato sui valori di CA per predire i campioni, mentre lo schema di cross-validazione Monte Carlo per testare l'accuratezza globale della classificazione.

I 22 metaboliti maggiormente responsabili della discriminazione tra i gruppi sono stati identificati grazie alla libreria degli spettri RMN dei composti organici e database come HMDB. Le concentrazioni relative di questi metaboliti sono state calcolate integrando i segnali presenti nei rispettivi spettri (Wishart 2008) utilizzando gli script Matlab®. La significatività statistica tra i gruppi è stata valutata utilizzando il test Wilcoxon. Le variazioni tra metaboliti sono state espresse come fold change (FC) che corrisponde al log₂ del rapporto tra i valori mediani delle concentrazioni di metaboliti tra pazienti con parodontite e sani. P < 0,05 è stato considerato statisticamente significativo.

Risultati

Caratteristiche della popolazione

Nello studio sono stati reclutati un totale di 100 pazienti caucasici di cui 33 con PCG, 29 con PAGG e 39 in condizione di salute parodontale. Come riportato nella Tabella 1, non sono emerse differenze statisticamente significative tra i tre gruppi relativamente a genere e abitudine al fumo. Come atteso, i valori medi di FMPS, FMBS, PD e CAL erano più elevati nei pazienti con PAGG e PCG rispetto ai controlli sani (P < 0,001). Quando comparati tra loro, i gruppi con PCG e PAGG differivano soltanto per i valori di FMPS (P < 0,001).

SESSIONE “PREMIO H.M. GOLDMAN 2018”

Rimini, 15 marzo 2018
XX CONGRESSO NAZIONALE SidP

Tabella 1. Caratteristiche demografiche e cliniche del campione (media \pm deviazione standard)

Parametro	Gruppo S (n=39)	Gruppo PGC (n=33)	Gruppo PAgG (n=28)
Età (anni)	46,6 \pm 8,2	50,5 \pm 8,9	31,1 \pm 4,6*
Donne/uomini (n)	14/25	12/21	10/18
Fumatori/non fumatori (n)	6/33	5/28	4/24
FMPS (%)	12,3 \pm 2,3	62,1 \pm 25,8*	45,1 \pm 17,4*
FMBS (%)	9,7 \pm 3,2	52,3 \pm 20,8*	59,6 \pm 18,2*
PD (mm)	2,2 \pm 0,3	5,2 \pm 0,8*	5,5 \pm 1,0*
CAL (mm)	2,3 \pm 0,4	5,8 \pm 1,0*	6,0 \pm 0,9*

* $P < 0,001$ rispetto al gruppo di controllo (S).

Profilo metabolomico salivare

Il clustering dei pazienti sani o con patologia parodontale si è basato sulle analisi PCA/CA sui profili ^1H -RMN dei campioni salivari (Fig. 1).

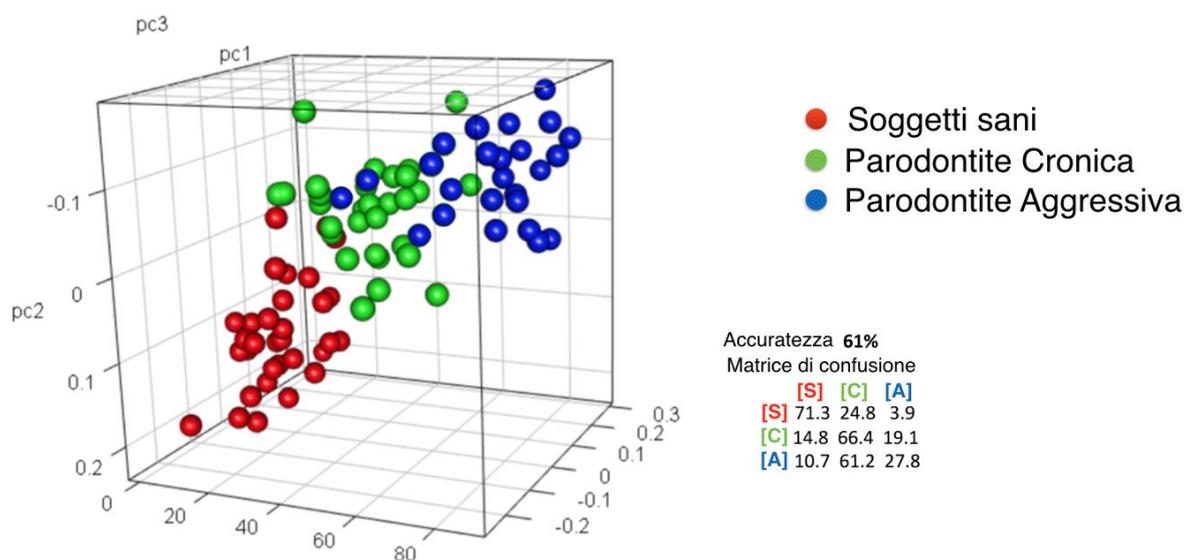


Figura 1. Discriminazione negli spettri salivari di pazienti sani e con parodontite con l'approccio PCA/CA. I soggetti sani sono localizzati nella parte inferiore sinistra dello spazio metabolico. pc (principal component): componente principale.

Il modello ha raggiunto un'accuratezza predittiva dell'81% nel discriminare gli individui sani sia dai pazienti con PCG sia dai pazienti con PAgG (Fig. 2 A, B). I risultati del test di permutazione (numero di permutazioni= 100), statisticamente significativi ($P < 0,001$), hanno evidenziato la buona accuratezza classificativa del modello. Il “fingerprinting” metabolomico è stato in grado di discriminare tra pazienti sani e affetti da parodontite, mentre non lo è stato nel discriminare tra le due forme cliniche di parodontite (accuratezza predittiva del 60%). I campioni salivari provenienti dai pazienti con PCG e PAgG sembravano appartenere allo stesso spazio metabolico (Fig. 3).

SESSIONE "PREMIO H.M. GOLDMAN 2018"

Rimini, 15 marzo 2018
XX CONGRESSO NAZIONALE SidP

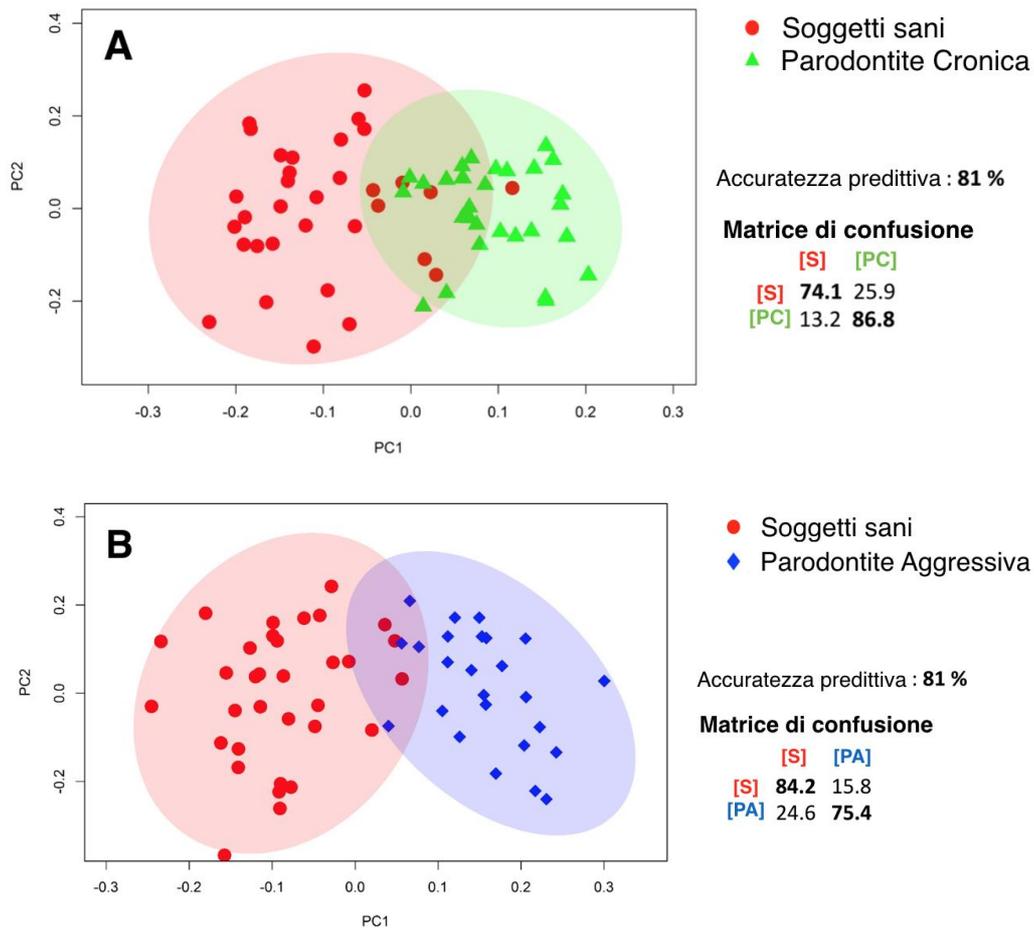


Figura 2. A. Discriminazione nello spettro salivare tra individui con parodontite cronica e sani. B. Discriminazione nello spettro salivare tra individui con parodontite aggressiva e sani. PC (principal component): componente principale.

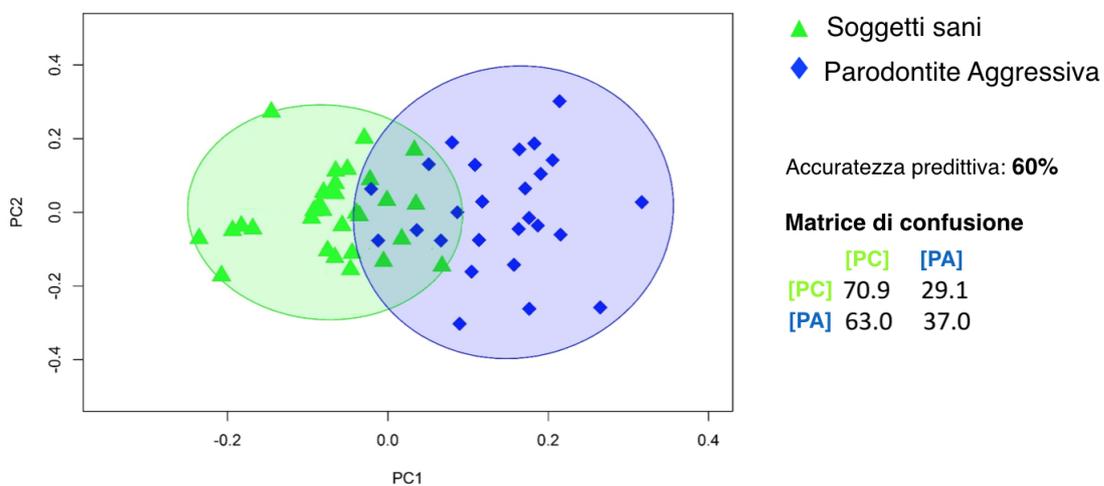


Figura 3. Discriminazione nello spettro salivare tra individui con parodontite cronica ed aggressiva. I due gruppi appaiono omogeneamente proiettati nello spazio metabolomico (60% di accuratezza discriminativa). PC (principal component): componente principale.

SESSIONE “PREMIO H.M. GOLDMAN 2018”

Rimini, 15 marzo 2018
XX CONGRESSO NAZIONALE SidP

Metaboliti associati alla malattia parodontale

I valori delle concentrazioni relative dei metaboliti salivari dei pazienti con parodontite e di quelli in condizione di salute parodontale sono stati stimati attraverso l'integrazione dei segnali dello spettro RMN. La quantificazione assoluta dei metaboliti non è stata eseguita, pertanto le concentrazioni sono riportate in unità arbitrarie consentendo di investigare solo le differenze relative tra i gruppi.

I pazienti parodontali sembrerebbero avere un metabolismo distintivo. Dalla comparazione tra gli spettri dei campioni salivari dei pazienti con parodontite e di quelli sani è emerso che i pazienti con PCG sono caratterizzati da più bassi livelli di ($P < 0,05$) di piruvato, gruppi N-acetilici and lattato e da livelli più elevati ($P < 0,05$) di prolina, fenilalanina, isoleucina, valina and tirosina, come riportato nella Figura 4A e nella Tabella 2. I pazienti con PAgG sono, invece, caratterizzati da livelli inferiori ($P < 0,05$) di piruvato, gruppi N-acetilici, lattato e sarcosina, e da valori più elevati ($P < 0,05$) di formato, fenilalanina e tirosina (Fig. 4B).

Tabella 2. Metaboliti discriminanti [mediana \pm MAD (deviazione media assoluta)] tra i controlli sani e i pazienti con parodontite. PCG: parodontite cronica generalizzata; PAgG: parodontite aggressiva generalizzata; S: sani.

Variabile	Soggetti sani (n=39)	Gruppo PCG (n=33)	P Value S vs PCG	Gruppo PAgG (n=28)	P value S vs PAgG
Isoleucina	0,13134404 \pm 0,06426435	0,2019391 \pm 0,07464959	0,0029	0,16894522 \pm 0,07098764	0,4120
Valina	0,07869439 \pm 0,03965957	0,11559132 \pm 0,07464959	0,0037	0,11452365 \pm 0,08066193	0,1661
Propionato	0,59803163 \pm 0,20712703	0,59258759 \pm 0,26467948	0,9720	0,68122853 \pm 0,54395153	0,3395
Isopropanolo	0,0504893 \pm 0,0483569	0,02809140 \pm 0,02978069	0,1308	0,02845722 \pm 0,04092747	0,2916
Etanolo	0,05515916 \pm 0,04515907	0,03663926 \pm 0,0317967	0,1999	0,05194470 \pm 0,05198074	0,8935
Lattato	0,24940672 \pm 0,61995248	0,13944799 \pm 0,05899849	0,0007	0,08675795 \pm 0,10816035	0,0044
Alanina	0,209794187 \pm 0,08302258	0,24546705 \pm 0,10664733	0,1920	0,20744606 \pm 0,15231503	0,9922
Butirrato	0,04776767 \pm 0,03256429	0,04076956 \pm 0,03058778	0,9031	0,05815527 \pm 0,04301668	0,5957
Acetato	13,5029942 \pm 3,04597609	13,2665201 \pm 4,10825965	0,9412	13,4623605 \pm 5,74416019	0,8209
Gruppi N-acetilici	0,7470707 \pm 0,46330607	0,3752415 \pm 0,2294052	0,0086	0,35232245 \pm 0,45111325	0,0481
Prolina	0,04490115 \pm 0,03301489	0,07075722 \pm 0,0462079	0,0221	0,08529403 \pm 0,0593811	0,11708
Piruvato	0,27237332 \pm 0,34326147	0,08259646 \pm 0,0503986	0,0001	0,08826433 \pm 0,06315526	0,0044
Succinato	0,06509401 \pm 0,12614590	0,06685424 \pm 0,0822175	0,9720	0,17149613 \pm 0,12419512	0,33956

SESSIONE "PREMIO H.M. GOLDMAN 2018"

Rimini, 15 marzo 2018
XX CONGRESSO NAZIONALE SidP

Variabile	Soggetti sani (n=39)	Gruppo PCG (n=33)	P Value S vs PCG	Gruppo PAGG (n=28)	P value S vs PAGG
Metilamina	0,02311899 ± 0,01061543	0,02307759 ± 0,01142731	0,9031	0,02222578 ± 0,01077311	0,871396172
Sarcosina	0,02592511 ± 0,02006617	0,01881152 ± 0,01196017	0,2134	0,01329193 ± 0,00751689	0,0086
GABA	0,12831713 ± 0,06669022	0,12495456 ± 0,08509027	0,9637	0,15837022 ± 0,11324637	0,6568
Colina	0,19668382 ± 0,1026644	0,20486807 ± 0,06902886	0,9412	0,16269168 ± 0,14600182	0,8483
Metanolo	0,083405087 ± 0,17874233	0,08252369 ± 0,07012703	0,9720	0,08263572 ± 0,17869551	0,8209
Glicina	0,62582332 ± 0,20507158	0,65052561 ± 0,30340402	0,1920	0,65755726 ± 0,54889334	0,6707
Tirosina	0,056849 ± 0,0210807	0,07985564 ± 0,02008946	0,0297	0,08330385 ± 0,03725721	0,0481
Fenilalanina	0,09162213 ± 0,0417894	0,14305737 ± 0,04423015	0,0007	0,14300188 ± 0,04453712	0,0099
Formato	0,00455631 ± 0,02086606	0,00860480 ± 0,0684531	0,1197	0,01339967 ± 0,07311111	0,0086

B

FOLD CHANGE PAGG vs S

PIÙ ALTI IN PAGG <-----> PIÙ ALTI IN S

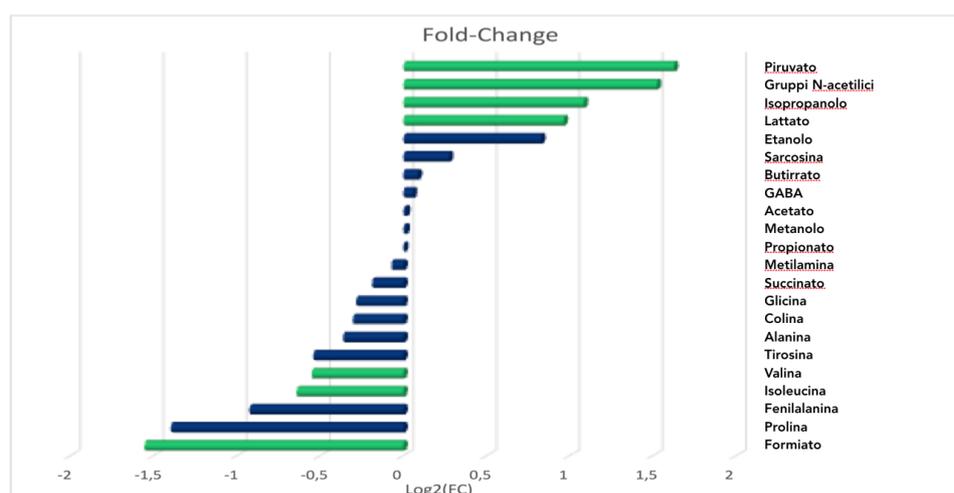


Figura 4. Cambiamenti nei livelli di metaboliti tra individui sani e affetti da parodontite cronica (A) e tra individui sani ed affetti da parodontite aggressiva (B) espressi come fold change (FC) che corrisponde al log2 del rapporto tra le intensità mediane normalizzate dei segnali negli spettri dei due gruppi. PCG: parodontite cronica generalizzata; PAGG: parodontite aggressiva generalizzata; S: sani.

Conclusioni

Il presente studio è stato condotto per verificare l'accuratezza dell'approccio metabolomico basato sulla RMN nel differenziare le impronte biochimiche della PCG da quelle della PAGG nella saliva umana. Nonostante l'analisi multivariata abbia messo in

SESSIONE “PREMIO H.M. GOLDMAN 2018”

Rimini, 15 marzo 2018

XX CONGRESSO NAZIONALE SidP

evidenza differenze significative nella distribuzione all'interno dello spazio metabolico degli spettri RMN in condizione di salute o patologia parodontale, essa non ha raggiunto un'accuratezza sufficiente per discriminare i profili dei pazienti affetti da PCG e da PAgG. Questo è in accordo con una serie crescente di dati sperimentali e confermerebbe la difficoltà nel differenziare la forma aggressiva di parodontite sulla base di oggettive caratteristiche microbiologiche, istopatologiche o molecolari (Van der Velden 2017). Rispetto ad altre tecniche ad alto rendimento, l'analisi metabolomica RMN ha la capacità di fotografare il punto di arrivo del complesso pathway eziologico che sottende la patogenesi della malattia parodontale. Le piccole molecole derivate dalla comunità batterica disbiotica e dalla distruzione dei tessuti dell'ospite, bersaglio della metabolomica, sono potenzialmente capaci di riflettere in tempo reale quello che è il fenotipo molecolare della malattia (Barros et al. 2016). Tenendo conto dei risultati di questa ricerca e dell'evidenza di numerose impronte molecolari distinte nelle lesioni parodontali (Loos and Papantopoulos 2013), la tradizionale classificazione binomiale delle parodontiti (Armitage 1999) sembra non essere più in grado di spiegare questa emergente eterogeneità.

Obiettivo secondario dello studio è stato valutare il potenziale della metabolomica nell'identificazione di robusti markers biologici salivari per la diagnosi parodontale. La discriminazione tra i campioni salivari dei pazienti con parodontite, indipendentemente dalla forma clinica di malattia, e quelli dei soggetti in condizione di salute parodontale rafforza l'evidenza di un'impronta metabolica salivare propria della parodontite (Barnes et al. 2011). I profili spettrali RMN del campione di pazienti esaminati nel presente studio sono dominati dal segnale di 20 - 30 molecole (Wallner-Liebmann et al. 2016). Le concentrazioni relative di tali metaboliti sono state stimate tramite l'integrazione dei rispettivi segnali spettrali RMN e si sono rivelate in linea con i risultati di una precedente pubblicazione (Aimetti et al. 2012). L'aumentato livello di acidi grassi, dipeptidi e monosaccaridi indica una parallela sovraregolazione delle attività lipasiche, proteasiche e glicosidasiche evidenziata nella parodontite. Una conseguenza della degradazione delle macromolecole è l'elevata disponibilità di metaboliti facilmente accessibili dal microbiota orale per la produzione di energia, nonché la creazione di un ambiente ideale per la moltiplicazione batterica. È noto che il lattato possa essere metabolizzato ad acetato e propionato da specie batteriche quali *Haemophilus parainfluenzae*, *Neisseria sicca*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Arachnia* e *Veillonella* (Distler e Kroncke 1981; Traudt e Kleinberg 1996) spiegandone così la relativa deplezione. I ridotti livelli di lattato, osservati nei campioni di saliva dei pazienti con GCP, determinano un abbassamento di piruvato, per la ridotta attività della L-lattico deidrogenasi. Ulteriori conferme dei risultati ottenuti derivano dal lavoro di Yoshida et al. (2015) nel quale si descrivono le vie metaboliche del *P. gingivalis* spiegando ulteriormente la deplezione di piruvato.

Infine, è interessante evidenziare i livelli significativamente più elevati di prolina, fenilalanina, isoleucina, valina e tirosina nella saliva dei pazienti parodontali rispetto ai soggetti sani come conseguenza della degradazione proteolitica dei tessuti dell'ospite, di nuovo in accordo con gli studi di Barnes et al. (2011).

I risultati di questa ricerca devono essere interpretati considerandone i limiti. Una delle maggiori controversie circa il significato dei metaboliti nei fluidi orali nasce dall'impossibilità di determinarne l'origine. Potrebbero, infatti, essere costituenti propri della saliva del paziente, derivare dalla distruzione dei tessuti o essere un prodotto delle

SESSIONE “PREMIO H.M. GOLDMAN 2018”

Rimini, 15 marzo 2018

XX CONGRESSO NAZIONALE SidP

comunità batteriche, persino dei microrganismi costituenti la placca sopragengivale. Per questo motivo Kuboniwa et al. (2016) hanno proposto di eseguire lo scaling sopragengivale prima di raccogliere campioni salivari dimostrando un aumento della capacità predittiva del modello. Nel presente studio, tuttavia, non è stata effettuata alcuna seduta di scaling. È importante considerare che la parodontite è una patologia che coinvolge il cavo orale nella sua globalità (Champagne et al. 2003) ed essere in grado di individuare differenze in un ambiente altamente rumoroso avrebbe indubbiamente più impatto sullo sviluppo di uno strumento diagnostico rapido e non invasivo.

Un altro aspetto da considerare è che il campione è stato bilanciato per genere e per abitudini tabagiche, ma non per età. La parodontite aggressiva colpisce, infatti, mediamente soggetti più giovani della forma cronica. Tuttavia, uno studio pubblicato recentemente in letteratura (Aimetti et al. 2012) ha dimostrato che l'impronta salivare è in grado di discriminare tra fumatori e non fumatori, tra giovani (14 - 40 anni) e anziani (58-73 anni) e tra uomini e donne con un'accuratezza piuttosto bassa, pari rispettivamente al 62,5%, 46,7% e 48,1%. In questo modo, si sono potuti escludere possibili bias attribuibili a fattori di confondimento. L'unico metabolita risultato discriminante ($P < 0,05$) è stato il piruvato (più alto nel gruppo dei fumatori), come anche riportato da Takeda et al. (2009). Gli altri metaboliti riportati come significativi nello stesso lavoro non lo erano nel presente campione.

Una delle maggiori sfide nella parodontologia clinica rimane quella di individuare un marker di distruzione tissutale che presenti elevata sensibilità e specificità, ma questo è reso complesso dall'incertezza che ancora permane nell'interpretazione della fluttuazione dei metaboliti nell'ecosistema orale durante la patogenesi della parodontite (Hajishengallis e Korostoff 2017). Presumibilmente, la maggior preoccupazione per un clinico dovrebbe essere rivolta, più che alla distinzione tra parodontite cronica ed aggressiva, all'identificazione precoce dei siti con distruzione tissutale, alla valutazione del rischio di progressione specifico per il paziente e al monitoraggio in tempo reale dell'attività della malattia. In questi termini, la metabonomica potrebbe rivelarsi di maggior interesse per il clinico. La complessa eziologia della parodontite renderà necessario eseguire trial clinici con un'elevata numerosità campionaria ed impiegare tecniche analitiche e analisi multivariate che prevedano una valutazione multiomica della saliva.

Bibliografia

- Armitage GC. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 4(1):1-6.
- Armitage GC. 2010. Comparison of the microbiological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000.* 53:70-88.
- Aimetti M, Cacciatore S, Graziano A, Tenori L. 2012. Metabonomic analysis of saliva reveals generalized chronic periodontitis signature. *Metabolomics.* 8(3):465-474.
- Barnes VM, Ciancio SG, Shibly O, Xu T, Devizio W, Trivedi HM, Guo L, Jonsson TJ. 2011. Metabolomics reveals elevated macromolecular degradation in periodontal disease. *J Dent Res.* 90(11):1293-1297.
- Barros SP, Williams R, Offenbacher S, Morelli T. 2016. Gingival crevicular fluid as a source of biomarkers for periodontitis. *Periodontol 2000.* 70(1):53-64.
- Bartold PM, Van Dyke TE. 2013. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. *Unlearning learned concepts. Periodontol 2000.* 62(1):203-217.
- Benjamini Y, Hochberg Y. 2000. On the adaptive control of the false discovery rate in multiple testing with independent statistics. *J Educ Behav Stat.* 25(1):60-83.

SESSIONE “PREMIO H.M. GOLDMAN 2018”

Rimini, 15 marzo 2018

XX CONGRESSO NAZIONALE SidP

- Buduneli N, Kinane DF. 2011. Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 38 (Suppl 11):85–105.
- Champagne CME, Buchanan W, Reddy MS, Preisser JS, Beck JD, Offenbacher S. 2003. Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 31:167–180.
- Clark CJ, Haselden JN. 2008. Metabolic profiling as a tool for understanding mechanisms of toxicity. *Toxicol Pathol.* 36(1):140-147.
- Distler W, Kroncke A. 1981. Acid formation by mixed cultures of dental plaque bacteria *Actinomyces* and *Veillonella*. *Arch Oral Biol.* 26:123–126.
- Duarte PM, da Rocha M, Sampaio E, Mestnik FJ, Feres M, Figueiredo LC, Bastos MF, Faveri M. 2010. Serum levels of cytokines in subjects with generalized chronic and aggressive periodontitis before and after non-surgical periodontal therapy: a pilot study. *J Periodontol.* 81(7):1056-1063.
- German JB, Hammock BD, Watkins SM. 2005. Metabolomics: building on a century of biochemistry to guide human health. *Metabolomics.* 1(1):3–9.
- Giannobile WV. 2012. Salivary diagnostics for periodontal diseases. *J Am Dent Assoc.* 143(10 Suppl):6S–11S.
- Hajishengallis G, Korostoff JM. 2017. Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. *Periodontol 2000.* 75(1):116–151.
- Holmes E, Foxall PJ, Nicholson JK, Neild GH, Brown SM, Beddell CR, Sweatman BC, Rahr E, Lindon JC, Spraul M, et al. 1994. Automatic data reduction and pattern recognition methods for analysis of 1H nuclear magnetic resonance spectra of human urine from normal and pathological states. *Anal Biochem.* 220(2):284–296.
- Ji S, Choi Y. 2015. Point-of-care diagnosis of periodontitis using saliva: technically feasible but still a challenge. *Front Cell Infect Microbiol.* 5:65.
- Kebschull M, Guarnieri P, Demmer RT, Boulesteix AL, Pavlidis P, Papapanou PN. 2013. Molecular differences between chronic and aggressive periodontitis. *J Dent Res.* 92(12):1081-1088.
- Kinney JS, Morelli T, Braun T, Ramseier CA, Herr AE, Sugai JV, Shelburne CE, Rayburn LA, Singh AK, Giannobile WV. 2011. Saliva/pathogen biomarker signatures and periodontal disease progression. *J Dent Res.* 90(6):752–758.
- Könönen E, Müller HP. 2014. Microbiology of aggressive periodontitis. *Periodontol 2000.* 65(1):46–78.
- Kornman KS. 2008. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol.* 79(8 Suppl):1560–1568.
- Kuboniwa M, Sakanaka A, Hashino E, Bamba T, Fukusaki E, Amano A. 2016. Prediction of periodontal inflammation via metabolic profiling of saliva. *J Dent Res.* 95(12):1381-1386.
- Loos BG, Papantonopoulos G. 2013. Molecular biotypes for periodontal diseases? *J Dent Res.* 92(12):1056–1057.
- Madsen R, Lundstedt T, Trygg J. 2010. Chemometrics in metabolomics--a review in human disease diagnosis. *Anal Chim Acta.* 659(1-2):23–33.
- Mikkonen JJW, Singh SP, Herrala M, Lappalainen R, Myllymaa S, Kullaa AM. 2016. Salivary metabolomics in the diagnosis of oral cancer and periodontal diseases. *J Periodontol Res.* 51(4):431-437.
- Nibali L, D’Aiuto F, Ready D, Parkar M, Yahaya R, Donos N. 2012. No association between *A. actinomycetemcomitans* or *P. gingivalis* and chronic or aggressive periodontitis diagnosis. *Quintessence Int.* 43(3): 247–254.
- Ozek NS, Zeller I, Renaul DE, Gumus P, Nizam N, Severcan F, Buduneli N, Scott DA. 2016. *J Dent Res* 95(13):1472-1478.
- Papapanou PN. 2014. Commentary: advances in periodontal disease epidemiology: a retrospective commentary. *J Periodontol.* 85(7):877–879.
- Rathnayake N, Gieselmann DR, Heikkinen AM, Tervahartiala T, Sorsa T. 2017. Salivary Diagnostics-Point-of-Care diagnostics of MMP-8 in dentistry and medicine. *Diagnostics (Basel).* 7(1). pii: E7. doi: 10.3390/diagnostics7010007.

SESSIONE "PREMIO H.M. GOLDMAN 2018"

Rimini, 15 marzo 2018

XX CONGRESSO NAZIONALE SidP

- Roberts FA, Darveau RP. 2015. Microbial protection and virulence in periodontal tissue as a function of polymicrobial communities: symbiosis and dysbiosis. *Periodontol* 2000. 69(1):18–27.
- Silwood CJL, Lynch EJ, Seddon S, Sheerin A, Claxson AWD, Grootveld MC. 1999. ¹H-NMR analysis of microbial-derived organic acids in primary root carious lesions and saliva. *NMR Biomed.* 12(6):345–356.
- Spraul M, Neidig P, Klauck U, Kessler P, Holmes E, Nicholson JK, Sweatman BC, Salman SR, Farrant RD, Rahr E, et al. 1994. Automatic reduction of NMR spectroscopic data for statistical and pattern recognition classification of samples. *J Pharm Biomed Anal.* 12(10):1215–1225.
- Takeda I, Stretch C, Barnaby P, Bhatnager K, Rankin K, Fu H, et al. Understanding the human salivary metabolome. *NMR Biomed.* 2009;22(6):577–84.
- Traudt M, Kleinberg I. 1996. Stoichiometry of oxygen consumption and sugar, organic acid and amino acid utilization in salivary sediment and pure cultures of oral bacteria. *Arch Oral Biol.* 41:965–978.
- Van der Velden U. 2017. What exactly distinguishes aggressive from chronic periodontitis: is it mainly a difference in the degree of bacterial invasiveness? *Periodontol* 2000. 75(1):24–44.
- Wallner-Liebmann S, Tenori L, Mazzoleni A, Dieber-Rotheneder M, Konrad M, Hofmann P, Luchinat C, Turano P, Zatloukal K. 2016. Individual Human Metabolic Phenotype Analyzed by (¹H) NMR of Saliva Samples. *J Proteome Res.* 15(6):1787–1793.
- Wishart DS. 2008. Quantitative metabolomics using NMR. *TrAC Trends Anal. Chem.* 27(3): 228–237.
- Xia J, Sinelnikov IV, Han B, Wishart DS. 2015. MetaboAnalyst 3.0--making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acid Res.* 43:W251-257.
- Yoshida Y, Sato M, Nagano K, Hasegawa Y, Okamoto T, Yoshimura F. 2015. Production of 4-hydroxybutyrate from succinate semialdehyde in butyrate biosynthesis in *Porphyromonas gingivalis*. *Biochim Biophys Acta.* 1850(12):2582–91.
- Zhang Y, Sun J, Lin CC, Abemayor E, Wang MB, Wong DTW. 2016. The emerging landscape of salivary diagnostics. *Periodontol* 2000. 70(1):38-52.
- Ziukaite L, Slot DE, Loos BG, Coucke W, Van der Weijden GA. 2017. Family history of periodontal disease and prevalence of smoking status among adult periodontitis patients: a cross-sectional study. *Int J Dent Hyg.* 15:e28-e34.