

**JÔICE DIAS CORRÊA**

**Caracterização do microbioma subgengival e da  
condição periodontal de pacientes com doenças  
reumáticas**

**Instituto de Ciências Biológicas**

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**Fevereiro de 2017**

**JÔICE DIAS CORRÊA**

# **Caracterização do microbioma subgengival e da condição periodontal de pacientes com doenças reumáticas**

Tese apresentada ao Programa de PósGraduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia - Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Biologia Celular

**Orientadora:** Profa. Tarcília Aparecida da Silva

Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas – Faculdade Odontologia/UFMG

**Instituto de Ciências Biológicas**

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**Fevereiro de 2017**



Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE  
JÓICE DIAS CORRÊA

169/2017  
entrada  
1º/2013  
2013670030

Às oito horas do dia 10 de fevereiro de 2017, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado de Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "CARACTERIZAÇÃO DO MICROBIOMA SUBGENGIVAL E DA CONDIÇÃO PERIODONTAL DE PACIENTES COM DOENÇAS REUMÁTICAS", requisito final para obtenção do grau de Doutora em Biologia Celular, área de concentração: Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Dra. Tarcília Aparecida da Silva, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Tarcília Aparecida da Silva	UFMG	Aprovada
Dr. Fernando de Oliveira Costa	UFMG	Aprovado
Dr. Marco Aurélio Ramirez Vinolo	UNICAMP	Aprovado
Dr. Gustavo Pompermaier Garlet	USP	Aprovado
Dra. Karina Gonzales Silverio Ruiz	UNICAMP	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 10 de fevereiro de 2017.

Drª. Tarcília Aparecida da Silva (Orientadora)

Dr. Fernando de Oliveira Costa

Dr. Marco Aurélio Ramirez Vinolo

Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

Drª. Karina Gonzales Silverio Ruiz

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof. Luciana de Oliveira Andrade  
COORDENADORA DO PROGRAMA DE  
PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR (CB/UFMG)

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Patologia Bucal Experimental (Profa. Tarcília Aparecida Silva - Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas - Faculdade de Odontologia/UFMG).

Contamos ainda com a **colaboração dos seguintes laboratórios:**

Laboratório de Interação Microrganismo-Hospedeiro (Profa. Danielle da Glória de Souza - Departamento de Microbiologia - ICB/UFMG).

Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica (Professor Antônio Lúcio Teixeira – Departamento de - Faculdade de Medicina/UFMG).

Laboratory of Oral Biology (Professor Dr. Dana T. Graves - Periodontics Department, University of Pennsylvania).

**Apoio Financeiro: FAPEMIG, CNPq e CAPES.**

*“Chance favors only the prepared mind.”*

**Louis Pasteur**

## AGRADECIMENTOS

Apenas agradecer algumas pessoas parece insuficiente para expressar tudo que fizeram por mim, em tantos momentos dessa trajetória. Cada um aqui citado teve uma parcela enorme no meu sucesso.

Professora **Tarcília Aparecida Silva**, obrigada pela confiança que depositou em mim há tantos anos. Nunca vou esquecer aquele convite inicial para trabalharmos juntas, ainda no final da minha graduação. E em tantos momentos os seus conselhos, e até as puxadas de orelha, me levaram pelo caminho certo. Tenho um orgulho imenso de trabalhar com uma pesquisadora tão brilhante.

**Carol**, te agradeço por ser meu porto seguro. Por me apoiar nos meus sonhos, mesmo que eles as vezes me levem para outro continente durante 9 meses! Obrigada por cada palavra de incentivo, por cada conselho, por cada lágrima enxugada, pela companhia e carinho em todos os meus dias. Por se orgulhar de mim e me fazer querer ser sempre melhor.

Obrigada aos meus amigos da vida: **Iara, Glayce, Lívia, Vicka, Gui**, por serem o ombro amigo nos momentos difíceis, por caminharem comigo cada passo nessa longa jornada.

**Celso**, meu sempre querido chefinho, obrigada por todo apoio, pelo conselho que me deu em um momento decisivo, pela colaboração em tantos momentos e pela amizade e momentos de descontração que se tornaram inesquecíveis!

**Janine**, obrigada pela ajuda imprescindível para a realização desse projeto, pela amizade e conselhos, pela companhia nos intervalos de lab, pela visita maravilhosa que me fez nos EUA e por ter se tornado uma amiga tão especial!

**Mila, Bela, Soraia, Carina, Adriana, Letícia, Talita, Davidson** e a todos os colegas do lab: obrigada pelos ensinamentos, pelas ajudas, pelos momentos de descontração!

Aos amigos que fiz na minha temporada nos EUA: ficar longe de casa, longe da família e amigos, em um ambiente tantas vezes hostil como o laboratório na Upenn (hahaha), seria muito doloroso sem a ajuda de vocês! **Marcelo e Debora**, que me receberam tão carinhosamente e me ajudaram com cada detalhe da minha vida americana e me fizeram sentir em casa!

**Gaby**, que bom foi ter alguém falando a minha língua num mar de chineses mal-humorados! Obrigada pela ajuda, por ter me ensinado tudo quando eu cheguei perdida naquele lab, pela companhia nas idas ao Jonh Morgan para cuidar do trilhão de bichos que a gente tinha!

**Márcia**, minha querida vizinha, obrigada pela sua alegria contagiente, pela companhia nas voltas na *ride* após a academia, por todos momentos que compartilhamos juntas e que me deram tanta felicidade!

**Mayra**, nem tem como agradecer o quanto você me ajudou naqueles meses de Philly! Obrigada até por me fazer dar risada no meio do lab meeting para o Graves me olhar de cara feia. Obrigada pela ajuda científica em tantos momentos, por me ajudar nos experimentos e por me ensinar tanto! Obrigada pela amizade que levarei pela vida toda!

**Lí**, obrigada por ser o abraço mais gostoso do mundo! Pela alegria que você compartilha com cada um no seu caminho!

**Gustavo**, obrigada pelas incontáveis risadas que me fez dar no lab, pela ajuda nas eutanásias dos bichos ao som de músicas brasileiras de gosto duvidoso!

**Deborah e Santuza**, muito obrigada pela colaboração durante todo o desenvolvimento desse trabalho, desde a fase de coleta de dados com a nossa luta para conseguir o número suficiente de pacientes para nossa pesquisa!

Aos professores **Dana Graves, Antônio Teixeira e Gilda**, agradeço pela orientação e suporte durante o desenvolvimento do projeto.

**Gabriel Fernandes**, sem a ajuda de uma fera da bioinformática eu estaria perdida. Muito obrigada mesmo!

Meu muito obrigada a todos os voluntários da pesquisa, que foram essenciais para a realização desse estudo!

Obrigada a toda a turma da Biocel, em especial **Priscila, Luiza e Fabíola**, a alegria de vocês durante aquele semestre tornou mais fácil a gincana da Biocel! E a amizade perdura para além dos portões da UFMG.

Agradeço imensamente à **Deus**, pela força para superar todos os desafios até aqui.

Agradeço à minha **família**, pelo suporte emocional em toda minha caminhada.



## RESUMO

A periodontite é uma doença crônica resultante da interação entre microrganismos do biofilme subgengival e a resposta imune do hospedeiro. Alterações na composição desse biofilme podem afetar a homeostase microbioma-hospedeiro resultando em exacerbação da resposta inflamatória e destruição dos tecidos periodontais. Desordens inflamatórias sistêmicas, como o Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e a Artrite Reumatoide (AR), tem sido associadas a piores condições periodontais. Entretanto os estudos sobre o impacto dessas doenças na microbiota subgengival são escassos. O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto do LES e AR na microbiota subgengival e suas correlações com a condição periodontal, assim como o impacto da inflamação periodontal na atividade da doença reumática. Foram recrutados 52 pacientes com LES e 43 pacientes com AR, em acompanhamento no ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFMG, que foram comparados com um grupo de voluntários saudáveis, pareados por idade e gênero. Todos os participantes foram submetidos ao exame periodontal completo e divididos em: Sem Periodontite (SP) e Periodontite Crônica (PC). Amostras de biofilme subgengival foram coletadas para análise microbiológica utilizando sequenciamento do gene 16S rRNA pela plataforma Ilumina MiSeq. Observou-se no grupo LES um maior percentual de indivíduos com periodontite e em idade mais precoce, comparados ao grupo controle. Os pacientes com LES, assim como os pacientes com AR, apresentaram periodontite mais grave e alta carga bacteriana subgengival associada à menor diversidade microbiana. Além disto, observou-se diminuição de algumas bactérias associadas à saúde oral nos pacientes com LES (*Haemophilus parainflunzae*, *Rothia*) e AR (*Streptococcus*, *Rothia aeria*, *Kingella oralis*). Por outro lado, verificou-se aumento de espécies relacionadas à periodontite nos pacientes com LES (*Fretibacterium*, *Prevotella nigrescens*, *Selenomonas*) e AR (*Prevotella*, *Selenomonas*, *Anaeroglobus geminatus*, *Parvimonas micra*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), mesmo em sítios sem doença periodontal. A presença desses microrganismos correlacionou-se com piores índices clínicos e inflamatórios do LES (Dose acumulada de Prednisona e níveis séricos de Proteína C Reativa) e da AR (Níveis séricos de Proteína C Reativa, score ACR e número de articulações dolorosas/edemaciadas). Pode-se concluir que a presença de doença reumática leva a disbiose da microbiota subgengival, o que pode explicar as piores condições periodontais nesses pacientes. Além disto, a inflamação periodontal pode contribuir para piora dos parâmetros sistêmicos nos pacientes com LES e AR.

**PALAVRAS CHAVE:** Periodontite, Lúpus Eritematoso Sistêmico, Artrite Reumatoide, Doenças Reumáticas, Microbioma

## ABSTRACT

Periodontitis is a chronic disease in response to subgingival biofilm. Changes in the composition of this biofilm could affect the homeostasis between microbiome-host, leading to a local inflammatory activation and destruction of tooth supporting tissues. Systemic inflammatory diseases, such as Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and Rheumatoid Arthritis (RA), have been associated with worse periodontal condition. However, studies evaluating the impact of these diseases on subgingival microbiome are rare. The objective of this study was to evaluate the impact of SLE and RA on the oral microbiome and its correlations with periodontal condition, and the impact of periodontal inflammation in the SLE and RA. 52 patients with SLE and 43 RA patients under treatment in Clinics Hospital of Federal University of Minas Gerais, were recruited and compared to subjects without rheumatic diseases (control group), matched for age and gender. All participants were classified as without periodontitis and with periodontitis. Oral microbiome composition was assessed by amplifying the V4 region of the 16S gene from subgingival dental plaque DNA extracts. These amplicons were examined by Illumina MiSeq sequencing. SLE patients exhibited higher percentual of periodontal disease and in a younger age compared to subjects of the control group. The more severe forms of periodontitis were found in SLE and RA subjects associated with higher bacterial load and decreased microbial diversity. Also, bacterial species related with oral health were decreased in SLE patients (*Haemophilus parainflunzae*, *Rothia*) and RA patients (*Streptococcus*, *Rothia aeria*, *Kingella oralis*), while some disease associated species were increased in SLE group (*Fretibacterium*, *Prevotella nigrescens*, *Selenomonas*) and RA group (*Prevotella*, *Selenomonas*, *Anaeroglobus geminatus*, *Parvimonas micra*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), even in healthy periodontal sites. The presence of these microorganisms correlated with worse clinical and inflammatory SLE features (accumulated dose of prednisone and C-reactive protein levels) and RA parameters (C-reactive protein levels, ACR score, number of tender and swollen joints). Our findings support the hypothesis that rheumatic diseases triggers dysbiosis between pathogenic/healthy-related bacteria, which are likely to contribute to susceptibility to periodontitis. In turn, periodontitis might worse the systemic parameters in RA and SLE patients.

KEY WORDS: Periodontitis, Systemic Lupus Erythematosus, Rheumatoid Arthritis, Rheumatic Diseases, Microbiome

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACR: *American College of Rheumatology*

Anti-CCP: anticorpo anti-proteína citrulinada

Anti-dsDNA: anticorpo anti-DNA de dupla fita

Anti-RNP: anticorpo anti-ribonucleoproteína

Anti-Sm: anticorpo anti Smith

APCs: células apresentadoras de抗ígenos

AR: Artrite Reumatoide

Células Th: células T auxiliadoras

Células Treg: células T reguladoras

C3: componente C3 do complemento

C4: componente C4 do complemento

DAS-28: *Disease Activity Score*

DNA: ácido desoxirribonucleico

DP: doença periodontal

HLA: antígeno leucocitário humano

HSP: *Heat shock proteins*

IgA: imunoglobulina A

IgG: imunoglobulina G

IgM: imunoglobulina M

IFN: interferon

IL: interleucina

IP: índice de placa

LES: Lúpus Eritematoso Sistêmico

MHC: Complexo de histocompatibilidade principal

MMP: metaloproteinases

NIC: nível de inserção clínica

NK: *natural killer* PC: Periodontite Crônica

PCR: reação em cadeia da polimerase

PGE: prostaglandina E

PMN: polimorfonucleares

PrCR: proteína C-reativa

PS: profundidade de sondagem

RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa B

RNA: ácido ribonucléico

SS%: percentual de sítios sangrantes

SLEDAI: *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*

SLICC/ACR: *Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index for Systemic Lupus Erythematosus*

SNPs: polimorfismos de nucleotídeos isolados

SP: Sem periodontite

TGF: Fator transformador do crescimento

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa

TLR: receptores do tipo *Toll*

VHS: velocidade de hemossedimentação

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> – Representação esquemática do periodonto saudável e com a presença de periodontite.....	16
<b>FIGURA 2</b> – Espécies associadas à saúde oral, espécies do core e associadas à periodontite.....	20
<b>FIGURA 3</b> – Proporções de espécies bacterianas associadas à saúde periodontal, espécies do core, associadas à periodontite e espécies variáveis na transição do estado de saúde periodontal para a doença periodontal.....	21
<b>FIGURA 4</b> – Inflamação na patogênese da periodontite.....	24
<b>FIGURA 5</b> – Representação esquemática da patogênese da Artrite Reumatoide.....	28
<b>FIGURA 6</b> – Representação da metodologia de sondagem periodontal.....	44
<b>FIGURA 7</b> – Coleta do biofilme subgengival.....	45
<b>FIGURA 8</b> – Carga bacteriana subgengival nos pacientes com LES e nos pacientes com AR.....	114
<b>FIGURA 9</b> – Diversidade bacteriana nas comunidades subgengivais de pacientes com LES e pacientes com AR.....	115
<b>FIGURA 10</b> – Distância Unifrac média entre pares de amostras em pacientes com LES e pacientes com AR.....	116
<b>FIGURA 11</b> – Comparação da composição bacteriana subgengival (nível gênero) entre os grupos LES e AR.....	117

**FIGURA 12** - Espécies bacterianas com diferentes abundâncias relativas em amostras de LES

e amostras de AR baseada na análise  
Lefse.....118

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> – Critérios para o diagnóstico do Lúpus Eritematoso Sistêmico.....	32
<b>Tabela 2</b> – Parâmetros para determinação do SLEDAI.....	34
<b>Tabela 3</b> – Parâmetros para elaboração do SLICC/ACR.....	36

# SUMÁRIO

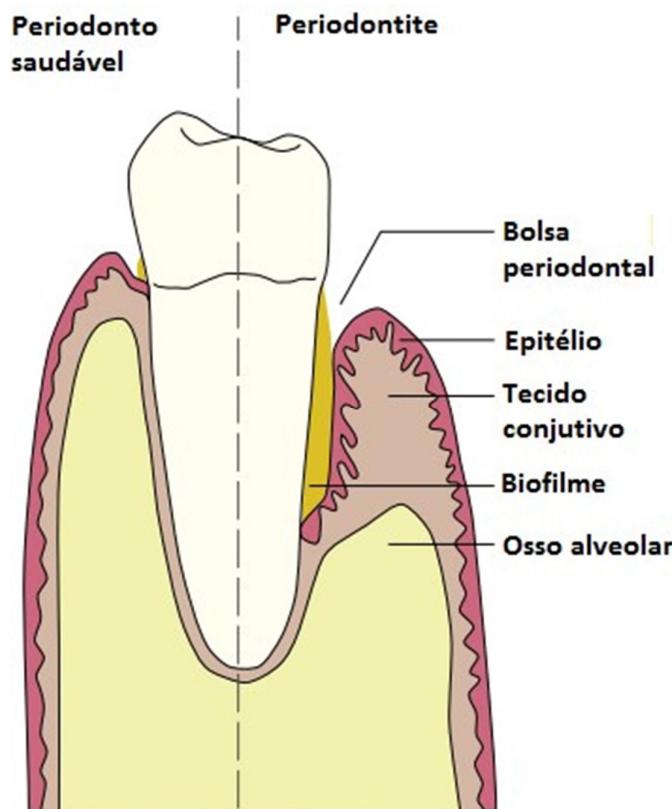
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1 Microbiologia das doenças periodontais.....</b>	<b>17</b>
<b>1.2 Resposta inflamatória na periodontite.....</b>	<b>22</b>
<b>1.3 Doenças reumáticas.....</b>	<b>25</b>
1.3.1 Artrite Reumatoide.....	25
1.3.2 Associação entre Artrite Reumatoide e Infecções orais.....	29
1.3.3 Lúpus Eritematoso Sistêmico.....	30
1.3.4 Associação entre o LES e Infecções Orais.....	37
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1 AMOSTRA.....</b>	<b>41</b>
3.1.1 Critérios de inclusão.....	41
3.1.2 Critérios de exclusão.....	42
<b>3.2 AVALIAÇÃO MÉDICA.....</b>	<b>42</b>
<b>3.3 AVALIAÇÃO ODONTOLÓGICA.....</b>	<b>43</b>
3.3.1 Exame Periodontal.....	43
3.3.2 Coleta da Saliva.....	44
3.3.3 Coleta do biofilme.....	45
<b>3.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....</b>	<b>45</b>
3.4.1 Extração do DNA e PCR.....	45
3.4.2 Avaliação da carga bacteriana.....	46
3.4.3 Análise da composição microbiológica.....	46
<b>3.5 ANÁLISE DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS.....</b>	<b>46</b>
<b>4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>48</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>

*PARTE I: Subgingival microbiota dysbiosis in systemic lupus erythematosus:*

<i>association with periodontal status.....</i>	50
<b>PARTE II:</b> <i>Subgingival microbiome dysbiosis in rheumatoid arthritis linked to increased periodontal inflammation and arthritis outcome.....</i>	88
<b>PARTE III:</b> <i>Análise comparativa do microbioma subgengival de pacientes portadores de LES e AR.....</i>	114
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	119
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	124
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	125
<b>APÊNDICE A</b>	
Protocolo de coleta de dados pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico.....	143
<b>APÊNDICE B</b>	
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Paciente.....	151
<b>APÊNDICE C</b>	
Protocolo de coleta de dados grupo controle.....	153
<b>APÊNDICE D</b>	
Termo de consentimento Livre e Esclarecido Grupo Controle.....	155
<b>APÊNDICE E</b>	
Protocolo de coleta de dados odontológicos.....	157
<b>ANEXO</b>	
Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa	

## 1. INTRODUÇÃO

O periodonto é formado pela gengiva, a qual é constituída de epitélio e tecido conjuntivo; ligamento periodontal; cemento e osso alveolar (**Figura 1**). A função do periodonto é a proteção e sustentação dos dentes na arcada dentária (NEWMAN et al., 2007). Entre a superfície dentária e o periodonto forma-se um espaço biológico conhecido como sulco gengival. Esse espaço é preenchido pelo fluido crevicular, um exsudato que contém componentes provenientes do soro, células residentes do epitélio gengival, microrganismos e mediadores inflamatórios produzidos localmente e sistemicamente (NEWMAN et al., 2007).



**FIGURA 1 – Representação esquemática do periodonto saudável e com a presença de periodontite.** No lado saudável há preservação do espaço biológico e discreto acúmulo de biofilme. Em contrapartida no lado com doença periodontal instalada há aumento da biomassa de biofilme, migração apical do epitélio com formação de um espaço profundo, agora denominado bolsa periodontal. Fonte: Adaptado de YUCEL-LINDBERG; BÅGE, 2013.

O termo doença periodontal engloba todas as alterações que afetam o periodonto,

como a gengivite e a periodontite. A gengivite é uma inflamação limitada ao epitélio gengival e tecido conjuntivo adjacente (ARMITAGE, 1999). A periodontite é uma condição inflamatória crônica dos tecidos de sustentação dos dentes caracterizada pela destruição progressiva do osso alveolar e dos tecidos conjuntivos periodontais (**Figura 1**) (ARMITAGE, 1999). O diagnóstico de periodontite é baseado em critérios clínicos, como profundidade de sondagem e nível de inserção clínica, e perda óssea radiográfica (EKE et al., 2012). Estudos epidemiológicos mostram que cerca de metade da população adulta brasileira apresenta sangramento gengival e cálculo dentário, enquanto 30% apresentam alguma forma de doença periodontal, sendo a mais comum a periodontite crônica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). Se não houver tratamento, a destruição progressiva do ligamento periodontal e a reabsorção do osso alveolar podem levar a formação de bolsa periodontal e retracção gengival, conforme ilustrados na **Figura 1**, e consequente perda do dente (BIYIKOGLU et al., 2013).

Os mecanismos precisos que levam ao início das doenças periodontais ainda não são completamente conhecidos, entretanto os estudos de patogênese da periodontite mostram que a instalação e progressão da destruição dos tecidos periodontais dependem invariavelmente de um desequilíbrio na resposta inflamatória do indivíduo aos microrganismos presentes no biofilme que coloniza os tecidos periodontais (CEKICI et al., 2014; HAJISHENGALLIS, 2014a).

### **1.1 Microbiologia das doenças periodontais**

Antony van Leeuwenhoek, considerado o pai da microbiologia, descreveu no século 17 a presença de “pequenos animais” vivendo no seu corpo e disse: “*a população vivendo na Holanda não é tão grande quanto os organismos vivos que eu carrego em minha boca*”. A partir destes primeiros relatos, o conhecimento da microbiota humana foi consideravelmente expandido. Entretanto, as técnicas tradicionais utilizadas para identificar bactérias eram limitadas devido à necessidade de cultivo dos microrganismos, estimando-se atualmente que menos de 50% da microbiota oral pode ser cultivada (AAS et al., 2005). Nos anos 90, Sigmund Socransky e colaboradores, desenvolveram técnicas para identificação das comunidades bacterianas periodontais usando sondas de DNA, sem a obrigatoriedade de cultivá-las (SOCRANSKY et al., 1998). Desde então, técnicas mais modernas se baseiam no sequenciamento da subunidade (16S) do gene do RNA ribossomal (rRNA) (NIH HMP WORKING GROUP., PETERSON J, GARGES S, GIOVANNI M, MCINNES P, WANG L et al., 2009). A utilização do 16S rRNA se deve ao fato da sua presença universal em organismos celulares e a presença de regiões conservadas e regiões variáveis que permitem a identificação filogenética dos microrganismos (CAPORASO et al., 2010a). Esta nova tecnologia garantiu um grande avanço no conhecimento da microbiologia

nos últimos anos e o desenvolvimento do projeto Microbioma Humano (NIH HMP WORKING GROUP., PETERSON J, GARGES S, GIOVANNI M, MCINNES P, WANG L et al., 2009), que teve como objetivo a caracterização completa do microbioma de vários sítios diferentes do corpo humano de 250 voluntários saudáveis.

O termo “microbioma” foi designado por Joshua Lederberg e define as comunidades comensais, simbióticas e patogênicas de microrganismos que habitam o corpo humano (GRICE; SEGRE, 2012). O microbioma humano é geralmente estável ao longo do tempo, sendo resistente a perturbações, mas pode variar no tempo e de acordo com a região corporal, na mesma pessoa e de pessoa para pessoa (Parfrey & Knight, 2012). Esta grande diversidade deve-se a vários fatores, tais como a exposição aos microrganismos após o nascimento, a idade, fatores genéticos, a dieta, intervenções terapêuticas e estímulos ambientais (NIH HMP WORKING GROUP., PETERSON J, GARGES S, GIOVANNI M, MCINNES P, WANG L et al., 2009).

A cavidade oral é o segundo maior nicho bacteriano do corpo humano, em quantidade de microrganismos presentes, perdendo apenas para o trato gastrointestinal (WADE, 2013). Atualmente cerca de 700 diferentes espécies bacterianas já foram identificadas (ABUSLEME et al., 2013; GRIFFEN et al., 2012; KUMAR et al., 2006) e em condições de saúde estima-se que entre 100 e 200 espécies estejam presentes na cavidade oral (AAS et al., 2005).

Os tecidos periodontais mantém proximidade com um biofilme polimicrobiano aderido às superfícies dentais (MARSH, 2003). A microbiota se beneficia deste “habitat seguro” e nutritivo e em contrapartida contribui para a digestão de alimentos, regulação do metabolismo (catabolismo de macromoléculas complexas), estimulação do sistema imune e previne a colonização por microrganismos exógenos, geralmente patogênicos (MARSH; MOTER; DEVINE, 2011).

As relações entre o biofilme e o hospedeiro são dinâmicas e as interações ecológicas entre estes é que vão determinar a homeostase local ou a transição para um estado de doença periodontal (DARVEAU, 2010). Esse equilíbrio pode ser perturbado tanto por alterações no ambiente local, como por doenças sistêmicas ou uso de medicações, quanto por fatores ambientais, como o hábito de fumar (ALJEHANI, 2014; CAMELO-CASTILLO et al., 2015; COSTA et al., 2013).

A primeira mudança perceptível nesse equilíbrio é quantitativa, com o aumento da biomassa do biofilme. Estudos relatam um aumento substancial (na faixa de 3 logs) na carga bacteriana subgengival na periodontite em comparação à saúde periodontal (ABUSLEME et al., 2013; SOCRANSKY et al., 1998). Mudanças qualitativas também ocorrem, pois com as alterações graduais no ambiente subgengival há uma mudança na competitividade e virulência de

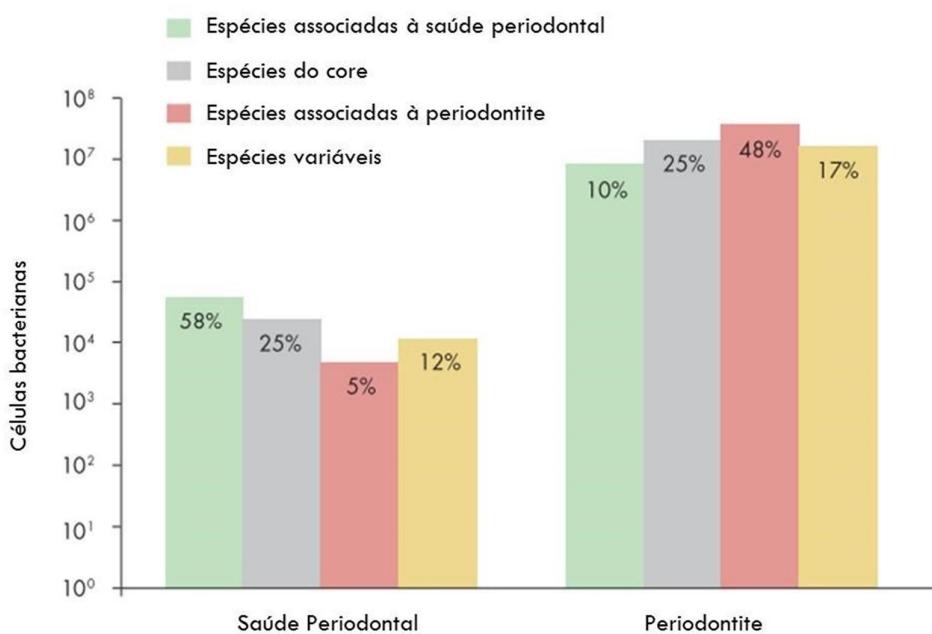
espécies putativas, que antes se apresentavam em menor proporção na microbiota, e passam a se tornar dominantes (DIAZ; HOARE; HONG, 2016). As doenças periodontais se iniciam e progridem quando essa homeostase é perturbada, pois diferente de muitas doenças infecciosas, na periodontite ocorre o crescimento de bactérias já presentes no estado de saúde periodontal, mudando apenas sua proporção (disbiose). Desta forma, não necessariamente ocorre surgimento/colonização de patógenos exógenos (DARVEAU, 2010; HAJISHENGALLIS, 2015).

O estudo clássico de Socransky descreveu o papel de cinco principais complexos microbianos no biofilme subgengival. Algumas espécies / complexos foram associadas com a saúde periodontal, como os complexos amarelo (*Streptococcus* spp) e roxo (*Veillonella parvula* e *Actinomyces odontolyticus*), enquanto outros foram associados com a doença, como o vermelho (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*) e o complexo laranja (*Fusobacterium*, *Prevotella* e *Campylobacter*) (SOCRANSKY et al., 1998). Até recentemente esse estudo baseou o paradigma de que organismos específicos estavam envolvidos com a etiologia da doença periodontal, principalmente os relacionados ao complexo vermelho. Essa teoria era ainda corroborada pelo fato de que espécies como *P. gingivalis* eram capazes de induzir perda óssea periodontal em modelos animais (GRAVES et al., 2012). Espécies como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* foram designadas como periodonto-patógenos em 1996, no relatório do *Workshop Mundial de Periodontia* (“Proceedings of the 1996 World Workshop in Periodontics”, 1996). Entretanto, estudos mais recentes forneceram uma visão mais abrangente do microbioma subgengival em condições de saúde e doença. Estes estudos confirmaram a associação dos microrganismos clássicos com a periodontite, mas também observaram um grande número de espécies adicionais presentes nos sítios com periodontite (GRIFFEN et al., 2011; LAZAREVIC et al., 2009; PARK et al., 2015; PÉREZ-CHAPARRO et al., 2014; SHI et al., 2015).

Uma revisão da literatura recente (DIAZ; HOARE; HONG, 2016) agrupou os resultados dos trabalhos mais atuais comparando a composição bacteriana subgengival entre sítios saudáveis e com periodontite e classificou os grupos em “espécies associadas à saúde”, “espécies do core” e “espécies associadas à periodontite” (DIAZ; HOARE; HONG, 2016) (**Figura 2**). As espécies do core são aquelas que aparecem na maioria dos indivíduos e não mudam de proporção entre os estados de saúde ou doença periodontal. São espécies capazes de se adaptar em diferentes condições e manter relações sinérgicas com diferentes espécies microbianas. Um exemplo importante de espécie do core é o *Fusobacterium nucleatum*, que é capaz de se associar a diversas outras espécies e ajudar na colonização do biofilme (DIAZ; HOARE; HONG, 2016).

<b>Health-associated species</b>	Abiotrophia defectiva <sup>1</sup> Acidovorax sp. 98-63833 <sup>1</sup> Acinetobacter junii <sup>1</sup> Actinobaculum sp. HOT183 <sup>1</sup> Actinomyces massiliensis <sup>1</sup> Actinomyces naeslundii <sup>3</sup> Actinomyces odontolyticus <sup>1</sup> Actinomyces sp. HOT169 <sup>2</sup> Actinomyces sp. HOT170 <sup>2</sup> Actinomyces sp. HOT171 <sup>3</sup> Actinomyces sp. HOT175 <sup>2</sup> Actinomyces sp. HOT177 <sup>1</sup> Actinomyces sp. HOT180 <sup>1</sup> Anthrobacter waluwensis <sup>1</sup> Bergeyella sp. HOT322 <sup>1</sup> Brachybacterium rhamnosum <sup>1</sup> Burkholderia cepacia <sup>1</sup> Capnocytophaga gingivalis <sup>2</sup> Capnocytophaga leadbetteri <sup>1</sup> Capnocytophaga sputigena <sup>1</sup>	Comamonadaceae nbu379c11c1 <sup>1</sup> Comamonadaceae VE2A04 <sup>1</sup> Corynebacterium durum <sup>2</sup> Corynebacterium matruchotii <sup>2</sup> (1 core) Eikenella corrodens <sup>1</sup> (1 core) Fusobacterium nucleatum ss polymorphum <sup>1</sup> (1 para) Gemella haemolysans <sup>2</sup> Gemella morbillorum <sup>2</sup> Granulicatella adjacens <sup>2</sup> (1 core) Haemophilus P3D1 620 <sup>1</sup> Haemophilus parahaemolyticus <sup>1</sup> Haemophilus parainfluenzae <sup>1</sup> (1 core) Kingella oralis <sup>1</sup> Lautropia AP009 <sup>1</sup> Lautropia mirabilis <sup>2</sup> (1 core) Leptotrichia sp. HOT212 <sup>1</sup> Leptotrichia sp. HOT225 <sup>1</sup> Moraxella osloensis <sup>1</sup> Neisseria elongata <sup>1</sup> Porphyromonas catoniae <sup>2</sup>	Porphyromonas sp. HOT279 <sup>2</sup> Propionibacterium propionicum <sup>1</sup> Rothia aeria <sup>3</sup> Rothia dentocariosa <sup>3</sup> (1 para) Schwartzia sp. HOT155 <sup>1</sup> (1 para) Selenomonas naxia <sup>1</sup> Selenomonas sp. HOT138 <sup>1</sup> Streptococcus B66 <sup>1</sup> Streptococcus cristatus <sup>1</sup> Streptococcus gordoni <sup>1</sup> Streptococcus intermedius <sup>2</sup> Streptococcus mitis bv <sup>1</sup> Streptococcus mitis <sup>2</sup> (1 core) Streptococcus sanguinis <sup>3</sup> Streptococcus sp. HOT058 <sup>1</sup> Streptococcus sp. HOT064 <sup>1</sup> Streptococcus vestibularis <sup>1</sup> unclassified Xanthomonadaceae <sup>1</sup> Veillonella parvula <sup>2</sup> (1 core)
<b>Core species</b>	Campylobacter gracilis <sup>2</sup> Catonella morbi <sup>1</sup> Corynebacterium matruchotii <sup>1</sup> (2 health) Eikenella corrodens <sup>1</sup> (1 health) Fusobacterium nucleatum ss animalis <sup>1</sup> (1 para)	Fusobacterium nucleatum ss nucleatum <sup>1</sup> Fusobacterium nucleatum ss vincentii <sup>2</sup> (1 para) Granulicatella adjacens <sup>1</sup> (2 health) Haemophilus parainfluenzae <sup>1</sup> (1 core) Lautropia mirabilis <sup>1</sup> (2 health)	Prevotella nigrescens <sup>1</sup> Prevotella sp. HOT317 <sup>1</sup> Pseudomonas pseudoalcaligenes <sup>1</sup> Streptococcus mitis <sup>1</sup> (2 health) Veillonella parvula <sup>1</sup> (2 health)
<b>Periodontitis-associated species</b>	Aggregatibacter sp. HOT458 <sup>1</sup> Anaeroglobus geminatus <sup>2</sup> Anaerolineae [G-1] sp. HOT439 <sup>2</sup> Atopobium rimae <sup>1</sup> Bacteroidaceae [G-1] sp. HOT272 <sup>2</sup> Bacteroidales [G-2] sp. HOT274 <sup>3</sup> Bacteroidetes [G-3] sp. HOT280 <sup>1</sup> Bacteroidetes [G-6] sp. HOT516 <sup>1</sup> Bifidobacterium dentium <sup>1</sup> Campylobacter rectus <sup>1</sup> Clostridiales[F-1][G-1] sp. HOT093 <sup>1</sup> Desulfovibulus sp. HOT041 <sup>3</sup> Dialister invisus <sup>1</sup> Enterobacter cancerogenus <sup>1</sup> Eubacterium brachy <sup>2</sup> Eubacterium minutum <sup>1</sup> Eubacterium nodatum <sup>2</sup> Eubacterium saphenum <sup>3</sup> Eubacterium yurii <sup>1</sup> Filifactor alocis <sup>4</sup> Fretibacterium fastidiosum <sup>3</sup> Fretibacterium sp. HOT360 <sup>4</sup> Fretibacterium sp. HOT361 <sup>2</sup> Fretibacterium sp. HOT362 <sup>1</sup> Fusobacterium A71 <sup>1</sup> Fusobacterium nucleatum ss animalis <sup>1</sup> (1 core) Fusobacterium nucleatum ss polymorphum <sup>1</sup> (1 para) Fusobacterium nucleatum ss vincentii <sup>1</sup> (2 core) Fusobacterium sp. HOT203 <sup>1</sup> Johnsonella sp. HOT166 <sup>1</sup>	Lachnospiraceae [G-8] sp. HOT500 <sup>2</sup> Leptotrichia EX103 <sup>1</sup> Leptotrichia IK040 <sup>1</sup> Leptotrichia sp. HOT215 <sup>1</sup> Leptotrichiaceae [G-1] sp. HOT210 <sup>1</sup> Mogibacterium timidum <sup>2</sup> Mycoplasma faecium <sup>1</sup> Parvimonas micra <sup>3</sup> Peptostreptococcaceae [1 1][G-2] sp. HOT091 <sup>1</sup> Peptostreptococcaceae [1 1][G-4] sp. HOT369 <sup>1</sup> Peptostreptococcaceae [1 3][G-1] sp. HOT113 <sup>1</sup> Peptostreptococcus stomatis <sup>2</sup> Porphyromonas endodontalis <sup>4</sup> Porphyromonas gingivalis <sup>4</sup> Prevotella buccae <sup>1</sup> Prevotella denticola <sup>2</sup> Prevotella intermedia <sup>3</sup> Prevotella melaninogenica <sup>1</sup> Prevotella oralis <sup>1</sup> Prevotella oulorum <sup>1</sup> Prevotella sp. HOT292 <sup>1</sup> Prevotella sp. HOT526 <sup>1</sup> Prevotella tannerae <sup>2</sup> Pseudoramibacter alactolyticus <sup>2</sup> Rothia dentocariosa <sup>1</sup> (3 health) Schwartzia sp. HOT129 <sup>1</sup> Schwartzia sp. HOT132 <sup>1</sup> Schwartzia sp. HOT145 <sup>2</sup> Schwartzia sp. HOT150 <sup>1</sup>	Schwartzia sp. HOT155 <sup>1</sup> (1 health) Selenomonas dianae <sup>2</sup> Selenomonas sp. HOT126 <sup>1</sup> Selenomonas sputigena <sup>3</sup> Shuttleworthia C1 <sup>1</sup> Solobacterium moorei <sup>1</sup> Stomatobaculum sp. HOT373 <sup>1</sup> Streptococcus anginosus <sup>1</sup> Streptococcus constellatus <sup>2</sup> Streptococcus parasanguinis_II <sup>1</sup> Synergistes G36 <sup>1</sup> Tannerella forsythiae <sup>4</sup> TM7 [G-1] sp. HOT346 <sup>2</sup> TM7 [G-1] sp. HOT349 <sup>3</sup> TM7 [G-5] sp. HOT356 <sup>2</sup> TM7 [G-5] sp. HOT437 <sup>1</sup> Treponema amylovorum <sup>1</sup> Treponema denticola <sup>4</sup> Treponema lecithinolyticum <sup>3</sup> Treponema maltophilum <sup>3</sup> Treponema medium <sup>2</sup> Treponema socranskii <sup>4</sup> Treponema sp. HOT230 <sup>1</sup> Treponema sp. HOT237 <sup>3</sup> Treponema sp. HOT246 <sup>1</sup> Treponema sp. HOT257 <sup>1</sup> Treponema sp. HOT490 <sup>1</sup> unclassified Clostridiales <sup>1</sup>

**FIGURA 2 – Espécies associadas à saúde periodontal, espécies do core e associadas à periodontite.** O número de estudos que embasa essa associação está em sobreescrito. Em caso de discordância entre os estudos a espécie foi colocada em ambos os grupos. Fonte: Adaptado de DIAZ; HOARE; HONG, 2016.



**FIGURA 3 – Proporções de espécies bacterianas associadas à saúde periodontal, espécies do core, associadas à periodontite e espécies variáveis na transição do estado de saúde periodontal para a doença periodontal.** FONTE: Adaptado de DIAZ; HOARE; HONG, 2016.

Com esses novos estudos a teoria mais atual do desenvolvimento da periodontite é a “hipótese ecológica da placa”, que postula que alterações nas condições ambientais locais podem alterar a competitividade no sistema do biofilme bacteriano, induzindo um aumento de organismos com maior capacidade de se adaptar ao novo ambiente (**Figura 3**) (MARSH, 2003).

Nesse sentido, o ambiente subgengival forma um nicho ecológico único para colonização microbiana. No periodonto, várias mudanças significativas acontecem no habitat subgengival durante a doença. Por exemplo, na formação da bolsa periodontal, o epitélio juncional migra apicalmente resultando no aprofundamento do sulco gengival (LOURENÇO et al., 2014; SHI et al., 2015). O fluxo do fluido crevicular aumenta, introduzindo no espaço crevicular não apenas componentes do sistema imune (imunoglobulinas, componentes do sistema complemento) mas também moléculas como transferrina e hemoglobina, que podem ser catabolizadas e usadas como fonte de nutrientes por bactérias Gram-negativas anaeróbias e proteolíticas (HAJISHENGALLIS, 2014a). Neste cenário, estabelece-se um ambiente anaeróbio, com maior pH e rico em produtos da degradação tecidual. Essa alteração ambiental seleciona bactérias classicamente associadas com o desenvolvimento da periodontite, como *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* e diminui a proporção de bactérias associadas à saúde periodontal, como *Streptococcus* (HAJISHENGALLIS, 2014b; HAJISHENGALLIS; LAMONT,

2016). Estas modificações não são restritas apenas aos sítios com doença periodontal, mas afeta toda a cavidade bucal do indivíduo com periodontite. Griffen et al. demonstraram que sítios saudáveis de pacientes com periodontite apresentavam depleção de espécies associadas à saúde periodontal e aumento de espécies associadas a periodontite, quando comparados com indivíduos sem nenhum sítio com doença periodontal (GRIFFEN et al., 2012).

Essa mudança ocorre não apenas na composição bacteriana do biofilme, mas também no seu metabolismo. Estudos do sequenciamento do RNA bacteriano presente nos sítios subgengivais com periodontite mostraram um aumento na expressão de genes associados a motilidade flagelar, transporte de peptídeos, aquisição de ferro, degradação do anel betalactâmico, biossíntese de lipídio A e resposta ao estresse oxidativo (JORTH et al., 2014; YOST et al., 2015). A expressão desses processos metabólicos em sítios com periodontite não ocorre apenas nas espécies associadas à doença, mas também nas espécies do core e naquelas associadas à saúde. Além disso, mesmo que os indivíduos possuam comunidades bacterianas diferentes entre si, as atividades metabólicas são similares, mostrando uma redundância em termos metabólicos do que cada espécie é capaz de fazer em uma comunidade polimicrobiana como o biofilme subgengival em função das pressões do ambiente (MARSH; HEAD; DEVINE, 2015; MARSH; MOTER; DEVINE, 2011). Nesse sentido é importante analisar as interações que ocorrem entre os microrganismos presentes no biofilme. Foi demonstrado que no biofilme oral as espécies têm uma organização espacial e funcional, mantém uma rede de comunicação e uma divisão do trabalho metabólico (JAKUBOVICS, 2015; MARSH; MOTER; DEVINE, 2011). Essa interação entre as espécies é capaz de modular a resposta do hospedeiro frente ao biofilme. Além disso, a expressão gênica das espécies é alterada quando fazem parte de uma comunidade como o biofilme. Por exemplo, *P. gingivalis* tem seu genoma expresso diferentemente quando em condições de cultura em biofilme em relação ao crescimento em cultura pura (MARSH; MOTER; DEVINE, 2011).

Os aspectos acima mencionados explicam parte do desafio da interpretação de estudos sobre biofilme subgengival. Em síntese, qualquer alteração no ambiente pode gerar impacto na microbiota, a qual por sua vez é capaz de induzir modificações na resposta do hospedeiro, gerando uma alça de amplificação do processo de doença periodontal.

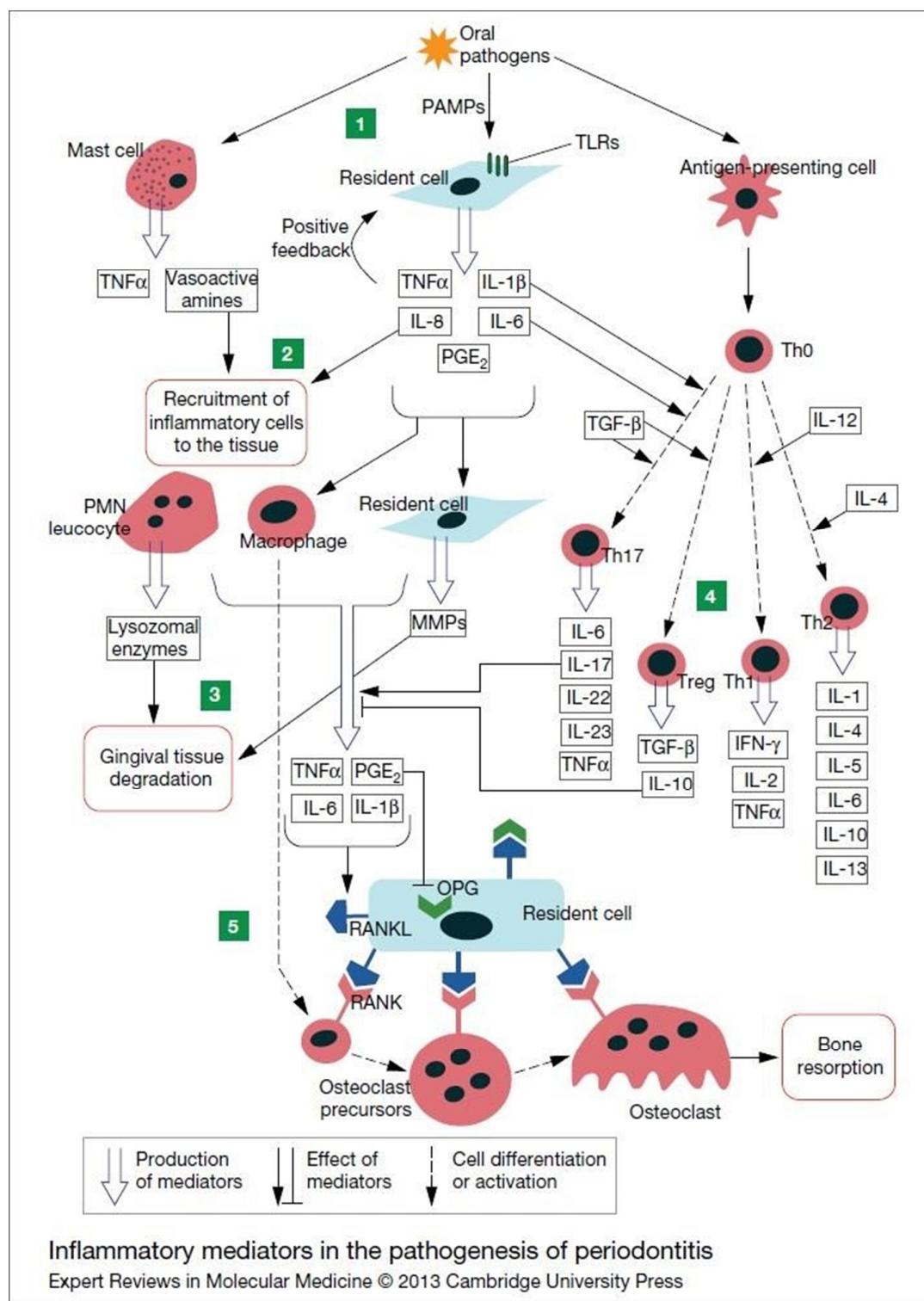
## **1.2 Resposta inflamatória na periodontite**

Uma vez que a presença do biofilme é essencial, mas não suficiente para o início da periodontite, o reconhecimento de componentes microbianos pelas células de defesa e a subsequente produção de mediadores inflamatórios é um passo crucial para a patogênese da

periodontite (CEKICI et al., 2014; YUCEL-LINDBERG; BÅGE, 2013). De fato, um dos componentes principais da resposta ao biofilme e seus produtos é a família de receptores *toll-like* (TLRs) (KIKKERT et al., 2007). Esses receptores, presentes em células apresentadoras de antígeno e células epiteliais por exemplo, ativam a resposta imune inata, por meio da ligação de vários componentes microbianos, como lipopolissacarídeos (LPS) (CEKICI et al., 2014). Inicia-se então uma cascata, com liberação de aminas vasodilatadoras por mastócitos, aumento da expressão de moléculas de adesão, produção de quimiocinas e ativação do sistema complemento, facilitando/induzindo o recrutamento de polimorfonucleares neutrófilos, linfócitos e macrófagos (CEKICI et al., 2014; HAJISHENGALLIS, 2010). Além disso, o reconhecimento de produtos bacterianos pode ativar a resposta imune adquirida, levando a diferenciação de células T auxiliares (Th) em células Th1, Th2, Th17 ou células T regulatórias (Treg) (CEKICI et al., 2014; YUCELLINDBERG; BÅGE, 2013).

Como resultado dessa ativação celular são produzidos mediadores inflamatórios, como citocinas (GRAVES, 2008), prostaglandinas (VAN DYKE; VAN WINKELHOFF, 2013) e quimiocinas (SILVA et al., 2007). As células Th1 são classicamente associadas a resposta imune celular, na presença de IL-12 produzem interferon gama (IFN- $\gamma$ ), fator de transformação do crescimento-beta (TGF- $\beta$ ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 2 (IL-2) (QUEIROZ-JUNIOR et al., 2010). A resposta Th2 é caracterizada pela produção de IL-4 assim como IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e TGF- $\beta$ . As respostas Th1 e Th2 também estimulam a produção de imunoglobulinas (Ig) pelas células B (SOUTO et al., 2014). As células Th17 foram descritas recentemente e estão associadas a processos autoimunes e hiper-inflamatórios. Na presença de TGF- $\beta$  células Th17 liberam IL-17, IL-23, IL-22, IL-6 e TNF- $\alpha$  (GAFFEN; HAJISHENGALLIS, 2008). As células Treg tem sido descritas como responsáveis pela homeostase imune, na presença de TGF- $\beta$  produzem citocinas ditas como imuno reguladoras, IL-10 e TGF- $\beta$  (JOSEFOWICZ; LU; RUDENSKY, 2012).

Um quadro dinâmico é estabelecido pela ação de diversas células e seus mediadores. Citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-17 estão envolvidas na estimulação da produção de outros mediadores inflamatórios, indução dos processos de reabsorção óssea e degradação tecidual (DI BENEDETTO et al., 2013; GRAVES, 2008). Em contrapartida, citocinas com IL-4 e IL-10 atuam regulando a resposta inflamatória e o dano aos tecidos periodontais (CETINKAYA et al., 2013; OUYANG et al., 2011). Além desses fatores, enzimas como elastases, colagenases e metaloproteinases (MMPs), liberadas pelas células residentes e do sistema imune, também contribuem para a destruição do tecido conjuntivo e ativação de osteoclastos responsáveis pela reabsorção óssea (YUCEL-LINDBERG; BÅGE, 2013) (**Figura 4**).



**FIGURA 4 – Vias inflamatórias e ativação osteoclástica envolvidas na patogênese da periodontite.** Fonte: Adaptado de YUCEL-LINDBERG; BÅGE, 2013.

O balanço entre mediadores pró-inflamatórios e reguladores da resposta imune irá determinar o controle da infecção periodontal ou avanço da periodontite. Além disso, a presença

de inflamação crônica periodontal tem sido proposta como fator de risco para o ocorrência e ou agravamento de desordens inflamatórias sistêmicas (HAJISHENGALLIS, 2015). Vários estudos têm correlacionado a periodontite com alterações endócrinas, cardíacas, alteração do curso gestacional e desordens autoimunes (OLIVEIRA et al., 2011; OLSEN, 2015; POLYZOS et al., 2010; ROSAMMA et al., 2013; TAYLOR; PRESHAW; LALLA, 2013; WU; XIAO; GRAVES, 2015). Nesse sentido, um grande número de estudos clínicos também apontam uma associação potencial entre a periodontite crônica e doenças reumáticas (DE PABLO et al., 2009; DETERT et al., 2010; MAYER et al., 2013).

### **1.3 Doenças reumáticas**

As doenças reumáticas constituem um grupo heterogêneo de condições caracterizadas pela quebra da tolerância imune, produção de auto anticorpos e substâncias responsáveis por lesões em vários órgãos, levando a um estado de inflamação crônica sistêmica (SPARKS; COSTENBADER, 2014). Estas doenças estão entre as mais antigas e comuns da humanidade e as estatísticas demonstram o aumento da população afetada por este tipo de enfermidade. Atualmente cerca de 10% da população sofre de algum tipo de doença reumática ao longo de sua vida (SENNA et al., 2004). No grupo de doenças reumáticas estão incluídas Esclerose Sistêmica, Síndrome de Sjögren, **Artrite Reumatoide e o Lúpus Eritematoso Sistêmico** (ABRÃO et al., 2016)

#### **1.3.1 Artrite Reumatoide**

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença inflamatória sistêmica, crônica e progressiva, que acomete a membrana sinovial das articulações menores e pode levar à destruição óssea e cartilaginosa, causando dor, inchaço, deformidades e perda de função (PICERNO et al., 2015). A AR também pode apresentar manifestações em diferentes órgãos e sistemas do organismo que são conhecidas como manifestações extra articulares. Essas manifestações extra articulares (nódulos reumatóides, vasculite, derrame pleural, pericardite, entre outras) correlacionam-se com pior prognóstico (DA MOTA et al., 2011; SAÚDE, 2014). Estima-se que aproximadamente 50% dos indivíduos com AR ficam impossibilitados de trabalhar após 10 anos do início da doença, o que representa significativo impacto econômico e social. Além disso, pacientes com AR têm sua expectativa de vida significativamente diminuída em comparação com a população em geral (GOELDNER; SKARE; REASON, 2011; SAÚDE, 2014).

No Brasil, os estudos de prevalência de AR em adultos demonstram uma variação entre 0,2%-1%, o que corresponderia a 1.300.000 indivíduos afetados, predominantemente mulheres entre a quarta e sexta décadas de vida (SENNA et al., 2004).

O diagnóstico de AR é estabelecido com base em achados clínicos e exames complementares (DA MOTA et al., 2011; GOELDNER; SKARE; REASON, 2011). Dentre os achados clínicos destaca-se o edema e a rigidez articular. Dentre os exames complementares a dosagem de vários auto anticorpos é amplamente utilizada (DA MOTA et al., 2011), como o fator reumatoide (FR), direcionado contra a região Fc da imunoglobulina G (IgG) (DA MOTA et al., 2011).

Atualmente utilizam-se os critérios de diagnóstico propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia, sendo necessária a presença de pelo menos 4 critérios por no mínimo 6 semanas (ARNETT et al., 1988):

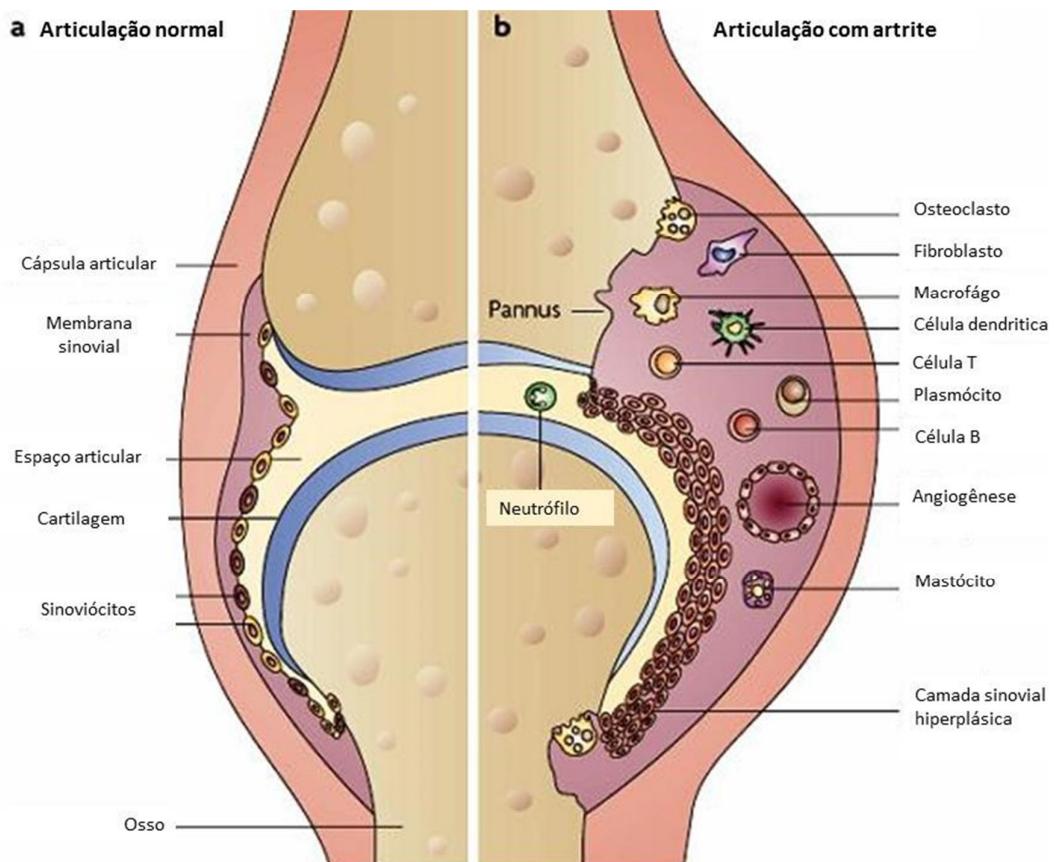
1. Rigidez articular matinal com pelo menos 1 hora de duração;
2. Artrite em pelo menos três sítios articulares;
3. Artrite de articulações das mãos: punhos, Inter falangeanas proximais (articulação do meio dos dedos) e metacarpo falangeanas (entre os dedos e mão);
4. Artrite simétrica (por exemplo no punho esquerdo e no direito);
5. Presença de nódulos reumatóides;
6. Presença de Fator Reumatoide no sangue,
7. Alterações radiográficas: erosões articulares ou descalcificações localizadas em radiografias de mãos e punhos.

Além do diagnóstico inicial é importante monitorar a atividade da doença para avaliar a sua progressão e resposta ao tratamento. Diferentes parâmetros da atividade da AR foram propostos, como o Escore de Atividade da Doença (DAS-28), a velocidade de hemossedimentação (VHS), os níveis de proteína C-reativa (PrCR), a contagem de articulações dolorosas ou edemaciadas, e os níveis de auto anticorpos anti-proteínas citrulinadas (Anti-CCP) (ANDERSON et al., 2012).

O tratamento medicamentoso da AR inclui o uso de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), glicocorticoides, medicamentos modificadores do curso da doença (em inglês, *Disease*

*Modifying Antirheumatic Drugs, DMARDs) - sintéticos e biológicos - e imunossupressores (DA MOTA et al., 2012).*

O ponto de partida da doença é a inflamação da membrana sinovial, uma estrutura que reveste a parede interna da cápsula fibrosa que envolve a articulação e cuja função é produzir o líquido sinovial, que nutre a cartilagem e lubrifica a sua superfície, permitindo o movimento normal da articulação (KOCH, 2007). Nesta fase, há significativa ativação da resposta imune inata, com estimulação de sinoviócitos e recrutamento de células apresentadoras de antígeno (Células dendriticas e macrófagos) (GOELDNER; SKARE; REASON, 2011). Essas células ativam células da resposta imune adaptativa (Linfócitos T e B) resultando na secreção de citocinas (principalmente TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17 e Ligante do receptor ativador de NF- $\kappa$ B (RANKL)) e MMPs, responsáveis pela destruição da cartilagem e reabsorção óssea articular. Formam-se projeções de tecido inflamatório proliferativo, que penetram na cavidade articular formando o *pannus*, característico da AR (KOCH, 2007) (**Figura 5**).



**FIGURA 5 – Representação esquemática da patogênese da Artrite Reumatoide.** Fonte: Adaptado de SCOTT et al., 2010.

A etiologia da AR, assim como de outras doenças reumáticas, ainda não é totalmente conhecida. A observação do aumento da incidência de AR entre familiares, principalmente entre gêmeos monozigóticos, sugere um componente genético em sua etiopatogênese (GOELDNER; SKARE; REASON, 2011; KOCH, 2007; MACGREGOR et al., 2000). Foram identificadas alterações no gene do antígeno leucocitário humano (*Human Leukocyte Antigen - HLA*), considerado o principal fator genético no desenvolvimento dessa doença (MACGREGOR et al., 2000). Além disso, mutações em genes promotores de citocinas, e moléculas de sinalização de células T contribuem para a susceptibilidade à AR (PICERNO et al., 2015; SAAD et al., 2016). Estes achados evidenciam que fatores de regulação imune são cruciais para o desenvolvimento da doença. No entanto, variações fenotípicas e de incidência apontam para participação de fatores ambientais no surgimento da AR (GOELDNER; SKARE; REASON, 2011).

Diversas hipóteses tentam explicar a ligação dos fatores ambientais na sequência de eventos observados na AR. A mais aceita sugere que a ativação repetida da imunidade inata, especialmente em superfícies mucosas, pode levar às modificações pós-traducionais induzidas por

agentes ambientais, tornando as moléculas próprias imunogênicas (BRUSCA; ABRAMSON; SCHER, 2014). A citrulinização de proteínas pode ser a chave para o entendimento dessas vias (LUNDBERG et al., 2010). Em tecidos estressados por feridas ou infecções, a atividade da peptil arginina desaminase (PAD) é induzida. Ao converter resíduos de arginina em citrulina a PAD desestabiliza as proteínas, tornando-as mais suscetíveis a degradação. Esta enzima também introduz novos epítópos de células B e T nas proteínas dos tecidos, o que pode resultar em autoimunidade (BRUSCA; ABRAMSON; SCHER, 2014; LUNDBERG et al., 2010). Dentre os fatores ambientais potencialmente envolvidos na etiologia da AR, o tabagismo e agentes infecciosos figuram como os mais promissores (SZODORAY et al., 2010). O cigarro acelera as reações de citrulinização em proteínas pulmonares (RUIZ-ESQUIDE; SANMARTÍ, 2012). Em consequência da exposição prolongada ao cigarro, ou a outros estímulos ambientais como agentes infecciosos, a resposta do sistema imunológico adaptativo aos peptídeos citrulinados pode preceder em anos o aparecimento dos sintomas clínicos da AR (GOELDNER; SKARE; REASON, 2011; SPARKS; COSTENBADER, 2014; SZODORAY et al., 2010).

### **1.3.2 Associação entre Artrite Reumatoide e Infecções orais**

A ideia de uma associação entre infecções orais e artrite data do ano de 400 A.C. Hipócrates, considerado o pai da medicina moderna, relatou a cura de um caso de artrite pela extração de um dente infectado (KUMAR, 2016). Diversos estudos clínicos, observacionais, longitudinais e de intervenção terapêutica, além de modelos animais e sistemas *in vitro* evidenciam a associação entre infecção/inflamação periodontal e AR (CORRÊA et al., 2016; DE AQUINO et al., 2014; MIRANDA et al., 2003; ORTIZ et al., 2009; PISCHON et al., 2008; QUEIROZ-JUNIOR et al., 2011; SCHER et al., 2012a).

Mas o que veio primeiro? A velha dúvida entre o ovo e a galinha. Teorias apontam que em indivíduos geneticamente susceptíveis, a resposta imune gerada contra proteínas citrulinadas pode ser um gatilho para o desenvolvimento da AR e também para manutenção da inflamação sistêmica após a deflagração da AR (DEMMER et al., 2011; OGRENDAK, 2013; SCHER; BRETZ; ABRAMSON, 2014). Como o papel de proteínas citrulinadas parece ser crucial na autoimunidade da AR tem sido sugerido que a bactéria *P. gingivalis*, que expressa PAD, sendo então capaz de citrulinar proteínas, pode estar envolvida na etiologia da AR (MARESZ et al., 2013). Corroborando essa teoria, anticorpos contra bactérias orais e o DNA dessas bactérias tem sido detectados no líquido sinovial de pacientes com AR (MOEN et al., 2006; OGRENDAK et al., 2005; REICHERT et al., 2013).

Em contrapartida estudos demonstram o efeito da AR na periodontite (GOLUB et al., 2006). Modelos animais demonstram que a indução da AR é capaz de levar a perda óssea alveolar (QUEIROZ-JUNIOR et al., 2011) pela alteração da microbiota oral (CORRÊA et al., 2016). Teorias também apontam que o tecido periodontal poderia ser apenas mais um alvo da AR, como as articulações, pelo fato da fisiopatogenia das duas doenças ser semelhante (destruição de tecido conjuntivo e reabsorção óssea inflamatória) (GREENWALD; KIRKWOOD, 1999). Esses achados corroboram a observação clínica de que pacientes com AR apresentam maior prevalência e gravidade das doenças periodontais e maior número de perdas dentais comparados à indivíduos saudáveis da mesma faixa etária e submetidos a fatores de risco semelhantes (DEMMER et al., 2011; FUGGLE et al., 2016; PISCHON et al., 2008; SMIT et al., 2012). Além disso, há uma associação positiva entre piores índices periodontais e índices de atividade da AR. De forma consistente, o tratamento da periodontite resulta em melhora nos índices da AR (BIYIKOGLU et al., 2013; OKADA et al., 2013; SILVESTRE et al., 2016), e maior eficácia da terapia medicamentosa com drogas anti-TNF (ORTIZ et al., 2009).

Além da AR, outra doença reumática, o Lúpus Eritematoso Sistêmico, tem sido associada à inflamação periodontal (CALDERARO et al., 2016; FABBRI et al., 2014; KOBAYASHI et al., 2003; NOVO et al., 1999).

### **1.3.3 Lúpus Eritematoso Sistêmico**

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença crônica do tecido conjuntivo de etiologia multifatorial (REKVIG; VAN DER VLAG, 2014). O LES é considerado o protótipo das doenças inflamatórias autoimunes e se caracteriza pela produção de auto anticorpos e formação de imunocomplexos que mediam a destruição tecidual que pode ocorrer em qualquer órgão ou sistema (REKVIG; VAN DER VLAG, 2014).

O LES pode afetar indivíduos de qualquer idade, raça e sexo, porém as mulheres são mais acometidas. Em estudos realizados com indivíduos brasileiros, a incidência de LES foi de 9 mulheres para cada homem e a faixa etária foi de 32-42 anos na data do diagnóstico do LES (SENNA et al., 2004; VILAR; SATO, 2002). No Brasil as estimativas indicam cerca de 65.000 pessoas afetadas por LES (NAKASHIMA et al., 2011; SENNA et al., 2004; VILAR; SATO, 2002).

O LES apresenta ampla gama de manifestações clínicas como fadiga, febre, mialgias, perda de peso e linfadenopatia. O envolvimento articular é a manifestação mais frequente, sendo

detectado em mais de 90% dos pacientes durante a evolução da doença (MOK; LAU, 2003; UVA et al., 2012). As lesões de pele são comuns, sendo que a maioria dos pacientes apresenta fotossensibilidade após exposição à radiação solar ou artificial (MOK; LAU, 2003). A clássica lesão em asa de borboleta, caracterizada por eritema malar e no dorso do nariz, preservando o sulco nasolabial, é identificada em menos de 50% dos casos (UVA et al., 2012). Dentre as alterações laboratoriais mais encontradas nos portadores de LES são citados a linfopenia, o aumento da velocidade de hemossedimentação, a redução dos níveis de moléculas do complemento C3 e C4, presença de anticorpos antinucleossomas e anti-DNA (NAKASHIMA et al., 2011; KOSKENMIES et al., 2008).

O LES é também caracterizado por alterações do sistema imune que envolvem células B hiper-reactivas e células T defeituosas (YIN et al., 2015), resultando em ativação policlonal de células B, produção de auto-anticorpos e formação de complexos imunes (MOK; LAU, 2003). É possível que uma deficiência na fagocitose de células apoptóticas e de seus componentes, considerados potenciais auto antígenos, resulte em um aumento da disponibilidade de auto antígenos e consequente produção de auto anticorpos. Esses anticorpos são dirigidos contra componentes intranucleares, citoplasmáticos e da superfície celular, e também contra moléculas solúveis como IgG e fatores de coagulação (MOK; LAU, 2003). Os anticorpos antinucleares (antiDNA, Sm, RNP, Ro, La, nucleossomos e outros) são os mais comumente presentes, em cerca de 95% dos pacientes. Anticorpos anti-DNA dupla fita (ds-DNA) e anti- ribonucleoproteína Sm são exclusivos de pacientes com LES (MOK; LAU, 2003).

Além de atuarem na produção de auto anticorpos, os linfócitos B são reconhecidos como as principais células apresentadoras de antígeno no LES, sendo então responsáveis pela ativação e expansão dos linfócitos T que produzem citocinas (ex. IL-4, IL-6, IL-10). Além disso, recrutam outras células inflamatórias para os sítios doentes e também atuam diretamente na destruição tecidual. Dessa forma, ocorre ativação do sistema imune inato, liberação de IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e consequentemente aumento da sobrevivência de células B autor reativas. Em resposta há recrutamento e ativação de outras células e vias inflamatórias, como as células dendríticas, os macrófagos e as células *Natural Killer*, além de ativação da cascata do complemento, levando à hipocomplementemia e deposição de componentes do complemento em sítios de destruição tecidual (MARTENS et al., 2009; REKVIG; VAN DER VLAG, 2014).

O diagnóstico do LES deve ser baseado no conjunto de alterações clínicas e laboratoriais. Visto que os sinais e sintomas do LES variam, o que dificulta o diagnóstico, o *American College*

*of Rheumatology* determinou que para se estabelecer o diagnóstico de LES é necessário que sejam identificados quatro ou mais dos onze critérios listados na Tabela 1 (HOCHBERG, 1997).

**TABELA 1 - Critérios para o diagnóstico do Lúpus Eritematoso Sistêmico – Critérios revisados em 1997**

- 1- **Rash malar** – Eritema fixo, plano ou elevado, em eminências malares, poupando o sulco nasolabial
- 2- **Rash discoide** – Placas eritematosas elevadas com áreas de ceratose e descamativas e perdas foliculares. Cicatrização atrófica em lesões antigas.
- 3- **Fotossensibilidade** – Rash cutâneo como resultado de exposição solar, informado pelo paciente ou observado pelo médico
- 4- **Úlceras orais** – Ulceração oral ou nasofaríngea indolor, observada pelo médico
- 5- **Artrite** – artrite não erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas caracterizadas por dor, edema ou derrame articular
- 6- Serosite**
  - a) **Pleurite** – história de dor pleurítica ou atrito pleural ouvido por médico ou evidência de derrame pleural OU
  - b) **Pericardite** – documentada por eletrocardiografia ou atrito pericárdico ou evidência de derrame pericárdico
- 7- Alterações renais**
  - a) Proteinúria persistente superior a 0,5 g/24 h ou 3+ em urina rotina
  - b) Cilindros celulares – eritrocitários, hemogolinúricos, granulosos, tubulares ou mistos
- 8- Alterações neurológicas**
  - a) Convulsões – na ausência de drogas ou alterações metabólicas que causem convulsões
  - b) Psicose – na ausência de drogas ou alterações metabólicas que causem psicose
- 9- Alterações hematológicas**
  - a) Anemia hemolítica – com reticulocitose OU
  - b) Leucopenia – inferior a  $4000/\text{mm}^3$  em duas ou mais ocasiões OU
  - c) Linfopenia – inferior a  $1500/\text{mm}^3$  em duas ou mais ocasiões OU
  - d) Plaquetopenia – inferior a  $100.000/\text{mm}^3$  na ausência de drogas que causem plaquetopenia
- 10- Alterações imunológicas**
  - a) Anti-DNA – anticorpos anti-DNA nativo em títulos anormais OU
  - b) Anti-Sm – presença de anticorpos anti-Sm OU
  - c) Presença de anticorpos antifosfolípides
- 11- Anticorpos antinucleares** – títulos anormais de anticorpos antinucleares pela imunofluorescência ou teste equivalente em qualquer tempo, na ausência do uso de drogas associadas à síndrome do lúpus induzidos por drogas

---

Fonte: HOCHBERG, 1997.

A principal forma de controle das manifestações do LES é a utilização de medicamentos imunossupressores, como os corticoides, os antimarialários (difosfato de cloroquina ou

hidroxicloroquina), e mais recentemente, os imunobiológicos, com objetivo de atenuar a resposta imune e prevenir complicações (REKVIG; VAN DER VLAG, 2014). Entretanto, o uso frequente destes medicamentos pode resultar em diversos efeitos colaterais, entre eles o risco aumentado a infecções (SEYMOUR, 2006).

Devido às múltiplas complicações relacionadas à doença, o risco de mortalidade entre pacientes com LES é quatro vezes maior que a população em geral (REKVIG; VAN DER VLAG, 2014). Este risco está relacionado à maior ocorrência de infecções graves decorrentes da imunossupressão e à atividade inflamatória da doença, especialmente quando há acometimento renal, do sistema nervoso central (SNC), e doença cardiovascular, sendo essa última a principal causa de mortes entre os pacientes com LES (BECKER-MEROK; NOSSENT, 2006; ZONANANACACH et al., 2000). A avaliação da atividade de doença do LES é então fundamental para determinar a gravidade da doença e orientar a escolha da terapêutica a ser adotada. Índices de atividade foram criados para tentar padronizar a avaliação da atividade do LES e vêm sendo cada vez mais usados na prática clínica. Dentre eles destaca-se o *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* 2000 (SLEDAI-2k). O SLEDAI-2k se baseia na avaliação de aspectos clínicos e laboratoriais apresentados pelo paciente (GLADMAN; IBÁÑEZ; UROWITZ, 2002). Cada uma das manifestações clínicas possui um escore correspondente. Após as avaliações clínica e laboratorial, o SLEDAI-2k é determinado pela soma dos valores correspondentes a cada parâmetro. Um escore zero corresponde à inatividade do LES e um escore diferente de zero corresponde ao LES ativo, sendo a gravidade do quadro maior quanto maior for o SLEDAI-2k (Tabela 2).

**Tabela 2 – Parâmetros para determinação do SLEDAI-2k**

PESO	DESCRIÇÃO	DEFINIÇÃO
8	Convulsão	<b>Início recente.</b> Excluído causas metabólicas, infecciosas ou por drogas
8	Psicose	<b>Habilidade alterada de realizar atividades normais devido à grave distúrbio na percepção da realidade.</b> Inclui alucinações, incoerência, perda significativa de associações, conteúdo inadequado do pensamento, pensamento ilógico, comportamento bizarro, desorganizado ou catatônico. Excluir uremia e drogas.
8	Síndrome cerebral orgânica	<b>Função mental alterada com prejuízo da orientação, memória ou outra função intelectual, com início e flutuações súbitas.</b> Inclui alteração do nível de consciência com diminuição da capacidade de concentração e incapacidade de sustentar atenção no meio-ambiente associado a 2 dos seguintes: distúrbios persecutórios, discurso incoerente, insônia ou sonolência diurna, atividade psicomotora aumentada ou diminuída. Excluir causas infecciosas, metabólicas ou drogas.
8	Distúrbio visual	<b>Alterações retinianas do LES.</b> Inclui corpos citoides, hemorragia retiniana, exsudato seroso ou hemorragia na coroide, neurite ótica. Excluir hipertensão, infecção e drogas.
8	Alteração de par craniano	<b>Início de neuropatia sensorial ou motora.</b>
8	Cefaleia lúpica	<b>Cefaleia intensa e persistente podendo ser tipo enxaqueca, mas tem que ser resistente ao uso de narcóticos.</b>
8	AVC	<b>AVC novo.</b> Excluir aterosclerose.
8	Vasculite	<b>Ulceração, gangrena, nódulos em dedos, infartos periungueais, hemorragias pontuais, biópsia ou arteriografia comprovando vasculite.</b>
4	Artrite	<b>Mais de 2 articulações com dor e flogose</b>
4	Miosite	<b>Fraqueza/dor muscular proximal associado a aumento de CK-Taldolase ou ENMG ou biópsia muscular.</b>
4	Cilindrúria	<b>Granular hemático ou celular de hemácias</b>
4	Hematúria	<b>&gt; 5 hemácias/cp. Excluir infecção, nefrolitíase ou outra causa.</b>
4	Piúria	<b>&gt; 5 leucócitos/cp. Excluir infecção.</b>
4	Proteinúria	<b>&gt;0,5 mg/24hs (independente de início recente ou recorrência)</b>
2	Nova erupção cutânea	<b>Erupção cutânea nova ou recorrente com sinais de inflamação.</b>
2	Alopécia	<b>Início recente ou recorrência de queda de cabelo anormal difusa ou localizada.</b>
2	Úlcera mucosa	<b>Início recente ou recorrência de úlceras orais ou nasais.</b>
2	Pleurite	<b>Dor torácica pleurítica com atrito ou derrame pleural ou espessamento pleural.</b>
2	Pericardite	<b>Dor pericárdica com mais um dos seguintes: derrame, atrito ou ECG, ou ECO.</b>
2	Baixo complemento	<b>Diminuição de CH50, C3, C4 abaixo do limite normal do laboratório.</b>
2	Aumento de anti-DNA	<b>&gt;25% do título de anti-DNA ou valor acima do normal para referência do laboratório</b>
1	Febre	<b>&gt;38°C. Excluir infecção.</b>
1	Trombocitopenia	<b>&lt; 100.000 plaquetas/mm<sup>3</sup></b>
1	Leucopenia	<b>&lt; 3.000 leucócitos/ mm<sup>3</sup>. Excluir drogas.</b>

Fonte: Adaptado de GLADMAN; IBAÑEZ; UROWITZ, 2002.

Para avaliação do dano associado ao LES é utilizado o *Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index for Systemic Lupus Erythematosus* (SLICC/ACR) (GLADMAN et al., 1996). Considera-se que houve dano associado ao LES ou ao seu tratamento quando a característica que compõe o SLICC/ACR está presente por pelo menos seis meses (Tabela 3).

**Tabela 3 – Parâmetros para elaboração do SLICC/ACR.**

<b>Ocular (qualquer olho, avaliação clínica)</b>	1
Catarata	1
Alteração retiniana ou atrofia do nervo óptico	
<b>Neuropsiquiátrico</b>	
Déficit cognitivo (ex. alteração de memória, dificuldade de calcular, concentração prejudicada, dificuldades de linguagem falada ou escrita, alteração da performance) ou psicose maior	1
Convulsão com terapia por seis meses	1
Acidente vascular cerebral (pontue 2 se > 1)	1 (2)
Neuropatia periférica ou craniana (excluir óptica)	1
Mielite transversa	1
<b>Renal</b>	
Taxa de filtração glomerular (estimada ou medida) < 50%	1
Proteinúria ≥ 3,5 g/ 24 h	1
<b>OU</b>	
Doença renal terminal (em hemodiálise ou com transplante renal)	3
<b>Pulmonar</b>	
Hipertensão pulmonar (Hiperfonese de B2 ou proeminência de ventrículo direito)	1
1	
Fibrose pulmonar (física ou radiográfica)	1
Pulmão encolhido (radiografia)	1
Fibrose pleural (radiografia)	1
Infarto pulmonar (radiografia)	
<b>Cardiovascular</b>	
Angina ou revascularização coronária	1
Infarto do miocárdio (pontue 2 se > 1)	1 (2)
Cardiomiopatia (disfunção ventricular)	1
Doença valvular (sopro diastólico ou sopro sistólico > 3/6)	1
Pericardite por 6 meses ou pericardectomia	1
<b>Vascular periférico</b>	
Claudicação por 6 meses	1
Perda tecidual mínima (polpa digital)	1
Perda tecidual significativa (perda de dedos ou membros). (Pontue 2 se > 1 local)	1 (2)
Trombose venosa com edema, ulceração ou estase	1
<b>Gastrointestinal</b>	
Infarto ou ressecção intestinal abaixo do duodeno, baço, fígado ou vesícula biliar por qualquer causa (pontue 2 se > 1 local)	1 (2)
Insuficiência mesentérica	1
Peritonite crônica	1
Estreitamento ou cirurgia no trato gastrintestinal superior	1
<b>Musculoesquelético</b>	
Atrofia ou fraqueza	1
Artrite erosiva ou deformante (incluir deformidades redutíveis; excluir necrose avascular)	1
Osteoporose com fraturas ou colapsos vertebrais (excluir necrose avascular)	1
Necrose avascular (pontue 2 se > 1 local)	1 (2)
Osteomielite	1
<b>Pele</b>	
Alopécia crônica cicatricial	1
Escarificação (ulceração) extensa ou paniculite em local diferente da polpa digital e do couro cabeludo	1
Ulceração cutânea (excluir trombose) por mais de 6 meses	1
<b>Falência gonadal prematura</b>	
<b>Diabetes (independente do tratamento)</b>	1
<b>Malignidade (excluir displasia) (pontue 2 se &gt; 1 local)</b>	1 (2)

Fonte: Adaptado de GLADMAN et al., 1996.

Os fatores que desencadeiam o LES ainda não foram elucidados, mas admite-se que vários fatores genéticos, hormonais e ambientais podem contribuir para o seu início. As evidências de uma susceptibilidade genética associada ao desenvolvimento do LES são baseadas na ocorrência da doença em gêmeos monozigóticos quando comparados aos gêmeos dizigóticos e a alta frequência da doença em parentes de primeiro grau (MOK; LAU, 2003). As alterações genéticas mais comuns associadas ao LES são as encontradas nos genes do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), sendo os polimorfismos associados ao gene responsável pela expressão do HLA um dos mais estudados (MOK; LAU, 2003).

Entre os fatores ambientais, um número crescente de evidências sugere uma relação do microbioma com a patogênese do LES (HARLEY; JAMES, 2006; HEVIA et al., 2014; VIEIRA; PAGOVICH; KRIEGEL, 2014). Infecções virais, como o Epstein-Barr, foram descritas como possíveis gatilhos para o LES (HARLEY; JAMES, 2006), enquanto outros estudos observaram diferenças na composição microbiana intestinal associada ao LES (HEVIA et al., 2014). Além disto, componentes bacterianos, como o LPS, foram capazes de iniciar e perpetuar o LES via ativação de receptores TLR através de maior produção de CXCL13, IL-10 e IFN- $\gamma$ , levando ao acúmulo exacerbado de células B em modelos animais (LIU et al., 2014).

### **1.3.4 Associação entre o LES e Infecções Orais**

Relatos de casos sugerindo associações clínicas e terapêuticas entre o LES e a periodontite vem sendo publicados desde a década de 80 (VOGEL, RICHARD, 1981). Alguns estudos avaliaram a prevalência e gravidade da periodontite em pacientes com LES em relação a voluntários saudáveis e os resultados obtidos são conflitantes. Alguns estudos demonstraram que não há diferença nos parâmetros periodontais (AL-MUTAIRI et al., 2015; MEYER et al., 2000), ou que a periodontite é menos grave nos pacientes com LES (MARQUES et al., 2016; MUTLU et al., 1993). Diversos estudos encontraram piores condições periodontais nos pacientes com LES (FERNANDES et al., 2007; KOBAYASHI et al., 2003; NAGLER et al., 1999; NOVO et al., 1999; RHODUS; JOHNSON, 1990). Além disso, verificou-se que a periodontite nos pacientes com LES esteve relacionada com aumento dos níveis de auto anticorpos (NOVO et al., 1999;

WANG et al., 2015) e que o tratamento da periodontite resultou em melhora nos índices do LES (FABBRI et al., 2014).

Nos estudos que relatam a maior gravidade de doenças periodontais nos pacientes com LES, as explicações apresentadas pelos autores para essa associação incluem a presença de xerostomia, o comprometimento vascular regional, a combinação de imuno-desregulação complexa, com desequilíbrio de produção de citocinas, e ainda a terapia com esteroides empregada, que pode predispor o paciente a um desequilíbrio hospedeiro-microrganismo que favorece a ocorrência de infecções (CALDERARO et al., 2016; FERNANDES et al., 2007; NAGLER et al., 1999; NOVO et al., 1999; RHODUS; JOHNSON, 1990). Há ainda dois estudos que atribuem a alta ocorrência de periodontite no LES a fatores genéticos comuns que contribuem tanto para a patogênese da periodontite quanto para o LES (KOBAYASHI et al., 2003, 2007).

Para os estudos que relatam menor gravidade da periodontite, os autores sugeriram que a possível existência de uma microbiota de menor patogenicidade ou os efeitos de administração de longa duração de AINEs ou de imunossupressores possam ser responsáveis pela menor destruição periodontal encontrada nesses pacientes. Entretanto, como foi relatado em uma revisão recente da associação entre periodontite e LES, a maioria dos estudos não controlou o viés de recrutamento do grupo controle, constituído primariamente por pacientes encaminhados para tratamento odontológico especializado e provavelmente com periodontite instalada e potencialmente mais grave (CALDERARO et al., 2016).

Mais recentemente, um estudo de 2015, descreveu a correlação positiva entre perda de inserção periodontal e os níveis de auto anticorpos ligados a maior predisposição para trombose. Além disso, a presença dos patógenos periodontais *Treponema denticola* e *Porphyromonas gingivalis* também foi associada aos maiores níveis séricos desses auto anticorpos (WANG et al., 2015). Nesse mesmo estudo, através de regressão logística, os autores verificaram que o risco de pacientes com periodontite desenvolverem LES foi significativamente maior comparados aos indivíduos sem periodontite.

Em síntese, grande parte dos estudos demonstram que a presença de LES pode ser um risco para o desenvolvimento da periodontite. Além disso, a doença periodontal pode não apenas exacerbar os sintomas do LES, mas também aumentar o risco de complicações como a ocorrência de trombose, nesses pacientes. Em vista desses dados a hipótese do estudo é que as doenças reumáticas induzem um status inflamatório sistêmico capaz de modificar a microbiota oral. A disbiose da microbiota subgengival gera repercussões negativas nos tecidos periodontais. O entendimento da associação entre doenças reumáticas e periodontite é de grande importância para o tratamento desses pacientes e contribuirá para melhora do prognóstico e qualidade de vida dos indivíduos portadores dessas doenças. Neste sentido, a identificação de fatores e mecanismos que potencialmente interferem e/ou explicam esta associação são úteis para monitoramento clínico

destes pacientes. Como o microbioma tem um efeito importante no sistema imune, a identificação de alterações no microbioma subgengival pode ser útil para esclarecer quais mecanismos atuam na relação entre autoimunidade e doenças periodontais.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Caracterizar a composição do microbioma subgengival de pacientes portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e pacientes com Artrite Reumatoide (AR) em condições de doença e saúde periodontal.

### 2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a ocorrência e gravidade da periodontite crônica em pacientes com LES e pacientes com AR;
- Avaliar a expressão de citocinas inflamatórias (IL-2, IL-6, IL-17, IL-33, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) na saliva de pacientes com LES e pacientes com AR comparados com controles;
- Verificar possíveis correlações entre os parâmetros periodontais e os parâmetros clínicos do LES e da AR;
- Verificar possíveis correlações entre o microbioma subgengival e os parâmetros clínicos do LES e da AR.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 AMOSTRA**

O presente trabalho apresenta um delineamento de estudo do tipo transversal paralelo. Os pacientes deste estudo foram recrutados no Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFMG. Foram inicialmente avaliados 336 pacientes com LES (presença de pelo menos quatro critérios de classificação ACR revisados em 1997) e 52 foram incluídos após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão.

Para o grupo AR foram inicialmente avaliados 230 pacientes com AR (pelo menos quatro critérios da classificação do Colégio Americano de Reumatologia de 1987 ou seis pontos nos critérios ACR/EULAR 2011) em acompanhamento no Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas. Após análise dos critérios de inclusão e exclusão 43 pacientes foram incluídos no estudo.

O grupo controle foi diferente para a comparação entre LES e AR devido a diferenças nas idades dos respectivos grupos de pacientes. Dessa forma o grupo controle para o estudo com pacientes LES foi formado por 52 voluntários enquanto o grupo controle para o estudo com pacientes AR teve um total de 47 pacientes. Todos sem diagnóstico de doença reumática, com idade superior a 18 anos e que concordaram em participar do estudo (leram e entenderam o termo de consentimento livre e esclarecido e deram seu consentimento por escrito na participação do estudo). Os voluntários do grupo controle foram recrutados entre os trabalhadores do Hospital das Clínicas da UFMG, pacientes do serviço de odontologia da prefeitura Municipal de Mateus Leme e também entre os acompanhantes dos pacientes com LES ou AR.

De acordo com um estudo anterior (ROSA et al., 2012) o grupo amostral incluído no presente trabalho é suficiente para obter um poder estatístico de cerca de 90%. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFMG, protocolo CAAE: 03128012.0.0000.5149/2012.

##### **3.1.1 Critérios de inclusão**

- Idade igual ou superior a 18 anos
- Entender o estudo e concordar em participar dele (ler e entender o termo de consentimento livre e esclarecido e dar seu consentimento por escrito na participação do estudo)
- Apresentar pelo menos oito dentes naturais

### **3.1.2 Critérios de exclusão**

- Pacientes gestantes ou lactantes.
- Realização de tratamento odontológico nos últimos seis meses.
- Uso de antibióticos por até 3 meses antes da avaliação periodontal.
- Uso de aparelho ortodôntico.
- Tratamento de neoplasia maligna nos últimos 5 anos.
- Presença de outras co-morbididades como diabetes.

### **3.2 AVALIAÇÃO MÉDICA**

Os pacientes responderam a um questionário sobre escolaridade, situação socioeconômica, hábitos (higiene oral, tabagismo e etilismo), sintomas atuais e medicações em uso. Para o grupo LES foi realizada revisão de prontuário para obtenção de dados quanto aos critérios diagnósticos e tratamentos prévios do LES e positividade para os anticorpos que são realizados rotineiramente nesses pacientes, antifosfolípides e auto anticorpos relacionados ao LES: anti-dsDNA (anti DNA dupla fita), anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro e anti-La. Os pacientes foram avaliados pelo mesmo examinador quanto aos sinais clínicos e laboratoriais e sintomas de atividade do LES. Foram aplicados os questionários SLEDAI – 2K, BILAG 2004, SLICC e *Lupus Check list* (SATO et al., 1991; FREIRE, 2008).

Os seguintes exames laboratoriais foram realizados de acordo com as técnicas padronizadas no Laboratório Central do Hospital das Clínicas-UFGM: hemograma completo, velocidade de hemossedimentação, proteína C reativa quantitativa, glicose em jejum, creatinina, bem como os níveis de complemento sérico (C3, C4) e o sedimento urinário. Os anticorpos antidsDNA foram pesquisados pela técnica de imunofluorescência indireta usando *Crithidia luciliae* como substrato.

Para os pacientes com AR foi realizada a revisão de prontuário para obtenção de dados quanto aos critérios diagnósticos e tratamentos prévios da AR, positividade para o fator reumatoide e o anticorpo anti-CCP e alterações radiológicas em mãos e punhos associadas à AR. Os pacientes foram avaliados pelo mesmo examinador quanto aos sinais clínicos e laboratoriais e sintomas de atividade da AR. Foram aplicados os índices de atividade DAS-28 e CDAI (MOTA et al., 2011). Foram anotados resultados de exames de atividade inflamatória, hematológicos e bioquímicos que fazem parte do controle usual da AR.

Os indivíduos voluntários que constituíram o grupo controle foram avaliados quanto à elegibilidade para o estudo e responderam a um questionário para investigação de comorbidades e medicações em uso.

### **3.3 AVALIAÇÃO ODONTOLÓGICA**

**3.3.1 Exame Periodontal:** Na avaliação periodontal dos pacientes foram avaliados Índice de placa (a), Profundidade de sondagem (b), Nível de inserção clínica (c) e Sangramento gengival à sondagem (d). Para todas as avaliações foi utilizada a sonda periodontal Hu-Friedy® – modelo PCP15, Universidade Carolina do Norte.

#### **a) Índice de placa**

O nível de higiene bucal foi avaliado por meio do índice de placa (IP) descrito por Silness e Löe (1964). A mensuração do estado de higiene bucal definida por Silness e Löe (1964) é baseada no registro de acúmulo de debris moles e mineralizados sobre as superfícies dos dentes 16, 12, 24, 36, 32 e 44. Os dentes perdidos não são substituídos por outros presentes. Para cada uma das quatro superfícies dos dentes (vestibular, lingual, mesial e distal) é atribuída uma pontuação 0-3. As pontuações das quatro áreas do dente são somadas e divididas por quatro, a fim de dar o índice de placa para cada dente. O índice de placa do paciente corresponde à soma dos índices de cada dente dividida pelo número de dentes. Os critérios para definição do *score* de cada superfície foram: 0 (zero) sem placa; 1- Presença de um filme de placa que adere à margem gengival livre e área adjacente do dente; 2 - Acúmulo moderado debris moles dentro do sulco gengival; 3- Abundância de matéria mole dentro do sulco gengival e/ou no dente e margem gengival.

#### **b) Profundidade de sondagem**

A profundidade de sondagem foi obtida mensurando-se a distância da margem gengival ao fundo do sulco gengival (**Figura 6**). A sondagem circunferencial foi realizada em todas as superfícies (distal, vestibular, mesial e lingual) dos dentes permanentes presentes, exceto terceiros molares.

### c) Nível de inserção clínica

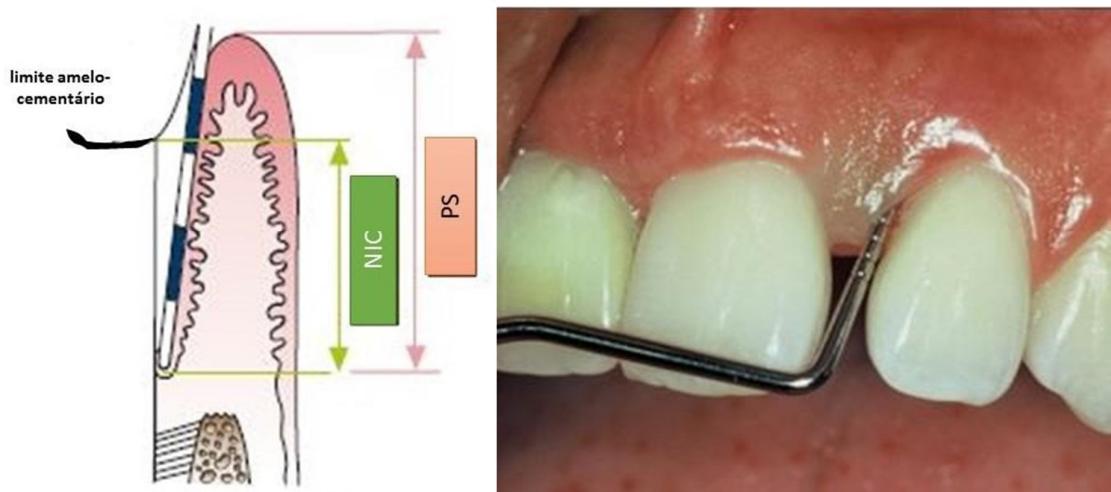
O nível de inserção clínica foi determinado pela distância entre o limite amelo-cementário e o fundo do sulco ou bolsa gengival. Foram registrados os valores de perda de inserção em todas as superfícies dos dentes incluídos no exame (distal, vestibular, mesial e lingual) (**Figura 6**).

Os pacientes foram classificados em Sem Periodontite e com Periodontite crônica. A presença de periodontite foi definida pela presença de 2 ou mais sítios interproximais com perda de inserção  $\geq 3\text{mm}$  e profundidade de sondagem  $\geq 4\text{mm}$  (não no mesmo dente) ou pelo menos um sítio com profundidade de sondagem  $\geq 5\text{mm}$  (EKE et al., 2012).

A avaliação do nível de concordância dos dois examinadores foi realizada através do cálculo do índice Kappa, baseado nos dados obtidos de profundidade de sondagem para todas as superfícies dentárias de quatro pacientes. O nível de concordância entre os dois examinadores foi aceitável (índice Kappa: 0,62)

### d) Sangramento gengival à sondagem

O teste de sangramento foi realizado durante o exame de sondagem, mediante a introdução cuidadosa da sonda no sulco gengival até o limite de sua base. A leitura do sangramento foi realizada 30 segundos após a sondagem. A ocorrência de sangramento após sondagem foi registrada em cada face de forma dicotômica, para sua presença ou ausência.



**FIGURA 6 – Representação da metodologia de sondagem periodontal.**

PS: Profundidade de sondagem. NIC: Nível de Inserção Clínica. Fonte: “Periodontal Epidemiology | Pocket Dentistry”, 2017.

**3.3.2 Coleta da saliva:** Para avaliação dos mediadores inflamatórios presentes na saliva os pacientes foram orientados a permanecerem 30 minutos sem alimentação ou ingestão de líquidos e mais 5 minutos sem realizar movimentos de mastigação, deglutição e fala antes da coleta. Foi coletada toda saliva formada na boca durante 5 minutos com paciente cuspindo em um tubo Falcon estéril. A saliva coletada foi então diluída na proporção 1:2 em uma solução de PBS (0,4 mM de NaCl e 10 mM de NaPO<sub>4</sub>) contendo inibidores de proteases (0,1 mM de Fluoreto de Fenil metil sulfonil, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de EDTA e 0,01 mg/mL de aprotinina A) e 0,05% de Tween-20. A solução foi então centrifugada por 5 minutos, com velocidade de 1500 rpm e o sobrenadante foi coletado, distribuído em alíquotas e congelado a -80°C até a realização dos ensaios.

**3.3.3 Coleta do biofilme:** Amostras do biofilme subgengival foram coletadas dos 5 sítios com maior valor de profundidade de sondagem com cones de papel absorvente estéril (# 30, Dentsply®) introduzido em cada sítio periodontal (**Figura 7**) e mantidos em posição por 60 segundos. Os cones foram colocados em um mesmo microtubo contendo 500 uL de água destilada, centrifugados e armazenados a -80°C.



**FIGURA 7 – Coleta do biofilme subgengival.**

Fonte: ACKERMANN, N. REICHENBACH, H. LORENZ, 2010.

### 3.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

**3.4.1 Extração do DNA e PCR:** O DNA gnômico total foi extraído das amostras de biofilme subgingival usando o Kit Quick-g DNA MicroPrep (Zymo Research, Irvine, CA, USA) com a adição de 50 µL (10 mg/ml) de lisozima por amostra para a máxima lise das paredes bacterianas. A concentração e a integridade da solução de DNA foram determinadas em um espectrofotômetro (Tecan, Männedorf, Switzerland).

Os primers 515F (5' -GTGCCAGCMGCCGCGTAA-3') e 806R (5' -GGACTACHVGGGTWTCTAAT- 3'), com adaptadores específicos para o sequenciamento na plataforma Illumina MiSeq e *barcodes* foram usados para amplificação por PCR da região V4 hiperváriável do gene ribossomal 16S (CAPORASO et al., 2012). A reação consistiu de um volume final de 25 µL (50 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,5 µL DNTPs 10 mM, 5 pmol/µL de cada primer, 1,25 U/µL de Platinum Taq DNA polimerase Hight Fidelity, tampão 10X). As condições para as reações da PCR de modo geral foram: ativação inicial a 94°C por 3 minutos, 28 ciclos com desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 57 °C por 1 minuto, extensão a 68°C por 45 segundos e 10 minutos de extensão final do fragmento a 68°C. Após a confirmação da amplificação dos produtos específicos por gel de agarose 1%, os produtos do PCR foram purificados pelo método de precipitação por etanol usando o kit comercial Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, CA, EUA). 30 ng de DNA de cada *amplicon* pós purificação foram enviados para sequenciamento na plataforma Illumina MiSeq no Centro de Sequenciamento da Universidade da Pensilvânia, PA, EUA (Next-Generation Sequencing Core of University of Pennsylvania). Todos os arquivos com o sequenciamento deste estudo estão disponíveis online no site do NCBI *Sequence Read Archive* (SRA) com o número de acesso PRJNA325500.

**3.4.2 Avaliação da carga bacteriana:** A quantificação da carga bacteriana total foi determinada por PCR de tempo real usando *primers* universais para o gene ribossomal 16S (F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG; R: ACGGCTACCTTGTACGACTT) (IDT, Coralville, Iowa, USA). Foram utilizados 2µl de DNA total das amostras de biofilme subgingival, amplificados por PCR em uma mistura com Fast SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) em um aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Para calcular a carga bacteriana total, uma curva padrão foi preparada usando DNA extraído de uma amostra de *Porphyromonas gingivalis*, com conhecido número de células bacterianas, amplificadas pelo mesmo protocolo de PCR em tempo real.

**3.4.3 Análise da composição microbiológica:** Para filtrar sequências de baixa qualidade, aquelas com score de qualidade  $\leq 25$  e tamanho da sequência  $< 200$  nucleotídeos eram descartadas. Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) foram definidas por agrupamento a 97% de similaridade e a taxonomia foi assinada em 80% de limiar de confiança utilizando como referência o banco de dados de microbioma oral CORE (GRIFFEN et al., 2011) no software QIIME (CAPORASO et al., 2010b) pelo método UCLUST. A média da diversidade alfa foi calculada primeiramente fazendo a rarefação múltipla (multiple\_rarefactions.py) começando com 1000 *reads* até 10.000 e posteriormente usando o script alpha\_diversity.py e collate\_alpha.py para determinar o número de espécies observadas assim como os índices Shannon e Chao1. A

diversidade inter-amostras (beta) foi calculada pelo método UNIFRAC e representada por gráficos de Análise de coordenadas principais (pcoa).

### **3.5 ANÁLISE DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS**

As concentrações de interleucina-2 (IL-2), IL-6, IL-17, fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) foram determinadas usando *Cytokine Bead Array Human Th1/Th2/Th17 Kit* (BD Biosciences, San Diego, CA) e análise em citômetro de fluxo BD FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company). A concentração de IL-33 foi medida pelo ensaio imuno-enzimático (ELISA) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções dos fabricantes. Os resultados foram expressos em picogramas de citocinas por mililitro ajustados de acordo com o fluxo salivar.

#### 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados clínicos, demográficos, níveis de citocinas, diversidade alfa e a carga bacteriana foram comparados utilizando o teste de Mann-Whitney (para dois grupos) ou Kruskal-Wallis (para três ou mais) seguido do pós-teste de Dunn. As correlações entre as abundâncias relativas de bactérias e os dados clínicos foram calculadas utilizando o coeficiente de Spearman. A comparação das abundâncias relativas de bactérias entre o grupo de pacientes e grupo controle foi realizada utilizando os testes DESeq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014) e LEFSE (SEGATA et al., 2011). Para a análise da diversidade beta foi realizado o teste estatístico PERMANOVA. Todos os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão da média. O nível de significância foi definido como  $p < 0.05$ . Os gráficos e teste estatísticos foram feitos com o auxílio dos programas GraphPad Prism 5, SPSS e R.

## 5. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em três partes, a primeira refere-se aos dados de microbioma subgengival dos pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico. Estes dados serão apresentados na forma de artigo científico publicado no periódico *Microbiome*. Na segunda parte serão apresentados dados de microbioma subgengival dos pacientes com Artrite Reumatoide. Estes dados também serão apresentados na forma de artigo científico em fase final de elaboração. Na terceira parte serão apresentados os dados comparativos do microbioma subgengival de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico e Artrite Reumatoide.

***PARTE I: SUBGINGIVAL MICROBIOTA DYSBIOSIS IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS: ASSOCIATION WITH PERIODONTAL STATUS.***

**SUBGINGIVAL MICROBIOTA DYSBIOSIS IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS:  
ASSOCIATION WITH PERIODONTAL STATUS**

Jôice Dias CORRÊA<sup>1</sup> - jo\_odonto@hotmail.com

Débora Cerqueira CALDERARO<sup>2</sup> - dccalderaro@gmail.com

Gilda Aparecida FERREIRA<sup>2</sup> - gildap@terra.com.br

Santuza Maria Souza MENDONÇA<sup>1</sup> - santuzam@yahoo.com.br

Gabriel R. FERNANDES<sup>3</sup> - fernandes.gabriel@gmail.com

E XIAO<sup>4</sup> - xiaoe1986@vip.163.com

Antônio Lúcio TEIXEIRA<sup>2</sup> - altexr@gmail.com

Eugene J. LEYS<sup>5</sup> - leys.1@osu.edu

Dana T. GRAVES<sup>4\*</sup> - dtgraves@dental.upenn.edu

Tarcília Aparecida SILVA<sup>1\*</sup> - silva.tarcilia@gmail.com

1. Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG, Brazil.
2. University Hospital, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG, Brazil.
3. Oswaldo Cruz Fundation, René Rachou Research Center, Belo Horizonte - MG, Brazil.
4. Penn Dental School, University of Pennsylvania, Philadelphia – PA, USA.
5. The Ohio State University, College of Dentistry, Columbus - OH, USA.

\* Senior authors contributed equally to this publication

Corresponding author: Tarcilia Aparecida Silva, Ph.D. Mailing address: Departamento de Patologia e Cirurgia Odontológica, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, CEP 31.270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Phone: 55 31 3409-2478 (voice); 55 31 3409-2430 (Fax). E-mail: silva.tarcilia@gmail.com

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Periodontitis results from the interaction between a subgingival biofilm and host immune response. Changes in biofilm composition are thought to disrupt homeostasis between the host and subgingival bacteria resulting in periodontal damage. Chronic systemic inflammatory disorders have been shown to affect the subgingival microbiota and clinical periodontal status. However, this relationship has not been examined in subjects with systemic lupus erythematosus (SLE). The objective of our study was to investigate the influence of SLE on the subgingival microbiota and its connection with periodontal disease and SLE activity.

**RESULTS:** We evaluated 52 patients with SLE compared to 52 subjects without SLE (control group). Subjects were classified as without periodontitis and with periodontitis. Oral microbiota composition was assessed by amplifying the V4 region of 16S rRNA gene from subgingival dental plaque DNA extracts. These amplicons were examined by Illumina MiSeq sequencing. SLE patients exhibited higher prevalence of periodontitis which occurred at a younger age compared to subjects of the control group. More severe forms of periodontitis were found in SLE subjects that had higher bacterial loads and decreased microbial diversity. Bacterial species frequently detected in periodontal disease were observed in higher proportions in SLE patients, even in periodontal healthy sites such as *Fretibacterium*, *Prevotella nigrescens*, and *Selenomonas*. Changes in the oral microbiota were linked to increased local inflammation, as demonstrated by higher concentrations of IL-6, IL-17 and IL-33 in SLE patients with periodontitis.

**CONCLUSIONS:** SLE is associated with differences in the composition of the microbiota, independently of periodontal status.

**Keywords:** Lupus; Periodontitis; Oral Microbiota; Cytokine; Subgingival dental plaque; Illumina sequencing.

## BACKGROUND

Periodontitis is a multifactorial infectious disease that affects tooth supporting tissues (ARMITAGE, 1999). In health there is an equilibrium between the subgingival biofilm and the host immune response. Periodontal bone loss is initiated when there is a disruption that causes the inflammatory response to move closer to bone inducing osteoclastogenesis and impaired osseous coupling (XIAO et al., 2015). Changes in bacterial composition or systemic inflammation are thought to disrupt the balance between host and oral microbiota leading to destruction of periodontal tissues (ANDRIANKAJA et al., 2012; HAJISHENGALLIS, 2015; KUMAR et al., 2006). Therefore, chronic inflammatory conditions such as diabetes, obesity, rheumatoid arthritis (RA) and systemic lupus erythematosus (SLE) are linked to an increased risk or severity of periodontal disease (CORRÊA et al., 2016; KOBAYASHI et al., 2007; LINDEN; HERZBERG, 2013; POLYZOS et al., 2010; SCHER; BRETZ; ABRAMSON, 2014; WU; XIAO; GRAVES, 2015). Furthermore, periodontitis might have an adverse effect by enhancing systemic inflammation and increasing the risk of myocardial infarction (OTOMO-CORGEL et al., 2012), preterm birth (POLYZOS et al., 2010), pneumonia (LINDEN; LYONS; SCANNAPIECO, 2013), stroke (GHIZONI et al., 2012), and rheumatoid arthritis (RIBEIRO et al., 2005) as well as worsen SLE severity (FABBRI et al., 2014).

SLE is an autoimmune disease characterized by the presence of aberrant antibody responses to nuclear and cytoplasmic antigens. It is a complex multifactorial disease in which genetic and environmental factors contribute to disease susceptibility (REKVIG; VAN DER VLAG, 2014). An environmental factor that modulates autoimmunity is the bidirectional crosstalk between the human host and microbiota, as reported for rheumatic diseases (PHILLIPS, 2015; PROAL; ALBERT; MARSHALL, 2013). However, few studies have addressed the relationship between SLE and the human microbiota (HEVIA et al., 2014; ZHANG et al., 2014) or the periodontal condition in SLE patients (AL-MUTAIRI et al., 2015; CALDERARO et al., 2016; DE

ARAÚJO NAVAS et al., 2012; FABBRI et al., 2014; KOBAYASHI et al., 2007; MUTLU et al., 1993; NOVO et al., 1999; WANG et al., 2015). Moreover, the results have been conflicting, due in part to small sample size.

The influence of SLE on the oral microbiota has not been reported. To address this issue we analyzed the subgingival microbiota in SLE patients and healthy subjects to draw potential links among systemic immune dysregulation, subgingival microbiota and periodontal disease. The results indicate that SLE alters the subgingival microbiota. This understanding might be useful in delineating strategies to treat these patients and suggests that these patients should be followed closely for periodontal disease based on their altered microbiota and enhanced susceptibility to develop periodontitis.

## RESULTS

### **Systemic Lupus Erythematosus results in higher prevalence and severity of periodontal disease**

Demographic and clinical characteristics of subjects included in the study are presented in Table 1. Sixty-seven percent of SLE patients had periodontitis, a significantly higher prevalence when compared to healthy controls (53%). The prevalence of chronic periodontitis in healthy Brazilians is consistent with previous reports (SILVA-BOGHOSSIAN; LUIZ; COLOMBO, 2009; SUSIN et al., 2004, 2005). An interesting finding was the presence of periodontitis at a younger age in SLE patients ( $40.5 \pm 10.1$  yrs.) compared to controls ( $46.3 \pm 13.2$ ,  $p < 0.05$ ). In addition, 29 SLE patients were younger than 35 years and from these, 52% already had periodontitis (data not shown). SLE subjects had increased probing depth and increased loss of clinical attachment indicating more severe periodontitis (Table 1). Periodontal probing depth was significantly correlated with most of the SLE parameters (duration of SLE  $\rho=0.32$ , accumulated dose of prednisone  $\rho=0.36$  and C reactive protein level  $\rho=0.30$ ,  $p < 0.05$ ). Moreover, loss of clinical attachment was correlated with duration of SLE ( $\rho=0.35$ ,  $p < 0.05$ ) and the SLICC/ACR damage index ( $\rho=0.32$ ,  $p < 0.05$ ).

All subjects exhibited similar oral hygiene habits (frequency of tooth brushing and dental flossing per day). No difference in smoking status between groups was found. When evaluating oral hygiene parameters control subjects with periodontitis had an increased plaque index compared to non-periodontitis subjects ( $p < 0.05$ ), but this association was not observed in SLE patients (Table 1). It is noteworthy that when 336 SLE patients were evaluated, 62 (24%) were excluded because they did not have at least 8 teeth. Although it is difficult to assess the exact cause of this early tooth loss, many patients reported that they lost their teeth because the teeth became “loose”, consistent with loss from periodontitis.

Table 1 – Demographic and clinical data of patients with SLE and healthy control subjects.

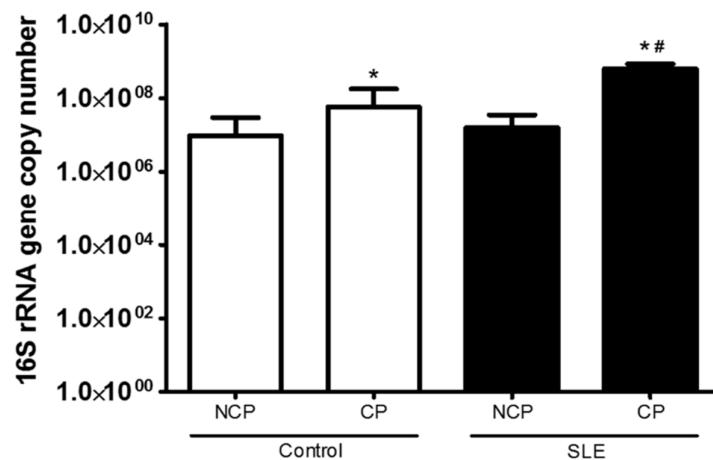
	Controls		SLE	
	Non-CP	CP	Non-CP	CP
<b>Subjects</b>	24 (46.2%)	28 (53.8%)	17 (32.7%)	<b>35 (67.3%)</b> *#
<b>Females (%)</b>	39	48	30	57
<b>Age (years)</b>	34.7 ( $\pm 15.9$ )	46.3 ( $\pm 13.2$ )*	31.2 ( $\pm 5.2$ )	<b>40.5 (<math>\pm 10.1</math>)*#</b>
<b>Smoking status (%)</b>	3.81	7.60	5.70	9.60
<b>SLE duration (years)</b>	-	-	8.6 ( $\pm 6.2$ )	12.5 ( $\pm 7.8$ )*
<b>SLEDAI</b>	-	-	4.5 ( $\pm 4.0$ )	5.5 ( $\pm 4.6$ )
<b>SLICC/ACR</b>	-	-	0.5 ( $\pm 1.0$ )	0.9 ( $\pm 0.9$ )
<b>Probing Depth (mm)</b>	1.65 ( $\pm 0.31$ )	2.72 ( $\pm 0.62$ )*	1.91 ( $\pm 0.62$ )	<b>3.37 (<math>\pm 0.49</math>)*#</b>
<b>Clinical attachment level (mm)</b>	2.60 ( $\pm 0.24$ )	3.62 ( $\pm 0.63$ )*	2.97 ( $\pm 0.63$ )	<b>4.00 (<math>\pm 0.63</math>)*#</b>
<b>Bleeding upon probing (% sites)</b>	4.67 ( $\pm 7.85$ )	20.78( $\pm 19.5$ )*	7.20 ( $\pm 4.70$ )	16.91 ( $\pm 15.9$ )*
<b>Plaque Index (score)</b>	0.43 ( $\pm 0.28$ )	0.91( $\pm 0.59$ )*	0.83 ( $\pm 0.40$ )	0.88 ( $\pm 0.50$ )
<b>Tooth brushing (times/day)</b>	2.85 ( $\pm 0.93$ )	2.62 ( $\pm 0.85$ )	3.0 ( $\pm 0.76$ )	2.96 ( $\pm 0.92$ )
<b>Dental Floss (times/day)</b>	1.06 ( $\pm 0.94$ )	0.74 ( $\pm 0.89$ )	1.26 ( $\pm 1.40$ )	1.38 ( $\pm 1.30$ )
<b>Tooth loss</b>	1.78 ( $\pm 2.17$ )	4.50 ( $\pm 3.70$ )*	1.38 ( $\pm 1.57$ )	4.90 ( $\pm 4.17$ )*

Values were expressed as mean  $\pm$  SD or percentage

Non-CP: without chronic periodontitis; CP Chronic Periodontitis; SLEDAI Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index, SLICC/ACR Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index. \*Statistically different comparing Non-CP x CP within the same group; # Statistically different comparing SLE x Healthy Control group. Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test  $<0.05$

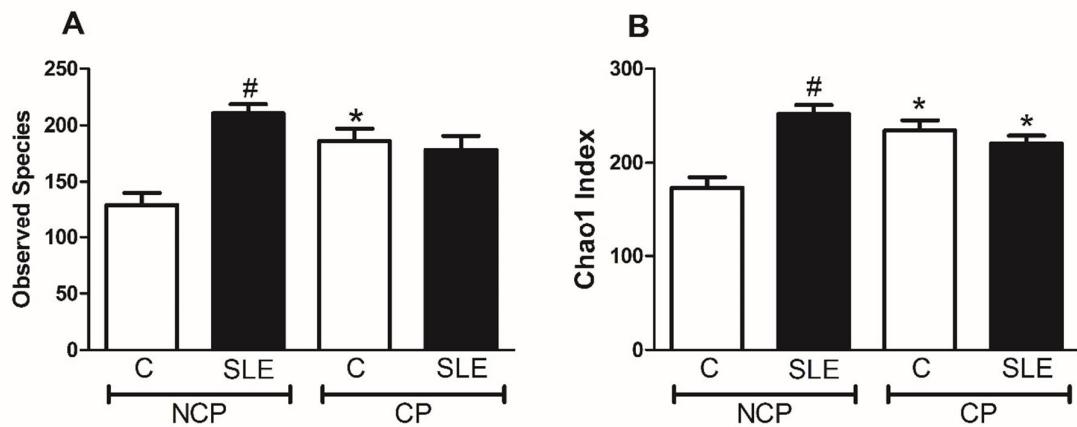
### SLE impacts oral microbiota diversity

To assess the factors that may lead to increased prevalence and severity of periodontitis in SLE patients we examined whether the subgingival microbiota was altered. The bacterial load was one log higher in SLE diseased sites compared to control subjects with diseased sites (Figure 1).



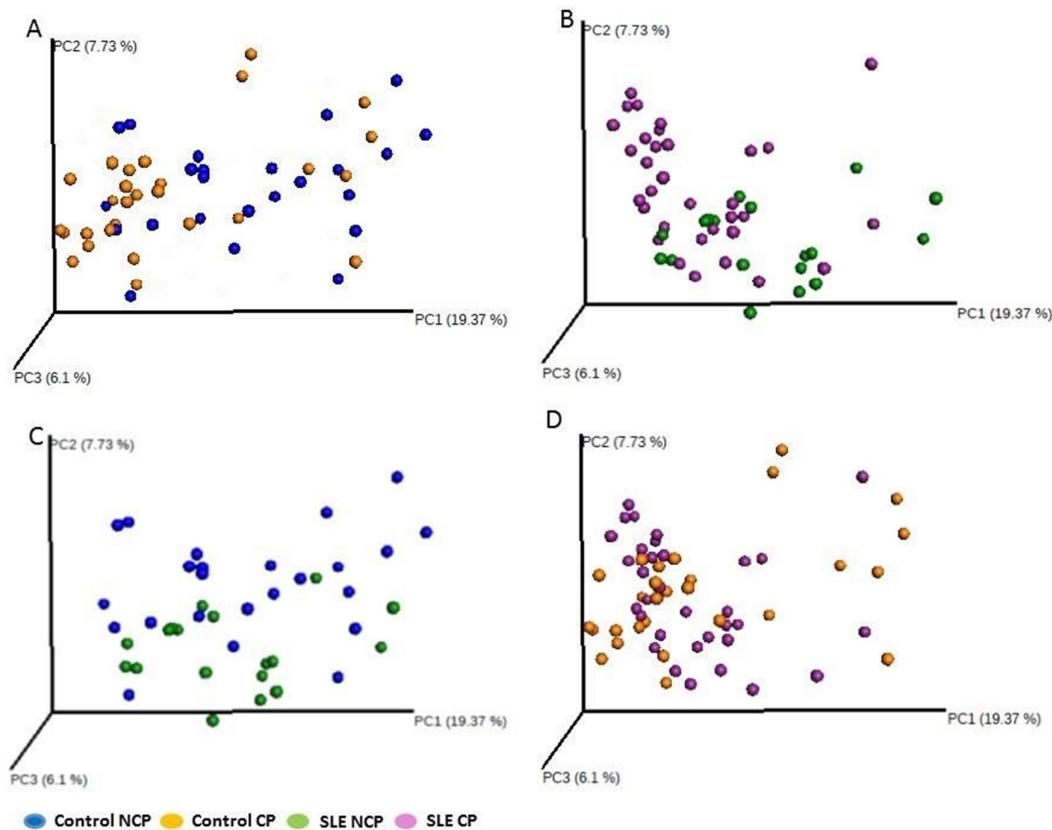
**Figure 1-** Subgingival Bacterial load of healthy subjects (Control) and patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE) with chronic periodontitis (CP) and Non-CP (NCP), determined by real-time PCR using universal primers for 16S rRNA gene. \*Statistically different compared to NCP subjects within the same group. #statistically different compared to control subjects. p<0.05, Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test

In control subjects, the presence of periodontitis resulted in increased microbial diversity (p<0.05), while in SLE patients there was decreased microbial diversity at diseased sites (p<0.05) (Figure 2A and B).



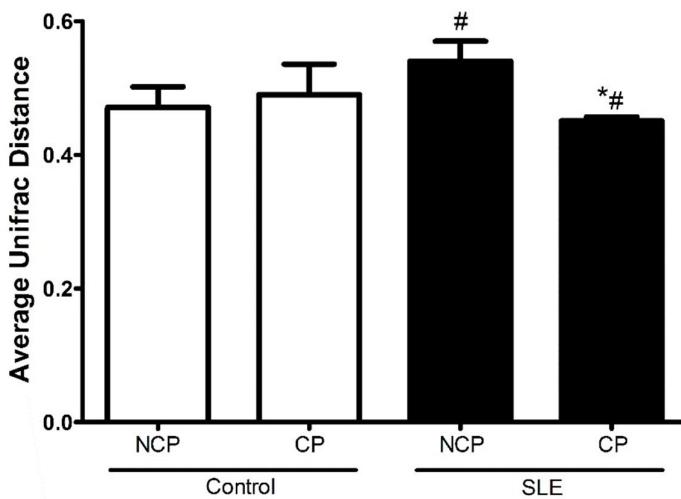
**Figure 2 -** Alpha diversity index, A) Observed species and B) Chao1 index of Control subjects or Systemic Lupus Erythematosus patients (SLE) with chronic periodontitis (CP) or Non-CP (NCP). \*Statistically different compared to NCP subjects within the same group. #statistically different compared to Control group. p<0.05, Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test. Alpha diversity metrics were calculated after subsampling to obtain equal number of sequences per library.

UniFrac analysis was performed to compare the degree of phylogenetic overlap in the microbial communities in SLE and control subjects. Beta diversity, which reflects the relatedness of disease- and health-associated bacterial populations, established that bacterial communities from each group tended to cluster together (PERMANOVA,  $p=0.001$ ) (Figure 3).



**Figure 3** – Beta diversity. Microbiota separation on the principal coordinates calculated from unweighted UniFrac distances. A) Control Subjects, B) SLE patients, C) Non-Periodontitis subjects, D) Chronic Periodontitis subjects

The bacterial taxa in SLE diseased sites were more similar to each other than bacteria from SLE non-periodontitis and healthy subjects' sites, indicating lower heterogeneity in subgingival microbial communities in the SLE periodontitis subjects (Figure 4).

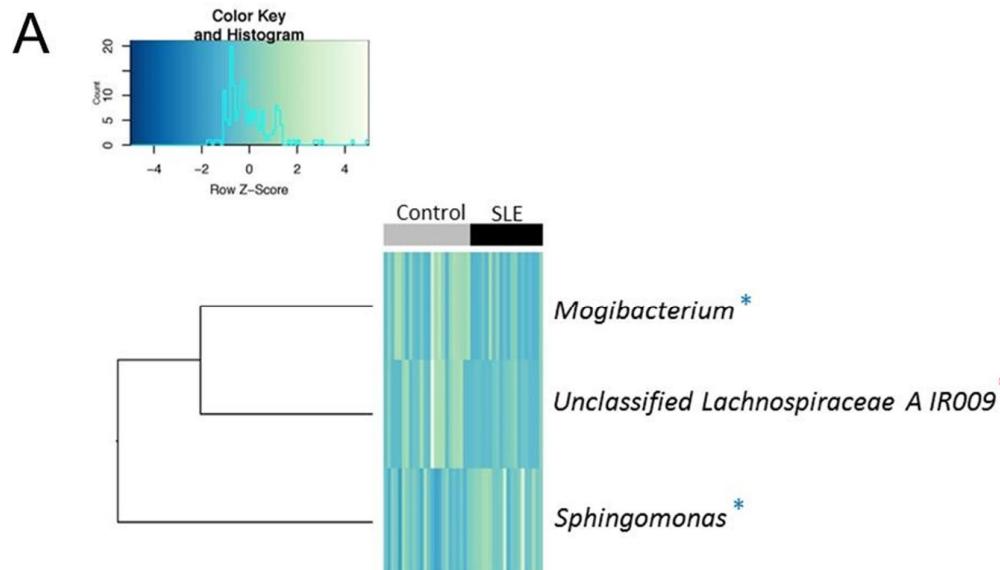
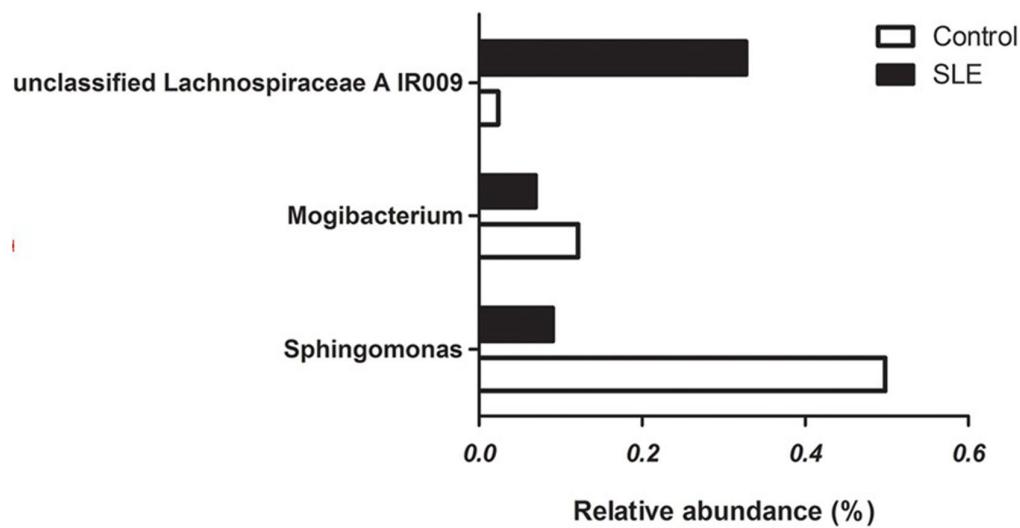


**Figure 4** – The average weighted UniFrac distance values (the beta diversities) of healthy subjects (Control) and patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE) with chronic periodontitis (CP) and Non-CP (NCP). .\*Statistically different compared to NCP subjects within the same group. #statistically different compared to Control group.  $p<0.05$ , Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test.

#### Dysbiosis of oral microbiota in patients with SLE

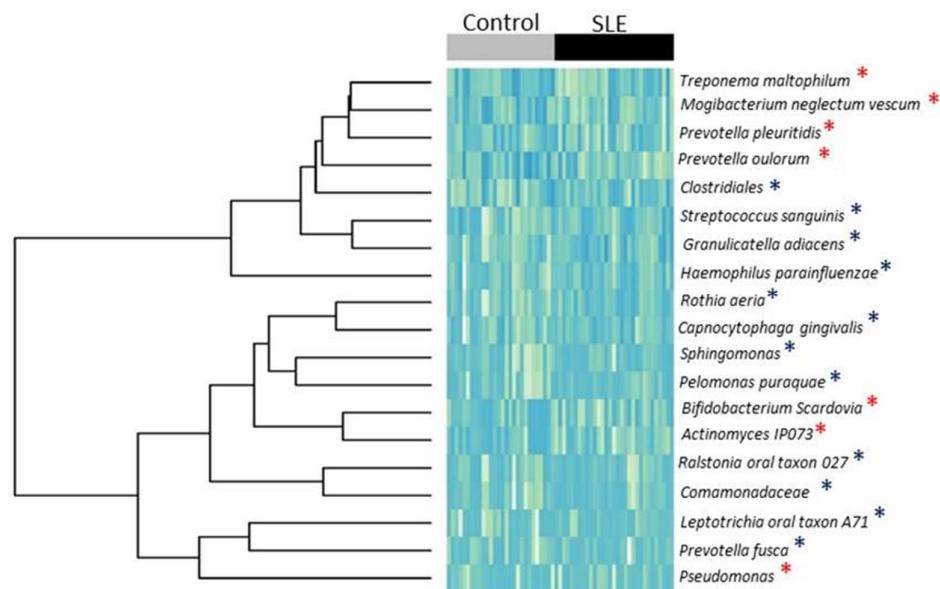
We investigated the impact of SLE on the subgingival bacterial composition. At healthy periodontal sites in SLE patients there were increased proportions of a member of *Lachnospiraceae* family (unclassified *Lachnospiraceae* A IR009) compared to healthy sites in controls ( $p<0.05$ ) (Figure 5A and B). In contrast, proportions of *Prevotella oulorum* and *P. pleuritidis*, *Pseudomonas* spp, *Treponema maltophilum*, *Actinomyces* IP073, bacteria associated with disease, were elevated at periodontal disease sites in patients with SLE compared to periodontitis sites of non-SLE controls ( $p<0.05$ ) (Figure 5C and D). *Sphingomonas* were at lower relative levels in healthy periodontal sites of SLE patients ( $p<0.05$ ) (Figure 5A and B) and *Rothia aeria*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Clostridiales*, *Rasltonia* oral taxon 027, *Leptotrichia* oral taxon A71, *Streptococcus sanguinis*, and *Haemophilus parainfluenzae* had decreased relative abundance in periodontitis sites of SLE group ( $p<0.05$ ) (Figure 5C and D)

## NON-PERIODONTITIS

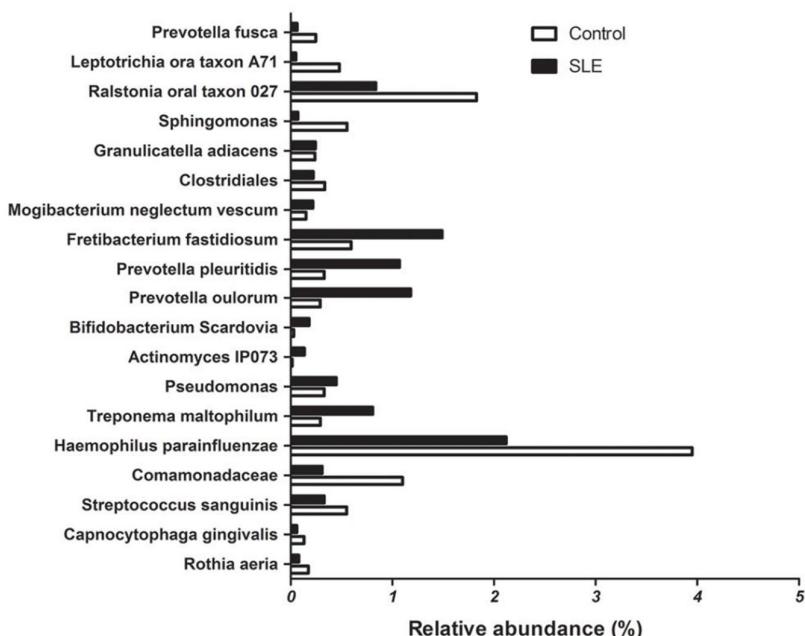
**B**

## PERIODONTITIS

C



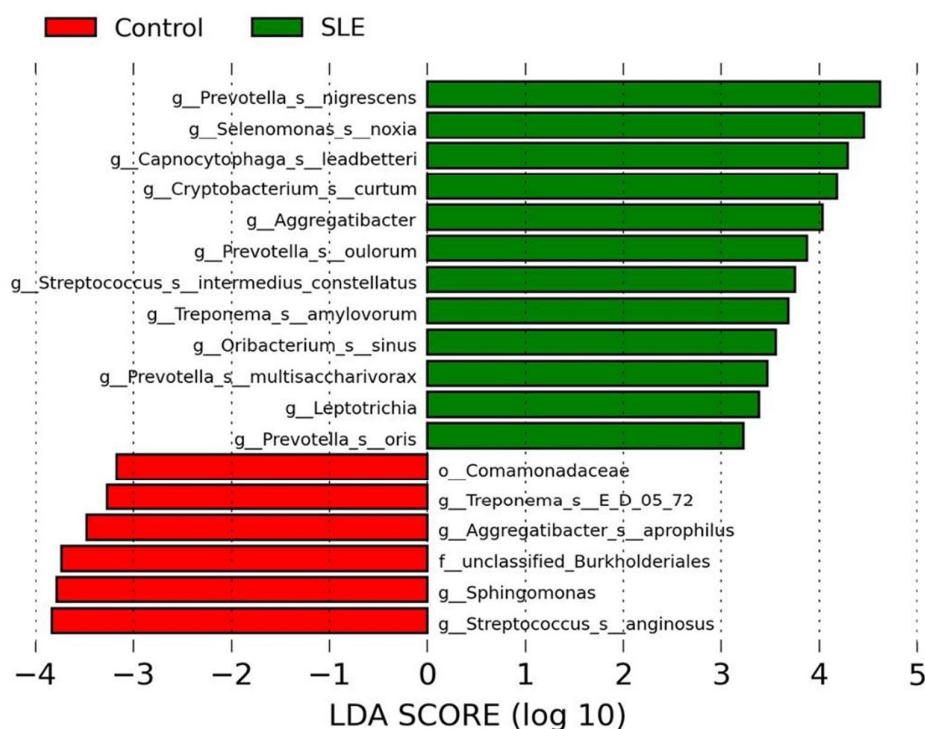
D



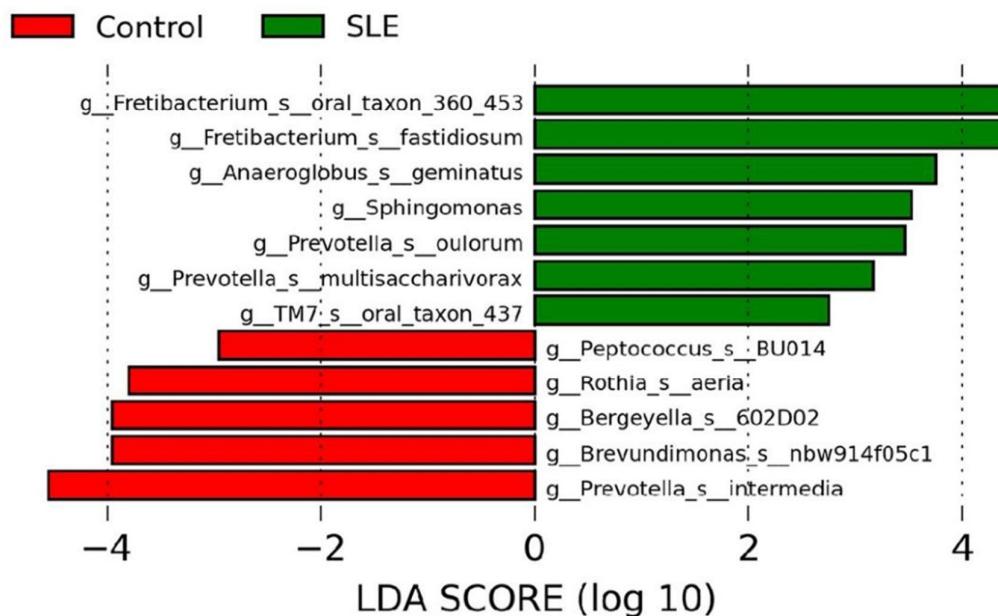
**Figure 5** - OTUs and taxa differing between Non-Periodontitis (Upper panel) and Periodontitis (Lower Panel) sites. A and C: Heat map with the OTUs showing a P value of less than 0.05 when comparing relative abundances between Control and SLE subjects. Subjects are shown in columns, while OTUs appear in rows. Blue asterisk indicate OTUs with decreased proportions in SLE patients, while red asterisks indicated OTUs with increased proportions in SLE in relation to respective controls. B and D are the graphic representation of differences in the relative abundances of species represented in the heat maps.

Differentially represented OTUs were analyzed via LEfSe, a statistical measure used in metagenomic biomarker discovery (SEGATA et al., 2011) (Figure 6). This analysis revealed that at SLE healthy periodontal sites, species such as *Prevotella nigrescens*, *P. oulorum*, *P. oris* and *Selenomonas noxia* exhibited elevated proportions (Figure 6A). When examining the periodontitis sites, we found again increased relative levels of *P. oulorum* in SLE patients as well as increased relative levels of *Fretibacterium fastidiosum* and *F. oral taxon 360 450*, *Anaeroglobus geminatus* and *TM7* oral taxon 437 (Figure 6B). Most of the bacterial species found with elevated proportions in SLE patients were anaerobic (*Prevotella*, *Selenomonas*, *Treponema*), while in healthy non-SLE subjects there was an increase in the relative abundance of predominantly aerobic species (*Rothia*, *Haemophilus*, *Streptococcus*).

## A) Non-periodontitis



## B) Periodontitis



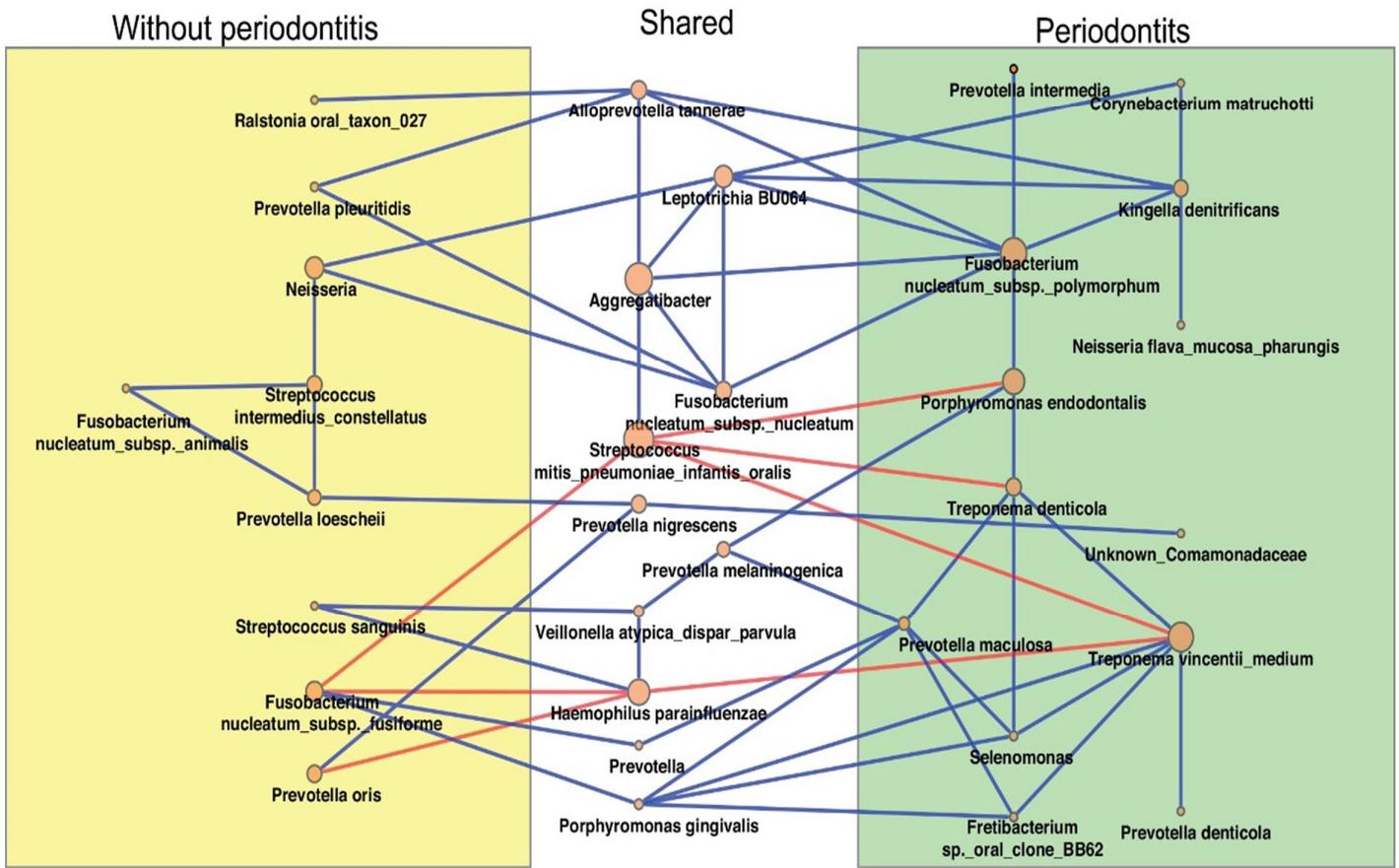
**Figure 6** - OTUs with different relative abundance in Control subjects (Red) and SLE samples (Green) in Non-Periodontitis (A) and Chronic Periodontitis subjects (B) Graph depicts OTUs with different relative abundance based on LEfSe results. Bars represent linear discriminant analysis scores (LDA).

### Microbial inter-correlations

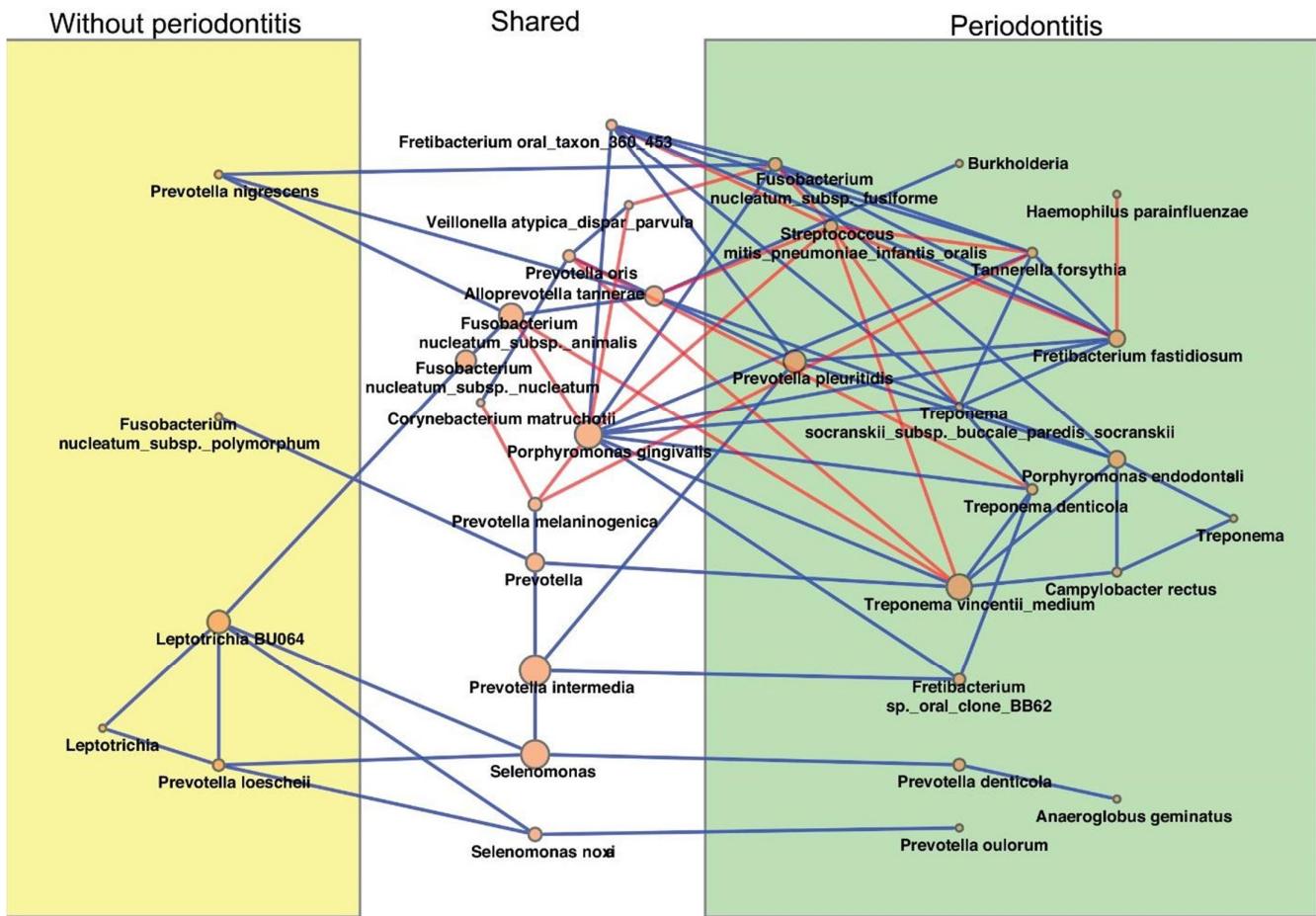
Since periodontitis is a polymicrobial disease it is important to investigate correlations among subgingival microorganisms. Figure 7 shows the co-occurrence patterns among bacterial species in subjects with and without SLE. In non-SLE subjects (Figure 7A), we observed a total of 89 bacterial correlations with positive relationship among pathogenic groups (i.e. *Porphyromonas gingivalis* and *Selenomonas*, *Treponema vincentii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fretibacterium*) and negative correlations between pathogenic bacteria and periodontal healthy-related species (i.e. *Streptococcus mitis* and *Treponema denticola* and *T. vincenti* or between *Prevotella oris* and *H. parainfluenzae*). In SLE patients we observed a wider net of correlations than in the healthy subjects, with a total of 111 correlations (Figure 7B). Positive correlations were found among

periodontal pathogens (*T. denticola*, *P. gingivalis*, *Fretibacterium fastidiosum* and *T. forsythia*) (SOCRANSKY et al., 1998). In contrast, negative correlations were observed among pathogenic bacteria (*Fretibacterium fastdiosum*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. intermedia*) and healthy-related species (*H. parainfluenzae* and *S. mitis*) in SLE group.

## A) Control



## B) SLE

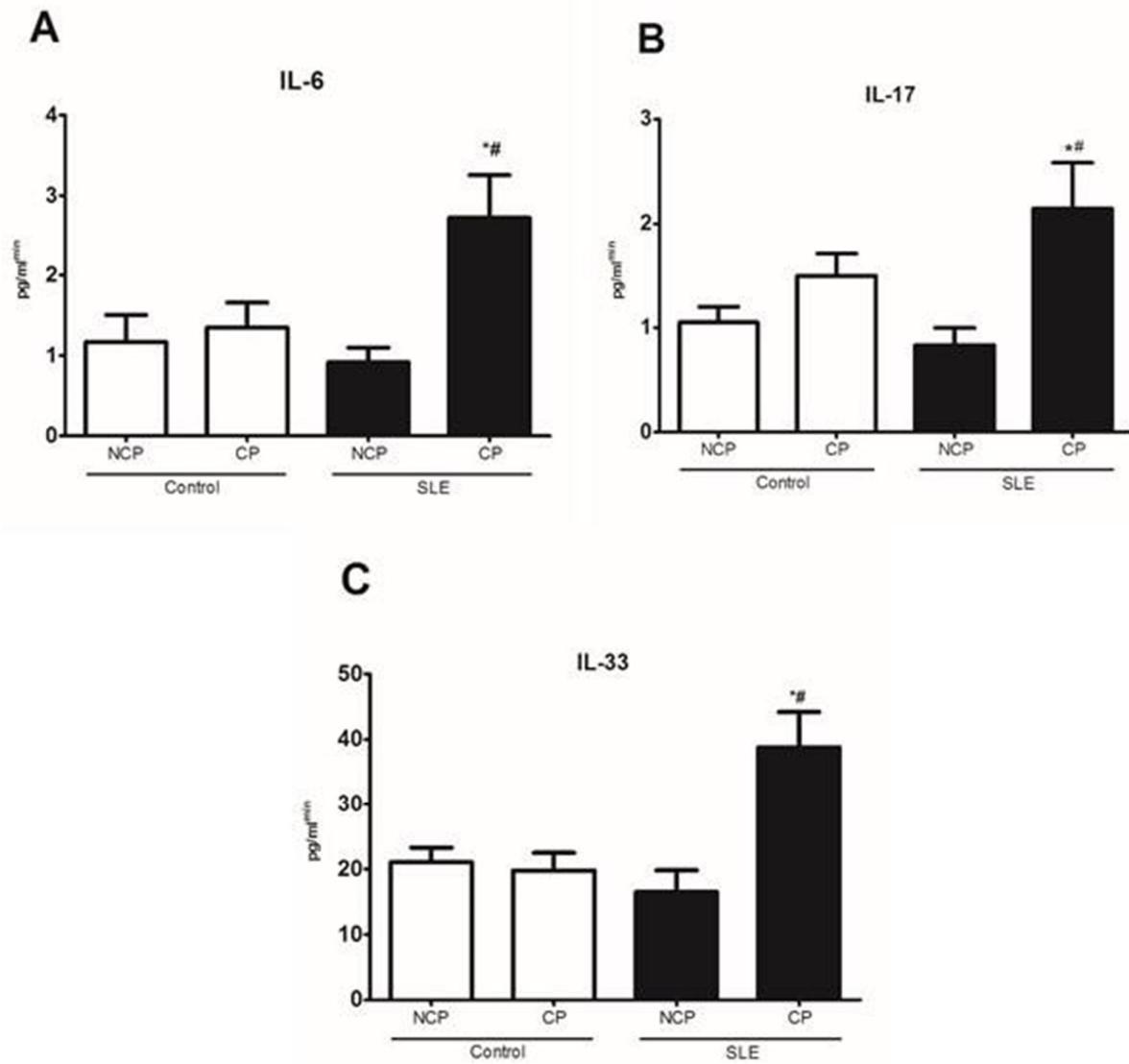


**Figure 7** - Correlations among bacteria species in Control (A) and SLE subjects (B) with chronic periodontitis (CP) (green) and Non-CP (NCP) (Yellow). In white area the bacteria that are common to subjects with CP and NCP. Spearman Rank test with a cut off rho value of 0.4 and  $p < 0.05$ . Blue lines indicate positive correlations and red lines negative correlations.

#### Microbiota correlations with SLE index, salivary and serum concentration of cytokines

We investigated the relationship between bacteria and local inflammation by measuring cytokines in saliva. There was a significant increase in inflammatory cytokines IL-6, IL-17 and IL-33 in saliva of SLE patients with periodontitis compared to control group with periodontitis. No significant differences in cytokine levels were found in non-SLE subjects with periodontitis compared to non-SLE subjects without periodontitis (Figure 8). The production of these cytokines in saliva of SLE patients was correlated with relative abundance of *Selenomonas* ( $\text{IL-6 } \rho = 0.42$ ,  $\text{IL-33 } \rho = 0.44$ ,  $p < 0.05$ ) *Prevotella denticola* ( $\text{IL-33 } \rho = 0.40$ ,  $p < 0.05$ ), *Veilonella atypica* ( $\text{IL-33 }$

$\rho=0.50$ ,  $p<0.05$ ) and *Leptotrichia* (IL-17  $\rho=0.4$ ,  $p<0.05$ ). *Leptotrichia* was also correlated with IL-17 in healthy periodontal sites from SLE patients ( $\rho=0.7$ ,  $p<0.05$ ).



**Figure 8** – Concentration of IL-6 (A), IL-17 (B) and IL-33 (C) in saliva of healthy subjects (Control) and patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE) with chronic periodontitis (CP) and Non-CP (NCP). Cytokine measurement was determined by CBA and ELISA and values were normalized by stimulated salivary flux. \*Statistically different compared to NCP subjects within the same group. #statistically different compared to Healthy subjects with CP.  $p<0.05$ , Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test.

In the serum, there was a significant increase in the levels of IL-6 in the SLE patients with periodontitis, while no difference was found in other analyzed cytokines TNF- $\alpha$ , IL-33 and IFN- $\gamma$ .

(Supplemental table 1). No correlations were observed between IL-6 and relative abundance of bacteria.

TABLE S1 - Levels of inflammatory cytokines in serum of Control subjects and SLE patients

	Control		SLE	
	NCP	CP	NCP	CP
IL-6	9.28±4.6	8.7±1.7	8.46±2.4	<b>41.66±19.4*</b>
IL-33	264.1±96.89	333.5±133.0	490.6±255.0	512.3±131.4
TNF-α	8.22±2.01	18.81±4.46	9.96±4.4	28.40±7.97
IFN-γ	6.58±2.32	4.81±1.01	10.71±3.6	20.18±6.81

Values represented are means± standard deviation

\*Statistical significant, p<0.05. Kruskal-Wallis test with Dunn's

Spearman Rank correlations were calculated to establish relationships between the relative abundance of bacterial taxa found in subgingival sites of SLE patients and parameters of SLE severity. Table 2 shows that six species of *Prevotella* correlated with SLE disease index and inflammatory markers. *Fretibacterium* oral taxon BB62 and *Fretibacterium fastidiosum* correlated with SLE duration, while *Selenomonas noxia* correlated with CRP levels. *Porphyromonas gingivalis* was positively correlated with SLE duration and accumulated dose of prednisone.

Table 2 - Correlations among SLE parameters and relative abundance of bacteria species in subjects with Chronic Periodontitis (rho values).

	SLICC	SLEDAI (Years)	SLE duration (Years)	Accumulated dose of prednisone (mg)	CRP (mg/L)	Neutrophils (cells/mm <sup>3</sup> )	Lymphocytes (cells/mm <sup>3</sup> )
<i>Prevotella nigrescens</i>	0.56*	0.40*	--	--	--	--	--
<i>Prevotella oris</i>	--	--	0.45*	--	--	--	--
<i>Prevotella dentincola</i>	--	--	--	--	0.44*	--	--
<i>Prevotella melaninogenica</i>	--	--	--	--	0.44*	--	--
<i>Prevotella oulorum</i>	--	--	--	--	--	--	0.56†
<i>Frenibacterium oral</i> taxon BB62	--	--	0.51*	0.75*	--	--	--
<i>Frenibacterium</i> <i>fastidium</i>	--	--	0.40*	--	--	--	--
<i>Selenomonas noxia</i>	--	--	--	--	0.50*	--	--
<i>Porphyromonas</i> <i>gingivalis</i>	--	--	0.68*	0.48*	--	--	--

SLEDAI Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index, SLICC/ACR Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index, CRP C-reactive protein. \*Spearman rank correlation, p<0.05

## DISCUSSION

The major findings of this study are that SLE patients had a dysbiotic subgingival microbiota with higher subgingival bacterial load, reduced microbial diversity and changes in bacterial composition with a shift toward greater proportions of pathogenic bacteria. The results suggest that SLE has a significant impact on periodontal health as SLE patients have more severe periodontitis. Reinforcing this finding, we also noticed that 24% of the initial SLE patients evaluated were excluded because they did not have at least 8 teeth. In comparison, none of the healthy subjects were excluded for this reason. This finding is likely to be important since periodontal disease is an important cause of tooth loss in adults (MONTANDON; ZUZA; TOLEDO, 2012). Moreover, periodontal probing depth, a measure of periodontal destruction, was correlated with the duration of SLE, accumulated dose of prednisone and the level of systemic inflammation measured by serum C-reactive protein.

We found a high prevalence of periodontitis in SLE patients, which was observed in almost 70% of these patients, in agreement with previous studies (FABBRI et al., 2014; KOBAYASHI et al., 2003; NOVO et al., 1999). In our study, the experimental and control groups were similar regarding age and gender, ruling out these potential confounding factors (SILVABOGHOSSIAN; LUIZ; COLOMBO, 2009). Other factors may also contribute to the premature development of periodontal disease in SLE subjects, such as medications used to treat SLE. However, most of are anti-inflammatory drugs consisting of steroids and immunosuppressive medications (MOK; LAU, 2003) that typically reduce gingival inflammation (BEEN; ENGEL, 1982; TOLLEFSEN; SALTVEDT; KOPPANG, 1978). We found that the dose of prednisone was correlated with periodontal destruction and also with the presence of pathogenic bacteria species such as *Fretibacterium* and *Porphyromonas gingivalis*. Whether this is due to more severe SLE in subjects with higher prednisone or a direct effect of the drug is open to question. Reports that corticosteroids have little direct impact on the periodontium would argue for the former (SEYMOUR, 2006).

Our study is the first to analyze the bacterial composition of the subgingival microbiota in SLE patients using 16S rRNA gene sequencing. This approach allowed a comprehensive view of the subgingival microbial communities associated with SLE. We found that the bacterial load was one log higher in SLE patients with periodontitis compared to control subjects with periodontitis. Alterations in the inflammatory status of the periodontium induced by SLE may impact the subgingival bacterial composition, which in turn may further enhance inflammatory changes and mediate tissue destruction in SLE patients (JACOB; STOHL, 2011). Consistently higher levels of IL-6, IL-17 and IL-33 were detected in SLE patients with periodontitis. These cytokines are increased in the serum of SLE patients (JACOB; STOHL, 2011; LI; LIN; ZHENG, 2014; NALBANDIAN; CRISPÍN; TSOKOS, 2009; TACKY; LIPSKY; ILLEI, 2004; YANG et al., 2011) and non-SLE individuals with inflamed gingival tissues (CORRÊA et al., 2012; MALCOLM et al., 2015; SARAIVA et al., 2013; STEFANI et al., 2013). IL-33 exacerbates periodontal disease (MALCOLM et al., 2015), increases IL-6 expression (BALATO et al., 2012) and enhances a Th17 response (LI; LIN; ZHENG, 2014). IL-6 promotes activation and differentiation of T cells, B cells, macrophages, neutrophils and osteoclasts and promotes formation of Th17 cells (NAKA; NISHIMOTO; KISHIMOTO, 2002). The levels of IL-6, IL-17 and IL-33 were positively correlated with the relative abundance of pathogenic bacteria such as *Selenomonas*, *Prevotela denticola*, *Veilonella* and *Leptotrichia*. Accordingly, increased inflammation may provide a source of nutrients in the form of tissue break-down products and alter the redox environment favoring the growth of anaerobic bacteria (HAJISHENGALLIS, 2015). In turn, changes in the microbiota might be important to amplify local inflammation and periodontal tissue damage.

SLE influenced microbial diversity, as patients with SLE had lower diversity in sites with periodontal breakdown compared to equivalent sites in matched control subjects. It is possible that the lower diversity facilitates microbial changes that increase susceptibility to periodontitis based on findings of decreased bacterial diversity in inflammatory diseases such as psoriatic arthritis

(SCHER et al., 2015) and Crohn's disease (WALKER et al., 2011). We also found that bacteria commonly found in periodontal healthy, such as *Capnocytophaga* (COLOMBO et al., 2012; GALIMANAS et al., 2014; GE et al., 2013; SCHER et al., 2012b; WANG et al., 2013), *Rothia* (ABUSLEME et al., 2013; COLOMBO et al., 2012; GALIMANAS et al., 2014; MOUTSOPOULOS et al., 2015), *H. parainflunzae* (COLOMBO et al., 2012; LOURENÇO et al., 2014) and *Streptococcus* (WADE, 2013) were reduced in proportional abundance in SLE patients with periodontitis, and bacterial species frequently detected in periodontal disease were observed in higher proportions in SLE patients, even in periodontal healthy sites (i.e. *Prevotella oulorum*, *P. nigrescens*, *P. oris*, *Selenomonas noxia*, *Leptotrichia*). In addition, bacterial samples from diseased sites in subjects with SLE were more similar to each other than bacterial samples from healthy sites. Shi et al (SHI et al., 2015) also found that bacteria from periodontal disease sites were more similar to each other than bacteria from healthy sites. This was observed in different sites within an individual and in comparison to sites between individuals. These findings suggest that the ecological environment is more consistent and similar in disease than in healthy conditions.

The subgingival microbial community in the SLE patients differs not only in the taxonomic composition but also in the co-occurrence patterns of periodontal microorganisms. Cooccurrence analysis indicates that in the SLE patients, the presence of pathogenic bacteria was positively correlated with other pathogenic bacteria (*T. denticola*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, and *Fretibacterium fastidiosum*) (SOCRANSKY et al., 1998). Shi el al similarly reported that periodontitis-associated microorganisms were highly correlated in the diseased state but poorly correlated after treatment, suggesting that there are coordinated interactions among the pathogenic microorganisms. It is possible that SLE favors bacterial interactions that lead to increased periodontal disease.

Periodontal disease in SLE patients shows distinct features compared to systemic healthy subjects. SLE may disrupt the balance between host and microbiota in favor of a dysbiotic condition, resulting in increased periodontal damage or an enhanced inflammatory response leading to an increased risk of periodontitis. It is also possible that periodontitis aggravates SLE

disease severity, as a worsened periodontal condition was correlated with increased systemic inflammation in subjects with SLE. This result is consistent with reports that periodontal treatment improves clinical outcomes in rheumatic diseases such as rheumatoid arthritis and SLE (DE PABLO et al., 2009; FABBRI et al., 2014; MONSARRAT et al., [s.d.]; NOVO et al., 1999). Moreover, increases in the proportion of some subgingival bacteria such as *Prevotella nigrescens* has been related to preterm birth (KUMAR, 2013), rheumatoid arthritis (DE AQUINO et al., 2014; SCHER; BRETZ; ABRAMSON, 2014; YEOH et al., 2013) and atherosclerosis (YAKOB et al., 2011). In our study *P. nigrescens* was correlated to higher values of SLE index (SLEDAI and SLICC/ACR), *P. denticola* with increased neutrophil levels, and *P. melaninogenica* with increased serum CRP levels in SLE patients. Other studies in rheumatoid arthritis have found that *Prevotella* species (SCHER et al., 2012b, 2013) and *A. geminatus* (SCHER et al., 2012b) were found in higher levels in RA patients than in healthy controls. These results suggest a possible two way cycle in which systemic inflammation enhanced by SLE induces dysbiosis of the subgingival microbiota and progression to periodontitis. Periodontitis may then affect the systemic immune response, leading to increased activity of SLE (GOLUB et al., 2006).

The present study represents the first comprehensive evaluation of the subgingival microbiota associated with periodontal status in SLE patients and provides a strong basis for further study on the relationship between the two diseases. As a cross sectional study the present work has limitations as it is not able to define cause and effect relationship. A longitudinal study in which the same individual was followed just after SLE diagnosis could provide evidence for a cause and effect relationship between the two diseases. This would be particularly useful in identifying bacterial changes associated with the onset of periodontal disease in SLE patients. An intervention trial in which patients are treated for periodontitis would further enhance our understanding as to whether periodontitis has an impact of SLE disease severity.

## CONCLUSIONS

SLE patients exhibit a higher prevalence of periodontal disease and increased periodontal disease severity. SLE patients had increased local inflammation and an altered subgingival microbiota, which may account, in part for the periodontal changes. Periodontal inflammation was also associated with more severe SLE scores. The results point to the need to closely monitor the periodontal health of subjects with SLE and for periodontal treatment at early stages, including the removal of subgingival dental plaque.

## MATERIAL AND METHODS

### Subjects

Three hundred thirty six patients diagnosed with SLE (according to ACR 1982/1997 revised classification criteria) from Rheumatology Outpatient Clinic of Clinics Hospital of Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil were initially evaluated. Based on a power analysis at alpha=1% and 5%, 50 subjects will reach a power of 99% when comparing bacterial taxa frequencies between subgingival samples as reported by La Rosa et al (ROSA et al., 2012). Fifty-two patients were included in the study after matched the inclusion criteria: Subjects included were at least 18 years of age, no other rheumatic diseases (except for secondary Sjögren syndrome), no treatment for periodontal disease within the last six months, no use of orthodontic appliances, no use of antibiotics within the last three months, no need for antibiotics for infective endocarditis prophylaxis during dental procedures, no chronic renal insufficiency requiring dialysis or after kidney transplantation, pregnancy or lactation, no acute or chronic infectious conditions at the time of the study visit, no diagnosis of neoplastic disease within the last five years and the presence of at least 8 teeth. Additionally we have excluded from the study patients that did not agreed to participated, did not understand the study or decided to leave the study after the first clinic visit. SLE group was matched for age and gender with 52 subjects without SLE or other known rheumatic diseases (control group).

Medical records were collected for SLE parameters, Systemic Lupus Erythematosus

Disease Activity Index 2000 (SLEDAI 2K) measured SLE activity (IBAÑEZ; GLADMAN; UROWITZ, 2005) and Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index (SLICC/ACR) evaluated SLE associated damage (GLADMAN et al., 1996). Periodontal status was assessed by two calibrated examiners. The following parameters were recorded: plaque index, probing depth (PD), clinical attachment level (CAL) and bleeding on probing (BOP). Periodontitis was defined as the presence of two or more interproximal sites with probing depth  $\geq$  4 mm or one site with probing depth  $\geq$  5 mm (EKE et al., 2012).

### **Sample collection**

Subgingival dental plaque samples were collected as described elsewhere (GHIZONI et al., 2012). Sterile endodontic paper points (ISO40) (Tanariman, Manacaparu, AM, Brazil) were inserted in the 5 sites with deepest periodontal pockets and kept there for one minute. All paper points with subgingival plaque samples were pooled together. After removal, the material was stored in a sterile tube containing 500  $\mu$ L of sterile distilled water and centrifuged at 3000xg for 5 minutes. The paper points were discharged and the pellet was kept at -80°C until DNA extraction.

For saliva collection, patients could not eat or drink an hour before collection procedure. They washed the mouth with pure water and swallowed whole saliva before collection. Saliva was collected by continuous drool into a sterile 50 mL tube for 5 minutes. The non-stimulated salivary flow was measured in milliliters per minute (ml/min). The saliva samples were subsequently diluted (1:1) in a phosphate-buffered saline (PBS) solution containing protease inhibitors and subsequently frozen at -80°C until analysis.

Blood samples were collected using a vacutainer with EDTA and immediately placed on ice, clarified by centrifugation at 3000xg for 5 minutes at 4°C, and kept frozen at -80°C until assayed.

## DNA Extraction and Sequencing

Genomic DNA was extract from the samples using the Quick-gDNA MicroPrep kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) and 50 µL (10 mg/ml) of lysozyme per sample for maximal bacterial cell lysis. All procedures were completed in a laminar flow hood with RNase free materials. The quantity and quality of DNA was measured using a spectrophotometer method (Tecan, Männedorf, Switzerland).

The primers 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGTAA-3') and 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT -3') which target the hypervariable V4 region of the 16S rRNA gene were used for amplification (CAPORASO et al., 2012) followed by gel purification and ethanol precipitation to remove any remaining contaminants and PCR artifacts and subjected to Illumina MiSeq Platform at the Next-Generation Sequencing Core of University of Pennsylvania.

## Microbiological Analysis

Taxonomy was assigned using “Quantitative Insights Into Microbial Ecology” (QIIME) software package (CAPORASO et al., 2010b) with UCLUST against CORE (GRIFFEN et al., 2011). Alpha rarefaction was performed using the Observed Species and Chao1 metrics. Beta diversity was calculated using UNIFRAC. Quantification of total bacterial load was determined by real-time PCR using universal primers for 16S rRNA gene (F:AGAGTTGATCCTGGCTCAG; R: ACGGCTACCTTGTACGACTT) (IDT, Coralville, Iowa, USA).

## Cytokines measurement

Analyses of IL-6 and IL-17 cytokines were determined using a BD CBA Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (Becton, Dickinson and Company, BD Biosciences, San Diego, CA) and analyzed on a BD FACSCalibur flow cytometer (Becton, Dickinson and Company). The concentration of the cytokine IL-33 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using commercially available kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The assays

were performed according to the manufacturer's instructions. The results were expressed as picograms of cytokines and adjusted accordingly salivary flux for salivary samples.

## Statistics

Clinical, demographic, alpha diversity and bacterial load data were compared using Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test. PERMANOVA was performed to compare beta diversity. Correlations between relative abundance of taxa and clinical parameters of periodontal disease and SLE were calculated using Spearman correlation coefficients. For co-occurrence analysis Spearman rank correlation was calculated with cut off value of rho  $\geq 0.4$  and p<0.05 as previously described (ZHANG et al., 2015). Relative abundances of Operation Taxonomy Units (OTU) were compared among SLE and Control subjects and tested for statistical significance using DESeq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014) and LEfSe (SEGATA et al., 2011). Briefly, LEfSe is a metagenomic biomarker-discovery approach based on an algorithm that first performs a nonparametric Kruskal-Wallis test in order to identify bacterial taxa whose relative abundance is significantly different in a group of interest compared to controls. Subsequently, LEfSe applies linear discriminant analysis (LDA) to those bacterial taxa identified as significantly different (p<0.05) and further assesses the effect size of each differentially abundant taxon. Only those taxa that obtain a log LDA score 2 are ultimately considered. As a result, LEfSe indicates those taxa and OTUs that better discriminate groups. P values <0.05 were considered to indicate statistical significance.

## DECLARATIONS

### Ethics approval and consent to participate

The subjects gave informed consent, and the study protocol was approved by the Institution Ethics Committee (CAAE: 03128012.0.0000.5149/2012).

### Consent for publication

Not applicable

### **Availability of data and material**

All Illumina sequence data from this study were submitted to the NCBI Sequence Read Archive (SRA) under BioProject accession number PRJNA325500. The dataset (OTU table) supporting the conclusions of this article is included within the article as additional file (Supplemental table 2).

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Funding**

This study was supported by CAPES, CNPq and FAPEMIG, Brazil as well as the NIDCR, R01DE017732.

### **Authors' contributions**

The project was conceived by TAS, DTG, GAF and ALT. The clinical material was collected by JDC, DCC and SMM. All laboratory work was conducted by JDC, TAS with the help of SMM and EX. Bioinformatics analysis was conducted by EJL, GRF, EX and JDC. JDC, DTG and TAS interpreted the data and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### **Acknowledgements**

We thank Daniele Souza, Janine Silva, Mayra L. Albiero and Marcelo Mattos for their contributions to this work.

### **LIST OF ABBREVIATIONS**

BOP: bleeding upon probing

CP: Chronic Periodontitis

CRP: C reactive protein

IL: interleukin

LDA: linear discriminant analysis

NCP: Non-periodontitis

RA: Rheumatoid arthritis

SLE: Systemic lupus erythematosus

SLICC/ACR: Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index,

SLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index

## REFERENCES

1. Armitage GC. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Ann. Periodontol.* 1999;4:1–6.
2. Xiao W, Li S, Pachios S, Wang Y, Graves DT. Bone Remodeling Under Pathological Conditions. *Front. Oral Biol.* 2015;18:17–27.
3. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2015;15:30–44.
4. Andriankaja OM, Galicia J, Dong G, Xiao W, Alawi F, Graves DT. Gene expression dynamics during diabetic periodontitis. *J. Dent. Res.* 2012;91:1160–5.
5. Kumar PS, Leys EJ, Bryk JM, Martinez FJ, Moeschberger ML, Griffen AL. Changes in Periodontal Health Status Are Associated with Bacterial Community Shifts as Assessed by Quantitative 16S Cloning and Sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44:3665–73.
6. Wu Y-Y, Xiao E, Graves DT. Diabetes mellitus related bone metabolism and periodontal disease. *Int. J. Oral Sci.* 2015;1–10.
7. Polyzos NP, Polyzos IP, Zavos A, Valachis A, Mauri D, Papanikolaou EG, et al. Obstetric outcomes after treatment of periodontal disease during pregnancy: systematic review and metaanalysis. *BMJ.* 2010;341:c7017–c7017.
8. Linden GJ, Herzberg MC. Periodontitis and systemic diseases: a record of discussions of working group 4 of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J. Periodontol.* 2013;40:S20–23.
9. Scher JU, Bretz W a, Abramson SB. Periodontal disease and subgingival microbiota as contributors for rheumatoid arthritis pathogenesis: modifiable risk factors? *Curr. Opin. Rheumatol.* 2014;26:424–9.
10. Kobayashi T, Ito S, Yasuda K, Kuroda T, Yamamoto K, Sugita N, et al. The combined genotypes of stimulatory and inhibitory Fc gamma receptors associated with systemic lupus erythematosus and periodontitis in Japanese adults. *J. Periodontol.* 2007;78:467–74.

11. Corrêa JD, Saraiva AM, Queiroz-Junior CM, Madeira MFM, Duarte PM, Teixeira MM, et al. Arthritis-induced alveolar bone loss is associated with changes in the composition of oral microbiota. *Anaerobe*. 2016;39:91–6.
12. Otomo-Corgel J, JJ P, MP R, MA R. State of the science: chronic periodontitis and systemic health. *J Evid Based Dent Pr*. 2012;12:20–8.
13. Linden GJ, Lyons A, Scannapieco FA. Periodontal systemic associations: review of the evidence. *J. Clin. Periodontol.* 2013;40 Suppl 1:S8-19.
14. Ghizoni JS, Antônio L, Taveira DA, Garlet GP, Flávio M, Pereira JR, et al. Increased levels of Porphyromonas gingivalis are associated with ischemic and hemorrhagic cerebrovascular disease in humans : an in vivo study. *J Appl Oral Sci.* 2012;20:104–12.
15. Ribeiro J, Leão A, AB N, Novaes AB. Periodontal infection as a possible severity factor for rheumatoid arthritis. *J. Clin. Periodontol.* 2005;32:412–6.
16. Fabbri C, Fuller R, Bonfá E, Guedes LKN, D'Alleva PSR, Borba EF. Periodontitis treatment improves systemic lupus erythematosus response to immunosuppressive therapy. *Clin. Rheumatol.* 2014;33:505–9.
17. Rekvig OP, Van Der Vlag J. The pathogenesis and diagnosis of systemic lupus erythematosus: Still not resolved. *Semin. Immunopathol.* 2014;36:301–11.
18. Phillips R. Rheumatoid arthritis: Microbiome reflects status of RA and response to therapy. *Nat. Rev. Rheumatol.* Nature Publishing Group; 2015;11:502–502.
19. Proal AD, Albert PJ, Marshall TG. The human microbiome and autoimmunity. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2013;25:234–40.
20. Zhang H, Liao X, Sparks JB, Luo XM. Dynamics of gut microbiota in autoimmune lupus. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014;80:7551–60.
21. Hevia A, Milani C, López P, Cuervo A, Arboleya S, Duranti S, et al. Intestinal Dysbiosis

- Associated with Systemic Lupus Erythematosus. MBio. 2014;5:1–10.
22. Muthu S, Richards A, Maddison P, Scully C. Gingival and periodontal health in systemic lupus erythematosus. Community Dent. Oral Epidemiol. 1993;21:158–61.
23. de Araújo Navas EAF, Sato EI, Pereira DFA, Back-Brito GN, Ishikawa JA, Jorge AOC, et al. Oral microbial colonization in patients with systemic lupus erythematosus: correlation with treatment and disease activity. Lupus. 2012;21:969–77.
24. Al-Mutairi K, Al-Zahrani M, Bahlas S, Kayal R, Zawawi K. Periodontal findings in systemic lupus erythematosus patients and healthy controls. Saudi Med. J. 2015;36:463–8.
25. Calderaro DC, Ferreira GA, Mendonça SMS de, Corrêa JD, Santos FX, Sanção JGC, et al. Há associação entre o lúpus eritematoso sistêmico e a doença periodontal? Rev. Bras. Reumatol. 2016;56:280–4.
26. Novo E, Garcia-macgregor E, Viera N, Chaparro N, Crozzoli Y. Periodontitis and AntiNeutrophil Cytoplasmic Antibodies in Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis: A Comparative Study. J. Periodontol. 1999;70:185–8.
27. Wang C-Y, Chyuan I-T, Wang Y-L, Kuo MY-P, Chang C-W, Wu K-J, et al.  $\beta$ 2-Glycoprotein I-Dependent Anti-Cardiolipin Antibodies Associated With Periodontitis in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. J. Periodontol. 2015;86:995–1004.
28. Susin C, Valle P, Oppermann R V., Haugejorden O, Albandar JM. Occurrence and risk indicators of increased probing depth in an adult Brazilian population. J. Clin. Periodontol. 2005;32:123–9.
29. Susin C, Dalla Vecchia CF, Oppermann R V, Haugejorden O, Albandar JM. Periodontal attachment loss in an urban population of Brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. J. Periodontol. 2004;75:1033–41.
30. Silva-Boghossian CM, Luiz RR, Colombo AP V. Periodontal status, sociodemographic, and behavioral indicators in subjects attending a public dental school in Brazil: analysis of clinical attachment loss. J. Periodontol. 2009;80:1945–54.

31. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 2011;12:R60.
32. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* 1998;25:134–44.
33. Montandon A, Zuza E, Toledo BE. Prevalence and reasons for tooth loss in a sample from a dental clinic in Brazil. *Int. J. Dent.* 2012;2012:8–10.
34. Kobayashi T, Ito S, Yamamoto K, Hasegawa H, Sugita N. Risk of Periodontitis in Systemic Lupus Erythematosus Is Associated with Fcγ receptor polymorphisms. *J. Periodontol.* 2003;74:378–84.
35. Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Pathol.* 2003;56:481–90.
36. Tollefsen T, Saltvedt E, Koppang HS. The effect of immunosuppressive agents on periodontal disease in man. *J. Periodontal Res.* 1978;13:240–50.
37. Been V, Engel D. The effects of immunosuppressive drugs on periodontal inflammation in human renal allograft patients. *J. Periodontol.* 1982;53:245–8.
38. Seymour R a. Effects of medications on the periodontal tissues in health and disease. *Periodontol.* 2000. 2006;40:120–9.
39. Jacob N, Stohl W. Cytokine disturbances in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 2011;13:228.
40. Tackey E, Lipsky PE, Illei GG. Rationale for interleukin-6 blockade in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2004;13:339–43.
41. Nalbandian a, Crispín JC, Tsokos GC. Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts. *Clin. Exp. Immunol.* 2009;157:209–15.
42. Li P, Lin W, Zheng X. IL-33 neutralization suppresses lupus disease in lupus-prone mice. *Inflammation.* 2014;37:824–32.

43. Yang Z, Liang Y, Xi W, Li C, Zhong R. Association of increased serum IL-33 levels with clinical and laboratory characteristics of systemic lupus erythematosus in Chinese population. *Clin. Exp. Med.* 2011;11:75–80.
44. Stefani FA, Viana MB, Dupim AC, Brito JAR, Gomez RS, da Costa JE, et al. Expression, polymorphism and methylation pattern of interleukin-6 in periodontal tissues. *Immunobiology.* 2013;218:1012–7.
45. Corrêa JD, Madeira MFM, Resende RG, Correia-Silva JDF, Gomez RS, de Souza DDG, et al. Association between polymorphisms in interleukin-17A and -17F genes and chronic periodontal disease. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:846052.
46. Saraiva AM, Alves e Silva MRM, Correia Silva JDF, da Costa JE, Gollob KJ, Dutra WO, et al. Evaluation of IL17A expression and of IL17A, IL17F and IL23R gene polymorphisms in Brazilian individuals with periodontitis. *Hum. Immunol.* 2013;74:207–14.
47. Malcolm J, Awang RA, Oliver-Bell J, Butcher JP, Campbell L, Adrados Planell A, et al. IL-33 Exacerbates Periodontal Disease through Induction of RANKL. *J. Dent. Res.* 2015;94:968–75.
48. Balato A, Lembo S, Mattii M, Schiattarella M, Marino R, Paulis A De, et al. IL-33 is secreted by psoriatic keratinocytes and induces pro-inflammatory cytokines via keratinocyte and mast cell activation. *Exp. Dermatol.* 2012;21:892–4.
49. Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res.* 2002;4 Suppl 3:S233–42.
50. Scher JU, Ubeda C, Artacho A, Attur M, Isaac S, Reddy SM, et al. Decreased bacterial diversity characterizes the altered gut microbiota in patients with psoriatic arthritis, resembling dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67:128–39.
51. Walker AW, Sanderson JD, Churcher C, Parkes GC, Hudspith BN, Rayment N, et al. Highthroughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis

- and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC Microbiol.* BioMed Central Ltd; 2011;11:7.
52. Scher JU, Ubeda C, Equinda M, Khanin R, Buischi Y, Viale A, et al. Periodontal disease and the oral microbiota in new-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2012;64:3083–94.
53. Ge X, Rodriguez R, Trinh M, Gunsolley J, Xu P. Oral Microbiome of Deep and Shallow Dental Pockets In Chronic Periodontitis. *PLoS One.* 2013;8:2–11.
54. Galimanas V, Hall M, Singh N, Lynch MD, Goldberg M, Tenenbaum H, et al. Bacterial community composition of chronic periodontitis and novel oral sampling sites for detecting disease indicators. *Microbiome.* 2014;2:32.
55. Wang J, Qi J, Zhao H, He S, Zhang Y, Wei S, et al. Metagenomic sequencing reveals microbiota and its functional potential associated with periodontal disease. *Sci. Rep.* 2013;3:1843.
56. Colombo AP V., Bennet S, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD, et al. Impact of Periodontal Therapy on the Subgingival Microbiota of Severe Periodontitis: Comparison Between Good Responders and Individuals With Refractory Periodontitis Using the Human Oral Microbe Identification Microarray. *J. Periodontol.* 2012;83:1279–87.
57. Moutsopoulos NM, Chalmers NI, Barb JJ, Abusleme L, Greenwell-Wild T, Dutzan N, et al. Subgingival Microbial Communities in Leukocyte Adhesion Deficiency and Their Relationship with Local Immunopathology. *PLOS Pathog.* 2015;11:e1004698.
58. Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N, Silva N, Burleson J a, Strausbaugh LD, et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J.* 2013;7:1016–25.
59. Lourenço TGB, Heller D, Silva-Boghossian CM, Cotton SL, Paster BJ, Colombo APV. Microbial signature profiles of periodontally healthy and diseased patients. *J. Clin. Periodontol.* 2014;41:1027–36.
60. Wade WG. Characterisation of the human oral microbiome. *J. Oral Biosci.* Elsevier;

2013;55:143–8.

61. Shi B, Chang M, Martin J, Mitreva M, Lux R, Klokkevold P, et al. Dynamic Changes in the Subgingival Microbiome and Their Potential for Diagnosis and Prognosis of Periodontitis. *MBio*. 2015;6:e01926-14.
62. Monserrat P, JN V, Cantagrel A, Algans N, Cousty S, Kémoun P, et al. Effect of periodontal treatment on the clinical parameters of patients with rheumatoid arthritis: study protocol of the randomized, controlled ESPERA trial. *Trials*. 14:253.
63. de Pablo P, Chapple ILC, Buckley CD, Dietrich T, P de P, IL C, et al. Periodontitis in systemic rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2009;5:218–24.
64. Kumar PS. Oral microbiota and systemic disease. *Anaerobe*. Elsevier Ltd; 2013;24:90–3.
65. Yeoh N, Burton JP, Suppiah P, Reid G, Stebbings S. The role of the microbiome in rheumatic diseases. *Curr. Rheumatol. Rep.* 2013;15:314.
66. de Aquino SG, Abdollahi-Roodsaz S, Koenders MI, van de Loo F a J, Pruijn GJM, Marijnissen RJ, et al. Periodontal pathogens directly promote autoimmune experimental arthritis by inducing a TLR2- and IL-1-driven Th17 response. *J. Immunol.* 2014;192:4103–11.
67. Yakob M, Söder B, Meurman JH, Jøgestrand T, Nowak J, Söder P-Ö. Prevotella nigrescens and Porphyromonas gingivalis are associated with signs of carotid atherosclerosis in subjects with and without periodontitis. *J. Periodontal Res.* 2011;46:749–55.
68. Scher JU, Sczesnak A, Longman RS, Segata N, Ubeda C, Bielski C, et al. Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *Elife*. 2013;2013:1–20.
69. Golub L., Payne J., Reinhardt R., Nieman G. Can Systemic Diseases Co- induce ( Not Just Exacerbate) Periodontitis? A Hypothetical “Two-hit” Model. *J. Dent. Res.* 2006;85:102–5.
70. Rosa PS La, Brooks JP, Deych E, Boone EL, Edwards DJ, Wang Q, et al. Hypothesis Testing and Power Calculations for Taxonomic-Based Human Microbiome Data. *2012;7:1–13.*

71. Ibañez D, Gladman DD, Urowitz MB. Adjusted mean Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index-2K is a predictor of outcome in SLE. *J. Rheumatol.* 2005;32:824–7.
72. Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Urowitz M, et al. The development and initial validation of the systemic lupus international collaborating clinics American College of Rheumatology Damage Index for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1996;39:363–
- 9.
73. Eke PI, Page RC, Wei L, Thornton-Evans G, Genco RJ. Update of the Case Definitions for Population-Based Surveillance of Periodontitis. *J. Periodontol.* 2012;83:1449–54.
74. Caporaso JG, Lauber CL, Walters W a, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, et al. Ultra-highthroughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.*
- Nature Publishing Group; 2012;6:1621–4.
75. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods.* 2010;7:335–6.
76. Griffen AL, Beall CJ, Firestone ND, Gross EL, DiFranco JM, Hardman JH, et al. CORE: A phylogenetically-curated 16S rDNA database of the core oral microbiome. *PLoS One.* 2011;6:1–
- 10.
77. Zhang X, Zhang D, Jia H, Feng Q, Wang D, Liang D, et al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nat. Med.* Nature Publishing Group; 2015;21:895–905.
78. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNAseq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15:550.

***PARTE II SUBGINGIVAL MICROBIOME DYSBIOSIS IN RHEUMATOID ARTHRITIS LINKED  
TO INCREASED PERIODONTAL INFLAMMATION AND ARTHRITIS OUTCOME***

SUBGINGIVAL MICROBIOME DYSBIOSIS IN RHEUMATOID ARTHRITIS LINKED TO  
INCREASED PERIODONTAL INFLAMMATION AND ARTHRITIS OUTCOMES

CORRÊA JD.<sup>1</sup>, CALDERARO D.<sup>2</sup>, MENDONÇA SMS.<sup>1</sup>, FERNANDES GR.<sup>3</sup>, ALBIERO ML.<sup>4</sup>,  
XIAO E.<sup>5</sup>, SILVA JM<sup>1</sup>, FERREIRA GA.<sup>2</sup>, TEIXEIRA AL.<sup>2</sup>, LEYS EJ<sup>6</sup>. GRAVES DT<sup>5\*</sup>, SILVA  
TAI\*

1. Faculty of Dentistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte - MG, Brazil.
2. University Hospital, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte - MG, Brazil.
3. Oswaldo Cruz Fundation, René Rachou Research Center, Belo Horizonte - MG, Brazil.
4. Faculty of Dentistry, University of Campinas, Piracicaba – SP, Brazil.
5. Penn Dental School, University of Pennsylvania, Philadelphia – PA, USA.
6. The Ohio State University, College of Dentistry, Columbus - OH, USA.

\* Senior authors contributed equally to this publication

KEY WORDS: Rheumatoid arthritis, oral microbiome, periodontal disease, inflammation

## ABSTRACT

**OBJECTIVES:** Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune and inflammatory disorder. Changes in subgingival microbiota in the context of systemic diseases contribute to disrupt local homeostasis, favoring periodontal tissues destruction. Although it is thought that RA increases the risk of periodontal disease, it is not known how it affects the microbiota in the periodontium. Here, we analyzed the subgingival microbiome of RA patients and its association with periodontal inflammation and RA activity.

**METHODS:** Forty-three patients with RA were compared to 47 control subjects. Patients were screened for probing depth (PD), clinical attachment level (CAL), bleeding on probing (BOP) and classified as with (CP) or without chronic periodontitis (NCP). Concentrations of inflammatory cytokines in saliva were determined. Subgingival plaque was collected for DNA extraction. Amplicons of the 16S rDNA V4 region were subject to Illumina MiSeq Sequencing.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Markers of periodontitis were significantly correlated with markers of RA. Salivary concentration of cytokines (IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-33 and IL-17) were increased in RA patients in comparison with controls. Non-periodontitis RA patients showed increased microbial diversity and bacterial load, higher frequency of pathogenic species (*Prevotella*, *Selenomonas*, *Anaeroglobus geminatus*, *Parvimonas micra*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) and reduction of health-related species (*Streptococcus*, *Rothia aeria*, *Kingella oralis*) compared to control subjects. Moreover, the severity of RA reflected by higher ACR scores, number of tender and swollen joints, and level of C-reactive protein was significantly correlated with the presence of pathogenic bacteria. Our findings support the hypothesis that RA triggers dysbiosis between pathogenic/healthy-related bacteria, which are likely to contribute to greater susceptibility to periodontitis.

## INTRODUCTION

The oral cavity is the second largest microbial niche after the gastrointestinal tract, and until now molecular biological techniques has identified over 700 bacterial species(ABUSLEME et al., 2013; GRIFFEN et al., 2012; KUMAR et al., 2006). This large microbial population coexists in equilibrium and shares a symbiotic relationship with the host. The change in this equilibrium has been linked to pathogenesis of oral diseases such as periodontitis (MARSH, 2003). Periodontitis is an inflammatory condition that affects the supporting tissues surrounding teeth, causing bone resorption and ultimately loss of the teeth (GRAVES; JIANG; GENCO, 2000; XIAO et al., 2015). Systemic inflammatory disorders might contribute to disrupting the balance between host and oral microbiome (HAJISHENGALLIS, 2015).

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic, chronic inflammatory and autoimmune disease characterized by damage of soft and hard articular tissues (KOCH, 2007). An increased incidence of periodontitis has been reported in patients with RA (DEMMER et al., 2011; MAYER et al., 2013; SMIT et al., 2012). Furthermore, treatment of periodontal disease reduces RA activity (BIYIKOGLU et al., 2013; MONSARRAT et al., [s.d.]; OKADA et al., 2013; SILVESTRE et al., 2016). These lines of evidence highlights a possible relationship where RA systemic inflammation modulates periodontal destruction and the resulting inflammatory response worsens RA progression. The majority of studies on this relationship implicate specific oral microorganisms, primarily *Porphyromonas gingivalis*, as triggers for RA (DHAOUADI et al., 2007; MIKULS et al., 2014; OKADA et al., 2013; REICHERT et al., 2013; SMIT et al., 2012). The advent of nextgeneration sequencing allows an entire microbial community to be sequenced, providing much more information than culture or targeted DNA studies (CZERNIECKI; WOŁCZYŃSKI, 2011). Until now, only few studies have described the oral microbiota in patients with RA (SCHER et al., 2012b; ZHANG et al., 2015). Zhang examined dental, salivary and gut microbiome but the periodontal status of RA subjects was not defined. Another study have evaluated subgingival microbiota and the periodontal condition of the RA subjects, but is limited

by not examining the impact of RA and periodontitis separately on microbiome composition.

Furthermore, neither of these studies assessed inflammatory parameters in the oral cavity.

Our study aimed to characterize the subgingival microbiome of RA patients and its association with markers of periodontal status, inflammation and RA scores to gain insight into whether these parameters are linked.

## MATERIAL AND METHODS

### Subjects

Two hundred thirty nine patients from Rheumatology Outpatient Clinic of Clinics Hospital of Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil diagnosed with RA, based on the 2010 American College of Rheumatology and EULAR classification criteria (ALETAHA et al., 2010), were evaluated. Forty-three patients were included in the study based on the inclusion criteria: no other rheumatic disease, no treatment for periodontal disease within the last six months, no use of orthodontic appliances, no use of antibiotics within the last three months, pregnancy or lactation and the presence of at least 8 teeth. The RA group was matched for age and gender with 47 subjects without RA or other known rheumatic disease (control group). The subjects gave written informed consent, and the study protocol was approved by the Institutional Ethics Committee.

Patient's medical history and medications were determined. Laboratory assessments (blood levels of IgM rheumatoid factor, C-reactive protein, anti-citrullinated protein antibody (ACPA) and the erythrocyte sedimentation rate) were reviewed. Periodontal status was assessed by two calibrated examiners (JDC and SMM) and the following parameters were recorded: plaque index (PI), probing depth (PD), clinical attachment level (CAL), and bleeding on probing (BOP). Periodontitis was defined as the presence of two or more interproximal sites with PD  $\geq$  4 mm or one site with PD  $\geq$  5 mm (EKE et al., 2012).

### **Sample collection**

Subgingival dental plaque samples were collected as described elsewhere (IMBRONITO et al., 2008). Endodontic paper points (ISO40) (Tunariman, Manacaparu, AM, Brazil) were inserted in the 5 sites with deepest periodontal pockets and kept there for one minute. After removal, the material was stored in a sterile tube containing 500 µL of sterile distilled water and centrifuged at 3,000g for 5 minutes. The paper points were discharged and the pellet was kept at 80°C until DNA extraction.

For saliva collection, patients could not eat or drink an hour before collection procedure. They washed the mouth with pure water and swallowed whole saliva before collection. Saliva was collected by continuous drool into a sterile 50 mL tube for 5 minutes. The unstimulated salivary flow was measured in milliliters per minute (ml/min). The saliva samples were subsequently diluted (1:1) in a phosphate-buffered saline (PBS) solution containing protease inhibitors and subsequently frozen at -80°C until analysis.

### **Cytokines measurement**

Concentrations of interleukin-2 (IL-2), IL-6, IL-17, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) in saliva were determined using a Cytokine Bead Array Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD Biosciences, San Diego, CA) and analyzed on a BD FACS Calibur flow cytometer (Becton, Dickinson and Company). The concentration of IL-33 was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Assays were performed according to the manufacturer's instructions. The results were expressed as picograms of cytokine adjusted according to salivary flow.

## DNA Extraction and Sequencing

Genomic DNA was extract from the samples using the Quick-g DNA MicroPrep kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) and 50 µL (10 mg/ml) of lysozyme per sample for maximal bacterial cell lysis. The quantity and quality of DNA was measured spectrophotometrically (Tecan, Männedorf, Switzerland). The primers 515F (5' -GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') and 806R (5' -GGACTACHVGGGTWTCTAAT- 3') which target the hypervariable V4 region of the 16S rDNA gene were used for amplification (CAPORASO et al., 2012) followed by ethanol precipitation. Amplicons were subjected to Illumina MiSeq Platform at the Next-Generation Sequencing Core of University of Pennsylvania. All Illumina sequence data from this study were submitted to the NCBI Sequence Read Archive (SRA) under BioProject accession number PRJNA325500.

## Microbiome Analysis

Taxonomy was assigned using QIIME software package (CAPORASO et al., 2010b) with UCLUST against CORE(GRIFFEN et al., 2011). Prior to alpha diversity analyses, samples were rarefied, or subsampled, 10 times at each step from 500 to 5,000 sequences with a 500-sequence step-size. Mean alpha diversity was calculated using the Qiime python scripts alpha\_diversity.py and collate\_alpha.py to determine the number of observed species at each sub-sampling depth in the rarefaction analysis as well as the Shannon and Chao1 indices. Beta diversity was calculated using UNIFRAC. Quantification of total bacterial load was determined by real-time PCR using universal primers for 16S rDNA (F: AGAGTTGATCCTGGCTCAG; R: ACGGCTACCTTGTACGACTT) (IDT, Coralville, Iowa, USA). To calculate the exact number of cells, a standard curve was prepared using DNA extracted from a known number of bacterial cells of *Porphyromonas gingivalis*, separated with flow cytometry and amplified with the same qPCR protocol. The standard curve was used to derive the Cq (quantification cycle value) vs log (number of cells) linear equation.

## Statistics

Clinical, demographic, alpha diversity, cytokines levels and bacterial load data were compared using Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test. Correlations between relative abundance of taxa and clinical parameters of periodontal disease and RA were calculated using Spearman correlation coefficients. Relative abundances of Operation Taxonomy Units (OTU) were compared among RA and control subjects and tested for statistical significance using LEFSE (SEGATA et al., 2011). P values <0.05 were considered to indicate statistical significance.

## RESULTS

### **Periodontal destruction in patients with RA.**

Of the 43 patients with RA included in the study, 51% were found to have periodontitis. The mean of RA duration was similar for patients without periodontitis ( $16.18 \pm 8.2$  years) and for those with periodontitis ( $12.46 \pm 9.7$  years). As shown in Table 1, RA disease activity parameters (ESR, CRP and DAS-28) and medications used were not different between RA patients with or without periodontitis. However, we observed that most of the RA (85.7%) subjects with periodontitis were positive for the presence of autoantibodies (ACPA).

RA has a negative impact on periodontal status as we found that periodontal parameters were worse in RA patients compared with control subjects: probing depth (Controls  $3.54 \pm 0.62$  x RA  $4.30 \pm 1.07$  mm), clinical attachment loss (Controls  $3.05 \pm 0.75$  x RA  $4.40 \pm 0.65$  mm) and number of missing teeth (Controls  $4.0 \pm 2.17$  x RA  $7.57 \pm 5.83$ ) (Table 1). These data indicates severe periodontitis in RA patients although hygiene habits and plaque index did not differ among RA patients and healthy subjects.

Table 1 – Demographic and clinical data of patients with RA and healthy control subjects.

	Controls		RA	
	Non-CP	CP	Non-CP	CP
Subjects	27(57.4%)	20(42.6%)	21(48.8%)	22(51.1%)
Females %	36.5	48	53.48	34
Age, years	42.8(±14.0)	46.5(±11.1)	49.9(±11.0)	52.7(±10.0)
Smoking status %	3.8	7.6	4.6	4.6
RA duration, years	n/a	n/a	16.2(±8.2)	12.5(±9.7)
<b>Disease active parameters</b>				
ESR, mm/h, mean	n/a	n/a	19.3(±12.4)	25.6(±18.3)
CRP, mg/l, mean	n/a	n/a	9.3(±5.7)	14.9(±3.2)
Tender joints	n/a	n/a	3.2(±4.0)	3.3(±4.6)
Swallow joints	n/a	n/a	2.5(±0.5)	2.4(±0.9)
DAS28	n/a	n/a	3.5(±1.2)	3.7(±1.5)
<b>Autoantibody status</b>				
IgM-RF positive, %	n/a	n/a	6	7.7
IgM-RF titer, kU/l, mean	n/a	n/a	134(±43)	109(±24)
ACPA positive, %	n/a	n/a	33	<b>85.7*</b>
ACPA titer, kU/l, mean	n/a	n/a	68(±34)	167(±40)
<b>Medications</b>				
Methotrexate, %	n/a	n/a	52.4	52.4
Prednisone, %	n/a	n/a	66.7	66.7
Biological agent, %	n/a	n/a	23.8	19.0
<b>Periodontal parameters</b>				
PD (mm)	2.04(±0.52)	3.54(±0.62)*	<b>2.74(±0.36)†</b>	<b>4.30(±1.07)*#</b>
CAL (mm)	2.61(±0.26)	3.05(±0.75)*	<b>3.05(±0.33)†#</b>	<b>4.40(±0.65)*#</b>
BOP (% sites)	10.0 (±7.55)	8.02(±18.4)	7.48(±1.47)	10.47(±2.5)
Missing teeth (number)	4.0 (±2.17)	4.75(±3.7)	<b>7.57(±5.83)†#</b>	6.57(±3.81)
Plaque Index	0.43(±0.28)	0.91(±0.59)*	0.63(±0.47)	0.67(±0.49)
Tooth brushing (times/day)	2.85(±0.93)	2.62(±0.85)	2.82(±0.5)	2.69(±0.6)
Dental Floss (times/day)	1.06(± 0.94)	0.74(± 0.89)	1.14(±1.13)	1.15(±0.89)

Values were expressed in mean ± SD or percentage

CP: Chronic Periodontitis, BOP: bleeding upon probing, PD probing depth, CAL clinical attachment level, ESR erythrocyte sedimentation rate, CRP c-reactive protein, DAS28: Disease Activity Score, RF rheumatoid factor, ACPA anti-citrullinated protein antibody.

\*Statistically different comparing Non-CP x CP within the same group

# Statistically different comparing RA x Healthy Control group. Kruskal-Wallis test, p<0.05

Several measures of RA were positively correlated with severe periodontitis (Table 2). These included a significant correlation between ESR and clinical attachment loss, and between RF and clinical attachment loss and bleeding on probing. Levels of ACPA were positively correlated with probing depth and clinical attachment loss. It is striking that RF was also significantly correlated with tooth loss, which in adults is most frequently due to periodontal disease (MONTANDON; ZUZA; TOLEDO, 2012; PHIPPS; STEVENS, 1995).

Table 2 – Correlations between periodontal findings and RA parameters (rho values)

	<b>PD mean (mm)</b>	<b>CAL mean (mm)</b>	<b>BOP%</b>	<b>Number of missing teeth</b>	<b>Bacterial load</b>
ESR	-	0.41*	-	0.40*	
CRP	-	-	-		0.41*
RF		0.47*	0.61*	0.50*	
ACPA	0.41*	0.40*			
Accumulated dose of Prednisone (mg)	-	-	-0.35*	-	

BOP: bleeding upon probing, PD: probing depth, CAL: clinical attachment level, CRP: C-reactive protein; IL: interleukin; ESR: Erythrocyte sedimentation rate, RF: rheumatoid factor; ACPA anti-citrullinated protein antibody. \*Spearman rank correlation, p<0.05

### RA affects subgingival microbial load, richness and diversity

We first investigated the total microbial biomass in RA subjects and found that nonperiodontitis RA patients had a significantly higher bacterial burden than did healthy individuals (Figure 1A). We next studied the impact of RA status on microbial diversity and richness by using the Observed species, Chao1 and Shannon indexes. RA significantly affected microbial diversity, which was significantly higher in non-periodontitis sites of healthy subjects compared to RA patients based on observed species and Chao 1 index values (Fig. 1B and C). The microbial diversity estimator (Shannon diversity index) showed that healthy periodontal sites of

RA patients harbored significantly more diverse bacterial communities than control non-periodontitis subjects. Interestingly, the values were high for both healthy individuals with periodontitis and periodontitis sites from RA patients with no difference between them (Fig. 1D).

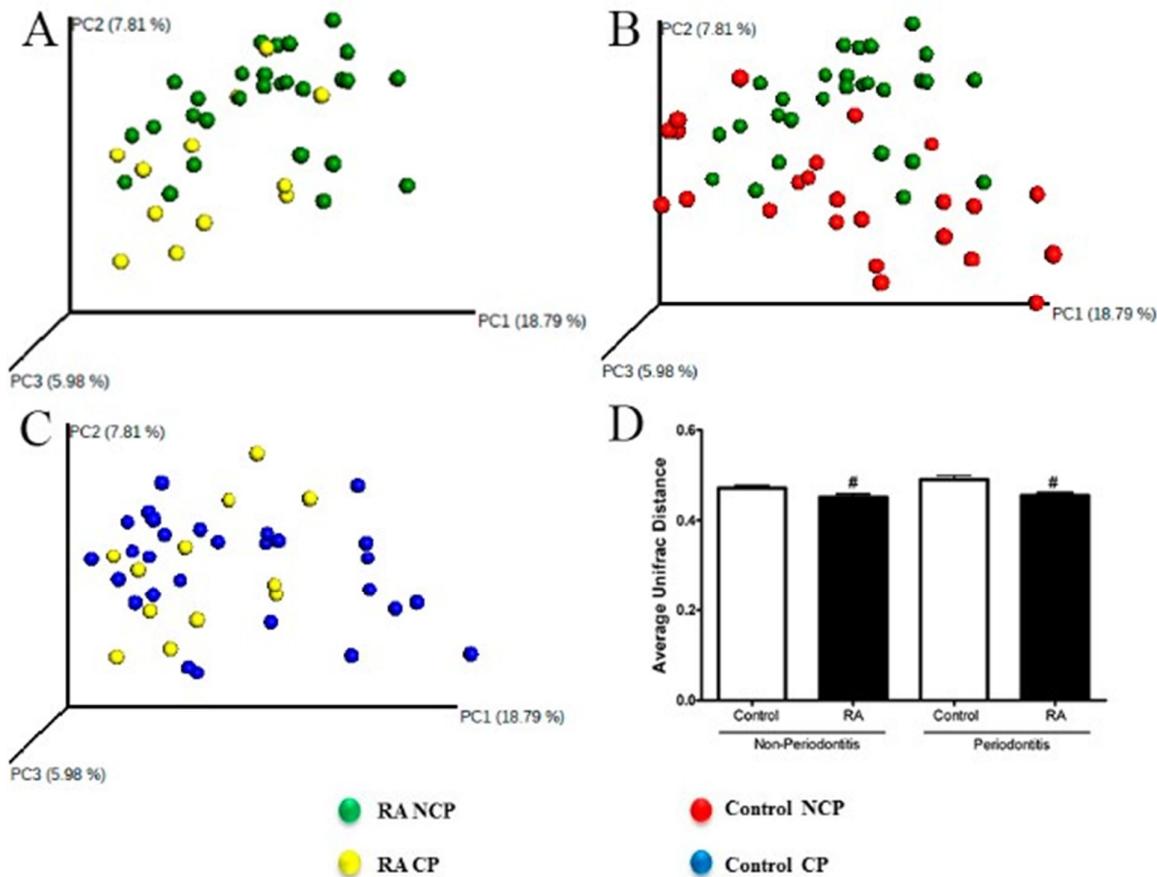


**Figure 1-** Bacterial load and microbial diversity. A) bacterial load, B, C and D) metrics of alpha diversity in Healthy subjects (Control) and RA patients with Periodontitis or Non-Periodontitis. \*Statistically different compared to Non-Periodontitis subjects within the same group. #statistically different compared to Healthy subjects. p<0.05, Kruskal-Wallis. alpha-diversity metrics were calculated after subsampling to obtain equal number of sequences per library.

To analyze whether the subgingival microbial communities in patients with RA was distinct from that controls, we performed unweighted UniFrac distance analysis (Figure 2).

Microbial communities clustering due to RA status, mainly in subjects without periodontitis (Figure 2B and 2C, PERMANOVA, p<0.01). In addition, the average UniFrac distance between

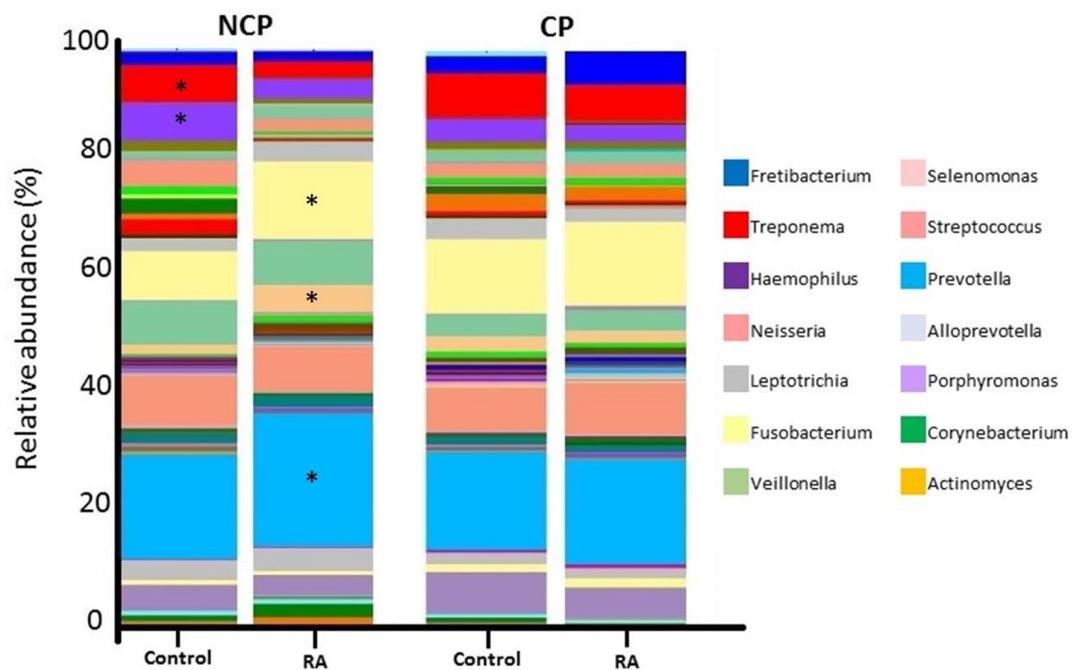
pairs of samples was lower in RA patients compared to control group (Figure 2D), indicating lower heterogeneity in subgingival microbial communities in RA patients with or without periodontitis compared to control group.



**Figure 2** – Comparison of subgingival microbial community composition. Weighted UniFrac analysis was used to generate distances among different samples. Scattered plots were then generated by using principal coordinate analysis. The percentage of variation explained by each principal coordinate (PC) is indicated on the axes. Each point represents a subject. (A) Microbial communities in Non-Periodontitis (NCP) RA patients versus Periodontitis (CP) RA patients. (B) Microbial communities in Non-Periodontitis RA patients versus Non-Periodontitis Control subjects. (C) Microbial communities in Periodontitis RA patients versus Periodontitis Control subjects. (D) Average UniFrac distance between pairs of samples within each group. Error bars indicate standard errors of the means

## Subgingival RA and Control group sites harbor distinct bacterial communities.

Analysis of the relative abundance of microbial taxonomic groups showed that bacterial compositions differed between control and RA sites. Generally, the most pronounced differences were observed between RA and control non-periodontitis sites (Figure 3). The genus *Prevotella* was the most prevalent, representing 18.13% and 23.14% in controls and RA non-periodontitis sites, respectively. Some genera, associated with worse periodontal status (DIAZ; HOARE; HONG, 2016), were over represented in RA non-periodontitis sites compared to controls (*Anaeroglobus* 1.21% x 0.27%, *Fusobacterium* 13.39% x 8.39% and *Selenomonas* 4.70% x 1.97%), while other genera were under represented (*Treponema* 2.84% x 6.28%, *Neisseria* 2.34% x 4.72%, *Haemophilus* 3.42% x 6.50%).

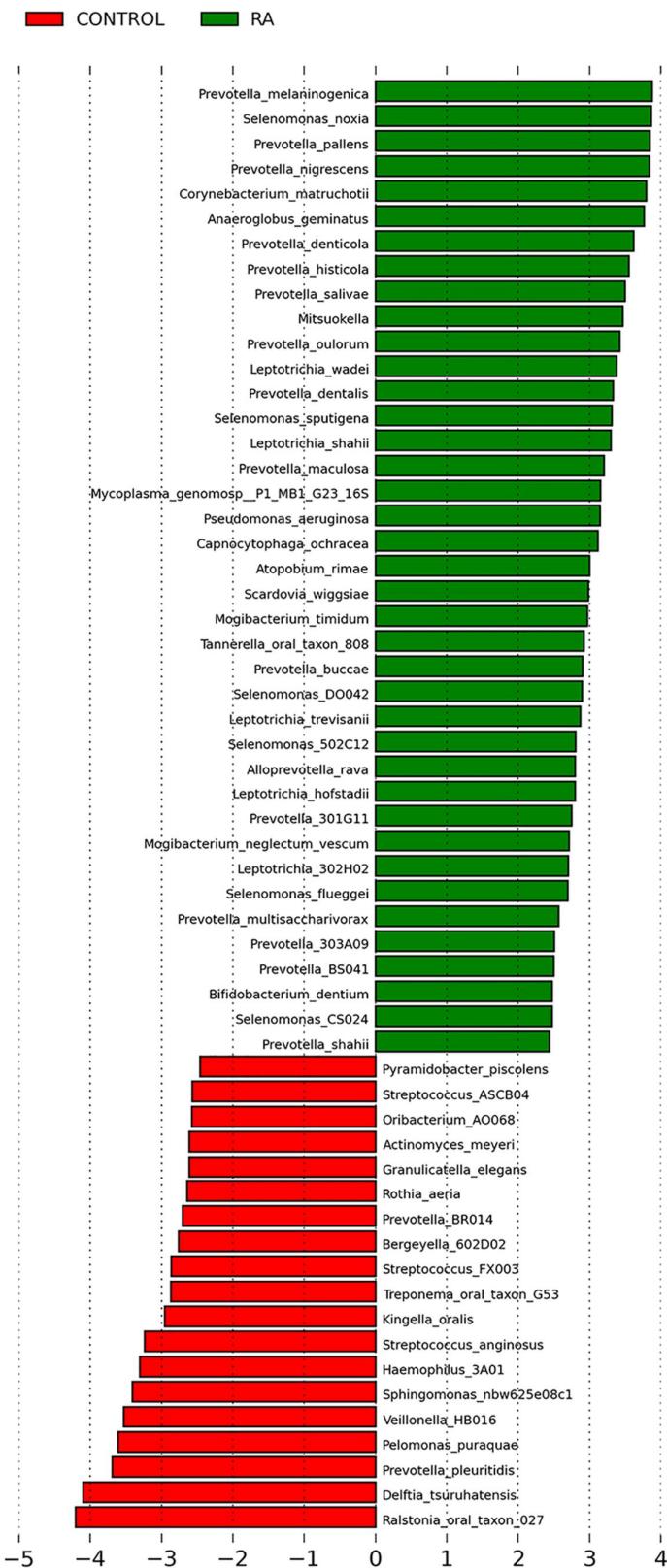


**Figure 3** - The relative abundance of the oral microbiota (genus level) was compared among patients without periodontitis (NCP) and with periodontitis (CP) Controls subjects and Rheumatoid Arthritis patients. \* indicate genus that were statically different between groups, .  $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis

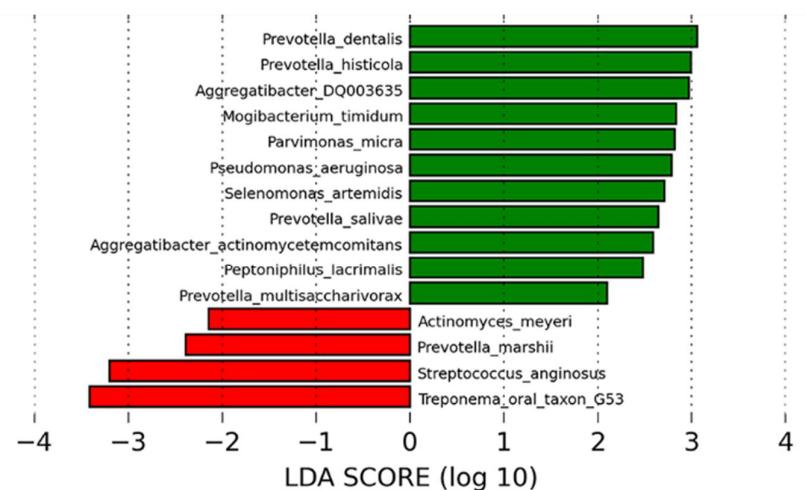
We next aim to identify at the species level the bacterial taxa that were significantly different in the RA patients and Controls. For this objective, we performed LEFSE (linear discriminant analysis coupled with effect size measurements). Surprisingly, RA patients without periodontitis

had enrichment in periodontitis-associated bacteria such as *Prevotella* species (*P. melaninogenica*, *P. denticola*, *P. histicola*, *P. nigrescens*, *P. oulorum*, and *P. maculosa*) and other pathogenic species (*Selenomonas noxia*, *S. sputigena* and *Anaeroglobus geminatus*). In addition, RA subjects presented a reduction of health-associated species (*Streptococcus*, *Rothia aeria*, *Kingella oralis*, *Haemophilus*, *Actinomyces*) (Figure 4A). In the same way, pathogenic species such as *Prevotella*, *Agregaticbacter actinomycetemcomitans* and *Parvimonas micra* were significantly increased in RA patients with periodontitis (Figure 4B).

## A) Non-Periodontitis



## B) Periodontitis



**Figure 4 - OTUs with different relative abundance based on LEfSe results.** Control subjects (Red) and RA samples (Green) in Non-Periodontitis and Chronic Periodontitis subjects. Bars represent linear discriminant analysis scores (LDA).

### Correlations of RA parameters and the presence of oral bacteria species

Table 3 shows interesting correlations between oral bacteria and RA parameters. Bacteria species related to periodontal healthy, such as *Streptococcus* and *Rothia aeria*, in RA subjects without periodontitis were negatively correlated with ACR score, number of tender and swollen joints and blood levels of C-reactive protein. On the other hand, in the same subjects, the presence of pathogenic bacterial species (*Selenomonas* and *Prevotella*) positively correlated with worse RA parameters. This tendency was also observed in RA subjects with periodontitis, as we have found that species such as *Fretibacterium fastidiosum*, *Parvimonas micra* and *Anaeroglobus geminatus* were correlated with worse DAS-28 index and ACR score and higher numbers of swollen and tender joints (Table 3).

Table 3 - Correlations among RA parameters and relative abundance of bacteria in RA patients (rho values)

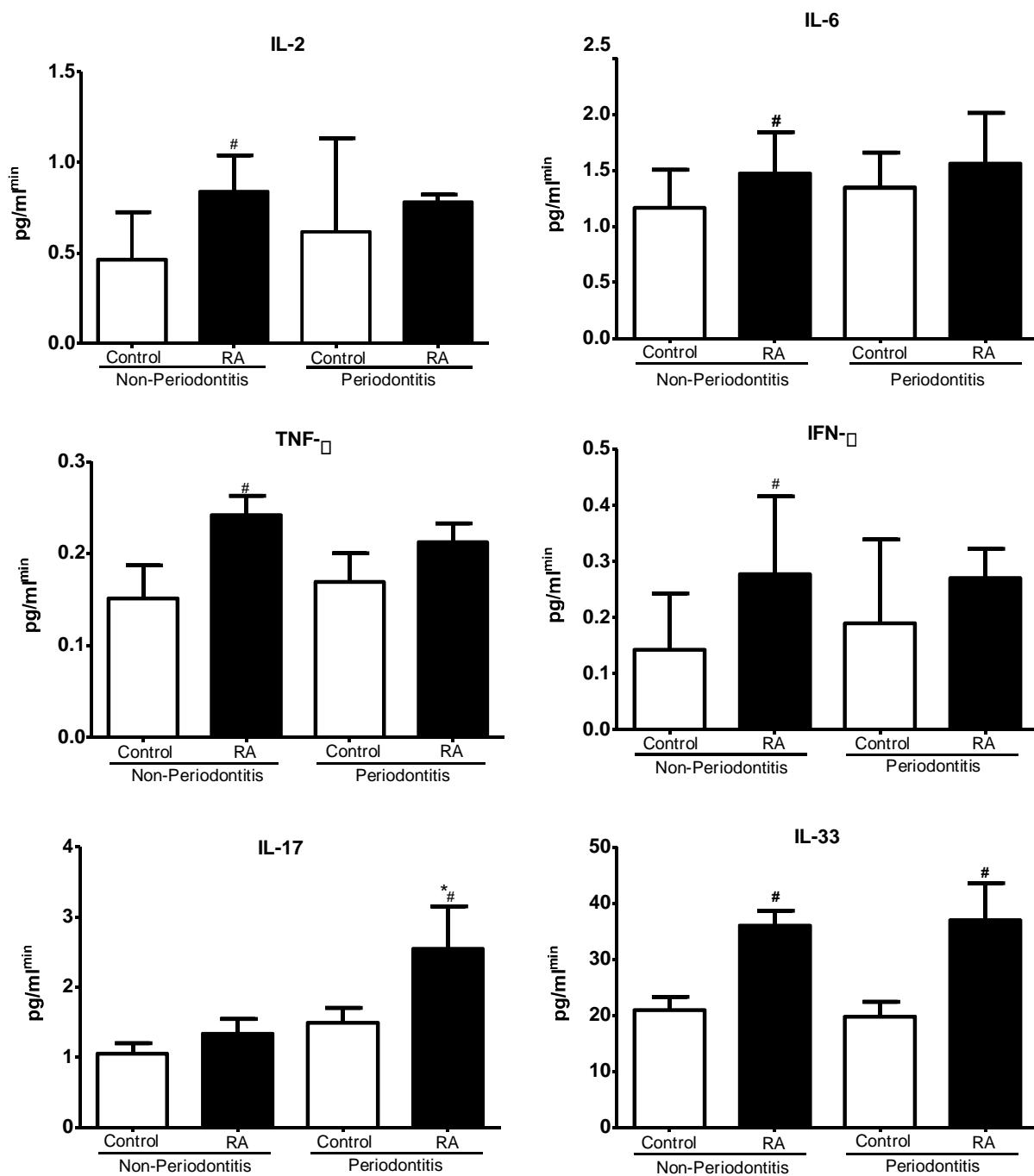
	ACR Score	Tender joints	Swollen joints	CRP (mg/L)
<b>Non-Periodontitis</b>				
<i>Streptococcus sanguinis</i>	-0.31	-0.34	-0.30	
<i>Haemophilus parainflunzae</i>		-0.32	-0.33	-0.30
<i>Rothia aeria</i>	-0.37			-0.30
<i>Streptococcus mitis</i>			-0.41	
<i>Selenomonas</i>				0.48
<i>Prevotella oralis</i>				0.47
<i>Prevotella nigrescens</i>	0.30		0.30	0.30
<b>Periodontitis</b>				
<i>Actinomyces</i>	-0.50	-0.36		
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0.30		0.30	0.30
<i>Fretibacterium fastidiosum</i>	0.36			
<i>Treponema socransky</i>		0.34	0.38	
<i>Parvimonas micra</i>		0.32	0.36	
<i>Anaeroglobus geminatus</i>			0.31	

ACR: American College of Rheumatology; CRP: c-reactive protein.

All values showed were statistically significant at value of p<0.05,  
Spearman rank correlation

### Increased concentrations of inflammatory cytokines in RA patients

To investigate whether the above-mentioned dysbiosis in subgingival microbiota could be associated with an altered inflammatory response we measured cytokines in saliva of RA and control subjects. As shown in Figure 5, the levels of IL-2, IL-6 and IFN- $\gamma$  were increased in saliva from non-periodontitis RA patients. IL-33 and TNF- $\alpha$  were increased in all RA patients independent of periodontal status, while IL-17 was increased only in RA subjects with periodontitis. In no case were salivary cytokine levels in RA subjects lower than the corresponding healthy control (Figure 5).



**Figure 5** – Concentration of inflammatory cytokines in saliva of healthy subjects (Control) and patients with Rheumatoid Arthritis (RA) with Periodontitis and Non-Periodontitis, determined by ELISA and CBA.  
 \*Statistically different compared to Non-Periodontitis subjects within the same group. #statistically different compared to Control. p<0.05, Kruskal-Wallis

The increased levels of these cytokines positively correlated not only with periodontal parameters (PD, CAL and number of missing teeth), as also with RA parameters (ESR, CPR and RF), demonstrated in table 4. These observations were similar when we evaluated the correlations among presence of bacteria and salivary concentration of inflammatory cytokines. As demonstrated in table 4, presence of healthy-related species (i.e. *Streptococcus*) were negative correlated with the levels of cytokines, while presence of pathogenic species, such as *Selenomas* and *Prevotella*, were correlated with increased levels of inflammatory cytokines (IL-2, IL-6, IL17, IL-33 and TNF- $\square$ ).

Table 4 - Correlations among inflammatory cytokines in saliva, relative abundance of bacteria, RA and Periodontal parameters in RA patients (rho values)

	<b>IL-33</b>	<b>IL-2</b>	<b>TNF-<math>\square</math></b>	<b>IL-6</b>	<b>IL-17</b>
<b>RA parameters RF</b>					
	0.80	-	-	-	-
CPR	0.60	-	-	0.32	-
ESR	-	-	-	0.50	-
<b>Periodontal parameters PD</b>					
(mm)	-	-	-	-	0.54
CAL(mm)	-	-	-	-	-
BOP (%)	0.51	-	-	-	-
Missing teeth	-	-	-	0.35	-
<b>Bacteria Rothia</b>					
<i>aeria</i>	-	-	-	-	-0.30
<i>Streptococcus</i>	-	-	-0.46	-	-0.35
<i>Actinomyces</i>	-	-	-0.45	-	-0.41
<i>Haemophilus</i>	-0.35	-	-	-	-
<i>Selenomonas</i>	0.32	-	-	0.38	-
<i>Selenomonas noxia</i>	0.35	-	-	0.35	-
<i>Prevotella oralis</i>	-	0.30	0.31	0.47	0.30
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	-	-	-	0.50	0.35

BOP: bleeding upon probing, PD: probing depth, CAL: clinical attachment level, CRP: C-reactive protein; IL: interleukin; ESR: Erythrocyte sedimentation rate, RF: rheumatoid factor; IL: interleukin; TNF: tumor necrosis factor. All values showed were statistically significant at value of  $p<0.05$ , Spearman rank correlation

## DISCUSSION

A relationship between RA and periodontitis has been known for some time without understanding how the interaction between RA and periodontal disease affect the microbiome

(CORRÊA et al., 2016; DE PABLO et al., 2009; JG et al., [s.d.]; MERCADO; MARSHALL; BARTOLD, 2003; QUEIROZ-JUNIOR et al., 2011; SCHER; ABRAMSON, 2011). In the present study, we show significant differences in the subgingival bacterial community between RA patients and controls. Indeed, RA patients had higher bacterial load, a more diverse microbiome and increased abundance of pathogenic species compared to controls, even in periodontal healthy sites. Accordingly, periodontal destruction (probing depth, clinical attachment loss and missing teeth) was greater in RA subjects and this destruction, together with the presence of pathogenic bacteria in subgingival biofilm, were correlated with worse RA parameters (i.e. ESR, CRP, RF).

Microbiome homeostasis can be modulated by the host through genetic factors, dietary habits, antibiotics and systemic disease or environmental factors (MOLLOY, 2012). Chronic systemic inflammation, as observed in RA, might affect local levels of inflammatory cytokines either directly or indirectly, as we demonstrated here. Indeed, changes in the salivary concentrations of cytokines have consistently been reported for chronic inflammatory diseases, such as systemic lupus erythematosus (MARQUES et al., 2016) and rheumatoid arthritis (MIRRIELES et al., 2010). Previous studies have suggested that periodontitis and RA are possibly interdependent with respect to the elevated levels of pro-inflammatory molecules that likely contribute to the milieu of the gingival crevicular fluid and saliva (AL-KATMA et al., 2007; BIYIKOGLU et al., 2013; ESEN et al., 2012). Saliva is for a major player in microbial homoeostasis in the oral cavity through the modulation of bacterial attachment and growth (VAN et al., 2014) due to the presence of serum-derived factors that affect bacteria (FÁBIÁN et al., 2012; MARCOTTE; LAVOIE, 1998). Inflammatory mediators found in the subgingival microenvironment, such as components in blood, may change the ecological conditions in favor to the outgrowth of pathogenic bacteria species, leading to periodontal destruction (HAJISHENGALLIS, 2014b), what might explain greater susceptibility to periodontitis that we and others researchers have observed in RA patients (SMIT et al., 2012). In agreement with this, studies in mice have shown that induction of RA resulted in severe alveolar bone loss, similar to

that induced by oral infection with the periodontal pathogen *A. actinomycetemcomitans*, and this bone loss was linked to disturbances in oral microbiota of these animals (CORRÊA et al., 2016; QUEIROZ-JUNIOR et al., 2011, 2012). In addition, treating periodontitis appears to improve RA severity along with the decrease of disease activity inflammatory biomarkers such as CRP, ESR and TNF (BIYIKOGLU et al., 2013; ERCIYAS et al., 2013; ORTIZ et al., 2009). These findings are in agreement with our observations that parameters of periodontal disease, such as probing depth and clinical attachment level, were positively correlated with RA parameters (ESR, CRP and cytokines levels).

It is still debatable whether periodontitis is a causative factor in RA or a consequence of the autoimmune process. Studies indicating that periodontitis might be a trigger for RA were focused in the ability of a pathogenic bacteria, *Porphyromonas gingivalis*, to citrullinate arginine residues of proteins by peptidyl arginine deiminases (BARTOLD et al., 2010; SCHER; BRETZ; ABRAMSON, 2014). More specifically, studies identified oral bacterial DNA in serum and synovial fluid of patients with RA, suggesting a close association between joint damage and oral bacteria (MOEN et al., 2006; REICHERT et al., 2013). A possible link between oral bacteria and RA was shown in animal studies in which oral inoculation with *P. gingivalis* and *Prevotella nigrescens* exacerbated arthritis in an experimental model (DE AQUINO et al., 2014). However, the concept of *Porphyromonas gingivalis* as a trigger of RA has not been supported by the only two next generation sequencing studies so far (SCHER et al., 2012b; ZHANG et al., 2015). Although they do suggest that other oral bacteria such as *Prevotella*, *Leptotrichia* and *Anaeroglobus geminatus* are associated with RA or rheumatoid factor and ACPA (SCHER et al., 2012b; ZHANG et al., 2015). Zhang et al. (ZHANG et al., 2015) reported a metagenome-wide association study of the fecal, dental and salivary microbiome of RA patients, revealing that RA-associated microbiome deviates substantially from healthy controls in all sites. In agreement with our results, they found that bacteria that were enriched in control samples correlated negatively with RA index of disease, whereas some bacteria enriched in RA individuals showed positive correlations with RA parameters. Unfortunately, the studies did not investigate whether

differences in the oral microbiota between RA patients and control subjects were associated with periodontal disease.

Finally, we observed that RA subjects without periodontitis harbored increased bacterial biomass, and RA subgingival microbiota, with and without periodontitis, were richer than microbiota from control subjects. Interestingly, we observed a general pattern of enrichment of *Prevotella* species in RA patients. This finding is quite interesting when we look at the metabolic pathways of *Prevotella*, which break down proteins and peptides into amino acids and degrade them further to produce short-chain fatty acids, ammonia, and sulfur compounds (TAKAHASHI, 2015). These metabolites are able to induce tissue inflammation (NIEDERMAN et al., 1997) and to promote apoptosis (KURITA-OCHIAI et al., 2008), contributing to periodontal destruction. In addition, periodontal inflammation will increases the secretion of gingival crevicular fluid, leading to a protein-rich environment, leading to overgrowth of proteolytic bacteria, such as *Prevotella*, keeping the destruction cycle(TAKAHASHI, 2015). These metabolic processes might also be responsible for the correlations among presence of subgingival pathogenic bacteria and worse RA parameters, such as number of tender and swollen joints.

The limitations of our study rely on the cross-sectional design, with only one time measurement. Thus, we are unable to answer the question whether changes in the microbiome are a cause and/or effect of the RA. However, data of missing teeth and worse periodontal scores in RA patients might suggest early occurrence and severity of periodontitis in this population. It reinforces the need of dental assistance and follow-up for patients soon after RA diagnosis, for better disease control, avoiding undesirable outcome of RA and improve the quality of life of this population.

In conclusion, our study is the first to demonstrate the influence of RA on subgingival microbiome using next generation sequence technics and taking into account the periodontal status of the subjects. Our findings support the concept that RA is a state of chronic inflammation that

might be triggered and/or aggravated by the imbalance between pathogenic bacteria/health-related commensal bacteria.

## REFERENCES

1. Kumar PS, Leys EJ, Bryk JM, Martinez FJ, Moeschberger ML, Griffen AL. Changes in Periodontal Health Status Are Associated with Bacterial Community Shifts as Assessed by Quantitative 16S Cloning and Sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44:3665–73.
2. Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N, Silva N, Burleson J a, Strausbaugh LD, et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J.* 2013;7:1016–25.
3. Griffen AL, Beall CJ, Campbell JH, Firestone ND, Kumar PS, Yang ZK, et al. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME J.* Nature Publishing Group; 2012;6:1176–85.
4. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology.* 2003;149:279–94.
5. Graves DT, Jiang Y, Genco C. Periodontal disease: bacterial virulence factors, host response and impact on systemic health. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2000;13:227–32.
6. Xiao W, Li S, Pacios S, Wang Y, Graves DT. Bone Remodeling Under Pathological Conditions. *Front. Oral Biol.* 2015;18:17–27.
7. Hajishengallis G. Periodontitis : from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* Nature Publishing Group; 2015;15:30–44.
8. Koch AE. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 2007;36:5–8.
9. Demmer RT, Molitor JA, Jacobs Jr DR, Michalowicz BS. Periodontal disease, tooth loss and incident rheumatoid arthritis: results from the First National Health and Nutrition Examination Survey and its epidemiological follow-up study. *J Clin Periodontol.* 2011;38:998–1006.
10. Smit M De, Westra J, Vissink A, Doornbos-van der Meer B, Brouwer E, van Winkelhoff AJ. Periodontitis in established rheumatoid arthritis patients: a cross-sectional clinical, microbiological and serological study. *Arthritis Res. Ther.* BioMed Central Ltd; 2012;14:R222.
11. Mayer Y, Elimelech R, Balbir-Gurman A, Braun-Moscovici Y, Machtei EE. Periodontal condition of patients with autoimmune diseases and the effect of anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  therapy. *J. Periodontol.* 2013;84:136–42.
12. Biyikoglu B, Buduneli N, Aksu K, Nalbantsoy A, Lappin DF, Evrenosoglu E, et al. Periodontal therapy in chronic periodontitis lowers gingival crevicular fluid interleukin-1beta and DAS28 in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int.* 2013;33:2607–16.

13. Okada M, Kobayashi T, Ito S, Tomoko Y, Abe A, Murasawa A, et al. Periodontal Treatment Decreases Levels of Antibodies to *Porphyromonas Gingivalis* and Citrulline in Patients With Rheumatoid Arthritis and Periodontitis. *J. Periodontol.* 2013;84:74–84.
14. Monsarrat P, JN V, Cantagrel A, Algans N, Cousty S, Kémoun P, et al. Effect of periodontal treatment on the clinical parameters of patients with rheumatoid arthritis: study protocol of the randomized, controlled ESPERA trial. *Trials.* 14:253.
15. Silvestre F, Silvestre-Rangil J, Bagan L, Bagan J. Effect of nonsurgical periodontal treatment in patients with periodontitis and rheumatoid arthritis: A systematic review. *Med. Oral Patol. Oral y Cir. Bucal.* 2016;0–0.
16. Dhaouadi T, Sfar I, Abelmoula L, Jendoubi-Ayed S, Aouadi H, Ben Abdellah T, et al. Role of immune system, apoptosis and angiogenesis in pathogenesis of rheumatoid arthritis and joint destruction a systematic review. *Tunisie Medicale.* 2007;85:991–8.
17. Reichert S, Haffner M, Keyßer G, Schäfer C, Stein JM, Schaller H-G, et al. Detection of oral bacterial DNA in synovial fluid. *J. Clin. Periodontol.* 2013;40:591–8.
18. Mikuls TR, Payne JB, Yu F, Thiele GM, Reynolds RJ, Cannon GW, et al. Periodontitis and *Porphyromonas gingivalis* in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* (Hoboken, N.J.) [Internet]. 2014 [cited 2014 Nov 10];66:1090–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24782175>
19. Czerniecki J, Wołczyński S. Deep sequencing – a new method and new requirements of gene expression analysis. 2011;25:41–8.
20. Scher JU, Ubeda C, Equinda M, Khanin R, Buischi Y, Viale A, et al. Periodontal disease and the oral microbiota in new-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2012;64:3083–94.
21. Zhang X, Zhang D, Jia H, Feng Q, Wang D, Liang D, et al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nat. Med.* Nature Publishing Group; 2015;1–13.
22. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010;62:2569–81.
23. Eke PI, Page RC, Wei L, Thornton-Evans G, Genco RJ. Update of the Case Definitions for Population-Based Surveillance of Periodontitis. *J. Periodontol.* 2012;1–8.
24. Imbronito AV, Okuda OS, Maria de Freitas N, Moreira Lotufo RF, Nunes FD. Detection of herpesviruses and periodontal pathogens in subgingival plaque of patients with chronic periodontitis, generalized aggressive periodontitis, or gingivitis. *J. Periodontol.* 2008;79:2313–21.
25. Caporaso JG, Lauber CL, Walters W a, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, et al. Ultra-highthroughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* Nature Publishing Group; 2012;6:1621–4.

26. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods.* 2010;7:335–6.
27. Griffen AL, Beall CJ, Firestone ND, Gross EL, DiFranco JM, Hardman JH, et al. CORE: A phylogenetically-curated 16S rDNA database of the core oral microbiome. *PLoS One.* 2011;6:1–10.
28. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol. BioMed Central Ltd;* 2011;12:R60.
29. Montandon A, Zuza E, Toledo BE. Prevalence and reasons for tooth loss in a sample from a dental clinic in Brazil. *Int. J. Dent.* 2012;2012:8–10.
30. Phipps KR, Stevens VJ. Relative contribution of caries and periodontal disease in adult tooth loss for an HMO dental population. *J. Public Health Dent.* 1995;55:250–2.
31. Diaz PI, Hoare A, Hong B. Subgingival Microbiome Shifts and Community Dynamics in Periodontal Diseases. *J. Calif. Dent. Assoc.* 2016;44:397–472.
32. Mercado FB, Marshall RI, Bartold P. Inter-relationships between rheumatoid arthritis and periodontal disease. A review. *J Clin Periodontol.* 2003;30:761–72.
33. de Pablo P, Chapple ILC, Buckley CD, Dietrich T, P de P, IL C, et al. Periodontitis in systemic rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2009;5:218–24.
34. JG R, JD G, Goules A, Charalampakis G, Pikazis D. Autopathogenic correlation of periodontitis and rheumatoid arthritis. *Rheumatol.* 50:1189–93.
35. Queiroz-Junior CM, Madeira MFM, Coelho FM, Costa VV, Bessoni RLC, Sousa LFDC, et al. Experimental arthritis triggers periodontal disease in mice: involvement of TNF- $\alpha$  and the oral Microbiota. *J. Immunol.* 2011;187:3821–30.
36. Corrêa JD, Saraiva AM, Queiroz-Junior CM, Madeira MFM, Duarte PM, Teixeira MM, et al. Arthritis-induced alveolar bone loss is associated with changes in the composition of oral microbiota. *Anaerobe.* 2016;39:91–6.
37. Scher JU, Abramson SB. The microbiome and rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* Nature Publishing Group; 2011;7:569–78.
38. Molloy S. Microbiome: Tipping the balance. *Nat Rev Micro.* Nature Publishing Group; 2012;10:3.
39. Marques CPC, Victor EC, Franco MM, Fernandes JMC, Maor Y, de Andrade MS, et al. Salivary levels of inflammatory cytokines and their association to periodontal disease in systemic lupus erythematosus patients. A case-control study. *Cytokine.* 2016;85:165–70.
40. Mirrieles J, Crofford L, Yushun L, Kryscio R, Dawson D, Ebersole J, et al. Rheumatoid arthritis and salivary biomarkers of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2010;37:1068–74.
41. MK A-K, NF B, JM B, Sue J, AD A, Al-Katma, Mhd Khaldoun, Bissada NF, et al. Control of periodontal infection reduces the severity of active rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol.* 2007;13:134–7.

42. Esen C, BA A, Kirnap M, Akgül O, Isikoglu S, Erel O. The effects of chronic periodontitis and rheumatoid arthritis on serum and gingival crevicular fluid total antioxidant/oxidant status and oxidative stress index. *J Periodontol.* 83:773–9.
43. Van W, Enno H, Arie CIV, Amerongen VN, Ligtenberg AJM. Antimicrobial Defense Systems in Saliva. *2014;24:40–51.*
44. Fábián TK, Hermann P, Beck A, Fejérdy P, Fábián G. Salivary Defense Proteins : Their Network and Role in Innate and Acquired Oral Immunity. *2012;4295–320.*
45. Marcotte H, Lavoie MC. Oral Microbial Ecology and the Role of Salivary Immunoglobulin A. *1998;62:71–109.*
46. Hajishengallis G. The inflamophilic character of the periodontitis-associated microbiota. *Mol. Oral Microbiol.* 2014;29:248–57.
47. Queiroz-Junior CM, Madeira MFM, Coelho FM, de Oliveira CR, Cândido LCM, Garlet GP, et al. Experimental arthritis exacerbates *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced periodontitis in mice. *J. Clin. Periodontol.* 2012;39:608–16.
48. Ortiz P, Bissada N, Palomo L, Han Y, Al-Zahrani M, Panneerselvam A, et al. Periodontal therapy reduces the severity of active rheumatoid arthritis in patients treated with or without tumor necrosis factor inhibitors. *J Periodontol.* 2010;80:535–40.
49. Erciyas K, Sezer U, Üstün K, Pehlivan Y, K B, Sz S, et al. Effects of periodontal therapy on disease activity and systemic inflammation in rheumatoid arthritis patients. *2013;394–400.*
50. Bartold P, Marino V, Cantley M, Haynes D. Effect of *Porphyromonas gingivalis*-induced inflammation on the development of rheumatoid arthritis. *J Clin Periodontol.* 2010;37:405–11.
51. Scher JU, Bretz W a, Abramson SB. Periodontal disease and subgingival microbiota as contributors for rheumatoid arthritis pathogenesis: modifiable risk factors? *Curr. Opin. Rheumatol.* 2014;26:424–9.
52. Moen K, Brun JG, Valen M, Skartveit L, Ribs Eribe EK, Olsen I, et al. Synovial inflammation in active rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis facilitates trapping of a variety of oral bacterial DNAs. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2006;24:656–63.
53. de Aquino SG, Abdollahi-Roodsaz S, Koenders MI, van de Loo F a J, Pruijn GJM, Marijnissen RJ, et al. Periodontal pathogens directly promote autoimmune experimental arthritis by inducing a TLR2- and IL-1-driven Th17 response. *J. Immunol.* 2014;192:4103–11.
54. Takahashi N. Oral Microbiome Metabolism: From “Who Are They?” to “What Are They Doing?” *J. Dent. Res.* 2015;0022034515606045-.
55. Niederman R, Buyle-Bodin Y, Lu Y, Robinson P, Naleway C. Short-chain carboxylic acid concentration in human gingival crevicular fluid. *J Dent Res.* 1997;76:575–9.
56. Kurita-Ochiai T, Seto S, Suzuk N, Yamamoto M, Otsuka K, Abe K, et al. Butyric Acid Induces Apoptosis in Inflamed Fibroblasts. *J Dent Res.* 2008;87:51–5.

**PARTE III ANÁLISE COMPARATIVA DO MICROBIOMA SUBGENGIVAL DE PACIENTES PORTADORES DE LES e AR**

**A presença de LES e AR afetam a diversidade bacteriana subgingival de formas distintas**

Como demonstrado anteriormente, os pacientes com LES apresentaram um aumento na carga bacteriana nos sítios com periodontite comparados aos sítios sem periodontite. Já os pacientes com AR não apresentaram diferenças na carga bacteriana entre sítios sem periodontite e com periodontite. Além disso, não houve diferença na carga bacteriana entre os pacientes com LES e AR (**Figura 8**).

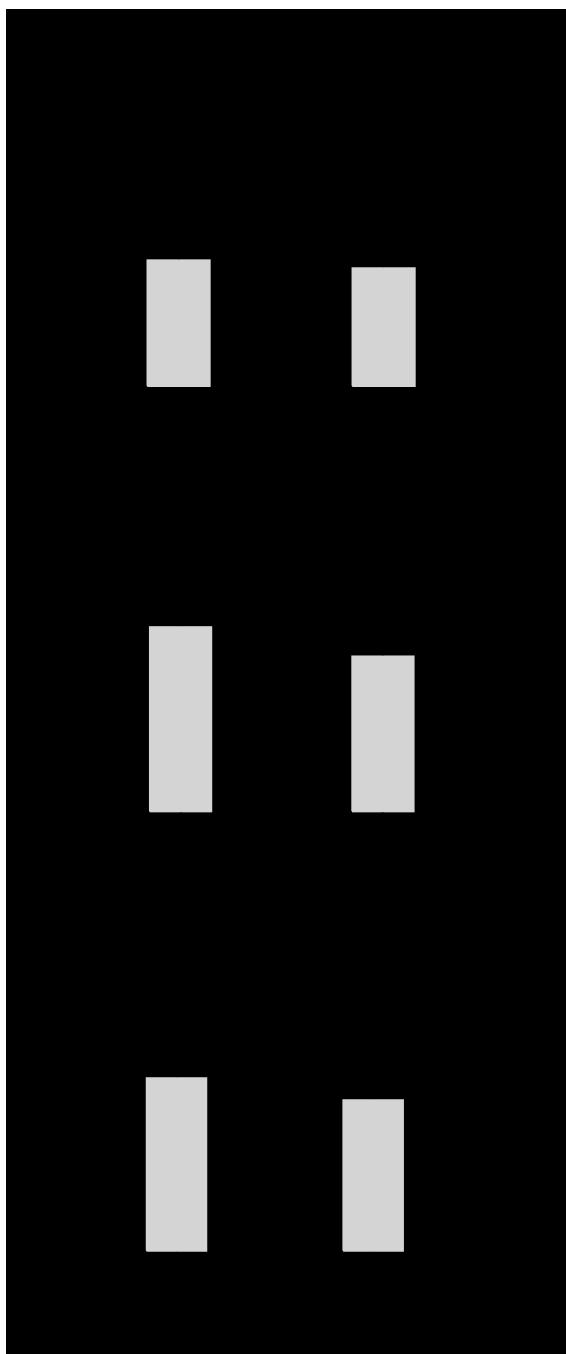


**FIGURA 8 – Carga bacteriana subgengival nos pacientes com LES e nos pacientes com AR.**

LES: pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico; AR: pacientes com Artrite Reumatoide.

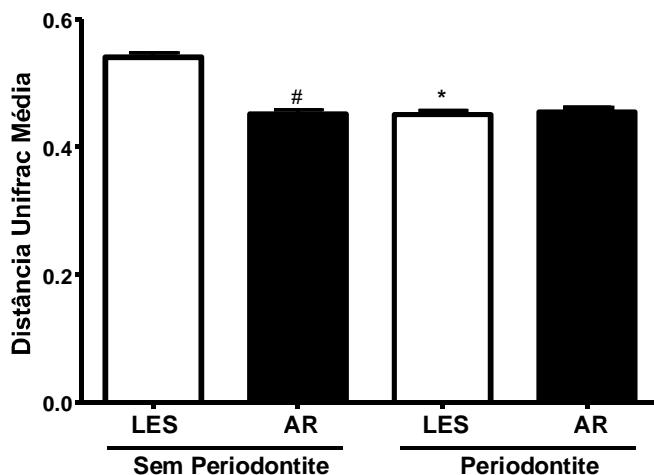
\*Estatisticamente diferente comparado aos sítios sem periodontite no mesmo grupo,  $p<0.05$ , teste Kruskal-Wallis com pós teste Dunn's.

Na análise da diversidade microbiana observamos um aumento do índice Shannon nos pacientes com AR comparados ao grupo LES, tanto nos sítios saudáveis quanto nos sítios com doença periodontal (**Figura 9A**). Além disso, há aumento do número de espécies bacterianas, índice de diversidade Chao1 e Shannon nas amostras com periodontite dos pacientes com AR em comparação aos pacientes com LES (**Figura 9A, B e C**).



**FIGURA 9 – Diversidade bacteriana nas comunidades subgengivais de pacientes com LES e pacientes com AR.** LES: pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico; AR: pacientes com Artrite Reumatoide. \*Estatisticamente diferente comparado aos sítios sem periodontite no mesmo grupo, #Estatisticamente diferente comparado ao grupo LES.  $p<0.05$ , teste Kruskal-Wallis com pós teste Dunn's.

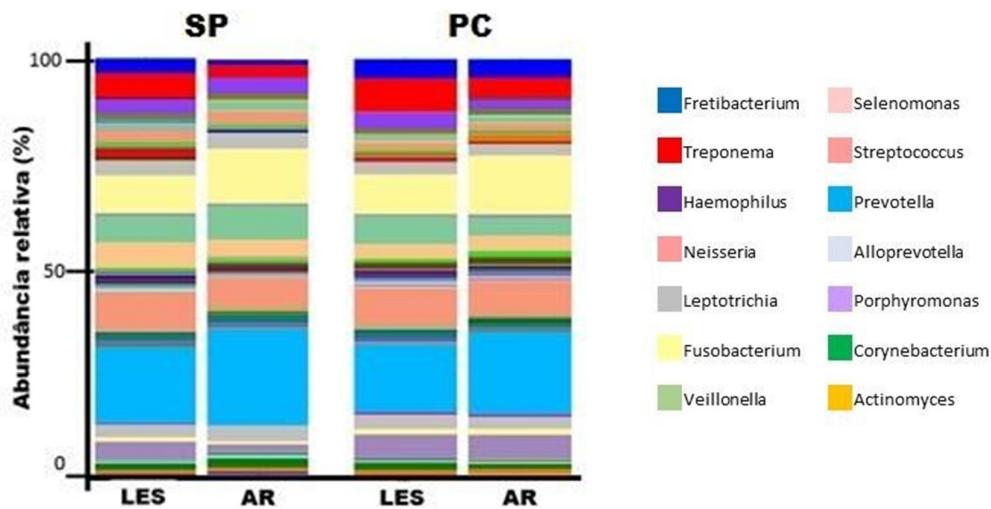
Outro resultado interessante foi a observação que as comunidades microbianas dos sítios sem periodontite se mostraram mais semelhantes entre os indivíduos com AR que nos indivíduos com LES (**Figura 10**).



**FIGURA 10 – Distância UniFrac média entre pares de amostras em pacientes com LES e pacientes com AR.** LES: pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico; AR: pacientes com Artrite Reumatoide. \*Estatisticamente diferente comparado aos sítios sem periodontite no mesmo grupo, #Estatisticamente diferente comparado ao grupo LES.  $p<0.05$ , teste Kruskal-Wallis com pós teste Dunn's.

#### *LES e AR apresentam diferentes composições das comunidades bacterianas subgengivais*

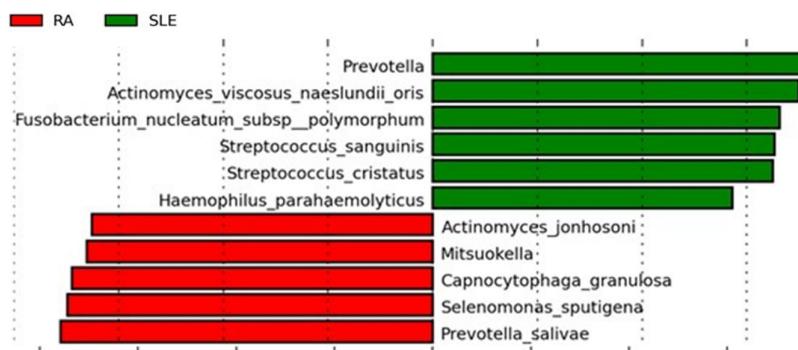
Nós analisamos o impacto do LES e da AR na composição bacteriana subgingival. No nível filogenético gênero nos pacientes com LES há um aumento de *Treponema* (AR 2,8% x LES 5,6%) e *Fretibacterium* (AR 1,7% x LES 3,8%), nos sítios sem periodontite. Nos pacientes com AR há maior representação dos gêneros *Fusobacterium* (LES 9,2% x AR 13,8%) e *Anaeroglobus* (LES 0,3% x AR 1,2%) também nos sítios sem periodontite. Nos sítios com periodontite dos pacientes com LES há maior representação do gênero *Veillonella* (AR 3,6% x LES 6,7%), *Selenomas* (AR 1,8% x LES 3,4%) e *Alloprevotella* (AR 1,9% x LES 3,6%), enquanto os pacientes com AR apresentam aumento de *Fusobacterium* (LES 9,5% x AR 14,9%) (**Figura 11**).



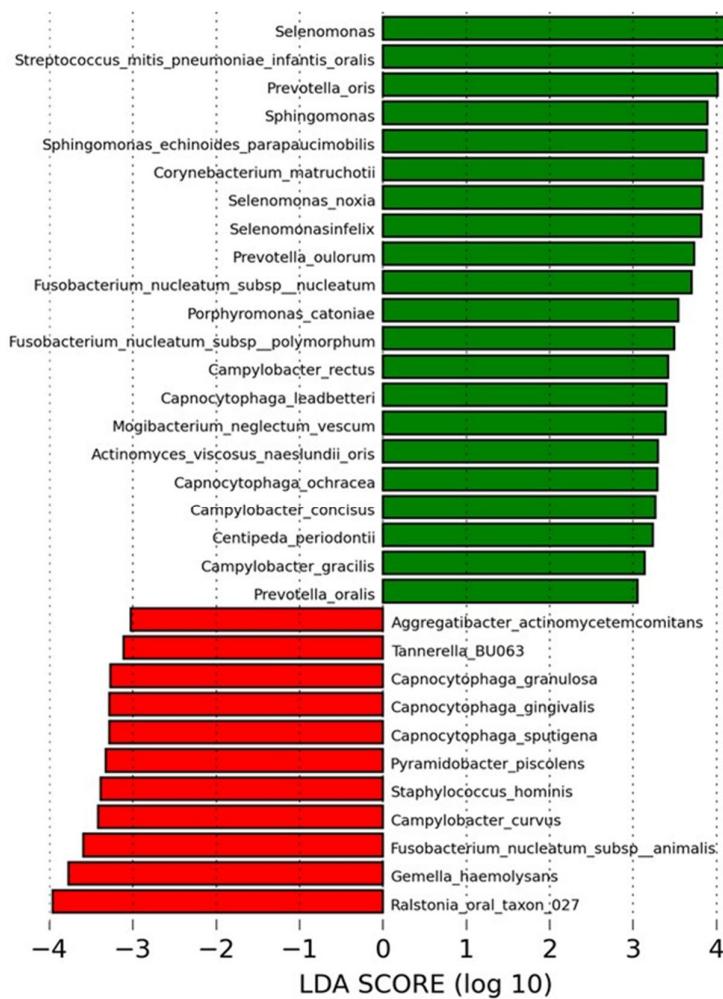
**FIGURA 11 – Comparação da composição bacteriana subgengival (nível gênero) entre os grupos LES e AR.** SP: Sem periodontite; PC: periodontite crônica; LES: pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico; AR: pacientes com Artrite Reumatoide.

Quando analisamos as diferenças entre os grupos ao nível de espécie observamos que nos sítios sem periodontite dos pacientes com LES há um aumento de *Prevotella*, *Actinomyces* e *Streptococcus* (**Figura 12**). Entre os pacientes com AR observou-se um aumento de espécies como *Prevotella salivae* e *Selenomonas sputigena* (**Figura 12**). Já nos sítios com periodontite dos pacientes com LES foi observado uma maior representação de *Prevotella oulorum*, *Selenomas noxia* e *Fusobacterium nucleatum* (**Figura 12**). Os pacientes com AR demonstraram um aumento de espécies como *Agregaticbacter actinomycetemcomitan*, *Tannerella*, *Capnocytophaga* e *Staphylococcus hominis* (**Figura 12**).

### A) Sem periodontite



### B) Periodontite



**FIGURA 12 - Espécies bacterianas com diferentes abundâncias relativas** em amostras de pacientes com Artrite Reumatoide (Vermelho) e amostras de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (Verde) baseada na análise Lefse.

## 6. DISCUSSÃO

Associações entre infecções periodontais e doenças reumáticas tem sido descritas na literatura há séculos (COIT; SAWALHA, 2016; DE PABLO et al., 2009; ROSENBAUM; ASQUITH, 2016; SCHER; LITTMAN; ABRAMSON, 2016), porém não existem ainda respostas conclusivas acerca do papel do microbioma oral nessa possível relação. No presente trabalho, observamos alterações no microbioma subgengival de pacientes com LES e pacientes com AR que podem explicar os achados de **maior frequência e gravidade** de periodontite nesses pacientes. Verificamos ainda uma associação do quadro de inflamação periodontal com piora nos parâmetros clínicos das doenças reumáticas. Os principais resultados deste estudo incluem a **maior carga bacteriana subgengival, alteração da diversidade microbiana** e a transição da composição bacteriana em direção a um **biofilme potencialmente patogênico** caracterizada pelo aumento de espécies associadas à periodontite e depleção/redução de espécies relacionadas a saúde periodontal, nos pacientes com doença reumática, mesmo em sítios sem doença periodontal. Esses resultados sugerem que as doenças reumáticas apresentam impacto significativo na homeostase periodontal, como demonstrado pelo fato de pacientes com LES apresentarem periodontite em idade mais precoce (Controles 46.3 x LES 40.5 anos), e pacientes com LES ou AR apresentarem periodontite mais grave que indivíduos sem doença reumática. Esse fato é reforçado pela alta taxa de perda dentária nesses pacientes, visto que 24% da amostra inicial de pacientes com LES e 47% dos pacientes com AR foram excluídos por não apresentarem pelo menos 8 dentes naturais presentes. Nos pacientes com AR, por apresentarem faixa etária mais alta (média de 52 anos enquanto os pacientes com LES tiveram média de 40 anos), naturalmente se espera um maior edentulismo devido a característica da população brasileira (PERES et al., 2014), mas mesmo nos pacientes incluídos no estudo, pareados por idade com os indivíduos saudáveis, essa proporção de dentes perdidos se mostrou significativamente maior. Esses achados na amostra estudada são semelhantes aos estudos anteriores que também relataram maior prevalência e gravidade da doença periodontal em grupos de pacientes com LES (KOBAYASHI et al., 2003; NAGLER et al., 1999; NOVO et al., 1999) ou AR (CHOI et al., 2016; PISCHON et al., 2008).

Obtivemos ainda, correlações positivas entre os índices de inflamação (sangramento à sondagem) e destruição periodontal (profundidade de sondagem, nível de inserção clínica) e os índices de atividade inflamatória sistêmica e de dano das doenças reumáticas (níveis de proteína creativa, velocidade de hemossedimentação, SLEDAI, ACR score). Esses resultados são similares a estudos anteriores que demonstraram que a presença de periodontite pode ser prejudicial para o prognóstico de doenças reumáticas e que o tratamento da periodontite resulta em melhora dos

parâmetros do LES (FABBRI et al., 2014) e da AR (AL-KATMA et al., 2007; ERCIYAS et al., 2013; PINHO et al., 2009; RIBEIRO et al., 2005).

A presença de AR e LES resultou em aumento da carga bacteriana subgengival, mesmo em sítios sem doença periodontal, e afetou a diversidade das espécies presentes no biofilme subgengival. Geralmente observa-se um aumento da diversidade bacteriana nos sítios periodontais na transição da saúde para doença periodontal (GRIFFEN et al., 2012). Entretanto, nossos resultados mostram que nos pacientes com LES ou AR há uma comunidade microbiana mais diversa nos sítios sem periodontite e que a transição para a doença periodontal resultou em uma diminuição dessa diversidade, padrão geralmente observado em comunidades microbianas intestinais de pacientes com artrite psoriática (SCHER et al., 2015) e doença de Crohn (WALKER et al., 2011). Destaca-se que essa menor diversidade microbiana foi associada com pior prognóstico dessas doenças em estudos anteriores (SCHER et al., 2015; WALKER et al., 2011).

Observou-se também que as comunidades bacterianas dos sítios com periodontite dos pacientes com LES e AR foram mais semelhantes entre si que as comunidades dos indivíduos saudáveis. Neste sentido, um estudo recente (SHI et al., 2015) demonstrou que os sítios com periodontite apresentam comunidades mais próximas filogeneticamente que os sítios saudáveis, sugerindo que sítios doentes apresentam condições ecológicas semelhantes e que condições mais distintas de habitat podem ser encontradas em sítios saudáveis.

A homeostase do microbioma subgengival pode ser modulada por uma variedade de fatores genéticos, hábitos de higiene oral, uso de antibióticos, fatores locais e doenças sistêmicas (UTTER; MARK WELCH; BORISY, 2016). Inflamações crônicas sistêmicas, como observado nos casos do LES e da AR, podem afetar os níveis de mediadores inflamatórios locais, como demonstramos aqui pelo aumento da concentração de citocinas na saliva. De fato, alterações nos níveis salivares dessas moléculas tem sido demonstradas tanto em pacientes com LES (MARQUES et al., 2016) quanto pacientes com AR (MIRRIELEES et al., 2010). Nesse sentido, já foi demonstrado que a saliva desempenha papel importante na homeostase da microbiota oral, modulando o crescimento bacteriano (VAN et al., 2014). Dessa maneira, a presença de mediadores inflamatórios no microambiente subgengival, pode alterar as condições ecológicas locais, provendo fontes de nutrientes em forma de produtos da degradação tecidual e alterando o potencial redox, o que poderá favorecer o crescimento de espécies anaeróbicas e proteolíticas, potencialmente patogênicas (HAJISHENGALLIS, 2015). Em contrapartida, essas alterações na microbiota podem aumentar a inflamação local e a destruição periodontal (MARSH; MOTER; DEVINE, 2011). Dessa maneira pode se afirmar que alterações inflamatórias do hospedeiro são capazes de iniciar a disbiose do biofilme polimicrobiano periodontal, e então é imprescindível reduzir a resposta inflamatória para se ter condições de restaurar a homeostase e a saúde

periodontal (MARSH; HEAD; DEVINE, 2015). Em concordância com esses achados, estudos em modelos animais demonstraram que a indução de AR resulta em perda óssea significativa, similar a induzida pela infecção com o patógeno periodontal *A. actinomycetemcomitans*, e essa perda óssea estava relacionada com alterações da microbiota oral (CORRÊA et al., 2016; QUEIROZJUNIOR et al., 2011). Em adição a esses achados, o tratamento da AR foi capaz de reduzir inflamação periodontal e perda óssea alveolar (QUEIROZ-JUNIOR et al., 2013). Um estudo recente avaliou o microbioma oral de pacientes com AR e, apesar de não avaliarem as condições periodontais desses pacientes, demonstraram que existe uma disbiose no microbioma oral de pacientes com AR comparados com controles saudáveis e que essa disbiose é parcialmente revertida após o tratamento da AR com medicamentos modificadores do curso da doença (em inglês, *Disease Modifying Antirheumatic Drugs*, DMARDs) (ZHANG et al., 2015).

Uma tendência geral observada nos pacientes com doenças reumáticas foi o aumento de espécies consideradas patogênicas (ex: *Prevotella*, *Selenomonas*) e uma depleção/redução de espécies associadas à saúde periodontal (ex: *Streptococcus*) (DIAZ; HOARE; HONG, 2016), mesmo em pacientes sem doença periodontal. Além disso, nos pacientes com LES, a análise de co-ocorrência das espécies bacterianas no biofilme mostrou que bactérias patogênicas se correlacionam positivamente com outras espécies patogênicas (*T. denticola*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, e *Fretibacterium fastidiosum*) e negativamente com espécies associadas a saúde periodontal. Verificamos ainda que a rede de correlações que ocorre no biofilme subgengival de pacientes com LES é maior que nos indivíduos saudáveis. Corroborando nossos achados, Shi et al. (SHI et al., 2015) também demonstraram que no biofilme associado à periodontite as espécies são altamente correlacionadas, mas após o tratamento há uma diminuição dessas correlações, sugerindo que as interações entre espécies patogênicas são essenciais para o processo de doença periodontal. Nossos resultados apontam para a possibilidade de um favorecimento de interações entre espécies microbianas patogênicas na presença do LES que resultariam na ocorrência de periodontite.

A mudança na composição do biofilme subgengival, dos pacientes com LES e AR, mesmo em sítios sem periodontite, pode representar um estado “pró-periodontite”, pois se assemelham mais as condições encontradas nos indivíduos controle (sem doença reumática) com periodontite instalada, implicando o LES e AR como potenciais fatores de risco para o surgimento de periodontite.

A presença de espécies associadas à periodontite como *Prevotella* e *Fretibacterium*, mesmo nos sítios sem doença periodontal, esteve relacionada com piores índices clínicos e inflamatórios do LES (SLEDAI, SLICC e PrCR) e da AR (DAS28, número de articulações doloridas ou edemaciadas, PrCR). Outros estudos já demonstraram possíveis associações entre

essas bactérias patogênicas orais (ex: *Prevotella nigrescens*, *Anaeroglobus* e *P.gingivalis*) e complicações sistêmicas como parto prematuro (KUMAR, 2013), aterosclerose (YAKOB et al., 2011), AR (DE AQUINO et al., 2014; SCHER et al., 2013; SCHER; BRETZ; ABRAMSON, 2014; YEOH et al., 2013) e LES (WANG et al., 2015).

Estudos anteriores tentaram explicar a relação entre periodontite e AR com base na capacidade do periodontopatógeno *Porphyromonas gingivalis* em citrulinar proteínas (HOW; SONG; CHAN, 2016; LUNDBERG et al., 2010). Entretanto, estudos utilizando novas técnicas moleculares para identificação de microrganismos do biofilme oral, não encontraram diferenças na proporção de *P. gingivalis* entre pacientes com AR e indivíduos saudáveis (SCHER et al., 2012a; ZHANG et al., 2015), assim como no presente estudo. Apesar disso, esses autores descrevem uma disbiose da microbiota oral ligada a AR, com algumas espécies sendo mais prevalentes nos pacientes com AR, como o *Anaeroglobus geminatus* (SCHER et al., 2012a), semelhante aos nossos achados. Além disso, a presença de *Anaeroglobus geminatus* esteve correlacionada com maiores níveis de auto anticorpos, sugerindo que a disbiose da microbiota oral pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de doenças reumáticas. Um interessante estudo publicado recentemente aponta o periodonto-patógeno *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*) como a possível ligação entre infecção periodontal e autoimunidade (KONIG et al., 2016). Os autores relatam que o *Aa* é capaz de induzir a hiper-citrulinização de proteínas dos neutrófilos, mimetizando no periodonto as condições de proteínas citrulinadas encontradas nas articulações de pacientes com AR. Além disso, o estudo demonstrou uma forte associação entre a exposição prévia à leucotoxina do *Aa* e a AR (KONIG et al., 2016). Esses dados corroboram nossos resultados que demonstraram que pacientes com AR apresentam maiores proporções de *Aa* em comparação ao grupo controle e também ao grupo LES.

De fato, infecções têm sido consideradas como possíveis gatilhos para doenças autoimunes há vários anos (Rogers 2015). Os possíveis mecanismos pelos quais os microrganismos podem levar a autoimunidade incluem: 1) a presença persistente de patógenos com estimulação de *Heat Shock Proteins* (HSPs), as quais aumentam a imunidade antimicrobiana. Entretanto, com a persistência do estímulo, a resposta do sistema imune aos抗ígenos HSP pode estimular uma resposta auto imune (JEONG et al., 2012); 2) mimetismo molecular, onde a presença de sequências homólogas entre estruturas de proteínas microbianas e proteínas próprias do hospedeiro torna difícil para o sistema imune distinguir o que é próprio do exógeno (PROAL; ALBERT; MARSHALL, 2013); 3) ativação de TLRs: a ativação dos TLRs é feita pela ligação com moléculas associadas a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs), como o LPS, ou moléculas associadas ao dano (*danger-associated molecular patterns*, DAMPs) que são liberadas de células em processo de morte celular (MILLER; ERNST; BADER, 2005). A ativação

dos TLRs leva ao aumento da resposta imune. Foi proposto que a sinergia na ativação de TLRs através de PAMPs microbianos e ligantes endógenos poderia resultar em autoimunidade (LIU et al., 2014). De fato, alguns estudos já demonstraram o envolvimento de TLRs na patogênese do LES (LIU et al., 2006) e da AR (DE AQUINO et al., 2014; ROSE, 2008).

Além dos mecanismos descritos acima, os microrganismos orais podem ser o segundo gatilho em pacientes já susceptíveis à autoimunidade devido ao estado pró-inflamatório crônico (BRUSCA; ABRAMSON; SCHER, 2014).

Apesar do desenho do presente estudo não permitir responder à questão se as alterações da microbiota oral são uma causa ou consequência das doenças reumáticas, os resultados apresentados aqui sugerem uma via de mão dupla, onde a inflamação sistêmica causada pelo LES ou AR induz a disbiose da microbiota subgengival e progressão para periodontite. A periodontite então afetaria a resposta imune sistêmica, levando a maior atividade do LES e da AR. Um estudo longitudinal, onde o mesmo indivíduo seja acompanhado desde o diagnóstico inicial da doença reumática, pode ajudar a responder esses questionamentos. Outra limitação do presente estudo reside no fato do recrutamento de pacientes ter sido realizado dentro de um centro de referência em Reumatologia, pois a grande maioria dos pacientes já foram diagnosticados há muitos anos e estão sob tratamento e controle permanente, apresentando, portanto, menor atividade de doença, mas alto índice de danos sistêmicos decorrentes da evolução do LES ou AR. É importante também ressaltar que existe uma diversidade de formas de analisar os dados de sequenciamento do gene 16s RNA empregando-se diferentes softwares disponíveis. Assim, os resultados encontrados podem variar de estudo para estudo, de acordo com as análises realizadas e as configurações aplicadas.

Um fato interessante é a observação que as doenças reumáticas aqui estudadas, AR e LES, afetam a microbiota de formas distintas. Observamos por exemplo que os pacientes com LES apresentam maior carga bacteriana nos sítios com periodontite. Em contrapartida, os pacientes com AR apresentaram uma diversidade maior nas comunidades bacterianas subgengivais com doença periodontal em relação aos pacientes com LES. Esses achados demonstram a importância de se estudar o impacto de doenças inflamatórias sistêmicas detalhadamente, pois provavelmente as vias que levam a disbiose da microbiota oral em cada caso serão diferentes.

Em síntese, nossos achados embasam o conceito de que as doenças reumáticas induzem um estado de inflamação crônica que pode iniciar e/ou agravar o desequilíbrio entre bactérias patogênicas e espécies comensais associadas a saúde. Estes achados reforçam a necessidade de acompanhamento odontológico de todos os pacientes diagnosticados com doenças reumáticas, para prevenção de doença periodontal e melhor controle e resposta ao tratamento da doença.

reumática. O entendimento da fisiopatologia dos possíveis processos de ligação entre o microbioma oral e doenças reumáticas pode contribuir para detecção precoce de alterações na composição da microbiota associadas às doenças autoimunes, enquanto a correção desses desequilíbrios podem ser úteis no tratamento dessas doenças.

## 7. CONCLUSÃO

A investigação da doença periodontal nos pacientes portadores de doenças reumáticas mostrou que esses pacientes apresentam uma frequência maior de periodontite comparados com uma população sem doença reumática, além de apresentarem uma forma da doença mais avançada e perda dental precoce.

Além disso, os pacientes com AR apresentaram maiores níveis de citocinas inflamatórias na saliva e quando analisamos o impacto da inflamação periodontal nas doenças reumáticas observamos que há uma correlação entre parâmetros clínicos de gravidade da periodontite com aspectos clínicos e inflamatórios do LES e da AR.

Pacientes com doenças reumáticas apresentaram alterações do microbioma subgengival, com alta carga bacteriana, mudanças na diversidade microbiana e modificação das espécies presentes no sulco gengival. Essas alterações foram principalmente caracterizadas pelo aumento de espécies patogênicas e diminuição de espécies bacterianas associadas à saúde periodontal.

Os resultados indicam que a inflamação sistêmica presente nos pacientes com doenças reumáticas como LES e AR pode alterar a composição bacteriana subgengival, levando a um quadro de disbiose da microbiota, a qual pode estar associada à pior condição periodontal observada nestes pacientes. Em contrapartida, a periodontite pode agravar os sinais e sintomas associados ao LES e a AR, interferindo no curso destas doenças.

Como perspectiva clínica dos dados, a avaliação odontológica dos pacientes portadores de LES e AR ou outras desordens inflamatórias sistêmicas pode trazer benefício aos pacientes no que concerne à prevenção e tratamento das alterações periodontais e melhora do controle dos parâmetros sistêmicos. Futuros estudos sobre o papel do microbioma oral nas desordens sistêmicas podem contribuir para o delineamento de estratégias para o tratamento e abordagem multidisciplinar dessas doenças.

## REFERÊNCIAS

- AAS, J. A et al. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5721–32, nov. 2005.
- ABRÃO, A. L. P. et al. What rheumatologists should know about orofacial manifestations of autoimmune rheumatic diseases. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 56, n. 5, p. 441–450, 2016.
- ABUSLEME, L. et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. **The ISME journal**, v. 7, n. 5, p. 1016–25, maio 2013.
- ACKERMANN, K. et al. Microbiological and genetical diagnostics for advanced risk profiles. **Journal of Dental Implantology**, p. 256–266, 2010.
- AL-KATMA, K. et al. Control of periodontal infection reduces the severity of active rheumatoid arthritis. **Journal of Clinical Rheumatology**, v. 13, n. 3, p. 134–137, 2007.
- AL-MUTAIRI, K. et al. Periodontal findings in systemic lupus erythematosus patients and healthy controls. **Saudi Medical Journal**, v. 36, n. 4, p. 463–468, 2015.
- ALETAHA, D. et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. **Arthritis & Rheumatism**, v. 62, n. 9, p. 2569–2581, set. 2010.
- ALJEHANI, Y. A. Risk factors of periodontal disease: review of the literature. **International Journal of Dentistry**, v. 2014, p. 126–30, 2014.
- ANDERSON, J. et al. Rheumatoid arthritis disease activity measures: American College of Rheumatology recommendations for use in clinical practice. **Arthritis Care & Research**, v. 64, n. 5, p. 640–647, 2012.
- ANDRIANKAJA, O. M. et al. Gene expression dynamics during diabetic periodontitis. **Journal of dental research**, v. 91, n. 12, p. 1160–5, 2012.
- ARMITAGE, G. C. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. **Annals of Periodontology**, v. 4, n. 1, p. 1–6, 1999.
- ARNETT, F. C. et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 31, n. 3, p. 315–24, 1988.

- BALATO, A. et al. IL-33 is secreted by psoriatic keratinocytes and induces pro-inflammatory cytokines via keratinocyte and mast cell activation. **Experimental Dermatology**, v. 21, n. 11, p. 892–894, 2012.
- BARTOLD, P. et al. Effect of Porphyromonas gingivalis-induced inflammation on the development of rheumatoid arthritis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 37, n. 5, p. 405–411, 2010.
- BECKER-MEROK, A.; NOSSENT, H. C. Damage Accumulation in Systemic Lupus Erythematosus and Its Relation to Disease Activity and Mortality. **The Journal of Rheumatology**, v. 33, n. 8, p. 1570–1577, 2006.
- BEEN, V.; ENGEL, D. The effects of immunosuppressive drugs on periodontal inflammation in human renal allograft patients. **Journal of periodontology**, v. 53, n. 4, p. 245–248, 1982.
- BIYIKOGLU, B. et al. Periodontal therapy in chronic periodontitis lowers gingival crevicular fluid interleukin-1beta and DAS28 in rheumatoid arthritis patients. **Rheumatology International**, v. 33, p. 2607–2616, 2013.
- BRUSCA, S.; ABRAMSON, S. B.; SCHER, J. U. Microbiome and mucosal inflammation as extra-articular triggers for rheumatoid arthritis and autoimmunity. **Current opinion in rheumatology**, v. 26, n. 1, p. 101–107, 2014.
- CALDERARO, D. C. et al. Há associação entre o lúpus eritematoso sistêmico e a doença periodontal? **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 56, n. 3, p. 280–284, 2016.
- CAMELO-CASTILLO, A. J. et al. Subgingival microbiota in health compared to periodontitis and the influence of smoking. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 119, 2015.
- CAPORASO, J. G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **PNAS**, v. 108, n. suppl.1, p. 4516–4522, 2010a.
- CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, n. 5, p. 335–336, 2010b.
- CAPORASO, J. G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME journal**, v. 6, p. 1621–4, ago. 2012.
- CEKICI, A. et al. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. **Periodontology 2000**, v. 64, n. 1, p. 57–80, 2014.

- CETINKAYA, B. et al. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and patients with chronic periodontitis.
- Journal of Periodontology**, v. 84, n. 1, p. 84–93, 2013.
- CHOI, I. A. et al. Periodontitis is associated with rheumatoid arthritis : a study with longstanding rheumatoid arthritis patients in Korea. **The Korean Journal of Internal Medicine**, v. 31, n. 5, p. 977–86, 2016.
- COIT, P.; SAWALHA, A. H. The human microbiome in rheumatic autoimmune diseases: A comprehensive review. **Clinical Immunology**, v. 170, p. 70–79, 2016.
- COLOMBO, A. P. V. et al. Impact of Periodontal Therapy on the Subgingival Microbiota of Severe Periodontitis: Comparison Between Good Responders and Individuals With Refractory Periodontitis Using the Human Oral Microbe Identification Microarray. **Journal of Periodontology**, v. 83, n. 10, p. 1279–1287, 2012.
- CORRÊA, J. D. et al. Association between polymorphisms in interleukin-17A and -17F genes and chronic periodontal disease. **Mediators of inflammation**, v. 2012, p. 846052, jan. 2012.
- CORRÊA, J. D. et al. Arthritis-induced alveolar bone loss is associated with changes in the composition of oral microbiota. **Anaerobe**, v. 39, p. 91–96, 2016.
- COSTA, F. O. et al. Progression of periodontitis and tooth loss associated with glycemic control in individuals undergoing periodontal maintenance therapy: a 5-year follow-up study. **Journal of Periodontology**, v. 84, n. 5, p. 595–605, 2013.
- CZERNIECKI, J.; WOŁCZYŃSKI, S. Deep sequencing – a new method and new requirements of gene expression analysis. v. 25, n. 38, p. 41–48, 2011.
- DA MOTA, L. M. H. et al. 2011 Consensus of the Brazilian Society of Rheumatology for Diagnosis and Early Assessment of Rheumatoid Arthritis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 51, n. 3, p. 199–219, 2011.
- DA MOTA, L. M. H. et al. 2012 Brazilian Society of Rheumatology consensus for the treatment of rheumatoid arthritis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, n. 2, p. 135–174, 2012.
- DARVEAU, R. P. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 481–490, 2010.
- DE AQUINO, S. G. et al. Periodontal pathogens directly promote autoimmune experimental arthritis by inducing a TLR2- and IL-1-driven Th17 response. **Journal of Immunology**, v. 192, n.

9, p. 4103–11, 2014.

DE ARAÚJO NAVAS, E. A. F. et al. Oral microbial colonization in patients with systemic lupus erythematosus: correlation with treatment and disease activity. **Lupus**, v. 21, n. 9, p. 969–77, 2012.

DE PABLO, P. et al. Periodontitis in systemic rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 5, n. 4, p. 218–224, 2009.

DEMNER, R. T. et al. Periodontal disease, tooth loss and incident rheumatoid arthritis: results from the First National Health and Nutrition Examination Survey and its epidemiological followup study. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 38, n. 11, p. 998–1006, 2011.

DETERT, J. et al. The association between rheumatoid arthritis and periodontal disease. **Arthritis Research & Therapy**, v. 12, n. 5, p. 218, 2010.

DHAOUADI, T. et al. Role of immune system, apoptosis and angiogenesis in pathogenesis of rheumatoid arthritis and joint destruction a systematic review. **Tunisie Medicale**, v. 85, n. 12, p. 991–998, 2007.

DI BENEDETTO, A. et al. Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. **Clinical & Developmental Immunology**, v. 2013, p. 503754, 2013.

DIAZ, P. I.; HOARE, A.; HONG, B. Subgingival Microbiome Shifts and Community Dynamics in Periodontal Diseases. **Journal of California Dental Association**, v. 44, n. 7, p. 397–472, 2016.

EKE, P. I. et al. Update of the Case Definitions for Population-Based Surveillance of Periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 83, n. 12, p. 1449–1454, 2012.

ERCIYAS, K. et al. Effects of periodontal therapy on disease activity and systemic inflammation in rheumatoid arthritis patients. **Oral Diseases**, v. 19, p. 394–400, 2013.

ESEN, C. et al. The effects of chronic periodontitis and rheumatoid arthritis on serum and gingival crevicular fluid total antioxidant/oxidant status and oxidative stress index. **Journal of periodontology**, v. 83, n. 6, p. 773–779, 2012.

FABBRI, C. et al. Periodontitis treatment improves systemic lupus erythematosus response to immunosuppressive therapy. **Clinical Rheumatology**, v. 33, n. 4, p. 505–9, 2014.

FÁBIÁN, T. K. et al. Salivary Defense Proteins : Their Network and Role in Innate and Acquired Oral Immunity. **Internation Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 4295–4320, 2012.

- FERNANDES, E. G. C. et al. Oral health and the masticatory system in juvenile systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 16, n. 9, p. 713–9, 2007.
- FUGGLE, N. R. et al. Hand to mouth: A systematic review and meta-analysis of the association between rheumatoid arthritis and periodontitis. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 1–10, 2016.
- GAFFEN, S. .; HAJISHENGALLIS, G. A New Inflammatory Cytokine on the Block: Re-thinking Periodontal Disease and the Th1/Th2 Paradigm in the Context of Th17 Cells and IL-17. **Journal of Dental Research**, v. 87, n. 9, p. 817–828, 2008.
- GALIMANAS, V. et al. Bacterial community composition of chronic periodontitis and novel oral sampling sites for detecting disease indicators. **Microbiome**, v. 2, n. 1, p. 32, 2014.
- GE, X. et al. Oral Microbiome of Deep and Shallow Dental Pockets In Chronic Periodontitis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 2–11, 2013.
- GHIZONI, J. S. et al. Increased levels of *Porphyromonas gingivalis* are associated with ischemic and hemorrhagic cerebrovascular disease in humans : an in vivo study. **J Appl Oral Sci**, v. 20, n. 1, p. 104–112, 2012.
- GLADMAN, D. et al. The development and initial validation of the systemic lupus international collaborating clinics American College of Rheumatology Damage Index for Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, v. 39, n. 3, p. 363–369, 1996.
- GLADMAN, D. D.; IBAÑEZ, D.; UROWITZ, M. B. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. **The Journal of Rheumatology**, v. 29, n. 2, p. 288–91, 2002.
- GOELDNER, I.; SKARE, T. L.; REASON, I. T. D. M. Artrite reumatoide : uma visão atual. **Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 5, p. 495–503, 2011.
- GOLUB, L. . et al. Can Systemic Diseases Co- induce ( Not Just Exacerbate) Periodontitis? A Hypothetical “Two-hit” Model. **Journal of Dental Research**, v. 85, n. 2, p. 102–105, 2006.
- GRAVES, D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 8 Suppl, p. 1585–1591, 2008.
- GRAVES, D. T. et al. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. **Frontiers of Oral Biology**, v. 15, p. 117–132, 2012.

GRAVES, D. T.; JIANG, Y.; GENCO, C. Periodontal disease: bacterial virulence factors, host response and impact on systemic health. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 13, n. 3, p. 227–232, jun. 2000.

GREENWALD, R. A.; KIRKWOOD, K. Adult periodontitis as a model for rheumatoid arthritis (with emphasis on treatment strategies). **The Journal of Rheumatology**, v. 26, n. 8, p. 1650–3, 1999.

GRICE, E. A; SEGRE, J. A. The Human Microbiome: Our Second Genome\*. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 13, p. 151–170, 2012.

GRIFFEN, A. L. et al. CORE: A phylogenetically-curated 16S rDNA database of the core oral microbiome. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. 1–10, 2011.

GRIFFEN, A. L. et al. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. **The ISME Journal**, v. 6, n. 6, p. 1176–1185, 2012.

HAJISHENGALLIS, G. Complement and Periodontitis. **Biochem Pharmacol**, v. 80, n. 12, p. 1992–2001, 2010.

HAJISHENGALLIS, G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. **Trends in Immunology**, v. 35, n. 1, p. 3–11, 2014a.

HAJISHENGALLIS, G. The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. **Molecular Oral Microbiology**, v. 29, n. 6, p. 248–257, 2014b.

HAJISHENGALLIS, G. Periodontitis : from microbial immune subversion to systemic inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 1, p. 30–44, 2015.

HAJISHENGALLIS, G.; LAMONT, R. J. Dancing with the Stars: How Choreographed Bacterial Interactions Dictate Nososymbiocity and Give Rise to Keystone Pathogens, Accessory Pathogens, and Pathobionts. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 477–489, 2016.

HARLEY, J. B.; JAMES, J. A. Epstein-Barr virus infection induces lupus autoimmunity. **Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases**, v. 64, p. 45–50, 2006.

HEVIA, A. et al. Intestinal Dysbiosis Associated with Systemic Lupus Erythematosus. **mBio**, v. 5, n. 5, p. 1–10, 2014.

- HOCHBERG, M. C. Updating the American College of Rheumatology Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, v. 40, n. 9, p. 1725–1734, 1997.
- HOW, K. Y.; SONG, K. P.; CHAN, K. G. Porphyromonas gingivalis: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–14, 2016.
- IBAÑEZ, D.; GLADMAN, D. D.; UROWITZ, M. B. Adjusted mean Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index-2K is a predictor of outcome in SLE. **Journal of Rheumatology**, v. 32, n. 5, p. 824–827, 2005.
- IMBRONITO, A. V. et al. Detection of herpesviruses and periodontal pathogens in subgingival plaque of patients with chronic periodontitis, generalized aggressive periodontitis, or gingivitis. **Journal of periodontology**, v. 79, n. 12, p. 2313–21, dez. 2008.
- JACOB, N.; STOHL, W. Cytokine disturbances in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Research & Therapy**, v. 13, p. 228, 2011.
- JAKUBOVICS, N. S. Intermicrobial Interactions as a Driver for Community Composition and Stratification of Oral Biofilms. **Journal of Molecular Biology**, v. 427, n. 23, p. 3662–3675, 2015.
- JEONG, E. et al. Predominant immunoreactivity of Porphyromonas gingivalis heat shock protein in autoimmune diseases. **Journal of Periodontal Research**, v. 47, n. 6, p. 811–6, 2012.
- JG, R. et al. Autopathogenic correlation of periodontitis and rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 50, n. 7, p. 1189–1193, [s.d.].
- JORTH, P. et al. Metatranscriptomics of the human oral microbiome during health and disease. **mBio**, v. 5, n. 2, p. 1–10, 2014.
- JOSEFOWICZ, S. Z.; LU, L.-F.; RUDENSKY, A. Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 531–64, 2012.
- KIKKERT, R. et al. Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 22, n. 3, p. 145–151, 2007.
- KOBAYASHI, T. et al. Risk of Periodontitis in Systemic Lupus Erythematosus Is Associated with Fcy receptor polymorphisms. **Journal of Periodontology**, v. 74, n. 3, p. 378–384, 2003.
- KOBAYASHI, T. et al. The combined genotypes of stimulatory and inhibitory Fc gamma receptors associated with systemic lupus erythematosus and periodontitis in Japanese adults. **Journal of Periodontology**, v. 78, n. 3, p. 467–74, 2007.

- KOCH, A. E. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **The New England Journal of Medicine**, v. 36, p. 5–8, 2007.
- KONIG, M. F. et al. Aggregatibacter actinomycetemcomitans-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 369, p. 1–13, 2016.
- KUMAR, P. S. et al. Changes in Periodontal Health Status Are Associated with Bacterial Community Shifts as Assessed by Quantitative 16S Cloning and Sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 3665–3673, 2006.
- KUMAR, P. S. Oral microbiota and systemic disease. **Anaerobe**, v. 24, p. 90–93, 2013.
- KUMAR, P. S. From focal sepsis to periodontal medicine: A century of exploring the role of the oral microbiome in systemic disease. **Journal of Physiology**, 2016.
- KURITA-OCHIAI, T. et al. Butyric Acid Induces Apoptosis in Inflamed Fibroblasts. **J Dent Res**, v. 87, n. 1, p. 51–55, 2008.
- LAZAREVIC, V. et al. Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 79, n. 3, p. 266–271, 2009.
- LI, P.; LIN, W.; ZHENG, X. IL-33 neutralization suppresses lupus disease in lupus-prone mice. **Inflammation**, v. 37, n. 3, p. 824–832, 2014.
- LINDEN, G. J.; HERZBERG, M. C. Periodontitis and systemic diseases: a record of discussions of working group 4 of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. **Journal of periodontology**, v. 40, n. Suppl 14, p. S20-23, 2013.
- LINDEN, G. J.; LYONS, A.; SCANNAPIECO, F. A. Periodontal systemic associations: review of the evidence. **Journal of clinical periodontology**, v. 40 Suppl 1, p. S8-19, abr. 2013.
- LIU, B. et al. TLR4 Up-Regulation at Protein or Gene Level Is Pathogenic for Lupus-Like Autoimmune Disease. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 10, p. 6880–6888, 2006.
- LIU, Y. et al. TLR2 and TLR4 in autoimmune diseases: a comprehensive review. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 47, n. 2, p. 136–147, 2014.
- LOURENÇO, T. G. B. et al. Microbial signature profiles of periodontally healthy and diseased patients. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 41, n. 11, p. 1027–1036, 2014.

- LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, p. 550, 2014.
- LUNDBERG, K. et al. Periodontitis in RA—the citrullinated enolase connection. **Nature reviews. Rheumatology**, v. 6, n. 12, p. 727–730, 2010.
- MACGREGOR, A. J. et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. **Arthritis & Rheumatism**, v. 43, n. 1, p. 30–37, 2000.
- MALCOLM, J. et al. IL-33 Exacerbates Periodontal Disease through Induction of RANKL. **Journal of dental research**, v. 94, n. 7, p. 968–75, 2015.
- MARCOTTE, H.; LAVOIE, M. C. Oral Microbial Ecology and the Role of Salivary Immunoglobulin A. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 1, p. 71–109, 1998.
- MARESZ, K. J. et al. Porphyromonas gingivalis Facilitates the Development and Progression of Destructive Arthritis through Its Unique Bacterial Peptidylarginine Deiminase (PAD). **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 9, p. 1–10, 2013.
- MARQUES, C. P. C. et al. Salivary levels of inflammatory cytokines and their association to periodontal disease in systemic lupus erythematosus patients. A case-control study. **Cytokine**, v. 85, p. 165–170, 2016.
- MARSH, P. D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology**, v. 149, n. 2, p. 279–294, 2003.
- MARSH, P. D.; HEAD, D. A.; DEVINE, D. A. Ecological approaches to oral biofilms: Control without killing. **Caries Research**, v. 49, n. suppl 1, p. 46–54, 2015.
- MARSH, P. D.; MOTER, A.; DEVINE, D. A. Dental plaque biofilms: Communities, conflict and control. **Periodontology 2000**, v. 55, n. 1, p. 16–35, 2011.
- MARTENS, H. A. et al. Analysis of C1q polymorphisms suggests association with systemic lupus erythematosus, serum C1q and CH50 levels and disease severity. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 68, n. 5, p. 715–20, 2009.
- MAYER, Y. et al. Periodontal condition of patients with autoimmune diseases and the effect of anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  therapy. **Journal of Periodontology**, v. 84, n. 2, p. 136–42, 2013.
- MERCADO, F. B.; MARSHALL, R. I.; BARTOLD, P. Inter-relationships between rheumatoid arthritis and periodontal disease. A review. **J Clin Periodontol**, v. 30, n. 9, p. 761–772, 2003.

- MEYER, U. et al. Oral findings in three different groups of immunocompromised patients. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 29, n. 4, p. 153–8, 2000.
- MIKULS, T. R. et al. Periodontitis and Porphyromonas gingivalis in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis & rheumatology**, v. 66, n. 5, p. 1090–100, maio 2014.
- MILLER, S. I.; ERNST, R. K.; BADER, M. W. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 36–46, 2005.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais**. [s.l: s.n.].
- MIRANDA, L. A. et al. Periodontal conditions in patients with juvenile idiopathic arthritis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 30, n. 11, p. 969–974, 2003.
- MIRRIELEES, J. et al. Rheumatoid arthritis and salivary biomarkers of periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 37, p. 1068–1074, 2010.
- MOEN, K. et al. Synovial inflammation in active rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis facilitates trapping of a variety of oral bacterial DNAs. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 24, n. 6, p. 656–663, 2006.
- MOK, C. C.; LAU, C. S. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Journal of Clinical Pathology**, v. 56, n. 7, p. 481–490, 2003.
- MOLLOY, S. Microbiome: Tipping the balance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 3, 2012.
- MONSARRAT, P. et al. Effect of periodontal treatment on the clinical parameters of patients with rheumatoid arthritis: study protocol of the randomized, controlled ESPERA trial. **Trials**, v. 14, p. 253, [s.d.].
- MONTANDON, A.; ZUZA, E.; TOLEDO, B. E. Prevalence and reasons for tooth loss in a sample from a dental clinic in Brazil. **International Journal of Dentistry**, v. 2012, p. 8–10, 2012.
- MOUTSOPoulos, N. M. et al. Subgingival Microbial Communities in Leukocyte Adhesion Deficiency and Their Relationship with Local Immunopathology. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 3, p. e1004698, 2015.
- MUTLU, S. et al. Gingival and periodontal health in systemic lupus erythematosus. **Community dentistry and oral epidemiology**, v. 21, n. 3, p. 158–61, 1993.

- NAGLER, R. M. et al. Generalized periodontal involvement in a young patient with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 8, n. 9, p. 770–772, 1999.
- NAKA, T.; NISHIMOTO, N.; KISHIMOTO, T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. **Arthritis research**, v. 4 Suppl 3, p. S233–S242, 2002.
- NAKASHIMA, C. A. K. et al. Incidence and clinical-laboratory aspects of systemic lupus erythematosus in a Southern Brazilian city. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 51, n. 3, p. 231–239, 2011.
- NALBANDIAN, A; CRISPÍN, J. C.; TSOKOS, G. C. Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts. **Clinical and experimental immunology**, v. 157, n. 2, p. 209–15, ago. 2009.
- NEWMAN, M. G. et al. **Periodontia Clinica**. 10. ed. [s.l.] ELSEVIER, 2007.
- NIEDERMAN, R. et al. Short-chain carboxylic acid concentration in human gingival crevicular fluid. **J Dent Res**, v. 76, n. 1, p. 575–579, 1997.
- NIH HMP WORKING GROUP., PETERSON J, GARGES S, GIOVANNI M, MCINNES P, WANG L et al. The NIH Human Microbiome Project. **Genome Research**, v. 19, n. 12, p. 2317–2323, 2009.
- NOVO, E. et al. Periodontitis and Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies in Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis: A Comparative Study. **Journal of Periodontology**, v. 70, n. 2, p. 185–188, 1999.
- OGRENDIK, M. et al. Serum antibodies to oral anaerobic bacteria in Patients with Rheumatoid Arthritis. **Medscape General Medicine**, v. 7, n. 2, p. 1–9, 2005.
- OGRENDIK, M. Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease caused by periodontal pathogens. **International Journal of General Medicine**, v. 6, p. 383–386, 2013.
- OKADA, M. et al. Periodontal Treatment Decreases Levels of Antibodies to Porphyromonas Gingivalis and Citrulline in Patients With Rheumatoid Arthritis and Periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 84, n. 12, p. 74–84, 2013.
- OLIVEIRA, A. M. S. D. et al. Periodontal therapy and risk for adverse pregnancy outcomes. **Clinical Oral Investigations**, v. 15, n. 5, p. 609–615, 2011.
- OLSEN, I. From the acta prize lecture 2014: the periodontal-systemic connection seen from a microbiological standpoint. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 73, p. 1–6, 2015.

ORTIZ, P. et al. Periodontal therapy reduces the severity of active rheumatoid arthritis in patients treated with or without tumor necrosis factor inhibitors. **Journal of Periodontology**, v. 80, n. 4, p. 535–540, 2009.

OTOMO-CORGEL, J. et al. State of the science: chronic periodontitis and systemic health. **J Evid Based Dent Pract**, v. 12, n. 3 Suppl, p. 20–28, 2012.

OUYANG, W. et al. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 71–109, 2011.

PARK, O.-J. et al. Pyrosequencing Analysis of Subgingival Microbiota in Distinct Periodontal Conditions. **Journal of Dental Research**, 2015.

PERES, M. A. et al. Tooth loss in Brazil: Analysis of the 2010 Brazilian oral health survey. **Revista de Saude Publica**, v. 47, n. SUPPL.3, p. 78–89, 2014.

PÉREZ-CHAPARRO, P. J. et al. Newly identified pathogens associated with periodontitis: a systematic review. **Journal of Dental Research**, v. 93, p. 846–858, 2014.

**Periodontal Epidemiology | Pocket Dentistry.** Disponível em: <<http://pocketdentistry.com/3periodontal-epidemiology/>>. Acesso em: 3 jan. 2017.

PHILLIPS, R. Rheumatoid arthritis: Microbiome reflects status of RA and response to therapy. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 11, n. 9, p. 502–502, 2015.

PHIPPS, K. R.; STEVENS, V. J. Relative contribution of caries and periodontal disease in adult tooth loss for an HMO dental population. **Journal of public health dentistry**, v. 55, n. 4, p. 250–2, 1995.

PICERNO, V. et al. One year in review: the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 33, n. 4, p. 551–558, 2015.

PINHO, M. DE N. et al. Relationship between periodontitis and rheumatoid arthritis and the effect of non-surgical periodontal treatment. **Brazilian Dental Research**, v. 20, n. 5, p. 355–364, 2009.

PISCHON, N. et al. Association among rheumatoid arthritis, oral hygiene, and periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 6, p. 979–986, 2008.

POLYZOS, N. P. et al. Obstetric outcomes after treatment of periodontal disease during pregnancy: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, v. 341, p. c7017–c7017, 2010.

PROAL, A. D.; ALBERT, P. J.; MARSHALL, T. G. The human microbiome and autoimmunity. **Current opinion in rheumatology**, v. 25, n. 2, p. 234–40, 2013.

Proceedings of the 1996 World Workshop in Periodontics. **Annals of periodontology**, v. 1, n. 1, p. 1–947, nov. 1996.

QUEIROZ-JUNIOR, C. M. et al. A controversial role for IL-12 in immune response and bone resorption at apical periodontal sites. **Clinical & Developmental Immunology**, v. 2010, p. 327417, 2010.

QUEIROZ-JUNIOR, C. M. et al. Experimental arthritis triggers periodontal disease in mice: involvement of TNF- $\alpha$  and the oral Microbiota. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 7, p. 3821–30, 2011.

QUEIROZ-JUNIOR, C. M. et al. Experimental arthritis exacerbates Aggregatibacter actinomycetemcomitans-induced periodontitis in mice. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 39, n. 7, p. 608–16, 2012.

QUEIROZ-JUNIOR, C. M. et al. Preventive and therapeutic anti-TNF- $\alpha$  therapy with pentoxifylline decreases arthritis and the associated periodontal co-morbidity in mice. **Life Sciences**, v. 93, n. 9–11, p. 423–8, 2013.

REICHERT, S. et al. Detection of oral bacterial DNA in synovial fluid. **Journal of clinical periodontology**, v. 40, n. 6, p. 591–8, 2013.

REKVIG, O. P.; VAN DER VLAG, J. The pathogenesis and diagnosis of systemic lupus erythematosus: Still not resolved. **Seminars in Immunopathology**, v. 36, n. 3, p. 301–311, 2014.

RHODUS, N. L.; JOHNSON, D. K. The prevalence of oral manifestations of systemic lupus erythematosus. **Quintessence International**, v. 21, n. 6, p. 461–5, 1990.

RIBEIRO, J. et al. Periodontal infection as a possible severity factor for rheumatoid arthritis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, n. 4, p. 412–416, 2005.

ROSA, P. S. LA et al. Hypothesis Testing and Power Calculations for Taxonomic-Based Human Microbiome Data. v. 7, n. 12, p. 1–13, 2012.

ROSAMMA, J. et al. Association between chronic periodontitis and rheumatoid arthritis: a hospital-based case-control study. **Rheumatology International**, v. 33, n. 1, p. 103–109, 2013.

ROSE, N. R. The adjuvant effect in infection and autoimmunity. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 34, n. 3, p. 279–282, 2008.

ROSENBAUM, J. T.; ASQUITH, M. J. The Microbiome: a Revolution in Treatment for Rheumatic Diseases? **Current Rheumatology Reports**, v. 18, n. 10, p. 62, 2016.

RUIZ-ESQUIDE, V.; SANMARTÍ, R. Tabaco y otros factores ambientales en la artritis reumatoide. **Reumatología Clínica**, v. 8, n. 6, p. 342–350, 2012.

SAAD, M. N. et al. Identification of rheumatoid arthritis biomarkers based on single nucleotide polymorphisms and haplotype blocks: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Advanced Research**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2016.

SARAIVA, A. M. et al. Evaluation of IL17A expression and of IL17A, IL17F and IL23R gene polymorphisms in Brazilian individuals with periodontitis. **Human Immunology**, v. 74, n. 2, p. 207–14, 2013.

SAÚDE, M. DA. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas. Artrite Reumatóide. **Portaria SAS/MS nº 710, de 27 de junho de 2013, retificada em 06 de março de 2014 e 10 de junho de 2014**, 2014.

SCHER, J. U. et al. Periodontal disease and the oral microbiota in new-onset rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 64, n. 10, p. 3083–3094, 2012a.

SCHER, J. U. et al. Periodontal disease and the oral microbiota in new-onset rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 64, n. 10, p. 3083–94, 2012b.

SCHER, J. U. et al. Expansion of intestinal Prevotella copri correlates with enhanced susceptibility to arthritis. **eLife**, v. 2013, n. 2, p. 1–20, 2013.

SCHER, J. U. et al. Decreased bacterial diversity characterizes the altered gut microbiota in patients with psoriatic arthritis, resembling dysbiosis in inflammatory bowel disease. **Arthritis & Rheumatology**, v. 67, n. 1, p. 128–39, 2015.

SCHER, J. U.; ABRAMSON, S. B. The microbiome and rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 7, n. 10, p. 569–78, 2011.

SCHER, J. U.; BRETZ, W. A; ABRAMSON, S. B. Periodontal disease and subgingival microbiota as contributors for rheumatoid arthritis pathogenesis: modifiable risk factors? **Current Opinion in Rheumatology**, v. 26, n. 4, p. 424–9, 2014.

SCHER, J. U.; LITTMAN, D. R.; ABRAMSON, S. B. Review: Microbiome in Inflammatory Arthritis and Human Rheumatic Diseases. **Arthritis and Rheumatology**, v. 68, n. 1, p. 35–45, 2016.

- SCOTT, D. L. et al. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 376, n. 9746, p. 1094–108, 2010.
- SEGATA, N. et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. **Genome Biology**, v. 12, n. 6, p. R60, 2011.
- SENNA, E. R. et al. Prevalence of Rheumatic Diseases in Brazil : A Study Using the COPCORD Approach. **Journal of Rheumatology**, v. 31, n. 3, p. 594–7, 2004.
- SEYMOUR, R. A. Effects of medications on the periodontal tissues in health and disease. **Periodontology 2000**, v. 40, p. 120–129, 2006.
- SHI, B. et al. Dynamic Changes in the Subgingival Microbiome and Their Potential for Diagnosis and Prognosis of Periodontitis. **mBio**, v. 6, n. 1, p. e01926-14, 2015.
- SILVA-BOGHOSSIAN, C. M.; LUIZ, R. R.; COLOMBO, A. P. V. Periodontal status, sociodemographic, and behavioral indicators in subjects attending a public dental school in Brazil: analysis of clinical attachment loss. **The Journal of periodontology**, v. 80, n. December, p. 1945–1954, 2009.
- SILVA, T. A. et al. Chemokines in Oral Inflammatory Diseases: Apical Periodontitis and Periodontal Disease. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 4, p. 306–319, 2007.
- SILVESTRE, F. et al. Effect of nonsurgical periodontal treatment in patients with periodontitis and rheumatoid arthritis: A systematic review. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 21, n. 3, p. e349-54, 2016.
- SMIT, M. DE et al. Periodontitis in established rheumatoid arthritis patients: a cross-sectional clinical, microbiological and serological study. **Arthritis Research & Therapy**, v. 14, n. 5, p. R222, 2012.
- SOCRANSKY, S. S. et al. Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 25, p. 134–144, 1998.
- SOUTO, G. R. et al. Pro-inflammatory, Th1, Th2, Th17 cytokines and dendritic cells: a crosssectional study in chronic periodontitis. **PloS One**, v. 9, n. 3, p. e91636, 2014.
- SPARKS, J. A.; COSTENBADER, K. H. Genetics, Environment, and Gene-Environment Interactions in the Development of Systemic Rheumatic Diseases. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 40, n. 4, p. 637–657, 2014.

- STEFANI, F. A. et al. Expression, polymorphism and methylation pattern of interleukin-6 in periodontal tissues. **Immunobiology**, v. 218, n. 7, p. 1012–7, jul. 2013.
- SUSIN, C. et al. Periodontal attachment loss in an urban population of Brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. **The Journal of periodontology**, v. 75, n. 7, p. 1033–1041, 2004.
- SUSIN, C. et al. Occurrence and risk indicators of increased probing depth in an adult Brazilian population. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, n. 2, p. 123–129, 2005.
- SZODORAY, P. et al. Anti-citrullinated protein/peptide autoantibodies in association with genetic and environmental factors as indicators of disease outcome in rheumatoid arthritis. **Autoimmunity Reviews**, v. 9, n. 3, p. 140–143, 2010.
- TACKEY, E.; LIPSKY, P. E.; ILLEI, G. G. Rationale for interleukin-6 blockade in systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 13, n. 5, p. 339–43, 2004.
- TAKAHASHI, N. Oral Microbiome Metabolism: From “Who Are They?” to “What Are They Doing?” **Journal of dental research**, v. 94, n. 12, p. 1628–37, 2015.
- TAYLOR, J. J.; PRESHAW, P. M.; LALLA, E. A review of the evidence for pathogenic mechanisms that may link periodontitis and diabetes. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 40 Suppl 1, p. S113-34, 2013.
- TOLLEFSEN, T.; SALTVEDT, E.; KOPPANG, H. S. The effect of immunosuppressive agents on periodontal disease in man. **Journal of periodontal research**, v. 13, n. 3, p. 240–50, 1978.
- UTTER, D. R.; MARK WELCH, J. L.; BORISY, G. G. Individuality, stability, and variability of the plaque microbiome. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 564, 2016.
- UVA, L. et al. Cutaneous manifestations of systemic lupus erythematosus. **Autoimmune diseases**, v. 2012, p. 834291, 2012.
- VAN, W. et al. Antimicrobial Defense Systems in Saliva. **Monographs in Oral Science**, v. 24, p. 40–51, 2014.
- VAN DYKE, T. E.; VAN WINKELHOFF, A. J. Infection and inflammatory mechanisms. **Journal of clinical periodontology**, v. 40, n. Suppl. 14, p. S1-7, 2013.
- VIEIRA, S.; PAGOVICH, O.; KRIEGEL, M. Diet, microbiota and autoimmune diseases. **Lupus**, v. 23, n. 6, p. 518–26, 2014.

- VILAR, M. J. P.; SATO, E. I. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). **Lupus**, v. 11, n. 8, p. 528–532, 2002.
- VOGEL, RICHARD, I. Periodontal Disease Associated With Amegakaryocytic Thrombocytopenia Systemic Lupus Erythematosus. **Journal of Periodontology**, v. 52, n. 1, p. 20–21, 1981.
- WADE, W. G. Characterisation of the human oral microbiome. **Journal of Oral Biosciences**, v. 55, n. 3, p. 143–148, 2013.
- WALKER, A. W. et al. High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 7, 2011.
- WANG, C.-Y. et al.  $\beta$ 2-Glycoprotein I-Dependent Anti-Cardiolipin Antibodies Associated With Periodontitis in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. **Journal of Periodontology**, v. 86, n. 8, p. 995–1004, 2015.
- WANG, J. et al. Metagenomic sequencing reveals microbiota and its functional potential associated with periodontal disease. **Scientific reports**, v. 3, p. 1843, jan. 2013.
- WU, Y.-Y.; XIAO, E.; GRAVES, D. T. Diabetes mellitus related bone metabolism and periodontal disease. **International Journal of Oral Sciences**, p. 1–10, 2015.
- XIAO, W. et al. Bone Remodeling Under Pathological Conditions. **Frontiers of oral biology**, v. 18, p. 17–27, 2015.
- YAKOB, M. et al. Prevotella nigrescens and Porphyromonas gingivalis are associated with signs of carotid atherosclerosis in subjects with and without periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, v. 46, n. 6, p. 749–55, 2011.
- YANG, Z. et al. Association of increased serum IL-33 levels with clinical and laboratory characteristics of systemic lupus erythematosus in Chinese population. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 11, n. 2, p. 75–80, 2011.
- YEOH, N. et al. The role of the microbiome in rheumatic diseases. **Current Rheumatology Reports**, v. 15, n. 3, p. 314, 2013.
- YIN, Y. et al. Normalization of CD4+ T cell metabolism reverses lupus. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 274, p. 274ra18, 2015.

YOST, S. et al. Functional signatures of oral dysbiosis during periodontitis progression revealed by microbial metatranscriptome analysis. **Genome Medicine**, v. 7, n. 1, p. 27, 2015.

YUCEL-LINDBERG, T.; BÅGE, T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 15, p. e7, 2013.

ZHANG, H. et al. Dynamics of gut microbiota in autoimmune lupus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 24, p. 7551–7560, 2014.

ZHANG, X. et al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. **Nature Medicine**, v. 21, n. 8, p. 895–905, 2015.

ZONANA-NACACH, A. et al. Damage in systemic lupus erythematosus and its association with corticosteroids. **Arthritis and Rheumatism**, v. 43, n. 8, p. 1801–1808, 2000.

**APÊNDICE A: Protocolo de coleta dos dados médicos – Grupo de pacientes com  
lúpus eritematoso sistêmico**

**Protocolo pesquisa – Lúpus eritematoso sistêmico**

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

Data (M0): \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_ Data (M1): \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_ anos

Escolaridade: \_\_\_\_\_ anos estudados

Cor: \_\_\_\_ B \_\_\_\_ P \_\_\_\_ N

Renda familiar média mensal: \_\_\_\_\_ salários – mínimos

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone (s): (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_

Data do diagnóstico do LES: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Tempo de doença:

**Critérios diagnósticos do LES (ACR-1997) – 0: Não; 1: Sim**

( ) Rash malar
( ) Rash discoide
( ) Fotossensibilidade
( ) Úlcera orais
( ) Artrite
( ) Serosite
( ) Nefrite
( ) Psicose/convulsões
( ) ANA (título e padrão)
( ) Hemat.
( ) A
( ) LG (< 4000 2x)
( ) Lyn (< 1500 2x)
( ) Plaq (< 100.000)
( ) Imunológico (anotar títulos)
( ) Anti-DNA _____
( ) Anti-Sm _____
( ) ACL-IgG (duas medidas – intervalo 12 semanas) - título

_____	12 semanas) - título
<input type="checkbox"/> ACL-IGM (duas medidas - intervalo _____)	
<input type="checkbox"/> AL (duas medidas - intervalo 12 semanas)	
<input type="checkbox"/> VDRL _____	

**Comorbidades -0: Não; 1: Sim**

Comorbidades	Outras:
DM – Tipo _____	
HAS  PA (M0): _____ x _____ mmHg  PA (M1): _____ x _____ mmHg	
DAC	
Dislipidemia	
Hipotireoidismo	
Obesidade	
Osteoporose	
HF+ DAC	

**Comorbidades: DM – presente se 2 glicemias > 126, diagnóstico ou uso de hipoglicemiantes**

**HAS – presente de duas medidas de PA > 140x80, diagnóstico ou uso de anti-hipertensivos**

**DAC – presente se sintomas confirmados por CATE ou Cintilografia miocárdica ou angioplastia ou CRVM prévias**

**Dislipidemia – presente se elevação de LDL-c > 130 ou CT> 200 ou TG>150, diagnóstico ou uso de estatinas (anotar mesmo se intermitente/sem tratamento específico)**

**Hipotireoidismo: presente se elevação de TSH com redução de T4L, diagnóstico ou uso de hormônios tireoidianos**

**Obesidade: Baixo peso: IMC<18,5; Peso normal: IMC: 18,5-24,9; Sobrepeso se IMC 25-29,9; Obesidade grau I > 30-34,9; Obesidade grau II: 35-39,9; Obesidade grau III: IMC≥40.**

**Osteoporose: DMO com T-score< -2,5 ou fratura de baixo impacto**

**HF+DAC: parentes de primeiro grau (pais, irmãos, filhos) com DAC**

**Manifestações clínicas -0: Não; 1: Sim**

Manifestação	Prévia	Atual (M0) Visto exame	Atual (M1) Visto durante exame
Serosite (sintomas + radiografia)			
Lesão discoide (ativa)			
Lúpus subagudo (ativo)			
Rash/ Eritema malar (ativo)			
Úlceras mucosas (ativas)			
Vasculite (ativas)			
Nefrite (biópsia ou proteinúria > 0,5 g ou Cilindrúria celular)			
SNC – psicose			
SNC - convulsão			
Pneumonite (sintomas + TC tórax)			
DIP (sintomas + TC tórax)			
Pulmão encolhido (sintomas + TC/ECO normais + RX encolhido)			
Artrite			
Miocardite (sintomas + ECO ou cintilografia miocárdica)			
Linfopenia< 1500 2x			
Leucopenia< 4000 2x			
Anemia hemolítica (COOMBS direto +, LDH ↑, BI↑, reticulocitose)			
Plaquetopenia< 100.000			

TVP confirmada por Doppler (Nº episódios)			
TEP confirmado por cintilografia ou angio-TC (Nº episódios)			
Trombose arterial confirmada por Doppler e não associada a vasculite			
Perda fetal (feto normal) com 10 ou mais semanas			
Nascimento prematuro (< 34 semanas) por eclampsia, pré-eclâmpsia ou insuficiência placentária			
03 ou mais abortamentos < 10 semanas sem outra causa			
Morbidade gestacional (DHEG)			
G____P____A____			
F. Raynaud			
Alopécia			

**Sorologias prévias:**

ANA	
Anti-Sm	
Anti-DNA	
Anti-Ro	
Anti-La	
Anti-RNP	
FR	
ANCA-C	
ANCA-P	
ACL-IgG (duas medidas – intervalo 12 semanas)- Título	

ACL-IgM (duas medidas – Intervalo 12 semanas)- Título	
AL (duas medidas – intervalo 12 semanas)	

Peso: \_\_\_\_\_ Kg. Altura: \_\_\_\_\_ m IMC (peso (Kg)/ (Alt (cm)<sup>2</sup>): \_\_\_\_\_

Circunferência abdominal: \_\_\_\_\_ cm (normal < 85 em homens; < 90 em mulheres)

**Hábitos (0: Não; 1: Sim)**

Tabagismo	Atual: _____	Prévio: _____	Anos-maço: _____	Interrupção: _____
Etilismo	Atual: _____	Prévio: _____	Drinks/semana: _____	Interrupção: _____
Escovação	Sim: _____	Não: _____	_____ Vezes ao dia	
Fio dental	Sim: _____	Não: _____	_____ Vezes ao dia	

**Medicações em uso atual (doses):**

Medicação	Dose M0	Dose M1
Corticoide _____		
Dose acumulada de corticoide (folha anexa)		
Ciclofosfamida		
Metotrexate ( ) SC ( ) Oral		
Carbonato de cálcio		
Mofetil Micofenolato		
Talidomida		
Antimalárico _____		
Ciclosporina		
Azatioprina		
Bisfosfonatos _____		
Vitamina D 3		

**Imunossupressores ou drogas de fundo para LES usados previamente:**

Ciclofosfamida ( )			
Azatioprina ( )			
Ciclosporina ( )			
Metotrexate ( )			
Mofetil micofenolato ( )			
Talidomida ( )			

Dapsona( )			
Pulso Metil ( )			
Dose máxima diária de prednisona			
Antimalárico			

Exames recentes – Data: \_\_\_\_\_

Exame:	Tempo 0	Tempo1
Hb:		
Ht:		
VCM:		
HCM:		
LG		
Neutrófilos		
Linfócitos		
Eosinófilos/ Monócitos		
Plaquetas		
VHS		
PCR (valor de referência)		
Anti-DNA		
C3 (Valor de referência)		
C4 (Valor de referência)		
Ureia		
Creatinina		
Glicemia		
TGO		
TGP		
Albumina		
Colesterol T		
LDL		

HDL		
VLDL		
Triglicérides		
Proteinúria de 24 h		
Clearence de creatinina (medido ou calculado)		

Outros: \_\_\_\_\_

---

Urina rotina – Data:

Densidade:	
Hemoglobina:	
Leucócitos:	
Proteínas:	
Hemácias:	
Piócitos:	
Epitélios:	
Cilindros:	

**Fatores de risco coronarianos: Colesterol T > 200; HDL < 40; LDL > 130; HAS, DM, IMC > 25,**

**Circunferência abdominal > ou = 85 (homens) ou 90 (mulheres); idade > 45 (homens) ou 55 (mulheres), tabagismo, HF + DAC**

**APÊNDICE B: Termo de Consentimento livre e esclarecido dos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico**

**ESTUDO: Doença periodontal e doenças reumáticas: avaliação de associações clínicas, imunológicas, genéticas e microbiológicas**

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

Registro: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Você está sendo convidado a participar desse estudo, pois apresenta um reumatismo chamado lúpus eritematoso sistêmico (lúpus). O seu reumatismo é uma doença autoimune, em que o seu sistema imunológico, responsável por defendê-lo contra substâncias ou agentes estranhos, passa a funcionar mal e a atacar as substâncias e órgãos que pertencem a você.

Sua doença tem períodos em que ela pode estar melhor (inativa), intercalados com períodos em que ela pode estar pior e provocar maiores alterações em diversas partes de seu organismo (atividade). O uso de diversos medicamentos pode ser necessário para o seu tratamento, que também inclui realização periódica de exames de sangue e urina, visitas regulares ao reumatologista e realização de exames de imagem, como radiografias, quando indicados.

A avaliação da presença de atividade ou lesões crônicas (cicatrizes) de sua doença depende dos exames de sangue e da avaliação clínica do seu médico reumatologista, mas hoje há uma série de questionários que permitem uma melhor avaliação, tanto da atividade quanto da presença de lesões provocadas por seu reumatismo.

A ocorrência de doença periodontal, que é uma doença da gengiva e das estruturas que sustentam os dentes, pode ser mais frequente em pacientes com o seu reumatismo. Quando ela não é tratada rapidamente, pode levar a infecções na boca e à perda de dentes. A doença periodontal decorre de uma infecção da gengiva e outras estruturas que mantêm o dente em boca e também envolve a alterações do sistema imunológico. Seu diagnóstico depende da avaliação feita por um dentista com realização de medidas clínicas que avaliam a localização dos dentes, a presença de alterações em sua fixação e a perda de dentes.

Desejamos estudar, nos pacientes que como você, apresentam lúpus e fazem seu tratamento no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a presença e a gravidade da doença periodontal. Desejamos também avaliar se a doença periodontal tem algum efeito sobre o seu reumatismo.

Para realizar este estudo, você, em dia de consulta regular para o tratamento e acompanhamento do seu lúpus, será convidado a participar dele. Se você concordar em participar, será realizada uma consulta usual com médico reumatologista (no caso eu, Débora Cerqueira Calderaro, pesquisadora deste estudo), que incluirá seu exame clínico, conferência dos exames laboratoriais de seguimento usual, aplicação de questionários para avaliação de atividade da doença e encaminhamento para uma avaliação odontológica.

Durante avaliação odontológica, que será realizada pela odontóloga Dra. Santuza Maria Souza Mendonça, será feita avaliação bucal com objetivo de avaliar toda sua boca. Será coletado um pouco de sua saliva quando você mastigará uma borrachinha e recolherá sua saliva em um copinho. Também passaremos em suas bochechas escovinhas com objetivo de coletar o material que está sobre elas. Faremos ainda exame dos dentes e das gengivas. Finalizando, faremos a coleta de amostras de saliva.

No sangue e na saliva serão medidas substâncias que regulam o sistema de defesa do organismo e se associam ao seu reumatismo e à doença periodontal e serão feitos exames para avaliar a possível influência de alterações genéticas sobre o seu reumatismo e/ou doença periodontal.

Se você tiver a doença periodontal, você será encaminhado a ambulatório especializado para o tratamento. Seis meses após terminar esse tratamento, você será reavaliado por seu médico e dentista e fará novos exames de sangue e saliva. O tratamento de seu reumatismo sofrerá alterações apenas se necessário, conforme presença de atividade do mesmo e julgamento clínico de seu médico.

Os resultados do estudo serão divulgados através de apresentação em congressos ou publicação em revistas médicas ou odontológicas e sua identidade não será divulgada de forma alguma.

As vantagens de participar do estudo incluem a avaliação odontológica para pesquisa da doença periodontal, cujo tratamento vai contribuir para a melhoria da sua saúde bucal e pode ajudar no controle e na prevenção de lesões de seu reumatismo. Os exames que serão realizados podem ainda ajudar a entender melhor o seu reumatismo e suas possíveis causas.

A principal desvantagem de participar do estudo inclui os desconfortos associados à avaliação pelo dentista e a colher sangue.

É importante que você entenda que sua participação no estudo é totalmente voluntária e, em qualquer momento, você pode solicitar que seja retirado dele. Caso você não concorde em participar dessa pesquisa, ou quiser interrompê-la, não haverá nenhum prejuízo ao seu tratamento e acompanhamento, os quais continuarão a serem feitos normalmente.

Em caso de dúvidas ou se perceber alguma alteração diferente, você poderá fazer contato com a Dra. Débora Cerqueira Calderaro, médica reumatologista, no telefone (31)9164-9191, Dra. Santuza Mendonça, no telefone (31) 8449-9390, cirurgiã-dentista. A pesquisadora principal do presente estudo é a Dra. Gilda Aparecida Ferreira, telefone: (31) 9617-4211.

O endereço do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, responsável pela aprovação da realização deste estudo, é Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2º Andar – Sala 2005 – UFMG – Campus Pampulha – BH – MG – Brasil, telefone (31) 3409-4592.

Declaro que li e entendi o estudo acima descrito e, de livre e espontânea vontade, concordei em participar dele. Declaro ainda que todas as minhas dúvidas foram prontamente esclarecidas pelas pesquisadoras.

Belo Horizonte, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Paciente  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Pesquisador

## APÊNDICE C: Protocolo de coleta de dados clínicos do grupo controle

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

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_ anos

Escolaridade: \_\_\_\_ anos Cor: \_\_\_\_ B \_\_\_\_ P \_\_\_\_ N

Renda familiar média mensal: \_\_\_\_\_ salários – mínimos

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone (s): (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_

### Comorbidades:

Comorbidades	Outras:	
DM – Tipo ____	Osteoporose	
HAS		
DAC		
Dislipidemia		
Hipotireoidismo		
Obesidade		

**Comorbidades:** DM – presente se 2 glicemias > 126, diagnóstico ou uso de hipoglicemiantes

**HAS –** presente de duas medidas de PA > 140x80, diagnóstico ou uso de anti-hipertensivos

**DAC –** presente se sintomas confirmados por CATE ou Cintilografia miocárdica ou angioplastia ou CRVM prévias

**Dislipidemia –** presente se elevação de LDL-c > 130 ou TG> 200, diagnóstico ou uso de estatinas

**Hipotireoidismo:** presente se elevação de TSH com redução de T4L, diagnóstico ou uso de hormônios tireoidianos

**Obesidade:** Baixo peso: IMC<18,5; Peso normal: IMC: 18,5-24,9; Sobrepeso se IMC 25-29,9; Obesidade grau I > 30-34,9; Obesidade grau II: 35-39,9; Obesidade grau III: IMC≥40.

**Osteoporose:** DMO com T-score< -2,5 ou fratura de baixo impacto

Peso: \_\_\_\_\_ Kg Altura: \_\_\_\_\_ m. IMC: \_\_\_\_\_

### Hábitos (S: sim, N: Não)

Tabagismo	Atual: _____	Prévio: _____	Anos-maço: _____	Interrupção: _____
Etilismo	Atual: _____	Prévio: _____	Drinks/semana: _____	Interrupção: _____
Escovação	Sim: _____	Não: _____	____ Vezes ao dia	
Fio dental	Sim: _____	Não: _____	____ Vezes ao dia	

### Medicações em uso atual (doses):

--	--


## **APÊNDICE D: Termo de Consentimento livre e esclarecido grupo controle**

**ESTUDO: Doença periodontal e doenças reumáticas: avaliação de associações clínicas, imunológicas, genéticas e microbiológicas**

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

Registro: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

O lúpus eritematoso sistêmico é uma doença autoimune que pode levar a uma série de alterações no organismo e tem tendência a acontecer mais frequentemente em uma mesma família. Ele decorre de um mal funcionamento no sistema de defesa do organismo, que começa a atacar várias partes do corpo.

A doença periodontal é uma infecção na gengiva e nos tecidos que sustentam os dente, que pode levar à perda de dentes, mas também a alterações do sistema de defesa do organismo semelhantes às que ocorrem no lúpus e em outros reumatismos.

Algumas alterações genéticas podem associar-se tanto ao lúpus quanto à doença periodontal.

Desejamos pesquisar, em pacientes com lúpus e com doença periodontal, as alterações no sistema de defesa do organismo e genéticas que podem ocorrer nas duas doenças e a influência de uma doença sobre a outra.

Também desejamos avaliar pacientes sem nenhuma das duas doenças para comparar os pacientes doentes com pessoas saudáveis e avaliar se as alterações que encontraremos são realmente devidas às doenças, que é o seu caso.

Se você concordar em participar, você responderá a algumas perguntas sobre o seu estado de saúde, colherá uma amostra de sangue para realização de exames de inflamação no sangue e pesquisa de alterações genéticas, e será avaliado por um dentista experiente, a Dra. Santuza Maria Souza Mendonça, que pesquisará a presença de doença periodontal.

Durante avaliação odontológica, será realizada avaliação oral completa para detectar a presença de doença periodontal, e será coletada saliva, para realização de exames de inflamação.

As vantagens de participar do estudo incluem a pesquisa de alterações que podem associar-se ao risco de desenvolvimento de lúpus sistêmico e o diagnóstico de doença periodontal. No caso desses diagnósticos, você será encaminhado para acompanhamento e tratamento.

A principal desvantagem de participar do estudo inclui o desconforto de colher sangue novamente e realizar o exame odontológico e a coleta de saliva.

Os dados do estudo serão divulgados em congressos e revistas médicos e odontológicos, mas sua identidade não será revelada em hipótese alguma.

É importante que você entenda que sua participação no estudo é totalmente voluntária e, em qualquer momento, você pode solicitar que seja retirado dele. Se você não concordar em participar nessa pesquisa, ou optar em deixá-la, não haverá nenhum prejuízo à realização de tratamento e acompanhamento que venham a ser necessários.

Em caso de qualquer dúvida ou se perceber alguma alteração diferente, você poderá fazer contato com as Dras. Débora Cerqueira Calderaro, médica reumatologista, no telefone (31) 9164-9191, ou Santuza Mendonça, odontóloga (dentista), no telefone (31) 8449-9390. A pesquisadora principal do presente estudo é a Dra. Gilda Aparecida Ferreira, telefone: 9617-4211.

O endereço do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, responsável pela aprovação da realização deste estudo, é Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2º. Andar – Sala 2005 – UFMG – Campus Pampulha – BH – MG – Brasil, telefone (31) 3409-4592.

Declaro que li e entendi o estudo acima descrito e, de livre e espontânea vontade, concordei em participar dele. Declaro ainda que todas as minhas dúvidas foram prontamente esclarecidas pelas pesquisadoras.

Belo Horizonte, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Paciente  
\_\_\_\_\_

Pesquisador  
\_\_\_\_\_

## APÊNDICE E: Protocolo de coleta dos dados odontológicos

### EXAME BUCAL

Nome:	Registro:
Data:	No.na pesquisa:

### 1) AVALIAÇÃO DA XEROSTOMIA

Escala 0-10										
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dificuldade na fonação devido boca seca?										
Dificuldade de deglutição devido boca seca?										
Relação de quantidade de saliva na boca										
Relação de secura na garganta										
Relação de secura dos lábios										
Relação de secura da língua										
Relação do nível de sede										

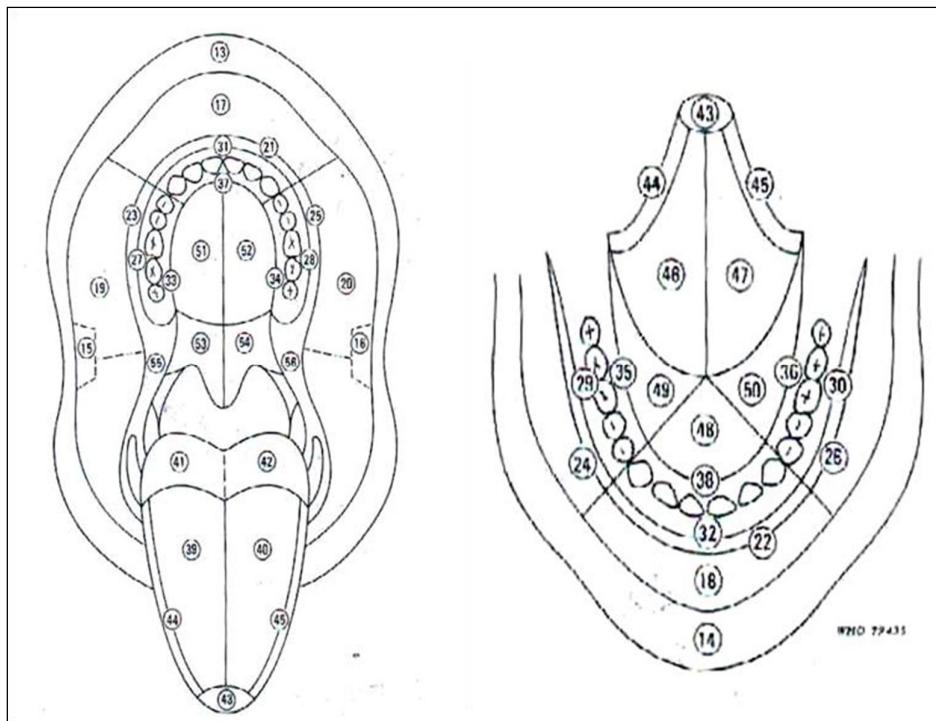
### 2) CARACTERIZAÇÃO DA SALIVA

Viscosidade	( ) viscosa	( ) fluida
Coloração	( ) presença de pigmento	( ) ausência de pigmento
Turbidez	( ) turva	( ) translúcida

### 3) SIALOMETRIA

		Volume Total (VT)		Volume Minuto (VM)	
Sialometria em repouso		mL/5 minutos		mL/minuto	
Sialometria sob estímulo		mL/5 minutos		mL/minuto	
Volume	( ) normal	( ) Hipossalivação leve	( ) Hipossalivação moderada	( ) Hipossalivação severa	( ) Sialorréia

#### **4) EXAME DA MUCOSA BUCAL**



## AVALIAÇÃO DA MUCOSA BUCAL

( ) Ausência de lesão de mucosa

( ) Presença de lesão de mucosa

TIPO DE LESÃO	LOCAL DA LESÃO (Indique o número)
( ) Mancha ou mácula	
( ) Placa	
( ) Erosão	
( ) Úlcera ou ulceração	
( ) Pápulas	
( ) Vesícula ou bolha	
( ) Nódulos	
Nome:	Registro:
Data:	No.na pesquisa:

**5) AVALIAÇÃO PERIODONTAL**

**5.1) Índice de placa**

DENTE	SUPERFÍCIE	SCORE SUPERFÍCIE	DA	SCORE DENTE	SCORE PACIENTE
16	Vestibular				
	Lingual				
	Mesial				
	Distal				
12	Vestibular				
	Lingual				
	Mesial				
	Distal				
24	Vestibular				
	Lingual				
	Mesial				
	Distal				
36	Vestibular				
	Lingual				
	Mesial				
	Distal				
32	Vestibular				
	Lingual				
	Mesial				
	Distal				
44	Vestibular				
	Lingual				
	Mesial				
	Distal				

**Índice de Placa/Paciente:** \_\_\_\_\_



## ANEXOS

### CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 03128012.0.0000.5149

Interessado(a): Profa. Gilda Aparecida Ferreira  
Departamento de Aparelho Locomotor  
Faculdade de Medicina – UFMG

### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 22 de agosto de 2012, o projeto de pesquisa intitulado "**Doença periodontal e doenças reumáticas: avaliação de associações clínicas, imunológicas, genéticas e microbiológicas**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral  
Coordenadora do COEP-UFMG

