



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO**  
**Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia)**

**DIANA ESTEFANÍA RAMOS PEÑA**

**Microbiota da doença periodontal em pacientes infectados pelo HIV-1**

**Versão corrigida**

**PG.PERIO**  
FOP - USP

**RIBEIRÃO PRETO**

**2021**

DIANA ESTEFANÍA RAMOS PEÑA

**Microbiota da doença periodontal em pacientes infectados pelo HIV-1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção de título de Mestre em Odontologia (Periodontia).

Área de concentração: Periodontia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Fragoso Motta

RIBEIRÃO PRETO

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

## Catálogo da Publicação

**Biblioteca Central do Campus USP – Ribeirão Preto**

**Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**

Versão corrigida da Dissertação/Tese. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa

Peña, Diana Estefanía Ramos

Microbiota da doença periodontal em pacientes infectados pelo HIV-1/ orientadora Ana Carolina Fragoso Motta. Ribeirão Preto - São Paulo, 2021.

**119 p.: il**

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Periodontia.

Orientador: Motta, Ana Carolina Fragoso.

1. Periodontite. 2. Infecções por HIV 3. Desbridamento Periodontal. 4. Microbiota

## FOLHA DE APROVAÇÃO

PEÑA, Diana Estefanía Ramos

Título: **Microbiota da doença periodontal em pacientes infectados pelo HIV-1.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Odontologia (Periodontia).

Aprovado em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / 2021

### Banca Examinadora

Prof. (a). Dr. (a). \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_  
Julgamento: \_\_\_\_\_  
Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. (a). Dr. (a). \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_  
Julgamento: \_\_\_\_\_  
Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. (a). Dr. (a). \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_  
Julgamento: \_\_\_\_\_  
Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. (a). Dr. (a). \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_  
Julgamento: \_\_\_\_\_  
Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. (a). Dr. (a). \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_  
Julgamento: \_\_\_\_\_  
Assinatura: \_\_\_\_\_

---

**DEDICATÓRIA**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha família, especialmente à minha mãe, quem tem me apoiado no meu sonho de estudar no exterior, sendo a maior incentivadora da minha carreira, e meu maior exemplo de superação. Às minhas irmãs e meu irmão, por sempre me apoiar e cuidar da irmã caçula esquecida e desligada que sou, e aos meus sobrinhos, que têm sido minha maior companhia durante esses anos, mesmo na distância.

---

**AGRADECIMENTOS**



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela minha vida, por ter permitido que eu tivesse saúde para não desistir do meu futuro, e por me permitir completar hoje este trabalho.

A minha mãe e irmãos, que me incentivaram em todo momento e compreenderam a minha ausência enquanto me dedicava à realização deste trabalho e à formação da minha carreira profissional.

À minha orientadora, profa. Dra. Ana Carolina Fragoso Motta, por ter me dado a oportunidade de trabalhar juntas e formar parte da sua equipe de trabalho, por sempre ter a paciência de resolver minhas dúvidas e me guiar no caminho a ser uma melhor profissional e ser humano.

Ao prof. Dr. Cassio do Nascimento, por toda ajuda e colaboração no desenvolvimento deste trabalho, e pelo acolhimento e confiança que recebi no seu laboratório de pesquisa.

Ao técnico do Centro de Sequenciamento de Ácidos Nucleicos, Emerson Santos. Por ter sido uma peça fundamental na execução desse trabalho. Agradeço sua dedicação e amizade durante e após os meses dedicados às análises desse trabalho.

Aos meus amigos e colegas de pós-graduação, por todo o companheirismo formado durante esses anos, pelo apoio durante os momentos de estresse, por sempre me incluir e me fazer sentir como em casa, e principalmente pelas amizades que levo para o resto da vida.

À Rafaella Scannavino, por ser minha colega, amiga, companheira de apartamento e família durante os anos de especialização e mestrado.

Ao Thiago Brieger, pelo companheirismo, amizade, compreensão e amor compartilhado durante os últimos anos.

À toda a equipe que compõe o Departamento de Cirurgia BucoMaxiloFacial e Periodontia da FORP-USP, professores, funcionários e técnicos de laboratório, por sua disponibilidade e dedicação para todos os alunos de pós-graduação. Pelo acolhimento e apoio que tive dentro do departamento como aluna estrangeira.

À CAPES, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos que, direta ou indiretamente, participaram ou contribuíram para a execução deste trabalho, muito obrigada.



## RESUMO

PEÑA, D. E. R. **Microbiota da doença periodontal em pacientes infectados pelo HIV-1.** 2021. X p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Os efeitos da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) e a introdução da terapia antirretroviral têm trazido mudanças na evolução da doença periodontal, não entanto estudos sobre a influência do HIV-1 na microbiota periodontal ainda são escassos. Foram analisadas amostras de pacientes incluídos em um estudo quase experimental com o objetivo de determinar o perfil microbiológico de pacientes com periodontite infectados e não infectado pelo HIV-1 submetidos a terapia periodontal não cirúrgica. Foram avaliados os perfis bacterianos de amostras de biofilme subgingival coletadas de sítios saudáveis e sítios com doença periodontal de pacientes com periodontite infectados (n=18) e não infectados (n=14) pelo HIV-1 que receberam terapia periodontal não cirúrgica (TPNC), utilizando a técnica de sequenciamento do gene 16S rRNA. As amostras foram coletadas em três tempos, baseline, 30 dias e 90 dias após o TPNC. Nas amostras do grupo HIV foram realizadas associações entre o perfil microbiano e contagens de linfócitos T CD4+ e níveis de carga viral. Os resultados indicaram que ambos os grupos apresentaram classificação da doença por estágio e grau semelhantes. *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Veillonella* e *Prevotella* foram os gêneros mais abundantes encontrados nas amostras de ambos os grupos. Bactérias relacionadas a doença periodontal foram observadas em níveis baixos em nossas amostras. Nos parâmetros imunológicos, a diversidade alfa e a abundância relativa sugeriram que o TPNC influenciou na reorganização do biofilme subgingival, conduzindo a microbiota a uma mais semelhante à dos pacientes não infectados pelo HIV-1. Nossos resultados sugerem a presença de dois tipos diferentes de microbiota nos pacientes periodontais do nosso estudo. Em base no anterior, podemos concluir que o TPNC alterou a microbiota de ambos os grupos, com maior impacto no grupo HIV, levando a uma diminuição da diversidade nos sítios doentes e saudáveis. No grupo controle, os sítios saudáveis mostraram diminuição na diversidade da microbiota, enquanto os sítios doentes experimentaram aumento.

Palavras-chave: Periodontite, infecção por HIV, Desbridamento Periodontal, microbiota

---

**ABSTRACT**

## ABSTRACT

The effects of the human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) infection and the introduction of antiretroviral therapy have brought changes in the evolution of periodontal disease, however studies on the influence of HIV-1 on the periodontal microbiota are still scarce. Samples from patients enrolled in a quasi-experimental study was carried out in order to determine the subgingival microbiological profile of periodontitis patients with or without HIV-1 infection undergoing non-surgical periodontal therapy (NSPT). We assessed, using 16S rRNA-based PCR sequencing, bacterial profile of subgingival biofilm samples of healthy and periodontal sites of HIV-1-infected (n=18) and non-HIV-1-infected (n=14) patients with periodontitis that received NSPT. The samples were collected at baseline, 30 and 90 days after the NSPT. Association of microbiote with CD4+ T-cell and viral load was performed. The results indicated that both groups showed similar stages and grades of periodontitis. *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Veillonella* and *Prevotella* were the most abundant genera in the samples. A low abundance of periodontal bacteria was observed. Analyses of the immunological parameters, alpha-diversity and relative abundance revealed that the NSPT induced shifts in the subgingival biofilm, leading to a microbiota profile similar to that in non-HIV-1 infected patients. Our results suggest two different microbiota profiles for the periodontitis patients. We can conclude that the NSPT changed the microbiota profile of both HIV and control groups. A higher impact was shown in the HIV group, with a significant increase in microbial diversity. In the control group, a significant reduction in microbial diversity was seen in periodontal sites, in contrast to an increased diversity in the healthy sites.

Keywords: Periodontitis, HIV infection, periodontal debridement, microbiota



## LISTAS DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b> Perfil clínico e parâmetros periodontais dos pacientes do grupo HIV e controle. Dados apresentados em números absolutos, médias e porcentagem (%) .....	<b>40</b>
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros imunológicos do grupo HIV. Dados apresentados em números absolutos, médias e porcentagem (%) .....	<b>41</b>



## LISTA DE FIGURAS

		<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b>	<b>a.</b> Beta-diversidade do grupo HIV e grupo controle <b>b.</b> Índice Shannon de Alfa-diversidade do grupo HIV e grupo controle <b>c.</b> Abundância relativa dos gêneros do grupo HIV e grupo controle.....	<b>44</b>
<b>Figura 2.</b>	Abundância relativa de cada ACV (192 amostras) mostrada em um heatmap de escala vermelha com identidades taxonômicas e variáveis da população.....	<b>46</b>
<b>Figura 3.</b>	<b>a.</b> Marcadores de condição da prevalência bacteriana dos grupos HIV e controle <b>b.</b> Marcadores de condição da prevalência bacteriana de periodontite localizada e generalizada.....	<b>47</b>
<b>Figura 4.</b>	Índice Shannon de Alfa-diversidade na relação com o número de dentes presentes em boca .....	<b>47</b>
<b>Figura 5.</b>	<b>a.</b> Índice Shannon de Alfa-diversidade para os sítios de coleta <b>b.</b> Alfa-diversidade dos sítios de coletas nos três tempo de coleta do grupo HIV <b>c.</b> Alfa-diversidade dos sítios de coletas nos três tempos de coleta do grupo Controle. SD: sítios doentes, SS: sítios saudáveis.....	<b>48</b>
<b>Figura 6.</b>	Abundância relativa de cada ACV (192 amostras) mostrada em um heatmap de escala vermelha com identidades taxonômicas e relação com os tempos de coleta, sítios de coleta e estado sorológico.....	<b>50</b>
<b>Figura 7.</b>	Índice Shannon de Alfa-diversidade bacteriana nas diferentes categorias de contagem de TCD4+ nos três tempos de coleta do grupo HIV <b>a.</b> T0 <b>b.</b> T1 <b>c.</b> T2. 0= grupo Controle .....	<b>51</b>
<b>Figura 8.</b>	Abundância relativa dos gêneros bacterianos em relação às contagens de TCD4+ no T0 <b>3a.</b> <100 cel/mm <sup>3</sup> <b>3b.</b> <200 cel/mm <sup>3</sup> <b>3c.</b> <500 cel/mm <sup>3</sup> .....	<b>53</b>
<b>Figura 9.</b>	Abundância relativa dos gêneros bacterianos em relação às contagens de TCD4+ no T1 <b>3a.</b> <100 cel/mm <sup>3</sup> <b>3b.</b> <200 cel/mm <sup>3</sup> <b>3c.</b> <500 cel/mm <sup>3</sup> .....	<b>54</b>

<b>Figura 10</b>	Abundância relativa dos gêneros bacterianos em relação às contagens de TCD4+ no T2 <b>3a.</b> <100 cel/mm <sup>3</sup> <b>3b.</b> <200 cel/mm <sup>3</sup> <b>3c.</b> <500 cel/mm <sup>3</sup> .....	<b>55</b>
<b>Figura 11.</b>	Índice Shannon de Alfa-diversidade bacteriana nas diferentes categorias de carga viral nos três tempos de coleta do grupo HIV <b>a.</b> T0 <b>b.</b> T1 <b>c.</b> T2. 0= grupo Controle.....	<b>56</b>
<b>Figura 12.</b>	Abundância relativa dos gêneros bacterianos em relação à carga viral no T0 <b>A.</b> Carga viral indetectável <b>B.</b> <1.000 cópias/ml <b>C.</b> <100.000 cópias/ml <b>D.</b> >100.000 cópias/ml.....	<b>58</b>
<b>Figura 13.</b>	Abundância relativa dos gêneros bacterianos em relação à carga viral no T1 <b>A.</b> Carga viral indetectável <b>B.</b> <1.000 cópias/ml <b>C.</b> <100.000 cópias/ml <b>D.</b> >100.000 cópias/ml.....	<b>59</b>
<b>Figura 14.</b>	Abundância relativa dos gêneros bacterianos em relação à carga viral no T2 <b>A.</b> Carga viral indetectável <b>B.</b> <1.000 cópias/ml <b>C.</b> <100.000 cópias/ml <b>D.</b> >100.000 cópias/ml .....	<b>60</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AAP:** Academia Americana de Periodontologia
- AIDS:** Síndrome da imunodeficiência adquirida
- ASV:** Amplicon *Sequence Variant*
- DP:** Desvio padrão
- DoP:** Doença Periodontal
- FORP:** Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
- GI:** Gastrointestinal
- HAART:** Tratamento antirretroviral de elevada eficácia (*highly active antiretroviral therapy*)
- HC-FMRP:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
- HIV:** Vírus da imunodeficiência humana
- IG:** Índice gengival
- IS:** Índice de Sangramento
- IHO:** Instruções de higiene oral
- LTCD-4:** Linfócito T auxiliar (*lymphocyte T helper*)
- NIC:** Nível de inserção clínica
- OMS:** Organização Mundial da Saúde
- PBS:** *Phosphate buffered saline*
- PCR:** Reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)
- PS:** Profundidade de sondagem
- PSR:** Exame periodontal simplificado
- RAR:** Raspagem e alisamento radicular
- SD:** Sítio de coleta doente
- SS:** Sítio de coleta sadio
- TARV:** Terapia antirretroviral
- TCLE:** Termo de consentimento livre e esclarecido
- TPNC:** Terapia periodontal não-cirúrgica
- UETDI:** Unidade Especial de Tratamento de Doenças Infecciosas
- UNAIDS:** Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS
- USP:** Universidade de São Paulo
- WHO:** Organização Mundial da Saúde (*World health organization*)

## LISTA DE SÍMBOLOS

**%**: Por cento

**≤**: Menor ou igual a (símbolo matemático)

**≥**: Maior ou igual a (símbolo matemático)

**>**: Maior a (símbolo matemático)

**<**: Menor a (símbolo matemático)

**=**: Igual

**±**: Desvio padrão

**n**: Tamanho da amostra

**P**: Probabilidade de significância

**°**: Graus Celsius

**μl**: Microlitros

**ml**: Mililitros

**mm**: Milímetros

**nM**: Nano molar

**pM**: Pico molar

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Página</b>
<b>ANEXO A</b> Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.....	<b>74</b>
<b>ANEXO B</b> Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes HIV.....	<b>77</b>
<b>ANEXO C</b> Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes não HIV	<b>78</b>
<b>ANEXO D</b> Comprovante da submissão do artigo em revista científica.....	<b>79</b>
<b>ANEXO E</b> Artigo científico submetido para publicação no periódico <i>Journal of Clinical Periodontology</i> .....	<b>80</b>



## SUMARIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	25
2 OBJETIVOS.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Amostra.....	31
3.2 Métodos.....	32
3.2.1 Anamnese.....	33
3.2.2 Exame físico extra e intraoral.....	33
3.2.3 Exame periodontal.....	33
3.2.4 Coleta do biofilme subgingival para avaliação microbiológica.....	34
3.2.5 Extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento para análise do perfil microbiológico pela técnica 16S rRNA-based PCR.....	35
3.2.6 Análise estatística e bioinformática 16S rRNA.....	36
5 RESULTADOS.....	39
5.1 Perfil clínico e parâmetros periodontais .....	39
5.2 Parâmetros imunológicos.....	41
5.3 Diversidade microbiana e características clínicas.....	43
5.4 Classificação da doença periodontal e microbiota oral.....	45
5.5 Comparação da microbiota entre sítios saudáveis e doentes.....	48
5.6 Estado imunológico e diversidade microbiana.....	51
6 DISCUSSÃO.....	62
7 CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS.....	69
ANEXOS.....	74





## 1. INTRODUÇÃO

As doenças periodontais (DoP) são um grupo de condições inflamatórias que resultam na destruição dos tecidos de suporte dos dentes, e que tem como principais características etiopatogênicas: formação de biofilme, que é composto por microrganismos ou grupos de microrganismos específicos; e inflamação periodontal, que produz a destruição progressiva do ligamento periodontal e do osso alveolar, evoluindo com formação de bolsa, recessão ou ambas (LINDHE, JAN; LANG, 2013; NEWMAN et al., 2018).

Enquanto etiologia da periodontite é bacteriana, atualmente está cada vez mais evidente que a patogênese da doença é mediada pela resposta do hospedeiro (GONÇALVES; GONÇALVES; FONTES, 2013). As DoPs e algumas doenças sistêmicas têm fatores genéticos e/ou ambientais similares, e, portanto, indivíduos afetados imunologicamente podem mostrar manifestações de ambas as condições. Consequentemente, a perda dos tecidos periodontais é uma manifestação comum de algumas doenças sistêmicas, e pode significar um importante parâmetro no diagnóstico e nas implicações terapêuticas; além disso, as terapias medicamentosas utilizadas nas diferentes condições sistêmicas podem ter impacto na evolução da DoP (JEPSEN et al., 2018; GROENEWEGEN et al., 2019).

A infecção pelo HIV-1, causador da AIDS, é uma doença infectocontagiosa viral, que continua a ser um grave problema de saúde pública mundial. No Brasil, 1.011.617 casos de AIDS foram registrados desde o começo da epidemia até junho de 2020 (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2020). Sabe-se que a imunossupressão em pacientes infectados pelo HIV-1 favorece o desequilíbrio entre a agressão microbiana e a resposta imune do hospedeiro, que por sua vez, pode potencializar a destruição dos tecidos periodontais. De fato, a correlação entre a perda de tecido de inserção e a redução na contagem de TCD4+ tem sido demonstrada (BARR; LOPEZ; RUA-DOBLES, 1992). Assim, o comprometimento da resposta imune em indivíduos infectados pelo HIV-1, em combinação com outros fatores inerentes ao hospedeiro oferece um risco adicional para a destruição periodontal (VERNON et al., 2009; MATAFTSI; SKOURA; SAKELLARI, 2011).

A terapia antirretroviral (TARV) tem decrescido a carga viral e reduzido a morbidade e mortalidade relacionada ao AIDS. Posteriormente, com o surgimento das terapias antirretrovirais combinadas, houve marcada diminuição na frequência das DoPs destrutivas nos pacientes com HIV; no entanto, alguns estudos sugerem que as terapias antirretrovirais combinadas podem reduzir as contagens de bactérias comensais que tem um efeito protetor contra a colonização de espécies patogênicas (RYDER et al., 2020).

O início da DoP depende da interação entre os microrganismos, principalmente bactérias do biofilme dental e a resposta imune do hospedeiro (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017). O desequilíbrio na população microbiana ou disbiose resulta em danos aos tecidos periodontais (KINANE et al., 1999; VAN DYKE; SERHAN, 2003; JI; CHOI; CHOI, 2015). Para a periodontite, a maioria dos estudos têm demonstrado que o microbioma é similar nos pacientes infectados e não infectados pelo HIV, com exceção de alguns patógenos comensais. Além disso, algumas associações de patógenos periodontais foram mais prevalentes em pacientes infectados pelo HIV. A diminuição na contagem de TCD4+ resulta na prolongada ativação neutrofílica e aumentada carga viral plasmática, que por sua vez causa ativação imune local e sistêmica e contribui para o surgimento de DoP mais grave (KINANE et al., 1999; ALPAGOT et al., 2004).

O imunocomprometimento afeta negativamente os mecanismos imunológicos envolvidos no controle de microrganismos, levando ao aumento da carga de patógenos oportunistas, resistência a medicamentos e infecções frequentes e recidivantes, culminando na modificação da composição e diversidade da microbiota (GONÇALVES et al., 2007; LOURENCO; FIGUEIREDO, 2008; BERBERI; NOUJEIM, 2015). Diversos estudos têm investigado a composição e a complexidade da microbiota oral em indivíduos infectados pelo HIV (GONÇALVES et al., 2007; PEREIRA et al., 2014; FERREIRA et al., 2016; ANNAVAJHALA et al., 2020): microrganismos não comumente encontrados no ambiente subgingival têm sido isolados, incluindo bactérias comensais gram-positivas do trato gastrointestinal, microrganismos comensais do ambiente oral, e bactérias oportunistas que afetam frequentemente as vias respiratórias e o trato urinário. Além disso, patógenos mais tipicamente associados à DoP foram encontrados em maior frequência em indivíduos infectados pelo HIV-1 com periodontite, mesmo estando sob TARV, em comparação a indivíduos não-infectados pelo HIV-1 (CROSS; SMITH, 1995; VERNON et al., 2009; BIERNE; HAMON; COSSART, 2012).

Há evidências sobre a habilidade das bactérias orais e seus produtos tóxicos de se translocar através da membrana mucosa em pacientes saudáveis com DoP. Acreditamos que a presença da infecção pelo HIV-1 adiciona um terceiro componente que pode atuar nessas interações orais e sistêmicas (RYDER et al., 2020). A infecção pelo HIV tem efeitos na alteração da microbiota oral e do intestino, que promove a translocação de bactérias, fungos e vírus na corrente sanguínea. A cavidade oral inflamada, especificamente na bolsa periodontal, e o revestimento da mucosa intestinal, são sítios potenciais para as bactérias cruzar ou

comprometer a barreira epitelial e entrar na corrente sanguínea, onde podem gerar bacteremia sistêmica (LAMONT; KOO; HAJISHENGALLIS, 2018; RYDER et al., 2020).

Estudos recentes (VALENTINE et al., 2016), mostraram que o tratamento periodontal foi associado com a diminuição da periodontite e aumento da contagem de TCD4+. Considerando que patógenos periodontais e seus produtos podem contribuir para a inflamação sistêmica, acredita-se que o tratamento periodontal resultaria na redução da inflamação sistêmica com consequente melhoria do estado da infecção pelo HIV-1. Em contraposição, a ativação imune devido à infecção pelo HIV-1 e a periodontite aumentaria o estado inflamatório sistêmico, piorando assim a resposta efetora e consequentemente o desfecho dos pacientes (MOGENSEN, 2009; PETERSEN; OGAWA, 2012; VALENTINE et al., 2016).

Com os avanços das tecnologias metabolômicas e transcriptômicas, como o sequenciamento de nova geração, amostras biológicas orais podem ser usadas para refletir a atividade de microrganismos envolvidos na patogênese da DoP (BARNES et al., 2014). Isto pode favorecer a compreensão da gravidade da DoP em pacientes infectados com HIV-1 (BARNES et al., 2014; SANTIAGO-RODRIGUEZ et al., 2015). Assim que os determinantes microbianos sejam identificados, terapia antimicrobiana específica poderia ajudar no manejo das DoPs em pacientes infectados com HIV-1 (LY et al., 2014). Individualmente, a DoP e a infecção por HIV-1 estão associadas com mudanças no microbioma oral (LY et al., 2014), no entanto, novos estudos são necessários para estabelecer a relação entre as duas doenças infecciosas e alterações no microbioma subgingival.

Considerando que as comunidades microbianas em pacientes infectados pelo HIV-1 com DoP podem estar alteradas e as informações sobre o assunto são escassas ou ainda inexistentes na literatura, o objetivo deste estudo foi determinar o perfil microbiológico dos pacientes com periodontite infectados ou não pelo HIV-1 após NSPT. Nossa hipótese consiste em: 1) O perfil microbiológico dos pacientes infectados pelo HIV-1 difere do perfil microbiológico de pacientes não infectados; e 2) O TPNC pode induzir mudanças na microbiota periodontal e marcadores serológicos para um padrão similar ao presente nos pacientes não infectados pelo HIV-1 com periodontite. Conhecer o perfil microbiológico da periodontite em indivíduos infectados pelo HIV-1 pode contribuir para a prevenção da destruição adicional dos tecidos periodontais, minimizar as reações inflamatórias locais e/ou sistêmicas, reduzir o vírus em latência, além de oferecer novas possibilidades terapêuticas para a DoP.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos gerais**

Determinar o perfil microbiológico de pacientes com periodontite infectados e não infectados pelo HIV-1 submetidos a terapia periodontal não cirúrgica.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar se o tratamento periodontal não cirúrgico efetuado em pacientes com periodontite infectados e não infectados pelo HIV-1 altera a microbiota oral local;
- Comparar a população microbiana oral de pacientes infectados com HIV-1 com a de pacientes não infectados pelo HIV nos diferentes tempos de coleta;
- Correlacionar os achados microbiológicos com os parâmetros clínicos da DoP.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Amostras

Foram analisadas amostras de 22 pacientes infectados pelo HIV-1 (Grupo HIV) e 26 indivíduos não infectados pelo HIV-1 (Grupo Controle), pareados por sexo e idade, incluídos no estudo clínico “Determinação de fatores envolvidos na patogênese da DoP em pacientes infectados pelo HIV-1” (NOBRE et al., 2019) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE: 50004415.1.0000.5419) (ANEXO A), e registrado no ClinicalTrials.gov (NCT03262402). Os participantes do grupo HIV foram recrutados dentre os pacientes em seguimento na Unidade Especial de Tratamento a Doenças Infecciosas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (UETDI HC-FMRP), e aqueles que apresentaram necessidade de tratamento periodontal e/ou cirúrgico odontológico foram convidados a participarem da pesquisa e encaminhados para a realização desses procedimentos na FORP-USP. Os participantes do grupo controle foram recrutados dentre os pacientes em seguimento das clínicas de atendimento odontológico da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP). Todos os participantes foram informados dos objetivos da pesquisa e deram o consentimento livre e esclarecido para participar da pesquisa (ANEXO B e C). Os critérios de inclusão que foram empregados na seleção dos participantes foram:

#### Pacientes não infectados pelo HIV

- Ter idade superior ou igual a 18 anos;
- Aceitar e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido;
- Possuir 12 ou mais dentes;
- Ser portador de periodontite, com no mínimo dois sítios com profundidade de sondagem  $\geq 5$ mm e dois dentes com perda de inserção interproximal  $\geq 4$ mm.

#### Pacientes infectados pelo HIV

- Mesmos critérios descritos para os não infectados pelo HIV, e;
- Possuir soropositividade para o HIV, confirmada laboratorialmente por meio de ELISA para detecção de anticorpos contra o HIV, reagentes em amostras sanguíneas distintas, assim como a realização de um exame confirmatório (Western Blot);
- Estar em uso de terapia antirretroviral regular;

- Pacientes em AIDS com contagem de TCD4+ inferior a 200 cel/mm<sup>3</sup> e/ou presença de infecções oportunistas;
- Apresentarem exames de contagem de TCD4<sup>+</sup> e de carga viral recente (três meses antes ou três meses depois da abordagem inicial da pesquisa).

Os critérios de exclusão para ambos os grupos foram:

- Pacientes que realizaram tratamento periodontal recente (seis meses antes da consulta);
- História de uso de antibióticos e anti-inflamatórios nos últimos seis meses;
- Presença de outro envolvimento sistêmico que possa interferir na progressão da DoP ou na resposta ao tratamento, como gestação, diabetes mellitus, ou estado de imunossupressão;
- Apresentar envoltimentos protéticos extensos, como uso de prótese total ou prótese parcial removível, já que esses tipos de prótese dentárias estão associadas ao aumento na incidência de candidíases orais, especialmente em pacientes infectados pelo HIV (LOURENCO; FIGUEIREDO, 2008);
- Tabagistas ativos.

### 3.2 Métodos

As amostras estudadas foram coletadas de pacientes incluídos em um estudo quase-experimental, já que não houve aleatorização dos grupos (CAMPBELL, D. T., STANLEY, J. C., & GAGE, 1963). As coletas foram realizadas em três diferentes tempos, como descritos a seguir:

#### Tempo 0

Os participantes foram submetidos a exame clínico-anamnésico (anamnese e exame físico), foram coletadas amostras de biofilme subgengival. Após as coletas, os pacientes receberam instrução de higiene oral e foram submetidos ao tratamento periodontal completo.

#### Tempo 1

Após 30 dias do tempo 0, os pacientes foram submetidos à reavaliação periodontal e coleta de biofilme subgengival, utilizando-se a mesma metodologia. Nova orientação de higiene oral foi aplicada.



## Tempo 2

Após 90 dias do tempo 0, os pacientes foram submetidos novamente ao exame clínico periodontal e coleta de amostras de biofilme subgingival. Foram então encerradas as coletas da pesquisa, e os pacientes tiveram alta parcial, retorno livre ou encaminhamento para tratamento de outras necessidades odontológicas.

### **3.2.1 Anamnese**

Os participantes foram submetidos a um questionário contendo perguntas sobre suas condições médico-odontológicas. Algumas questões foram dirigidas diretamente ao entrevistado, como: dados pessoais, automedicação e a história odontológica. Informações sobre tempo de soropositividade para o HIV, tempo de tratamento, ganho ou perda recente de peso, medicamentos em uso, teores de TCD4<sup>+</sup>, de carga viral, classificação da infecção pelo HIV (CDC, 1993) e histórico ou presença de manifestações oportunistas, foram obtidas por meio de consulta ao prontuário médico.

### **3.2.2 Exame físico extra e intraoral**

O exame físico teve início pela palpação dos linfonodos em região de cabeça e pescoço buscando possíveis alterações de volume, consistência e temperatura. No exame extraoral foram avaliadas alterações cutâneas faciais e perilabiais: comissuras labiais, lábios, nariz, região do processo zigomático da maxila e região mento. No exame intrabucal foi realizada a avaliação dos tecidos moles: língua, assoalho bucal, gengiva, mucosa jugal, palato duro, palato mole e tonsilas. As manifestações orais observadas foram catalogadas segundo a classificação e critérios diagnósticos para lesões orais na infecção por HIV (“Classification and diagnostic criteria for oral lesions in HIV infection. EC-Clearinghouse on Oral Problems Related to HIV Infection and WHO Collaborating Centre on Oral Manifestations of the Immunodeficiency Virus”, 1993). Após o exame físico dos tecidos moles, o paciente foi convidado a realizar a coleta do biofilme subgingival. Apenas após as coletas os pacientes foram submetidos ao exame periodontal completo.

### **3.2.3 Exame periodontal**

Todos os dentes presentes (exceto os terceiros molares) foram sondados, com sonda milimetrada Carolina do Norte 15, em seis sítios: mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual/palatino, lingual/palatino, disto lingual/palatino, e três diferentes

mensurações foram feitas, como descritas abaixo. Os participantes diagnosticados com periodontite (pelo menos 2 sítios com PD  $\geq$ 5mm) foram incluídos na pesquisa.

- Profundidade de sondagem (PD): Distância entre a margem gengival e a base do sulco gengival. Para essa mensuração a sonda periodontal é introduzida entre o dente e a gengiva paralelamente ao longo eixo do dente, respeitando-se o contorno dental.
- Nível de inserção clínica (NIC): Distância entre a base do sulco gengival e a junção amelo-dentinária. Para essa mensuração a sonda é introduzida paralelamente ao longo eixo do dente, respeitando-se o contorno dental.
- Índice de sangramento à sondagem (IS): Foram registrados todos os sítios sangrantes após a sondagem expressados em porcentagem (TROMBELLI et al., 2018).

Após 7 dias da consulta inicial, o participante foi submetido ao tratamento periodontal não cirúrgico em estágio único. A terapia periodontal foi realizada em um intervalo de 48 horas, por meio de raspagem (supragengival e subgengival) e alisamento radicular de todos os dentes com a utilização de instrumentos manuais (curetas de Gracey) e ultrassônicos.

#### **3.2.4 Coleta do biofilme subgengival para avaliação microbiológica**

Todo o instrumental e materiais utilizados para a coleta das amostras foram previamente esterilizados em autoclave. Para a coleta do biofilme subgengival, os dentes foram isolados com roletes de algodão, a fim de minimizar o risco de contaminação das amostras com a saliva. Amostras do biofilme subgengival dos sulcos gengivais foram obtidas com o auxílio de cones de papel absorvente estéreis, de dentes com profundidade de sondagem  $\geq$ 5mm (sítios doentes) e de dentes com profundidade de sondagem  $\leq$ 3mm (sítios saudáveis). Foram coletadas 6 amostras de sítios eleitos previamente por meio do exame periodontal completo (periograma). Os cones permaneceram introduzidos nos sulcos por 30 segundos e, ao final da coleta, foram colocados em um mesmo microtubo do tipo Eppendorf, constituindo uma única amostra (sítios saudáveis ou sítios doentes). As amostras foram coletadas em 3 tempos distintos, T0 = *baseline*, T1 = 30 dias após o tratamento periodontal não-cirúrgico e T2 = 90 dias após o tratamento periodontal não-cirúrgico. As amostras coletadas foram transferidas para microtubos contendo 300  $\mu$ l de solução tampão Tris-HCl (10mM; pH 7,6). Todos os microtubos foram armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o processamento das amostras.

### 3.2.5 Extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento para análise do perfil microbiológico pela técnica 16S rRNA-based PCR

As amostras foram submetidas à técnica de sequenciamento do gene 16S, a qual foi realizada no Laboratório de Diagnóstico Molecular do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da FORP/USP, e no Centro de Sequenciamento de Ácidos Nucleicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP), uma *facility* estabelecida na FCFRP/USP com recursos FAPESP e USP, e que oferece diversos serviços de sequenciamento de nova geração.

O DNA genômico foi extraído de cada amostra usando a técnica para extração de DNA genômico bacteriano com CTAB Doyle & Doyle 1990 modificado (DOYLE; DOYLE, 1990; NASCIMENTO et al., 2004). A pureza do DNA foi avaliada usando Espectrofotômetro UV/Visível. As amostras de DNA genômico extraído foram armazenadas a -80°C até o uso.

O par de primers (Reverse: 5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC 3'; e Forward 5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG 3')

foram sintetizados e purificados por HPLC, e obtidos através da IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, EUA) permitindo o sequenciamento da região V3 e V4. Os primers incluem os adaptadores de sequenciamento da Illumina®. A reação de amplificação por PCR para cada amostra foi realizada em um volume total de 25 µl, contendo: DNA genômico microbiano (2.5µl), Amplicon PCR Forward Primer 1 µM (5 µl), Amplicon PCR Reverse Primer 1 µM (5 µl), 2x NEBNext® Q5® Hot Start HiFi PCR Master Mix (New England Biolabs) (12.5 µl). Foram realizados 25 ciclos por reação utilizando um termociclador e respeitando as seguintes condições: 95°C por 3 minutos, 25 ciclos (95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos), 72°C por 5 minutos, e preservação a 4°C. A PCR foi realizada no termociclador Eppendorf, modelo Mastercycler epgradient S. O tamanho dos produtos da amplificação (amplicons) foi avaliado em gel de agarose.

Os amplicons obtidos foram purificados usando Agencourt AMPure XP Kit (Beckman Coulter, EUA). Após a purificação, os amplicons foram submetidos a uma segunda PCR para inserção dos barcodes (sequência identificadora de cada amostra individual). A reação de amplificação por PCR para cada amostra foi realizada em um volume total de 50 µl, contendo: amplicon gerado na primeira PCR (15µl), Nextera XT Index Primer 1 (5µl), Nextera XT Index Primer 2 (5µl), 2x NEBNext® Q5® Hot Start HiFi PCR Master Mix (25µl). Ciclagem: 95°C por 3 minutos, 25 ciclos (95°C por 30 segundos, 55°C por 30

segundos, 72°C por 30 segundos), 72°C por 5 minutos, e preservação a 4°C. A PCR foi realizada no termociclador Eppendorf®, modelo Mastercycler epgradient S.

Os amplicons obtidos foram purificados usando Agencourt AMPure XP Kit (Beckman Coulter, EUA). Após a purificação, os amplicons foram quantificados por PCR em tempo real utilizando o kit de quantificação NEBNext® Library Quant Kit for Illumina. As pipetagens foram realizadas no sistema automatizado de pipetagem Eppendorf® epMotion 5070. A PCR em tempo real foi realizada no equipamento Eppendorf® realplex4 Mastercycler epgradient S.

Após quantificação, as bibliotecas foram diluídas para 4 nM e misturadas para gerar um pool de amostras e submetidos a uma análise de qualidade por Bioanalyzer com Agilent DNA 1000 Kit 2100 (Agilent Technologies). O pool de amostras foi desnaturado e diluído para 10 pM. A seguir, foi sequenciado no equipamento MiSeq (Illumina®), utilizando o kit de sequenciamento MiSeq 600 cycles v3 (Illumina®) e seguindo o protocolo do fabricante (ILLUMINA, 2013).

### **3.2.6 Análise estatística e bioinformática 16S rRNA**

Os dados demográficos e clínicos foram avaliados por meio de estatística descritiva, as variáveis numéricas foram descritas como frequência, e expressados como média e desvio padrão. As amostras dos pacientes do grupo HIV foram divididas em categorias baseadas a contagem de TCD4+ e carga viral, com o propósito de determinar a influência do TCD4+ e a carga viral na diversidade bacteriana. Em base às contagens de TCD4+ foram estabelecidas três categorias: <100 cels/mm<sup>3</sup>, <200 cels/mm<sup>3</sup> (101-199 cels/mm<sup>3</sup>), e <500 cels/mm<sup>3</sup> (200-500 cels/mm<sup>3</sup>); e três categorias em base à carga viral: <1,000 cópias/mL (50-999 cópias/mL), <100,000 cópias/mL (1,000-100,000 cópias/mL), e >100,000 cópias/mL.

O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado aos dados para verificar sua normalidade. O teste t e o teste de Mann-Whitney foram usados para acessar as variáveis paramétricas e não paramétricas, respectivamente. O teste ANOVA de uma via foi usado para acessar mais de 2 variáveis. O índice de diversidade de Shannon (H) foi aplicado para acessar a diversidade alfa em diferentes grupos. A diversidade beta foi calculada pelo Índice de Bray-Curtis com teste estatístico PERMANOVA. O nível de significância adotado foi de 0,05. O modelo random forest foi usado para encontrar as principais características dos grupos analisados. Todas as

análises estatísticas foram realizadas com o software R (R Core Team, versão 3.3.1. Viena, Áustria, 2016).

O software FastQC versão 0.11.9 (ANDREWS, 2019) foi utilizado para verificar a qualidade das sequências, bem como o número de duplicatas, bases ambíguas e sequências truncadas. Posteriormente, as sequências foram processadas via R script, utilizando a pipeline recomendado pelo pacote DADA2 (CALLAHAN et al., 2016). Primeiro, as sequências de baixa qualidade foram filtradas com os seguintes parâmetros: o número máximo de N permitido de 0 ( $\text{maxN} = 0$ ), com o número máximo de erros esperados permitidos de 2 e 5 para sequências forward e reverse, respectivamente ( $\text{maxEE} = 2,5$ ). Na sequência, foi usado um modelo de aprendizado de máquina para corrigir as taxas de erro de bases possivelmente erradas com o uso de um modelo de erro paramétrico, o método implementado aprende esse modelo de erro a partir dos dados, alternando a estimativa das taxas de erro e inferência da composição da amostra até que eles convergem em um conjunto solução consistente. Após esta etapa, as sequências semelhantes foram agrupadas para posterior criação da tabela de contagem do tipo ASV (Amplicon Sequence Variant), após este passo foi executado a remoção das quimeras para minimizar possível viés de PCR. A análise taxonômica foi ser realizada considerando o banco de dados SILVA versão 132 (CALLAHAN, 2018) disponível online e a tabela de composição foi gerada a partir deste processo. Todos os gráficos de diversidade e abundância foram gerados na linguagem de programação R. Os dados da sequência foram submetidos ao banco de dados GenBank sob o número de acesso PRJNA678700.



## 5 RESULTADOS

Inicialmente foram incluídas amostras de três tempos de coleta (T0, T1 e T2) de sítios doentes e sadios de 22 pacientes do grupo HIV e 26 pacientes do grupo controle, totalizando 132 e 156 amostras, respectivamente. Após a finalização do processo de sequenciamento, para a análise final foram mantidas as amostras de 18 pacientes do grupo HIV, e 14 pacientes do grupo controle, totalizando 108 e 84 amostras, respectivamente. Ainda, após a análise das corridas dos sequenciamentos, todas as amostras com sequências que continham a base ambígua N foram descartadas (96 amostras), devido a que são consideradas como incompatibilidades, o que se traduz como uma alteração significativa na identidade das sequências, e posteriormente como um viés na identificação da microbiota de ditas amostras.

### 5.1 Perfil clínico e parâmetros periodontais

As características clínicas e parâmetros periodontais dos pacientes estão descritos na **Tabela 1**. O estudo incluiu um total de 32 pacientes, 16 homens e 16 mulheres, com uma média de 46 anos de idade. O seguimento de 90 dias após o tempo 0 foi completado por 100% dos pacientes. O diagnóstico periodontal foi inicialmente estabelecido seguindo a classificação de doenças periodontais de 1999 (ARMITAGE, 1999), e posteriormente reavaliado seguindo os parâmetros da Classificação Periodontal de 2018 (G. CATON et al., 2018).

A maioria dos pacientes (93,7% dos pacientes em ambos os grupos) apresentou periodontite generalizada; 44% dos pacientes do grupo HIV apresentaram periodontite estágio IV e 56% do grupo controle apresentou periodontite estágio III. Considerando a classificação por grau da periodontite, ambos os grupos tiveram alta prevalência de grau B, com 89% no grupo HIV e 7,41% no grupo controle; no entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre a classificação periodontal entre os grupos. O número médio de dentes foi de 22 em ambos os grupos, sem diferença estatística entre os grupos ( $p = 0,264$ ).

**Tabela 1.** Perfil clínico e parâmetros periodontais dos pacientes do grupo HIV e controle. Dados apresentados em números absolutos, médias e porcentagem (%).

<b>Características</b>	<b>Grupo HIV (%)</b> <b>(n= 18)</b>	<b>Grupo Controle (%)</b> <b>(n= 14)</b>	<b>Total</b> <b>(n= 32)</b>	<b>Valor de p</b> <b>0.083</b>
<b>Idade (Média)</b>	44 ± 6.2	48 ± 9.5	46 ± 8	<b>0.264</b>
<b>Masculino</b>	10 (62,5)	6 (37,5%)	16	<b>0.243</b>
<b>Feminino</b>	8 (50%)	8 (50%)	16	<b>0.218</b>
<b>Parâmetros periodontais</b>				
Número de dentes em boca (média)	20 ± 6	24 ± 4	22 ± 6	<b>0.264</b>
Extensão				<b>0.09</b>
Generalizada	16 (89)	14 (100)	30 (93,75)	
Localizada	2 (11)	0	2 (6,25)	
<b>Valor de p</b>	<b>0.2104</b>	<b>0.5000</b>		
Estágio				<b>0.4655</b>
3	10 (56)	9 (64,3)	19 (59,4)	
4	8 (44)	5 (35,7)	13 (40,6)	
<b>Valor de p</b>	<b>0.0705</b>	<b>0.1772</b>		
Grau				<b>0.8174</b>
B	16 (89)	10 (71,4)	26 (81,25)	
C	2 (11)	4 (28,6)	6 (18,75)	
<b>Valor de p</b>	<b>0.4208</b>	<b>0.2578</b>		
PS (média)				
T0	2,77 ± 0.6	2,84 ± 0.7	2,79 ± 0.6	
T1	2,29 ± 0.7	2,60 ± 0.7	2,40 ± 0.7	
T2	1,95 ± 0.6	2,43 ± 0.5	2,17 ± 0.6	
<b>Valor de p</b>	<b>0.0102</b>	<b>0.0021</b>		
NIC (média)				
T0	3,05 ± 0.7	3,42 ± 0.8	3,21 ± 0.8	
T1	2,70 ± 0.8	3,26 ± 0.6	2,93 ± 0.7	
T2	2,56 ± 1.0	3,08 ± 0.6	2,79 ± 0.8	
<b>Valor de p</b>	<b>0.0028</b>	<b>0.0009</b>		
IS (média)				
T0	39,22 ± 30.1	34,96 ± 23.8	37,44 ± 26.6	
T1	21,05 ± 27.4	15,40 ± 13.7	17,72 ± 21.3	
T2	16,23 ± 15.0	10,92 ± 8.4	13,30 ± 12.2	
<b>Valor de p</b>	<b>0.0678</b>	<b>0.1095</b>		

T0: tempo zero, T1: tempo um (30 dias), T2: tempos dois (90 dias)



## 5.2 Parâmetros imunológicos

Os parâmetros imunológicos do grupo HIV são descritos na **Tabela 2**. Dentro do grupo HIV, somente três pacientes apresentaram diagnóstico de HIV com mais de 20 anos de duração, sendo a média de soropositividade de 14 anos até a realização da anamnese no nosso estudo. Todos os pacientes, a exceção de um, apresentaram contagem de TCD4+ <200 cels/mm<sup>3</sup> no baseline, posteriormente foram registrados incrementos nas contagens de TCD4+ nos T1 e T2. Somente uma contagem de TCD4+ no tempo 1 não foi registrada. Em relação aos registros da carga viral, a maioria dos pacientes apresentaram cargas indetectáveis, com 10 pacientes no T0 (55,6%), 12 no T1 (67%) e 11 no T2 (61%). Dezesesseis dos 18 pacientes do grupo HIV apresentaram histórico de infecções oportunistas, sendo coinfeções em 10 casos, incluindo coinfeções de pneumonia e candidíase oral, pneumonia e herpes zoster, pneumonia, citomegalovírus e herpes zoster, pneumonia e criptococose, candidíase oral e herpes simples, candidíase oral e toxoplasmose. Outras infecções reportadas foram criptococose e tuberculose. Todos os pacientes se encontravam em TARV, sendo a maioria em terapias combinadas, principalmente com inibidores da transcriptase reversa nucleosídeos (INRT). Os regimes de antirretrovirais incluíam INRT (5,6%); combinação de INRT + Inibidores da Protease (55,5%); INRT + Inibidores da Protease + Inibidores da Integrase (5,6%); INRT + Inibidores da transcriptase reversa não nucleosídeo (11,1%); INRT + Inibidores da Integrase + Inibidores do correceptor CCR5 (11,1%); e Inibidores da Protease + Inibidores da Integrase (11,1%).

**Tabela 2.** Parâmetros imunológicos do grupo HIV. Dados apresentados em números absolutos, médias e porcentagem (%).

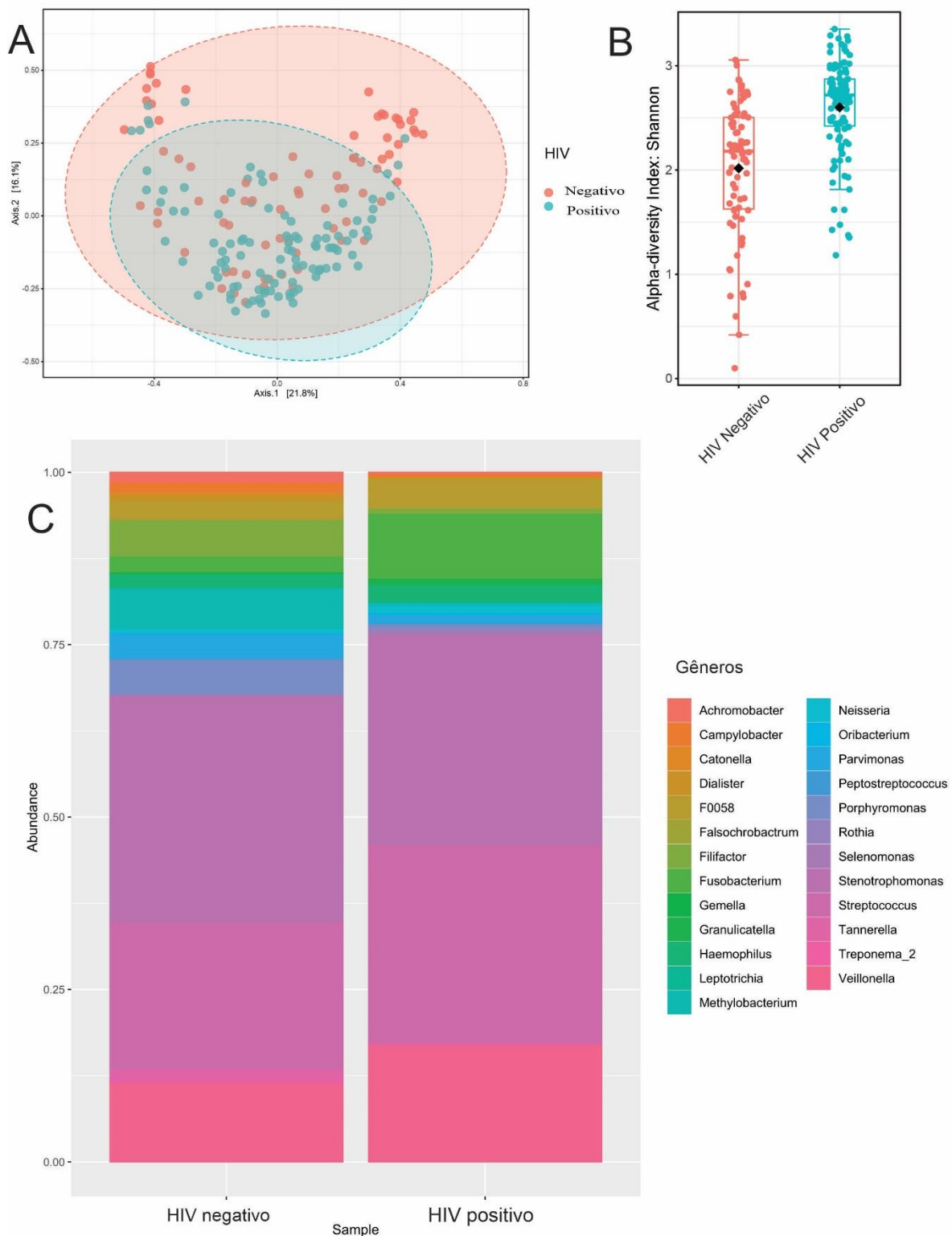
Parâmetros imunológicos	Total (%) (n=18)		
Tempo de exposição ao HIV (anos) (média)	14 ± 7.9		
≤10	7		
10-20	8		
>20	3		
Infecções oportunistas	16 (89)		
Candidíase Oral	8 (44)		
Pneumonia	8 (44)		
Herpes Zoster	6 (33)		
Herpes simples	3 (17)		
Toxoplasmose	4 (22)		
Citomegalovírus	3 (17)		
Outras infecções	4 (22)		
Coinfecções	10 (55)		
TCD4+*	T0	T1	T2
<100	9 (50)	4 (22)	5 (28)
101-199	8 (44)	5 (28)	5 (28)
200-500	1 (6)	8 (44)	6 (33)
>500	0	0	2 (11)
N/A		1 (6)	
Carga Viral **	T0	T1	T2
Indetectável	10 (55.6)	12 (67)	11 (61)
50 – 999	2 (11)	4 (22)	5 (28)
1.000-100.000	3 (16.7)	0	0
>100.000	3 (16.7)	2 (11)	2 (11)
Regime de TARV			
INTR	1 (5.6)		
INTR + IP	10 (55.5)		
INTR + IP + II	1 (5.6)		
INTR + INNTR	2 (11.1)		
INTR + II + ICCR5	2 (11.1)		
IP + II	2 (11.1)		

T0: tempo zero, T1: tempo um (30 dias), T2: tempos dois (90 dias), L TCD4+: linfócitos TCD4+, \*: valores em cel/mm<sup>3</sup>. \*\*: valores em cópias/ml, N/A: não aplica. INTR: inibidores da transcriptase reversa nucleosídeos, IP: inibidores da protease, II: inibidores da integrase, INNTR: inibidores da transcriptase reversa não nucleosídeos, ICCR5: Inibidores do correceptor CCR5.

### 5.3 Diversidade microbiana e características clínicas

De forma geral, a composição bacteriana da microbiota subgengival diferiu significativamente entre o HIV e o grupo de controle. Na beta diversidade a microbiota do grupo controle foi mais diversa em comparação ao grupo HIV, no entanto o grupo HIV teve sua dispersão dentro do grupo no grupo controle ( $p=3.8142e-08$ ). Enquanto a alfa diversidade, o grupo HIV apresentou uma gama mais ampla de espécies bacterianas na alfa diversidade ( $p=2.6582e-10$ ) em comparação ao grupo controle (**Figura 1a. e 1.b**).

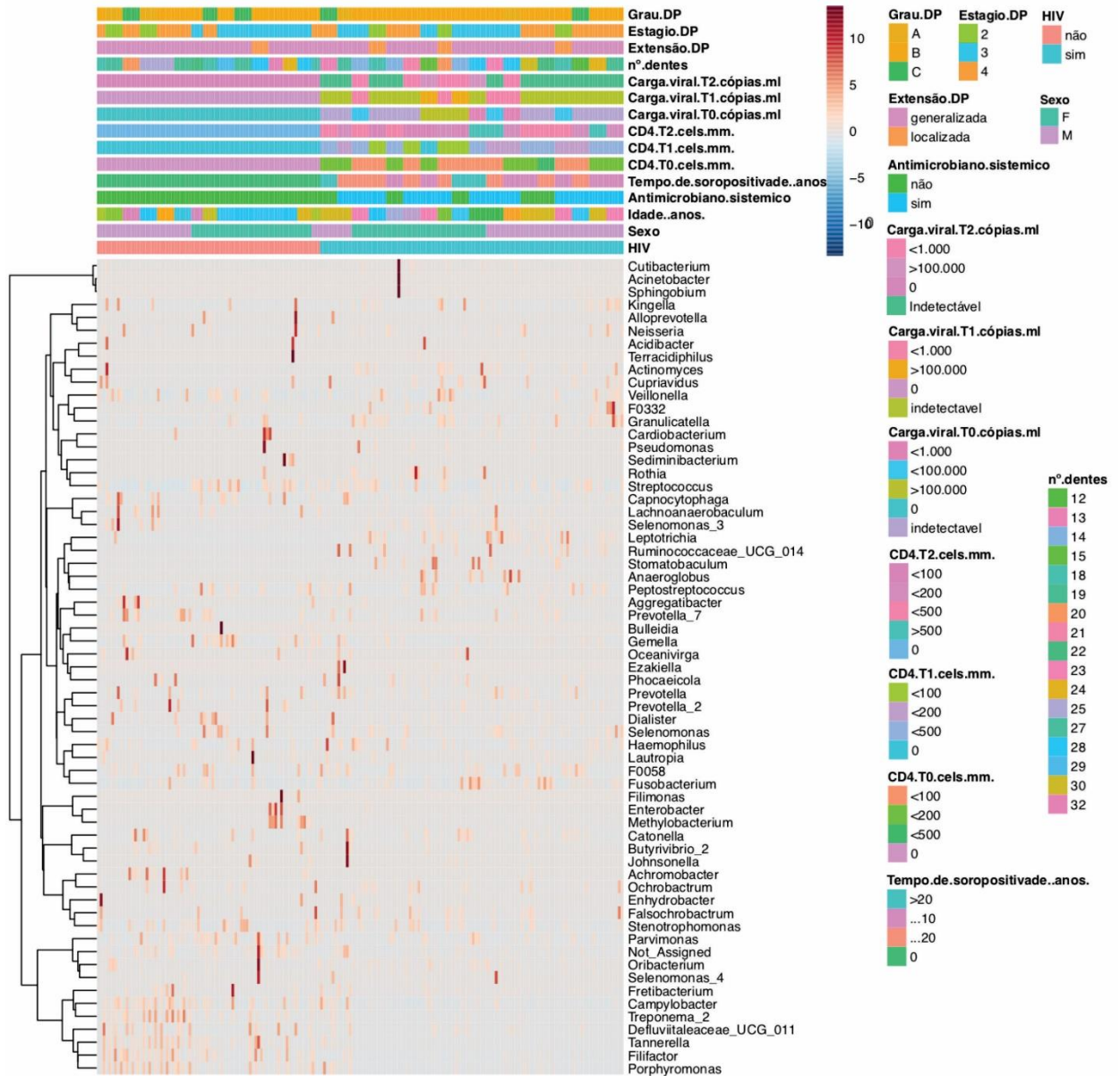
A soropositividade para HIV-1 mostrou influenciar na abundância relativa de patógenos orais e periodontais, conforme observado na **Figura 1c**. O gênero mais abundante entre as amostras incluídas em nosso estudo foi *Streptococcus* spp. Ambos os grupos apresentaram níveis altos de *Stenotrophomonas* e *Veillonella*. O grupo HIV também apresentou abundância de *Fusobacterium*, e o grupo controle revelou um enriquecimento significativo de *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus* e *Haemophilus* em comparação ao grupo HIV.

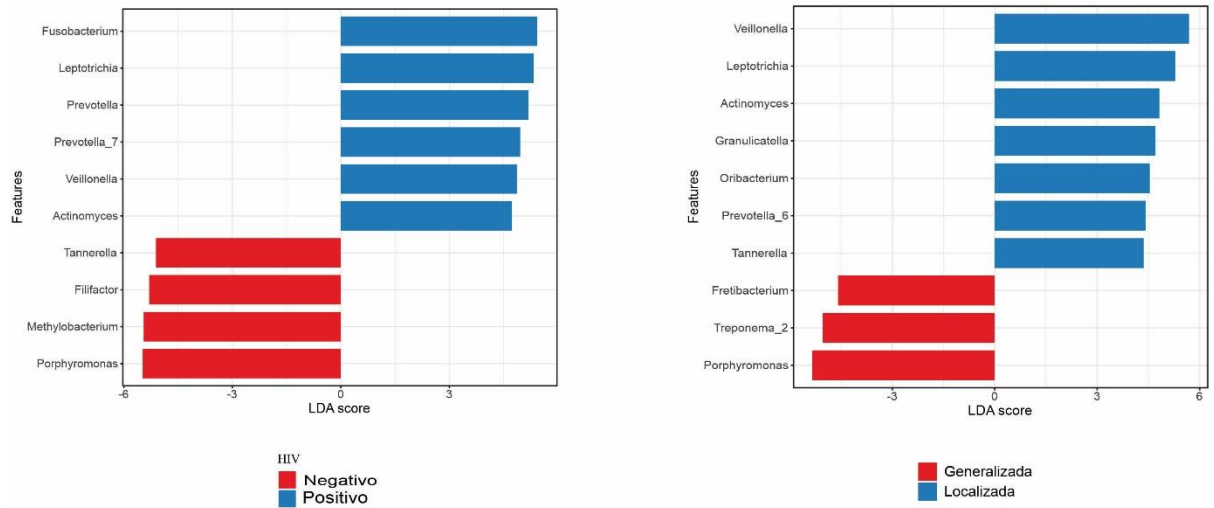


**Figura 1 a.** Beta-diversidade (Índice de Bray-Curtis Index com o HIV estatístico PERMANOVA) do grupo HIV e grupo controle ( $p=3.8142e-08$ ) **b.** Índice Shannon de Alfa-diversidade do grupo HIV e grupo controle ( $p=2.6582e-10$ ) **c.** Abundância relativa dos gêneros do grupo HIV e grupo controle.

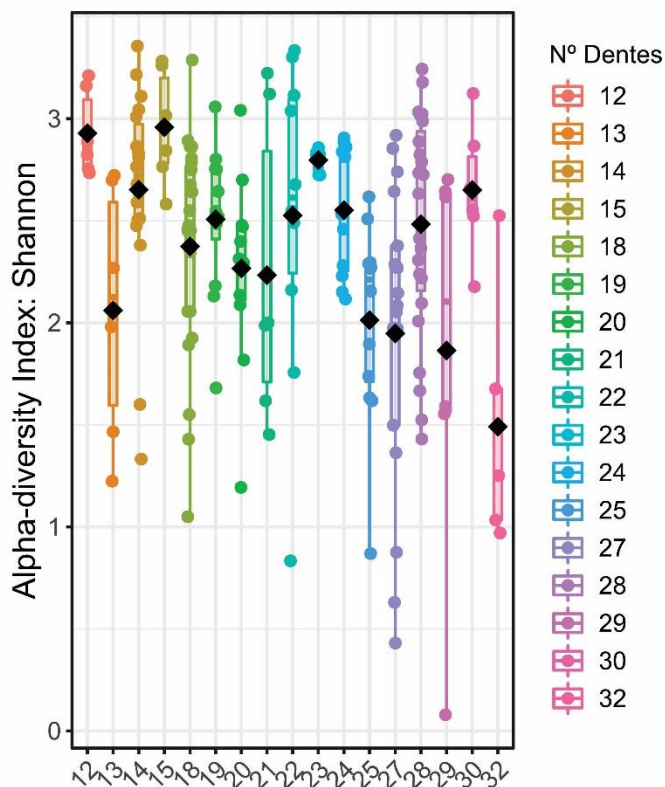
#### 5.4 Classificação da DoP e microbiota oral

A associação entre os parâmetros periodontais e a distribuição bacteriana é mostrada em forma de *heatmap* na **Figura 2**. Com base na classificação da DoP, o grau B apresentou uma microbiota mais diversa em comparação ao grau C. Com base na classificação do estágio, o estágio III mostrou a microbiota mais diversa, seguida dos estágios IV e II, nenhum dos pacientes incluídos apresentou classificação de estágio I ou II. A periodontite generalizada foi caracterizada pela presença de patógenos periodontais, como *Porphyromonas*, *Treponema* e *Fretibacterium*, enquanto os indicadores de periodontite localizada foram *Veillonella*, *Leptotrichia* e *Actinomyces*, entre outros gêneros. *Porphyromonas*, *Methylobacterium*, *Filifactor* e *Tannerella* foram indicadores para o grupo controle, como ilustrado nas **Figuras 3a e 3b**. O número de dentes presentes no momento da coleta também apresentou diferenças na diversificação bacteriana, sendo que os pacientes com 25 a 29 dentes em boca apresentaram menor alfa diversidade bacteriana, com uma relação direta entre a diminuição do número de dentes e o aumento da alfa diversidade ( $p=1.5814e-05$ ) (**Figura 4**).





**Figura 3 a.** Gêneros marcadores dos grupos HIV e controle **b.** Gêneros marcadores de periodontite localizada e generalizada.

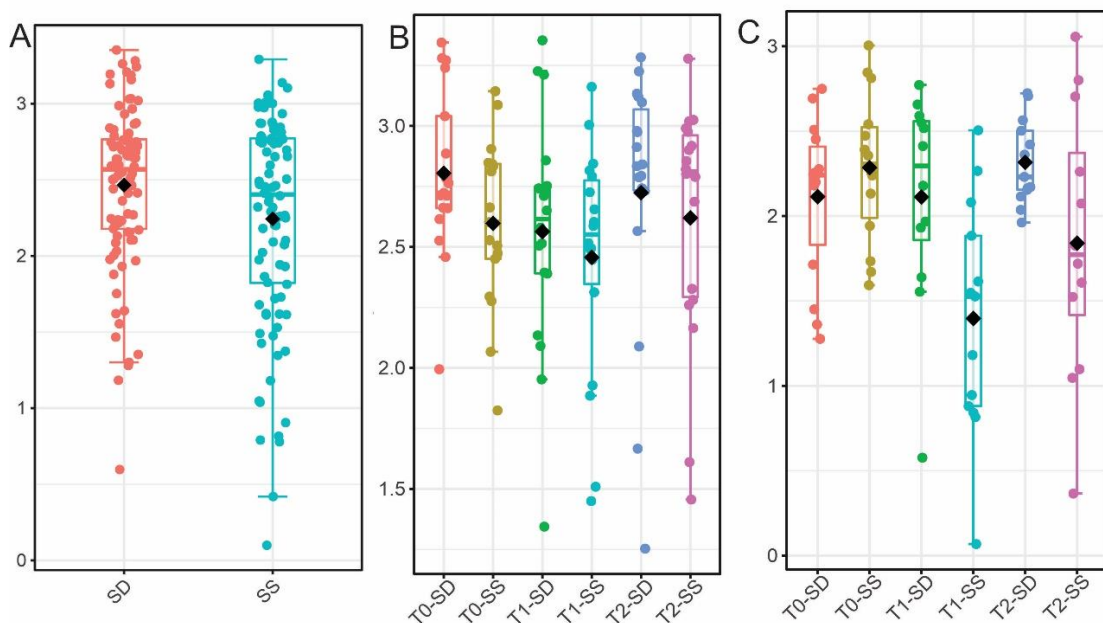


**Figura 4.** Índice Shannon de Alfa-diversidade na relação com o número de dentes presentes em boca ( $p= 1.5814e-05$ ).

### 5.5 Comparação da microbiota entre sítios saudáveis e doentes

As **figuras 5a, 5b e 5c** exibem a alfa diversidade bacteriana segundo os locais de coleta. Em uma visão geral de nossa amostra, o SS apresentou menor diversidade bacteriana em comparação ao SD ( $p= 0.0432076$ ). No T0, as amostras de SD e SS do grupo HIV apresentaram maior diversidade bacteriana em comparação às amostras do grupo controle ( $p= 0.056117$ ). No T1, diminuição na diversidade bacteriana foi observado para SSs e SDs em ambos os grupos ( $p: 5.3561e-11$ ), com uma diminuição marcada da diversidade dos SSs no grupo controle.

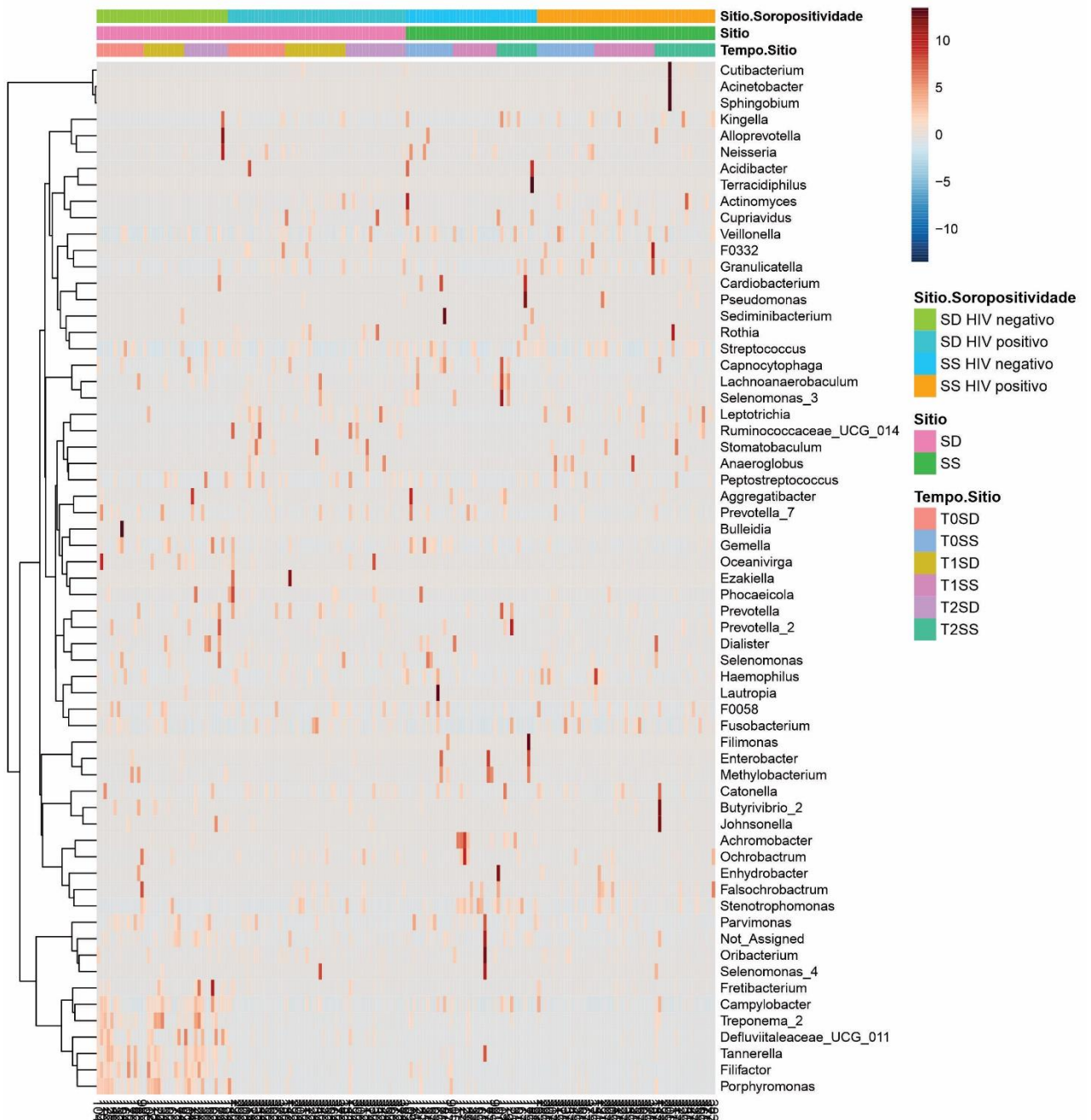
No T2, houve um aumento na alfa diversidade de ambos os grupos ( $p= 2.8709e09$ ), porém os SSs continuaram apresentando menor diversidade em comparação aos SDs, principalmente no grupo controle (**Figuras 5b e 5c**). A diminuição da diversidade bacteriana do T0 para os T1 e T2 corresponde com a execução do TPNC; entretanto, nas amostras dos SDs, ainda foi observada diversidade maior do que nas amostras de SSs.



**Figura 5. a.** Índice Shannon de Alfa-diversidade para os sítios de coleta ( $p= 0.0432076$ ) **b.** Alfa-diversidade dos sítios de coletas nos três tempos de coleta do grupo HIV **c.** Alfa-diversidade dos sítios de coletas nos três tempos de coleta do grupo Controle. SD: sítios doentes, SS: sítios saudáveis (T0  $p= 0.056117$ ), (T1  $p= 5.3561e-11$ ), (T2  $p= 2.8709e09$ ).



Em uma análise posterior sobre relação entre os locais de coleta, cinco gêneros foram agrupados no mesmo cluster tanto em SD como em SS em ambos os grupos, incluindo *Streptococcus*, *Veillonella*, *Kingella*, *Neisseria* e *Capnocytophaga*. *Peptostreptococcus*, *Leptotrichia*, *Fusobacterium* e *Campylobacter* também foram encontrados como gêneros abundantes em ambos os grupos. Os SDs do grupo controle apresentaram maior abundância de patógenos periodontais, como *Porphyromonas*, *Treponema* e *Tannerella*, enquanto nos SDs do grupo HIV foram identificados como gêneros abundantes *Veillonella*, *Stenotrophomonas* e *Prevotella*. Nas amostras dos SDs dos T1 e T2 do grupo HIV, foi observada redução significativa na abundância de gêneros, com níveis aumentados de *Anaeroglobus* e *Actinomyces*. Nas amostras de SD do grupo controle *Porphyromonas*, *Treponema* e *Tannerella* foram observadas no mesmo cluster, e em abundâncias semelhantes a partir do T0, também foram identificados no mesmo cluster os gêneros *Filifactor*, *Treponema* e *Defluviitaleaceae* (**Figura 6**).

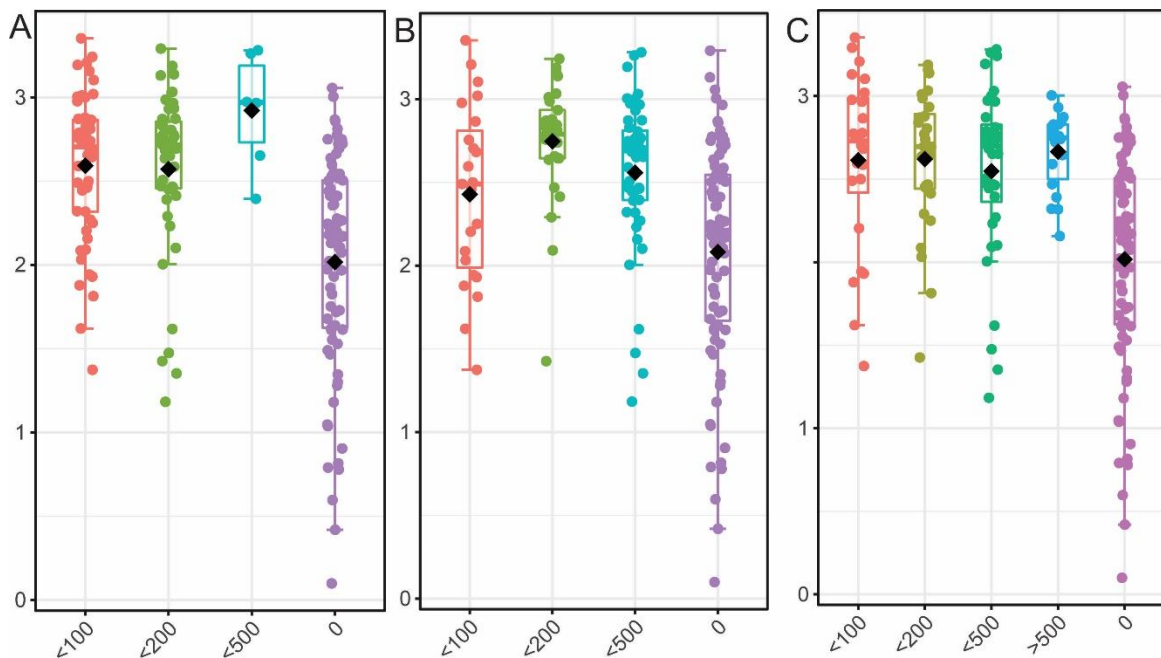


**Figura 6.** Abundância relativa de cada ACV (192 amostras) mostrada em um heatmap de escala vermelha com identidades taxonômicas e relação com os tempos de coleta, sítios de coleta e estado sorológico.

## 5.6 Estado imunológico e diversidade microbiana

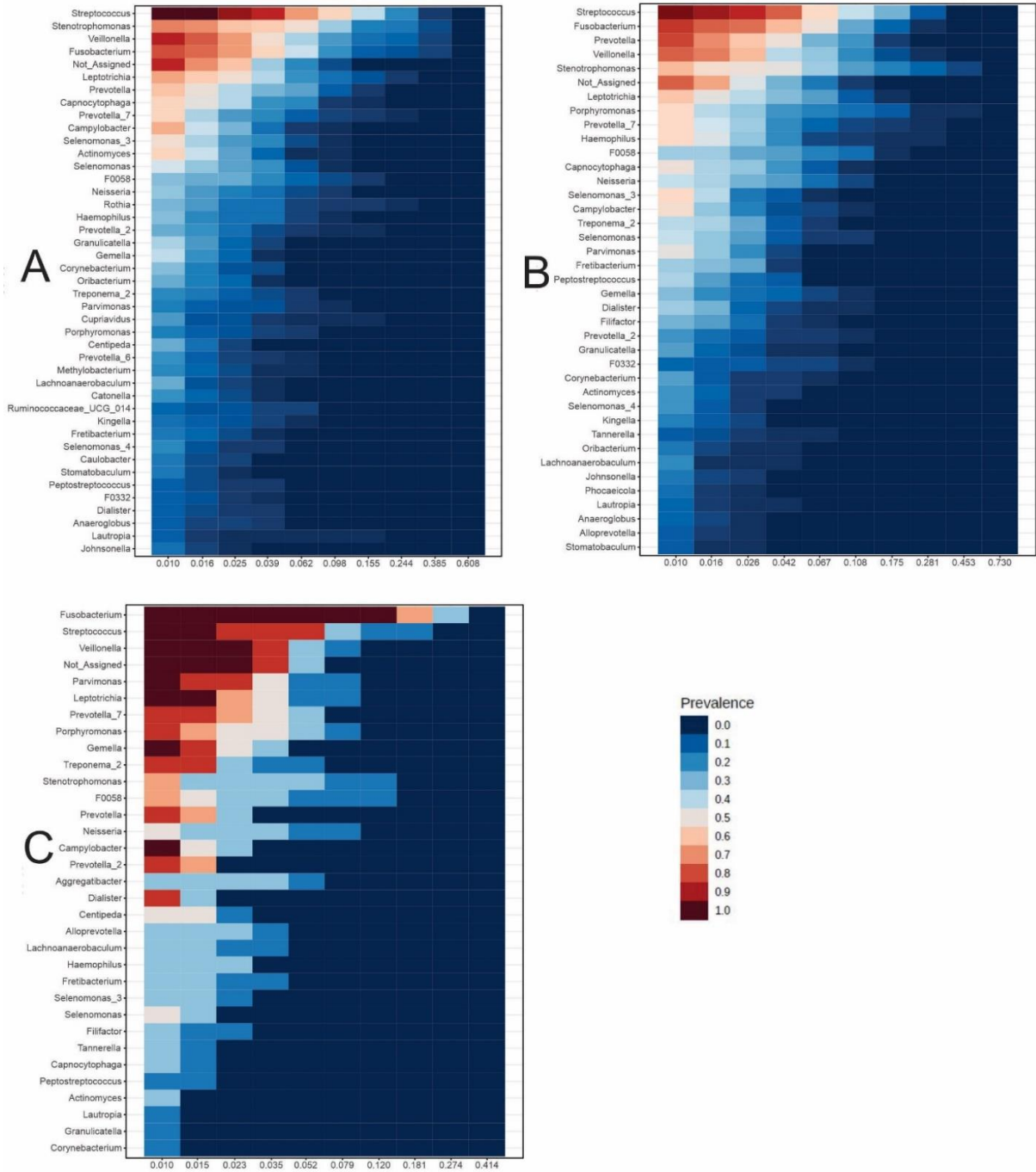
Foram avaliadas associações entre a abundância relativa de gêneros bacterianos específicos, contagens de TCD4+ e carga viral nos três tempos de coleta nas amostras do grupo HIV. Foi incluído o grupo controle somente como comparação para a alfa diversidade bacteriana, devido a que não foram verificadas as contagens de TCD4+ e carga viral para esse grupo controle. Foram observadas variações na alfa diversidade (índice de Shannon) após o TPNC nos T1 ( $p= 4.9469e-08$ ) e T2 ( $p= 2.8709e-09$ ) em comparação ao T0 (baseline) ( $p= 2.8652e-10$ ) nas três categorias de TCD4+ (**Figuras 7 a, b e c**). Houve diminuição da alfa diversidade bacteriana no T1 para as categorias <100 e <500, com um leve aumento no T2. Já a categoria <200 apresentou aumento para o T1, com uma leve diminuição para T2.

Contudo, deve ser destacado que os pacientes do grupo HIV apresentaram incremento nas contagens de TCD4+ nos T1 e T2, produzindo variações no número de pacientes incluídos em cada categoria, com um aumento na categoria <500 (200-500 cel/mm<sup>3</sup>) e presença de contagens de >500 cel/mm<sup>3</sup> somente para o T2.

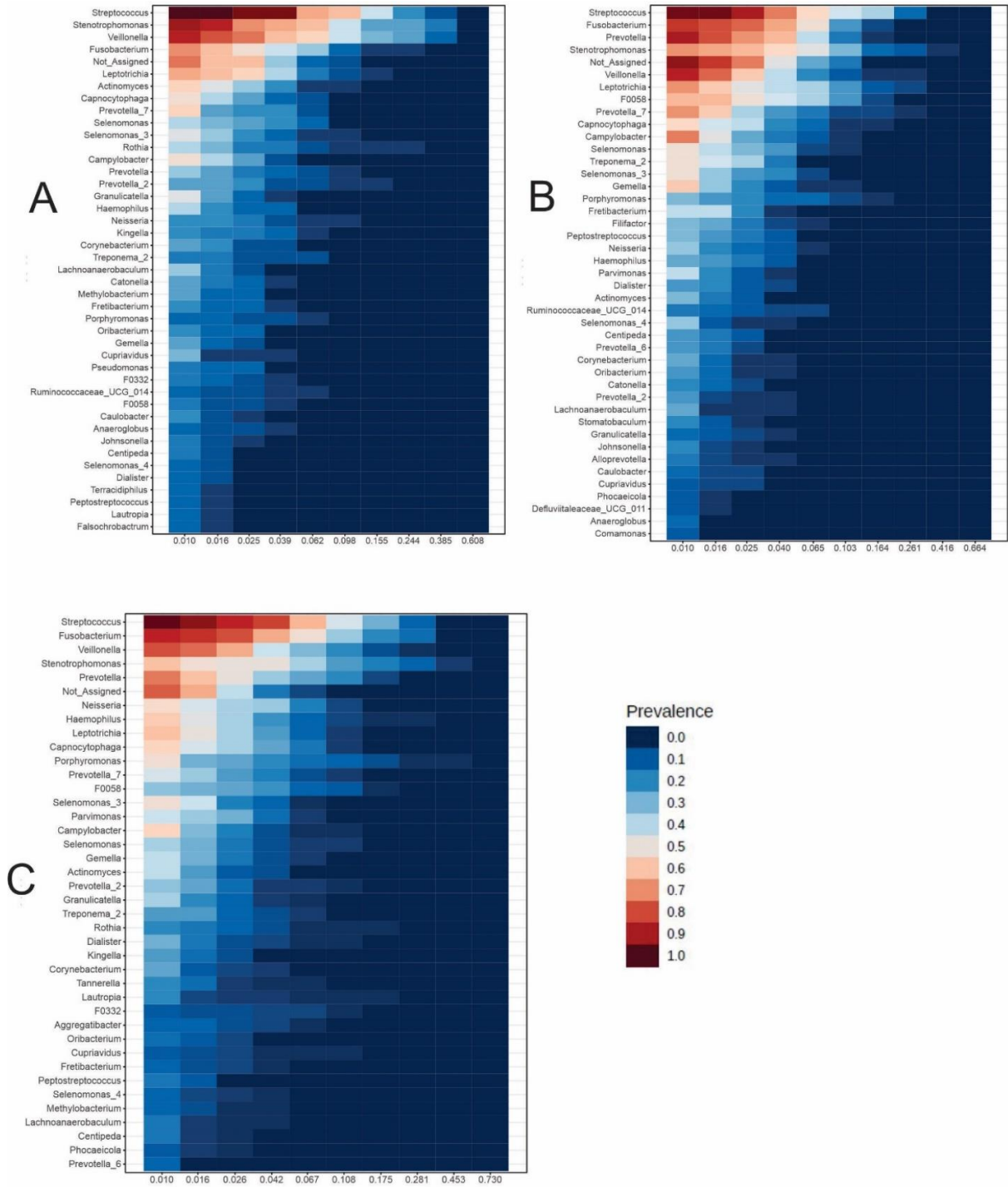


**Figura 7.** Índice Shannon de Alfa-diversidade bacteriana nas diferentes categorias de contagem de TCD4+ nos três tempos de coleta do grupo HIV **a.** T0 ( $p= 2.8652e-10$ ) **b.** T1 ( $p= 4.9469e-08$ ) **c.** T2 ( $p= 2.8709e-09$ ). 0= grupo Controle.

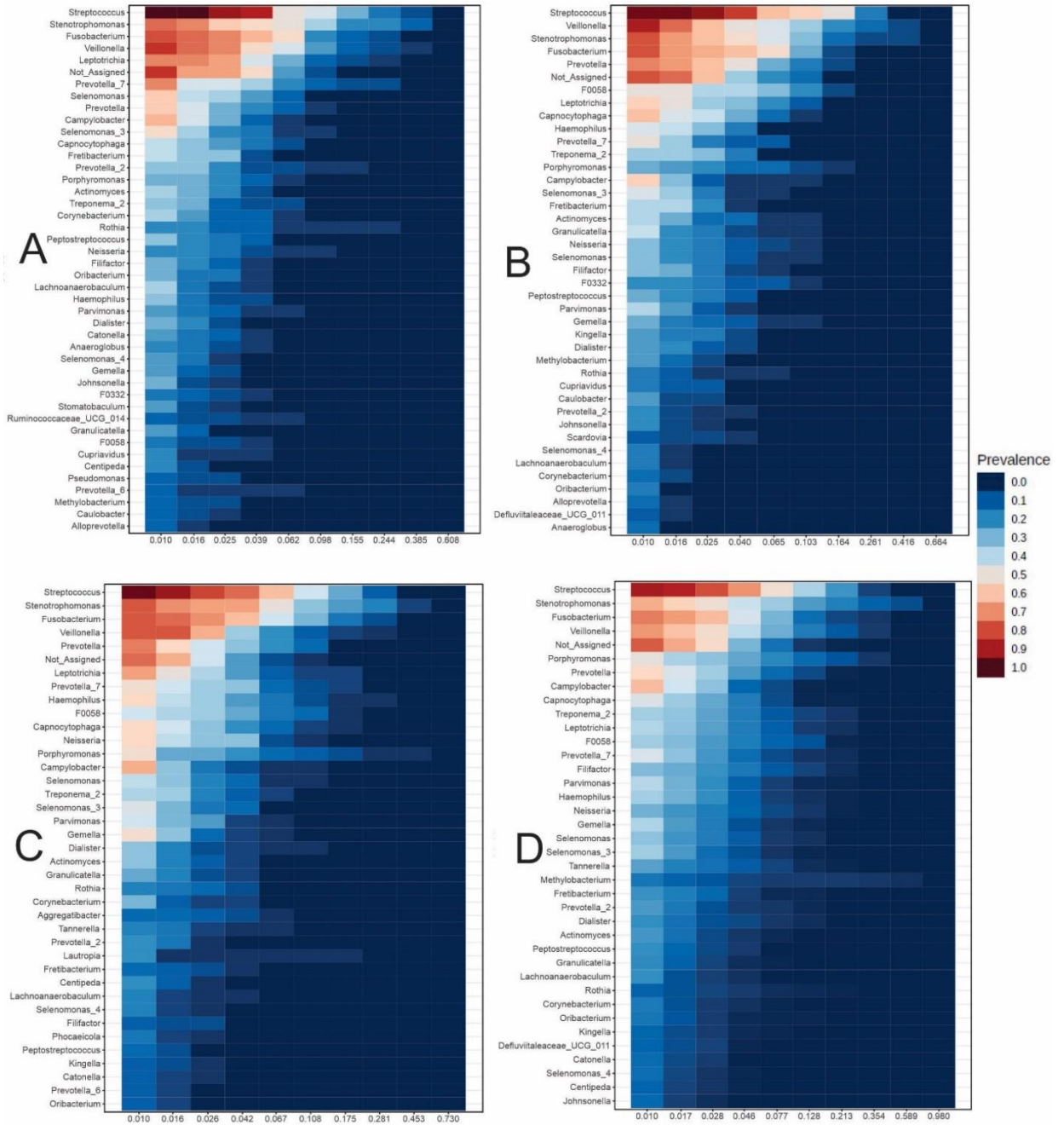
Pacientes com contagens de TCD4 +  $<100$  cel/mm<sup>3</sup> mostraram uma abundância significativa de *Streptococcus*, *Stenotrophomonas*, *Fusobacterium* e *Veillonella* nos T0, T1 e T2. Enriquecimento de *Prevotella* e diminuição do gênero *Stenotrophomonas* foram observados no T2. Nos pacientes com contagens de  $<200$  cel/mm<sup>3</sup>, o gênero mais abundante foi *Streptococcus* nos três tempos de coleta. *Fusobacterium*, *Prevotella* e *Veillonella* foram mais abundantes no T0 e T1, e *Veillonella* e *Stenotrophomonas* no T2. Pacientes com contagens de TCD4 +  $<500$  cel/mm<sup>3</sup>, apresentaram maior variação da alfa- diversidade ao longo do tempo. Nos T1 e T2, *Streptococcus* foi o gênero mais abundante, seguido por diferentes abundâncias de *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Stenotrophomonas* e *Prevotella*. No T0, além dos gêneros previamente identificados em T1 e T2 (*Fusobacterium*, *Veillonella*, *Stenotrophomonas* e *Prevotella*), observou-se enriquecimento de *Parvimonas*, *Leptotrichia*, *Gemella*, *Treponema*, *Campylobacter* e *Dialister*, porém este resultado é baseado em um único paciente (T0  $<500$  cel/mm<sup>3</sup> n = 1). Apenas dois pacientes apresentaram contagem de TCD4 +  $> 500$  cel/mm<sup>3</sup>, coletados no T2, os quais apresentaram a menor abundância de patógenos periodontais entre todas as contagens de TCD4 + nos três tempos de coleta. Os gráficos de abundância relativa e a associação com o TCD4 + são mostrados nas **Figuras 8, 9 e 10**.



**Figura 8.** Abundância relativa dos gêneros bacterianos em relação às contagens de TCD4+ no TO **3a.**  $<100 \text{ cel/mm}^3$  **3b.**  $101-199 \text{ cel/mm}^3$  **3c.**  $200-500 \text{ cel/mm}^3$ .

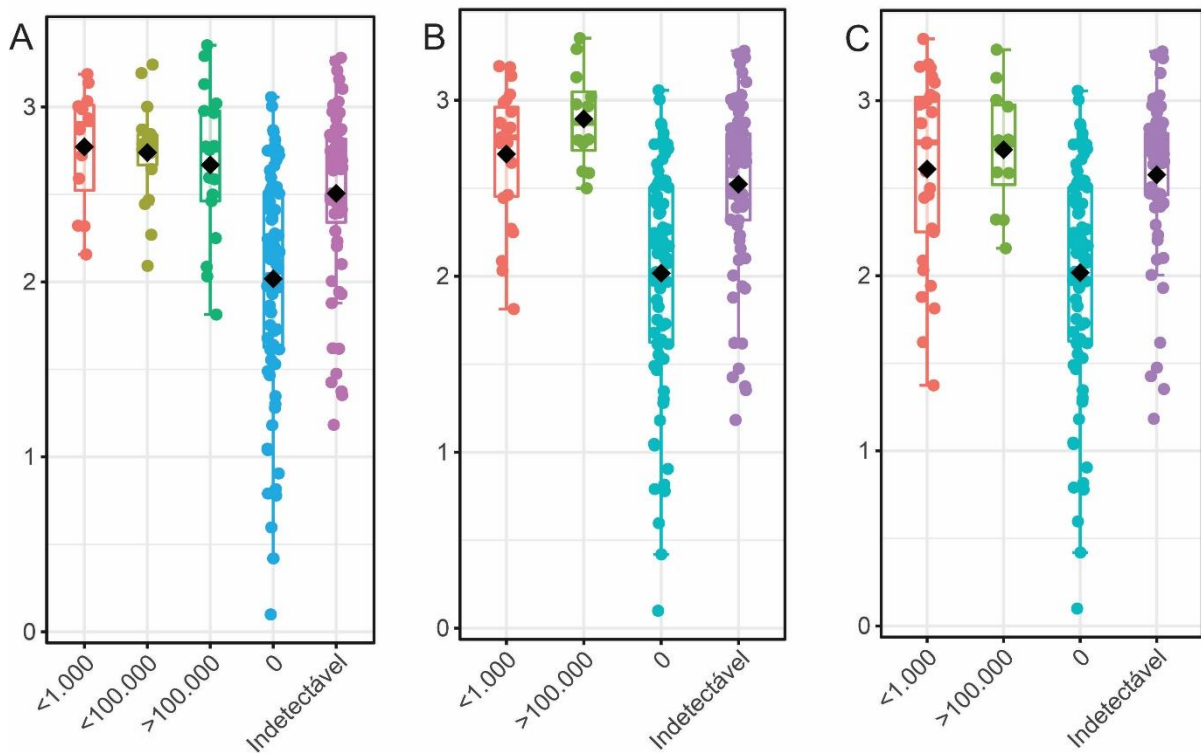


**Figura 9.** Abundância relativa dos gêneros bacterianos em relação às contagens de TCD4+ no T1 **a.** <math><100\text{ cel/mm}^3</math> **b.** <math>101-199\text{ cel/mm}^3</math> **c.** <math>200-500\text{ cel/mm}^3</math>.



**Figura 10.** Abundância relativa dos gêneros bacterianos em relação às contagens de TCD4+ no T2 **a.** <100 cel/mm<sup>3</sup> **b.** 101-199 cel/mm<sup>3</sup> **c.** 200-500 cel/mm<sup>3</sup> **d.** >500 cel/mm<sup>3</sup>

Em relação à carga viral, quando todas as amostras do grupo HIV foram analisadas em conjunto, uma menor abundância relativa de bactérias foi observada em pacientes com carga viral indetectável nos três tempos de coleta, enquanto uma diversidade aumentada foi observada em pacientes com carga detectável (**Figuras 11 a, b e c**) ( $p= 4.704e-10$ ,  $5.3561e-11$ ,  $6.0381e-10$  respectivamente). Houve uma diminuição na alfa diversidade da categoria <1.000 nos T1 e T2. A carga <100.000 apresentou um aumento da alfa diversidade para o T1, e uma diminuição para o T2, mostrando uma alfa diversidade similar à do T0. Não houve mudanças notáveis nas cargas indetectáveis nos diferentes tempos.

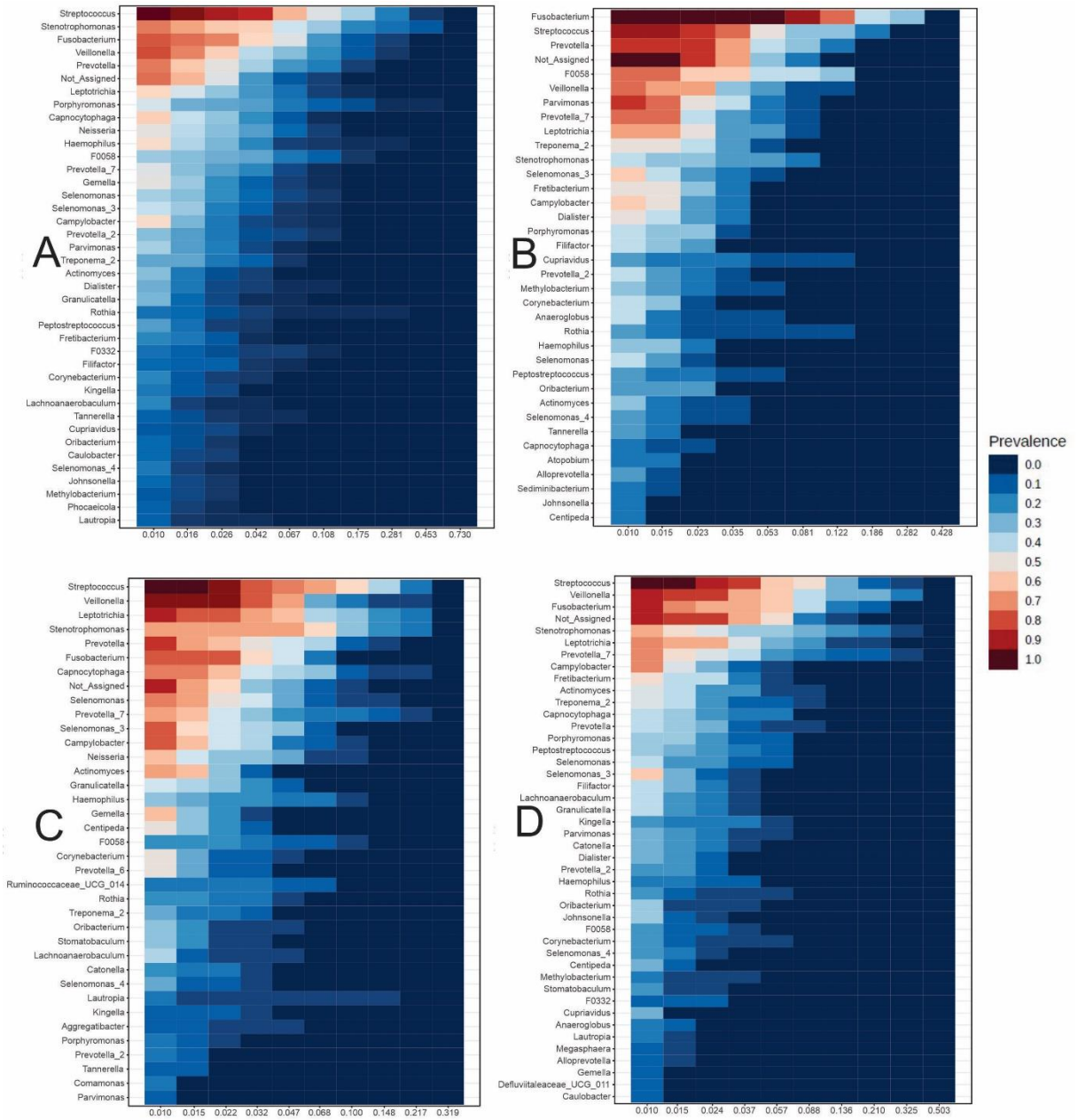


**Figura 11.** Índice Shannon de Alfa-diversidade bacteriana nas diferentes categorias de carga viral nos três tempos de coleta do grupo HIV **a.** T0 ( $p= 4.704e-10$ ) **b.** T1 ( $p= 5.3561e-11$ ) **c.** T2 ( $p= 6.0381e-10$ ). 0= grupo Controle.

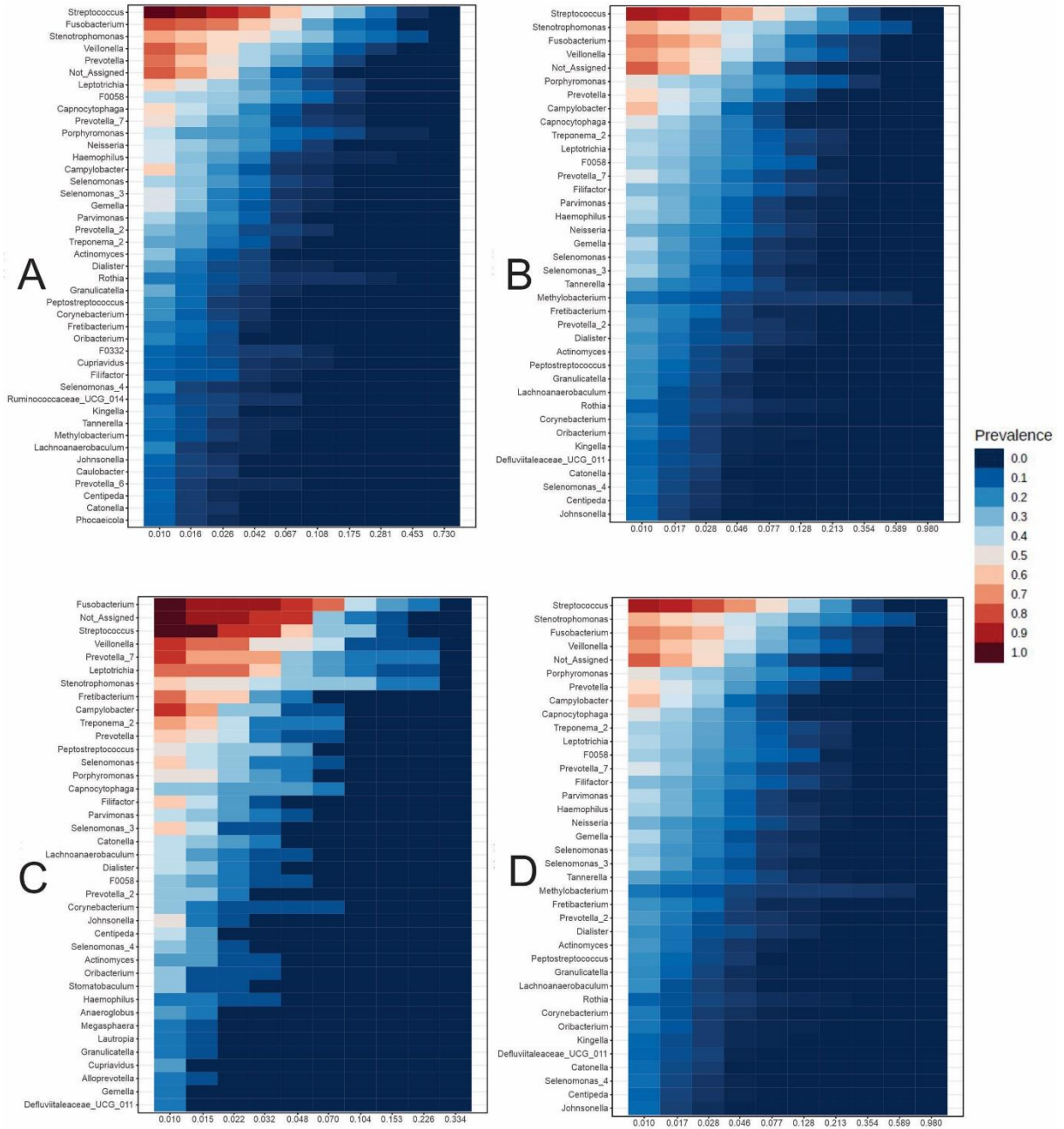


Nas **figuras 12, 13 e 14** são mostrados os gráficos de abundância relativa em relação à carga viral e tempos de coleta. Na carga viral indetectável, uma abundância semelhante de *Streptococcus*, *Stenotrophomonas*, *Fusobacterium*, *Veillonella* e *Prevotella* foi demonstrada ao longo do estudo. No T2, foi observado enriquecimento de *Capnocytophaga*, *Leptotrichia* e *Gemella*.

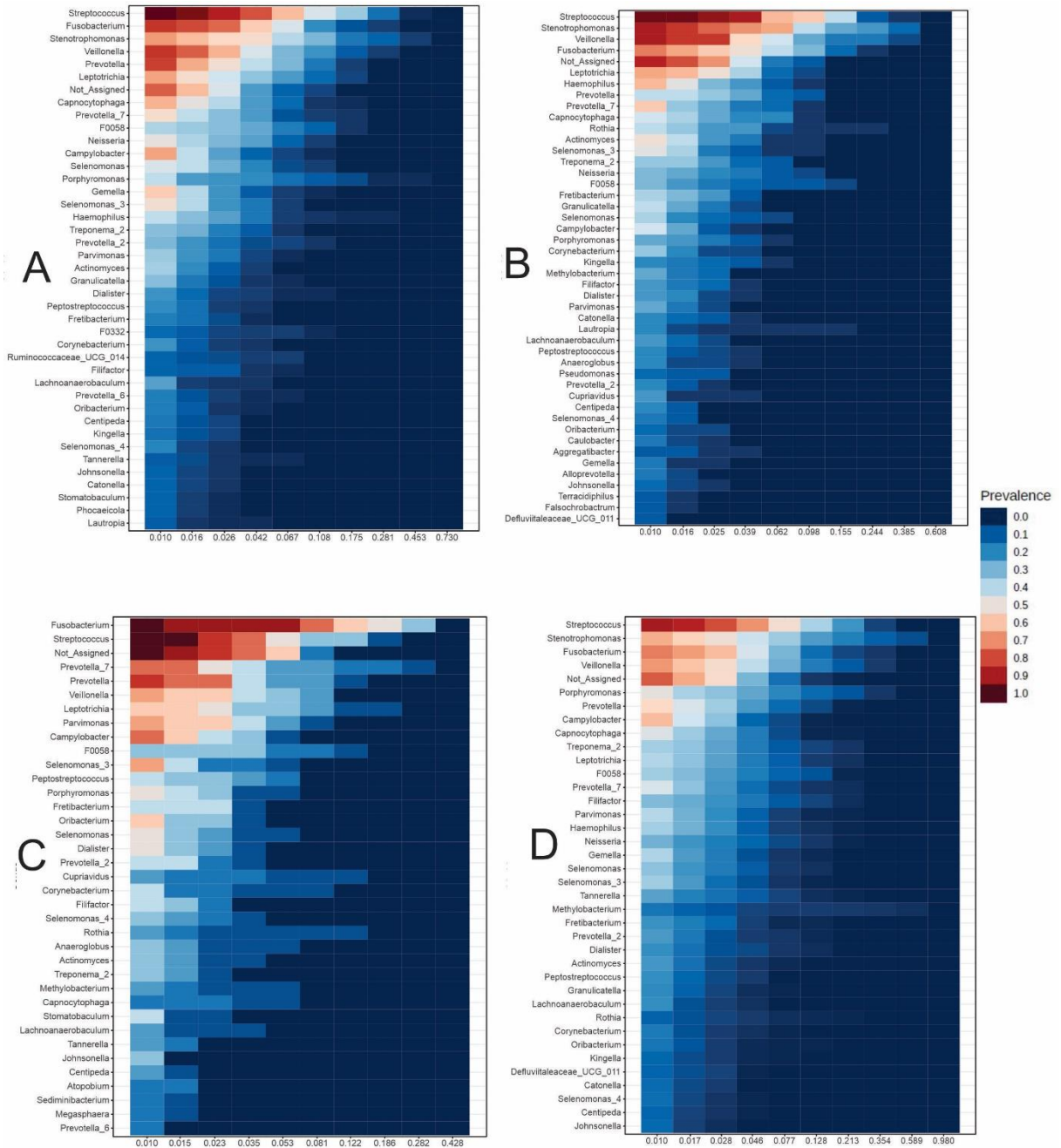
Em pacientes com carga viral <1.000 cópias/ml, *Fusobacterium* foi detectado como um gênero abundante no T0, que foi posteriormente reduzido nos T1 e T2, e uma diminuição da abundância relativa de periodontopatógenos foi observada nos T1 e T2. O gênero *Streptococcus* apresentou abundância semelhante nos três tempos de coleta. Apenas três pacientes apresentaram carga viral <100.000 cópias/ml, registrada no T0. Neste parâmetro, maior alfa diversidade de gêneros foi identificada em comparação à carga viral de <1.000 cópias/ml. *Streptococcus* foi o gênero mais abundante, *Veillonella*, *Leptotrichia*, *Prevotella*, *Campylobacter* e *Fusobacterium* também foram identificados como gêneros abundantes. Na carga viral de >100.000 cópias/ml, no T0, *Streptococcus*, *Veillonella* e *Fusobacterium* foram detectados como os gêneros mais abundantes, enquanto uma diminuição acentuada na abundância relativa de periodontopatógenos foi observada nos T1 e T2 após TPNC.



**Figura 12.** Abundância relativa dos gêneros bacterianos em relação à carga viral no T0 **a.** Carga viral indetectável **b.** <1.000 copias/ml **c.** <100.000 copias/ml **d.** >100.000 copias/ml.



**Figura 13.** Abundância relativa dos gêneros bacterianos em relação à carga viral no T1 **a.** Carga viral indetectável **b.** <1.000 copias/ml **c.** <100.000 copias/ml **d.** >100.000 copias/ml.



**Figura 14.** Abundância relativa dos gêneros bacterianos em relação à carga viral no T2 **a.** Carga viral indetectável **b.** <1.000 copias/ml **c.** <100.000 copias/ml **d.** >100.000 copias/ml.



## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo comparou a microbiota bacteriana subgengival em pacientes com periodontite infectados e não infectados pelo HIV-1. Foi realizada uma análise comparativa das alterações na microbiota com base em parâmetros clínicos e imunológicos e controles após o TPNC, incluindo locais com e sem sinais clínicos de DoP.

Alfa diversidade é definida como o número de espécies presentes em um local ou ecossistema, enquanto a beta diversidade se refere à variedade espécies que estão presentes num habitat, medida que depende da comparação das espécies presentes em dois ou mais locais (WHITTAKER, 1972), dessa forma maior alfa diversidade representaria uma maior quantidade de microorganismo presentes em um sitio, por outro lado, maior beta diversidade representaria maior numero de especies diferentes, sem necessariamente ter uma quantidade alta de microorganismos presentes. Nossos resultados revelaram que a infecção pelo HIV-1 foi associada a maior alfa diversidade bacteriana do biofilme subgengival em comparação ao grupo controle. Por outro lado, na beta diversidade, foi observado que o grupo HIV apresentou as mesmas espécies que o grupo controle, mas o grupo controle apresentou algumas espécies diferentes às do grupo HIV. Existem variações na literatura em relação à diversidade bacteriana nos pacientes infectados pelo HIV-1. Estudos como os de Beck et al., (2015) e Ferreira et al., (2016) relatam presença de maior diversidade bacteriana em amostras de enxaguado bucal e biofilme subgengival de pacientes com HIV em comparação às amostras de pacientes não infectados. Em contraposição, Annavajhala et al., (2020) e Li et al., (2014) observaram uma diversidade bacteriana oral significativamente menor em amostras de biofilme subgengival e saliva de pacientes infectados pelo HIV-1.

A diferença entre a microbiota de pacientes infectados e não infectados pelo HIV-1 pode estar relacionada à alta porcentagem de pacientes com infecções oportunistas no grupo HIV. Infecções pulmonares como a pneumonia têm sido associadas a aumento na abundância de bactérias em amostras orais (IWAI et al., 2012; BECK et al., 2015). De igual forma, o uso de TARV é relacionado a modificações na microbiota dos pacientes com HIV. O uso de INTR tem sido relacionado à diminuição da alfa diversidade bacteriana oral, porém o uso de terapias combinadas, como na maioria dos pacientes incluídos nesse estudo, não têm mostrado o mesmo efeito (BECK et al., 2015; ANNAVAJHALA et al., 2020). São necessários mais estudos sobre a relação entre a TARV, o desenvolvimento de AIDS e a diversidade bacteriana para compreender os efeitos desta terapia a longo prazo na microbiota. Além disso, o estado da DoP, em junção às diferentes variáveis clínicas como cárie, presença

de *Candida* spp, dentes ausentes, entre outros, podem ter maior influência nas mudanças do microbioma subgingival, que o estado imunológico *per se*. Os pacientes do grupo HIV apresentaram, embora sem significância estatística, pior condição periodontal e menor número de dentes em comparação ao grupo controle, ambos fatores relacionados a alfa diversidade bacteriana aumentada (BECK et al., 2015; GRIFFEN et al., 2019; ANNAVAJHALA et al., 2020).

A abundância relativa é um componente da biodiversidade, ela se refere a quão comum é um gênero em relação a outros gêneros localizados numa mesma comunidade (WHITTAKER, 1972), nesse contexto, as comunidades desse estudo são representadas pelos sítios de coleta, SD ou SS. *Streptococcus* foi o gênero mais abundante entre nossas amostras subgingivais nos SDs e SSs, seguido por *Fusobacterium*, *Veillonella* e *Prevotella*, cuja abundância relativa mudou dependendo do tempo de coleta e dos parâmetros periodontais e imunológicos. *Streptococcus*, gênero anaeróbio facultativo Gram positivo e *Veillonella*, anaeróbia Gram negativa, foram relatados anteriormente como gêneros dominantes em pacientes com HIV-1 com DoP (NOGUERA-JULIAN et al., 2017). Esses dois gêneros são relacionados à saúde no biofilme subgingival, atuam no desenvolvimento do biofilme como colonizadores precoces, e como bactérias de ligação, também ajudam na coagregação de espécies patogênicas. O gênero *Fusobacterium*, gênero anaeróbio Gram negativo, é considerado um membro estrutural do biofilme subgingival com potencial patogênico sinérgico, predominantemente associado a *Prevotella*. Esses dois gêneros estão relacionados à destruição de tecidos e à modificação da resposta do hospedeiro, e são encontrados tanto em saúde quanto em DoP (SOCRANSKY et al., 1998; HOLT; EBERSOLE, 2005), e têm sido descritos como generos abundantes em pacientes em uso de TARV (LI et al., 2014).

Gêneros de bactérias tradicionalmente ligados à DoP, como *Porphyromonas*, *Treponema* e *Tannerella*, foram observados em menor abundância na microbiota do grupo HIV em comparação ao grupo controle. Apesar da abundância mais generalizada observada nas amostras dos SDs, foram encontrados em baixa abundância em comparação com os outros gêneros presentes. Essa tendência de diferentes comunidades microbianas dentro da periodontite também foi identificada em estudos anteriores, onde dois tipos de microbiota foram descritos na periodontite, um com predominância de periodontopatógenos e um segundo, com predominância de espécies comensais e relacionadas a saúde (ZHOU et al., 2014; HONG et al., 2015; NOGUERA-JULIAN et al., 2017; ANNAVAJHALA et al., 2020). Este último corresponde à microbiota encontrada em nosso estudo para o grupo HIV. Além

disso, a presença de *Porphyromonas*, *Treponema* e *Tannerella* foi associada a pacientes não infectados pelo HIV-1, com periodontite generalizada, estágio 4 e grau B da classificação de DoP.

Em relação aos sítios de coleta, com e sem sinais clínicos de DoP, os SDs apresentaram maior alfa diversidade bacteriana nos três tempos de coleta em comparação aos SSs. Este resultado está de acordo com os resultados relatados por Chen et al. (2018) e Tsai et al. (2018), onde uma maior alfa diversidade de bactérias foi encontrada em amostras de pacientes saudáveis com DoP, em comparação a amostras de pacientes sem DoP. A diminuição da alfa diversidade de bactérias para ambos os grupos nos SDs e SSs nos T1 sugere que TPNC produziu uma reorganização do biofilme subgingival com redução de gêneros periodontopatogênicos e comensais como, *Peptostreptococcus*, *Aggregatibacter*, *Fusobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Filifactor*, *Treponema*, *Tannerella* e *Porphyromonas*, resultado que está em acordo com os resultados obtidos por Chen et al. (2018) e Lu et al. (2019). A diminuição da alfa diversidade no T2 pode estar relacionada ao reestabelecimento do biofilme periodontopatogênico, isto é, devido a que os efeitos do TPNC são considerados transitórios, e após três meses pode ser identificada uma regressão na microbiota (BEIKLER et al., 2004; LU et al., 2019).

Estudos prévios têm relatado que nos pacientes com HIV-1, as contagens de TCD4+ e carga viral não apresentam relação na modificação da microbiota, e vice-versa (BECK et al., 2015; GRIFFEN et al., 2019; ANNAVAJHALA et al., 2020). Os resultados do presente estudo mostraram que, na comparação entre os parâmetros imunológicos do HIV-1 e os tempos de coleta, houve alterações tanto na alfa diversidade da microbiota como nos parâmetros imunológicos do T0 (baseline), antes do TPNC, para T1 e T2, após o TPNC. Na análise da associação entre as contagens de TCD4+ e os tempos de coleta, no T2 a alfa diversidade bacteriana foi a mais semelhante à do grupo controle em todas as contagens de TCD4+, exceto níveis superiores a 500 cel/mm<sup>3</sup>, onde uma alfa diversidade reduzida foi encontrada, no entanto, somente dois pacientes foram incluídos neste parâmetro, resultando em uma amostra insuficiente.

Em relação à carga viral, nas amostras de pacientes com carga viral indetectável a alfa diversidade bacteriana foi a mais próxima à do grupo controle, com mínimas alterações antes e após o TPNC. No T2 (90 dias após o TPNC), as amostras de pacientes com carga viral inferior a 1.000 cópias/ml apresentaram diminuição na alfa diversidade bacteriana. Pereira et al. (2014) relataram maior abundância bacteriana entre os níveis detectáveis de carga viral,



incluindo patógenos periodontais e bactérias relacionadas à saúde, resultado que está parcialmente de acordo com nosso estudo, onde uma maior alfa diversidade bacteriana foi detectada nas amostras de pacientes com cargas virais detectáveis, no entanto, como foi descrito previamente, o grupo HIV apresentou baixa abundância de periodontopatógenos. Contudo, deve ser destacado que os pacientes do grupo HIV apresentaram melhora nas contagens de TCD4+ e carga viral nos T1 e T2, produzindo variações no número de pacientes incluídos em cada categoria, com aumento no número de pacientes nas categorias <500 (200-500 cel/mm<sup>3</sup>) de TCD4+ e <1.000 cópias/ml de carga viral, produzindo variações estatisticamente significativas entre os tempos de coleta.

Nosso estudo apresentou diversas limitações, incluindo o pequeno tamanho da amostra, o que dificultou a realização de análises estatísticas mais robustas. Além disso, limitações inerentes ao procedimento de sequenciamento do 16S rRNA, como a relatividade do resultado obtido com esta técnica e a ausência de determinação das relações patogênicas e sinérgicas dentro da microbiota (JO; KENNEDY; KONG, 2016). Nossa metodologia foi baseada no sequenciamento do fragmento V3-V4, Kim; Morrison e Yu (2011) mostraram que nas OTUs, ou em nosso caso nas ASV, a definição e riqueza são estimadas de forma mais confiável pelo sequenciamento do gene 16S quase completo, em vez do sequenciamento de uma região parcial. Essa limitação não nos permitiu classificar as reads do sequenciamento em níveis mais específicos (espécie ou subespécie).

Apesar disso, nossos resultados sugerem que o TPNC produziu uma reorganização do biofilme subgingival, aumentando a alfa diversidade bacteriana, se assemelhando ao grupo controle. Além disso, a microbiota identificada no grupo HIV foi correlacionada com formas menos agressivas de periodontite, com uma combinação de gêneros da microbiota residente associados a doença e a saúde, como *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Leptotrichia*, *Rothia* e *Actinomyces* (HONG et al., 2015). A ampla presença de *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia* e *Actinomyces* também foi relatada por Lu et al. (2019) em pacientes com DoP três meses após o TPNC. Baseado no anterior, pode-se inferir que o estado de imunossupressão produzido pela infecção pelo HIV-1 pode desestabilizar de forma significativa as relações bacterianas comensais normalmente encontradas na microbiota oral, causando aumento da alfa diversidade nos locais com DoP.

Embora não tenhamos encontrado uma variação significativa nas bactérias presentes no biofilme subgingival entre os tempos de coleta antes e depois do TPNC, uma modificação na abundância dos gêneros já estabelecidos para a DoP foi observada. Essas alterações no

biofilme subgengival reforçam a importância do TPNC em pacientes infectados pelo HIV-1 com DoP.

## 7 CONCLUSÃO

Diferentes perfis de microbiota subgengival foram identificados nos pacientes infectados pelo HIV-1 com periodontite em comparação com pacientes não infectados pelo HIV-1. Em pacientes infectados pelo HIV-1 foi encontrada microbiota mais diversa, composta principalmente por gêneros da microbiota residente e gêneros comensais, em contraste com uma microbiota menos diversa, com mais abundância de patógenos periodontais detectados em pacientes não-infectados pelo HIV-1 com periodontite.

O TPNC produziu alterações na microbiota de ambos os grupos, com maior impacto no grupo HIV, levando à diminuição da alfa diversidade tanto em SS como em SD. No grupo controle, os SSs mostraram diminuição da alfa diversidade bacteriana após o TPNC, enquanto os SDs mantiveram-se semelhante ao baseline. Talvez o comportamento dos SDs no grupo HIV tenha sido diferente do grupo controle por influência da TARV na microbiota. Esses resultados necessitam validação com estudos adicionais.



## REFERÊNCIAS

1. **1993 Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS Among Adolescents and Adults.** Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00018871.htm>>. Acesso em: 8 mar. 2020.
2. ALPAGOT, T. et al. Risk factors for periodontitis in HIV+ patients. **Journal of Periodontal Research**, v. 39, n. 3, p. 149–157, jun. 2004.
3. ANDREWS, S. **Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data.** Disponível em: <<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>. Acesso em: 14 out. 2020.
4. ANNAVAJHALA, M. K. et al. Oral and Gut Microbial Diversity and Immune Regulation in Patients with HIV on Antiretroviral Therapy. **mSphere**, v. 5, n. 1, 5 fev. 2020.
5. ARMITAGE, G. C. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. **Annals of Periodontology**, v. 4, n. 1, p. 1–6, dez. 1999.
6. BARNES, V. M. et al. Global Metabolomic Analysis of Human Saliva and Plasma from Healthy and Diabetic Subjects, with and without Periodontal Disease. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e105181, 18 ago. 2014.
7. BARR, C.; LOPEZ, M. R.; RUA-DOBLES, A. Periodontal changes by HIV serostatus in a cohort of homosexual and bisexual men. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 19, n. 10, p. 794–801, nov. 1992.
8. BECK, J. M. et al. Multicenter Comparison of Lung and Oral Microbiomes of HIV-infected and HIV-uninfected Individuals. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 192, n. 11, p. 1335–1344, dez. 2015.
9. BEIKLER, T. et al. Microbiological shifts in intra- and extraoral habitats following mechanical periodontal therapy. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 31, n. 9, p. 777–783, set. 2004.
10. BERBERI, A.; NOUJEIM, Z. Epidemiology and Relationships between CD4+ Counts and Oral Lesions among 50 Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus. **Journal of international oral health : JIOH**, v. 7, n. 1, p. 18–21, jan. 2015.
11. BIERNE, H.; HAMON, M.; COSSART, P. Epigenetics and Bacterial Infections. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 12, p. a010272–a010272, 1 dez. 2012.
12. CALLAHAN, B. **Silva taxonomic training data formatted for DADA2 (Silva version 132)[Data set]Zendo**, 2018. .
13. CALLAHAN, B. J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, 23 jul. 2016.

14. CAMPBELL, D. T., STANLEY, J. C., & GAGE, N. L. **Experimental and quasi-experimental designs in prevention research**. NIDA research monograph, 1963.
15. CHEN, C. et al. Oral microbiota of periodontal health and disease and their changes after nonsurgical periodontal therapy. **The ISME Journal**, v. 12, n. 5, p. 1210–1224, 16 maio 2018.
16. Classification and diagnostic criteria for oral lesions in HIV infection. EC-Clearinghouse on Oral Problems Related to HIV Infection and WHO Collaborating Centre on Oral Manifestations of the Immunodeficiency Virus. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 22, n. 7, p. 289–291, ago. 1993.
17. CROSS, D. L.; SMITH, G. L. F. Comparison of periodontal disease in HIV seropositive subjects and controls (II).. Microbiology, immunology and predictors of disease progression. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 22, n. 7, p. 569–577, jul. 1995.
18. DOYLE, J. J.; DOYLE, J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 13, p. 39–40, 1990.
19. FERREIRA, D. C. et al. Subgingival bacterial community profiles in HIV-infected Brazilian adults with chronic periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, v. 51, n. 1, p. 95–102, fev. 2016.
20. CATON, J. et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 45, n. March, p. S1–S8, 2018.
21. GONÇALVES, L. de S. et al. Clinical and Microbiological Profiles of Human Immunodeficiency Virus (HIV)–Seropositive Brazilians Undergoing Highly Active Antiretroviral Therapy and HIV-Seronegative Brazilians With Chronic Periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 78, n. 1, p. 87–96, 2007.
22. GONÇALVES, L. S.; GONÇALVES, B. M. L.; FONTES, T. V. Periodontal disease in HIV-infected adults in the HAART era: Clinical, immunological, and microbiological aspects. **Archives of Oral Biology**, v. 58, n. 10, p. 1385–1396, 2013.
23. GRIFFEN, A. L. et al. Significant effect of HIV/HAART on oral microbiota using multivariate analysis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 19946, 27 dez. 2019.
24. GROENEWEGEN, H. et al. Severe periodontitis is more common in HIV- infected patients. **Journal of Infection**, v. 78, n. 3, p. 171–177, mar. 2019.
25. HOLT, S. C.; EBERSOLE, J. L. Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the “red complex”, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 38, n. 1, p. 72–122, jun. 2005.
26. HONG, B.-Y. et al. Microbiome Profiles in Periodontitis in Relation to Host and Disease Characteristics. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0127077, 18 maio 2015.
27. ILLUMINA. 16S Metagenomic Sequencing Library. **Illumina.com**, n. B, p. 1–28, 2013.
28. IWAI, S. et al. Oral and Airway Microbiota in HIV-Infected Pneumonia Patients.

- Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 9, p. 2995–3002, 1 set. 2012.
29. JEPSEN, S. et al. Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 45, p. S219–S229, jun. 2018.
  30. JI, S.; CHOI, Y. S.; CHOI, Y. Bacterial invasion and persistence: critical events in the pathogenesis of periodontitis? **Journal of Periodontal Research**, v. 50, n. 5, p. 570–585, 8 out. 2015.
  31. JO, J.-H.; KENNEDY, E. A.; KONG, H. H. Research Techniques Made Simple: Bacterial 16S Ribosomal RNA Gene Sequencing in Cutaneous Research. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 136, n. 3, p. e23–e27, mar. 2016.
  32. KIM, M.; MORRISON, M.; YU, Z. Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. **Journal of Microbiological Methods**, v. 84, n. 1, p. 81–87, jan. 2011.
  33. KINANE et al. Humoral immune responses in periodontal disease may have mucosal and systemic immune features. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 115, n. 3, p. 534–541, mar. 1999.
  34. KINANE, D. F.; STATHOPOULOU, P. G.; PAPAPANOU, P. N. Periodontal diseases. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 17038, 21 dez. 2017.
  35. LAMONT, R. J.; KOO, H.; HAJISHENGALLIS, G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 12, p. 745–759, 2018.
  36. LI, Y. et al. HIV Infection and Microbial Diversity in Saliva. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1400–1411, 1 maio 2014.
  37. LINDHE, JAN; LANG, N. P. **Clinical Periodontology and Implant Dentistry**. [s.l.: s.n.]
  38. LOURENCO, A. G.; FIGUEIREDO, L. T. M. Oral lesions in HIV infected individuals from Ribeirao Preto, Brazil. **Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal**, v. 13, n. 5, p. E281-6, 2008.
  39. LU, H. et al. Microbiome in maintained periodontitis and its shift over a single maintenance interval of 3 months. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 46, n. 11, p. 1094–1104, 28 nov. 2019.
  40. LY, M. et al. Altered oral viral ecology in association with periodontal disease. **mBio**, 2014.
  41. MATAFTSI, M.; SKOURA, L.; SAKELLARI, D. HIV infection and periodontal diseases: an overview of the post-HAART era. **Oral Diseases**, v. 17, n. 1, p. 13–25, jan. 2011.
  42. MOGENSEN, T. H. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 2, p. 240–273, abr. 2009.

43. NASCIMENTO, E. et al. Detection and Selection of Microsatellites in the Genome of *Paracoccidioides brasiliensis* as Molecular Markers for Clinical and Epidemiological Studies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5007–5014, 1 nov. 2004.
44. NEWMAN, M. G. et al. **Newman and Carranza's Clinical Periodontology**. 13th. ed. [s.l.: s.n.]
45. NOBRE, Á. V. V. et al. Effects of non-surgical periodontal therapy on clinical and immunological profile and oral colonization of *Candida* spp in HIV-infected patients with chronic periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 90, n. 2, p. 167–176, 2019.
46. NOGUERA-JULIAN, M. et al. Oral microbiome in HIV-associated periodontitis. **Medicine**, v. 96, n. 12, p. e5821, mar. 2017.
47. PEREIRA, V. T. et al. The Association Between Detectable Plasmatic Human Immunodeficiency Virus (HIV) Viral Load and Different Subgingival Microorganisms in Brazilian Adults With HIV: A Multilevel Analysis. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 5, p. 697–705, 2014.
48. PETERSEN, P. E.; OGAWA, H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. **Periodontology 2000**, v. 60, n. 1, p. 15–39, out. 2012.
49. RYDER, M. I. et al. Current trends and new developments in HIV research and periodontal diseases. **Periodontology 2000**, v. 82, n. 1, p. 65–77, 2020.
50. SANTIAGO-RODRIGUEZ, T. M. et al. Transcriptome analysis of bacteriophage communities in periodontal health and disease. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 549, 28 dez. 2015.
51. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim Epidemiológico HIV / Aids | 2020**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: < <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2020/boletim-epidemiologico-hiv-aids-2020>>. Acesso em: 8 jan. 2021.
52. SOCRANSKY, S. S. et al. Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal of Clinical Periodontology**, 1998.
53. STERN, J. et al. Virome and bacteriome: two sides of the same coin. **Current Opinion in Virology**, v. 37, p. 37–43, ago. 2019.
54. TROMBELLI, L. et al. **Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations** **Journal of Periodontology**, 2018.
55. TSAI, C.-Y. et al. Subgingival microbiota in individuals with severe chronic periodontitis. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 51, n. 2, p. 226–234, abr. 2018.
56. VALENTINE, J. et al. Impact of periodontal intervention on local inflammation, periodontitis, and HIV outcomes. **Oral Diseases**, v. 22, p. 87–97, abr. 2016.
57. VAN DYKE, T. E.; SERHAN, C. N. Resolution of Inflammation: A New Paradigm for the Pathogenesis of Periodontal Diseases. **Journal of Dental Research**, v. 82, n. 2, p. 82–90, 13 fev. 2003.
58. VERNON, L. T. et al. Characterizing traditionally defined periodontal disease in



- HIV+ adults. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 37, n. 5, p. 427–437, out. 2009.
59. WHITTAKER, R. H. **Evolution and Measurement of Species Diversity**Source. [s.l: s.n.].
  60. ZHOU, Y. et al. Exploration of bacterial community classes in major human habitats. **Genome Biology**, v. 15, n. 5, p. R66, 2014.

**ANEXOS**

ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em pesquisa



USP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO  
PRETO DA USP - FORP/USP



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Determinação de fatores envolvidos na patogênese da doença periodontal em pacientes infectados pelo HIV

**Pesquisador:** Ana Carolina Fragoso Motta

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 50004415.1.0000.5419

**Instituição Proponente:** Universidade de São Paulo

**Patrocinador Principal:** CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO-CNPQ  
Financiamento Próprio  
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.897.758

#### **Apresentação do Projeto:**

Adequada, idem ao original; contextualiza e explica o estado da arte dos tipos de periodontite e sua relação com HIV/AIDS.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo desse estudo é determinar fatores que possam estar envolvidos na patogênese da doença periodontal em pacientes infectados pelo HIV, dentre eles fatores microbianos relacionados à contagem de *Candida albicans*, ou referentes à marcadores responsáveis pela resposta imunológica na saliva, tais como lactoferrina, interleucina-1, fator de necrose tumoral-, interleucina-6 e histatina, por meio do desenvolvimento de um quase-experimento.

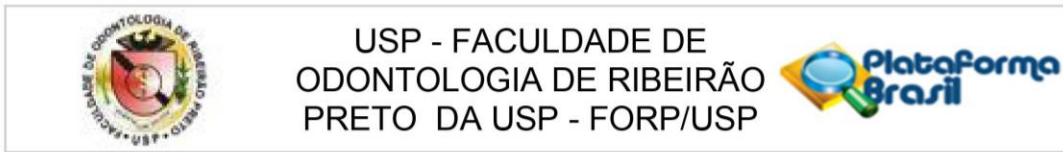
#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

idem ao projeto original previamente aprovado

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Esta emenda trata-se de justificar a inclusão de uma pesquisadora e de solicitar prazo de prorrogação devido ao atraso nas análises laboratoriais por motivo de financiamento.

**Endereço:** Avenida do Café s/nº  
**Bairro:** Monte Alegre **CEP:** 14.040-904  
**UF:** SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO  
**Telefone:** (16)3315-0493 **Fax:** (16)3315-4102 **E-mail:** cep@forp.usp.br



Continuação do Parecer: 3.897.758

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos obrigatórios foram apresentados no projeto original e não houve modificação, apenas o cronograma foi estendido.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Emenda aprovada

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Emenda aprovada conforme deliberado na 234ª Reunião Ordinária do CEP/FORP de 02/03/2020.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_913447 E2.pdf	11/11/2019 19:34:40		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEpacnaoHIV_emenda.pdf	11/11/2019 19:31:25	Ana Carolina Fragoso Motta	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEpacHIV_emenda.pdf	11/11/2019 19:31:06	Ana Carolina Fragoso Motta	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_emenda.pdf	11/11/2019 14:51:21	Ana Carolina Fragoso Motta	Aceito
Outros	Relatorio_parcial_emenda.pdf	06/11/2019 08:22:52	Ana Carolina Fragoso Motta	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado_emenda.pdf	06/11/2019 08:22:06	Ana Carolina Fragoso Motta	Aceito
Outros	Carta_CEP_alteracao_de_responsabilidade.pdf	23/04/2019 13:17:27	CARLOS FEITOSA DOS SANTOS	Aceito
Outros	alteracao_de_responsabilidade.pdf	16/10/2018 11:37:04	Alan Grupioni Lourenço	Aceito
Outros	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_2772829.pdf	16/10/2018 11:37:04	Alan Grupioni Lourenço	Aceito
Outros	relatorioparcial.pdf	01/06/2016 12:08:27	Alan Grupioni Lourenço	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutinfraesProfBenedito.pdf	01/06/2016 11:11:16	Alan Grupioni Lourenço	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico /	cartadesolicibiorrep.pdf	30/09/2015 12:35:31	Alan Grupioni Lourenço	Aceito

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3315-0493

Fax: (16)3315-4102

E-mail: cep@forp.usp.br



USP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO  
PRETO DA USP - FORP/USP



Continuação do Parecer: 3.897.758

Biorepositório / Biobanco	cartadesolicibiorrep.pdf	30/09/2015 12:35:31	Alan Grupioni Lourenço	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMOBIORP.doc	30/09/2015 12:35:03	Alan Grupioni Lourenço	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutinfraestPrSuzie.pdf	30/09/2015 12:31:38	Alan Grupioni Lourenço	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autinfraestprofamariane.pdf	30/09/2015 12:31:11	Alan Grupioni Lourenço	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutinfraestPrMarilena.pdf	30/09/2015 12:30:44	Alan Grupioni Lourenço	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoHIVDP_principal.doc	30/09/2015 12:26:20	Alan Grupioni Lourenço	Aceito
Outros	dec_part_pesq.doc	08/09/2015 15:15:39	Alan Grupioni Lourenço	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIBEIRAO PRETO, 04 de Março de 2020

---

**Assinado por:**  
**Simone Cecilio Hallak Regalo**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Avenida do Café s/nº

**Bairro:** Monte Alegre

**CEP:** 14.040-904

**UF:** SP

**Município:** RIBEIRAO PRETO

**Telefone:** (16)3315-0493

**Fax:** (16)3315-4102

**E-mail:** cep@forp.usp.br

## ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes com HIV



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Nós, Alan Grupioni Lourenço, Marilena Chinali Komesu, Letícia Richard, Vanessa Teles, Alcyone Artioli Machado, Benedito Antônio Lopes da Fonseca, Mario Taba Jr., Camila Tirapelli, Maria Conceição Pereira Saraiva, Diana Estefânia Ramos Peña e Ana Carolina Fragoso Motta solicitamos ao Sr. (a) \_\_\_\_\_ autorização para coletar sua saliva, seu fluido crevicular gengival (líquido que sai entre a gengiva e o dente), enxágue bucal (bochecho com uma substância um pouco salgada, chamada de PBS) e biópsia de tecido gengival (Caso o senhor(a) necessite de cirurgia periodontal, e somente se realmente existir tal indicação) para a pesquisa: **Determinação de fatores envolvidos na patogênese da doença periodontal em pacientes infectados pelo HIV**. Este trabalho quer avaliar quais são as características da periodontite crônica (doença da gengiva que leva ao amolecimento dos dentes) em pacientes infectados e não infectados pelo HIV, quais são os fatores que causam piora ou melhora das periodontite crônica, e se há alguma substância na gengiva, na saliva, no fluido crevicular gengival e no enxaguado bucal que está relacionada com o aparecimento ou gravidade da doença periodontal nesses pacientes. Esta avaliação será feita por meio de: perguntas sobre a saúde do paciente; exame da boca; biópsia de 5mm da área com periodontite crônica (caso o senhor precise retirar o excesso gengival durante seu tratamento periodontal, será feita anestesia, seguida de um pequeno corte com lâmina de bisturi, remoção do fragmento e depois realização de sutura - ponto); coleta de saliva (cuspir em um pote durante 5 minutos); e coleta do fluido crevicular gengival (colocação de uma tirinha de papel entre o dente e a gengiva) e estudo destas amostras em laboratório. Para comparar com as amostras biológicas dos pacientes infectados pelo HIV, é importante o estudo da saliva, do fluido crevicular gengival, da biópsia gengival e do enxaguado bucal tanto de pacientes infectados pelo HIV, quanto dos pacientes não infectados pelo HIV. Esta pesquisa poderá ajudar no entendimento do porquê da periodontite crônica ser mais comum e mais graves em pacientes soropositivos para o HIV. Todos os dados relacionados com o Sr. (a) serão confidenciais e sua identidade será mantida em sigilo. A divulgação dos resultados deste trabalho será realizada por meio da publicação em uma revista científica que será selecionada quando terminarmos o estudo.

Os riscos previsíveis à sua saúde em consequência desta pesquisa são mínimos, como por exemplo, discreta secura de boca imediatamente após cuspir a saliva; isso volta ao normal poucos minutos depois da coleta. Entretanto, garantimos as indenizações necessárias em caso eventual de danos, e o ressarcimento de despesas (transporte, alimentação e outras despesas) decorrentes da participação na pesquisa, nos termos da Resolução CNS 466/2012. Os pesquisadores que entrarão em contato com o Sr. (a), caso necessário, serão: **Alan Grupioni Lourenço e Ana Carolina Fragoso Motta**. E o Sr. (a) poderá fazer contato com a equipe por meio dos telefones pessoais citados abaixo e também pelos telefone da clínica de atendimento: **Clínica de Pacientes Especiais: 16-3315-4021** (terças-feiras manhã e quartas-feiras manhã e tarde). Como benefícios, estes exames ajudarão a definir as características da periodontite crônica em pacientes infectados e não infectados pelo HIV, e poderá ajudar a outros pacientes e profissionais a lidar com o tratamento desta doença periodontal. A sua autorização não é obrigatória, e o Sr.(a) poderá desistir a qualquer momento, retirando o seu consentimento. A não autorização deste trabalho não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP e/ou Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

Você receberá uma via deste termo, com o contato de cada pesquisador e da secretária do Comitê de Ética em Pesquisa da FORP/USP. Caso tenha alguma dúvida sobre o estudo, o Sr.(a) poderá entrar em contato com os pesquisadores a qualquer momento, antes, durante ou após a realização da pesquisa. Além disso, Sr.(a) terá tempo necessário para refletir e consultar familiares ou outras pessoas de sua confiança para avaliar se deseja ou não participar da pesquisa.

Este documento será assinado pelos pesquisadores **Alan Grupioni Lourenço e Ana Carolina Fragoso Motta**, e caso haja mais de uma página, as primeiras páginas devem ser rubricadas e a última assinada por todos os pesquisadores e pelo Sr.(a). Além disso, os dados obtidos neste protocolo não serão usados em outra pesquisa sem novo consentimento do Sr. (a).

Em caso de insatisfações ou reclamações, você poderá entrar em contato com a secretária do CEP, e seu nome será mantido em anonimato.

**Secretaria do CEP:** Endereço do CEP: Av. do Café s/ nº, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP, Monte Alegre, Ribeirão Preto-SP, 14.040-904; Telefone: (16) 3315-0493; e-mail: [cep@forp.usp.br](mailto:cep@forp.usp.br); horário de atendimento: de 2ª a 6ª feira, das 13 às 17horas.

Ribeirão Preto-SP, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Alan Grupioni Lourenço  
CPF: 294408248-59; Tel: 16-3315-4021  
Pesquisadora responsável

\_\_\_\_\_  
Ana Carolina Fragoso Motta  
CPF: 678.014.555-68; Tel: 16-3315-4067  
Pesquisadora participante

\_\_\_\_\_  
(Participante da pesquisa)

RG: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_ Endereço: \_\_\_\_\_

## ANEXO C – Termo de consentimento livre e esclarecido para paciente não HIV



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Nós, Alan Grupioni Lourenço, Marilena Chinali Komesu, Leticia Richard, Vanessa Teles, Alcyone Artioli Machado, Benedito Antônio Lopes da Fonseca, Mario Taba Jr., Camila Tirapelli, Maria Conceição Pereira Saraiva, Diana Estefania Ramos Peña e Ana Carolina Fragoso Motta solicitamos ao Sr. (a) \_\_\_\_\_ autorização para coletar sua saliva, seu fluido crevicular gengival (líquido que sai entre a gengiva e o dente), enxágue bucal (bochecho com uma substância um pouco salgada, chamada de PBS) e biópsia de tecido gengival (Caso o senhor(a) necessite de cirurgia periodontal, e somente se realmente existir tal indicação) para a pesquisa: **Determinação de fatores envolvidos na patogênese da doença periodontal em pacientes infectados pelo HIV**. Este trabalho quer avaliar quais são as características da periodontite crônica (doença da gengiva que leva ao amolecimento dos dentes) em pacientes infectados e não infectados pelo HIV, quais são os fatores que causam piora ou melhora das periodontite crônica, e se há alguma substância na gengiva, na saliva, no fluido crevicular gengival e no enxaguado bucal que está relacionada com o aparecimento ou gravidade da doença periodontal nesses pacientes. Esta avaliação será feita por meio de: perguntas sobre a saúde do paciente; exame da boca; biópsia de 5mm da área com periodontite crônica (caso o senhor precise retirar o excesso gengival durante seu tratamento periodontal, será feita anestesia, seguida de um pequeno corte com lâmina de bisturi, remoção do fragmento e depois realização de sutura - ponto); coleta de saliva (cuspir em um pote durante 5 minutos); e coleta do fluido crevicular gengival (colocação de uma tirinha de papel entre o dente e a gengiva) e estudo destas amostras em laboratório. Para comparar com as amostras biológicas dos pacientes infectados pelo HIV, é importante o estudo da saliva, do fluido crevicular gengival, da biópsia gengival e do enxaguado bucal tanto de pacientes infectados pelo HIV, quanto dos pacientes não infectados pelo HIV. Esta pesquisa poderá ajudar no entendimento do porquê da periodontite crônica ser mais comum e mais graves em pacientes soropositivos para o HIV. Todos os dados relacionados com o Sr. (a) serão confidenciais e sua identidade será mantida em sigilo. A divulgação dos resultados deste trabalho será realizada por meio da publicação em uma revista científica que será selecionada quando terminarmos o estudo.

Os riscos previsíveis à sua saúde em consequência desta pesquisa são mínimos, como por exemplo, discreta secura de boca imediatamente após cuspir a saliva; isso volta ao normal poucos minutos depois da coleta. Entretanto, garantimos as indenizações necessárias em caso eventual de danos, e o ressarcimento de despesas (transporte, alimentação e outras despesas) decorrentes da participação na pesquisa, nos termos da Resolução CNS 466/2012. Os pesquisadores que entrarão em contato com o Sr. (a), caso necessário, serão: **Alan Grupioni Lourenço e Ana Carolina Fragoso Motta**. E o Sr. (a) poderá fazer contato com a equipe por meio dos telefones pessoais citados abaixo e também pelos telefone da clínica de atendimento: **Clínica de Pacientes Especiais**: 16-3315-4021 (terças-feiras manhã e quartas-feiras manhã e tarde). Como benefícios, estes exames ajudarão a definir as características da periodontite crônica em pacientes infectados e não infectados pelo HIV, e poderá ajudar a outros pacientes e profissionais a lidar com o tratamento desta doença periodontal. A sua autorização não é obrigatória, e o Sr.(a) poderá desistir a qualquer momento, retirando o seu consentimento. A não autorização deste trabalho não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP e/ou Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

Você receberá uma via deste termo, com o contato de cada pesquisador e da secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da FORP/USP. Caso tenha alguma dúvida sobre o estudo, o Sr.(a) poderá entrar em contato com os pesquisadores a qualquer momento, antes, durante ou após a realização da pesquisa. Além disso, Sr.(a) terá tempo necessário para refletir e consultar familiares ou outras pessoas de sua confiança para avaliar se deseja ou não participar da pesquisa.

Este documento será assinado pelos pesquisadores **Alan Grupioni Lourenço e Ana Carolina Fragoso Motta**, e caso haja mais de uma página, as primeiras páginas devem ser rubricadas e a última assinada por todos os pesquisadores e pelo Sr.(a). Além disso, os dados obtidos neste protocolo não serão usados em outra pesquisa sem novo consentimento do Sr. (a).

Em caso de insatisfações ou reclamações, você poderá entrar em contato com a secretária do CEP, e seu nome será mantido em anonimato.

**Secretaria do CEP:** Endereço do CEP: Av. do Café s/ nº, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto-USP, Monte Alegre, Ribeirão Preto-SP, 14.040-904; Telefone: (16) 3315-0493; e-mail: [cep@forp.usp.br](mailto:cep@forp.usp.br); horário de atendimento: de 2ª a 6ª feira, das 13 às 17horas.

Ribeirão Preto-SP, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Alan Grupioni Lourenço  
CPF: 294408248-59; Tel: 16-3315-4021  
Pesquisadora responsável

\_\_\_\_\_  
Ana Carolina Fragoso Motta  
CPF: 678.014.555-68; Tel: 16-3315-4067  
Pesquisadora participante

\_\_\_\_\_  
(Participante da pesquisa)

RG: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_ Endereço: \_\_\_\_\_

ANEXO D: Comprovante da submissão do artigo em revista científica

# Submission Confirmation

---

 Print

Thank you for your submission

---

**Submitted to**

Journal of Clinical Periodontology

**Manuscript ID**

CPE-02-21-9792

**Title**

Non-surgical periodontal treatment increases the bacterial diversity in HIV-1-infected patients with periodontitis: a quasi-experimental study.

**Authors**

Ramos, Diana  
Santos, Emerson  
Bezerra, Rafael  
Nobre, Atila  
Pólvora, Tábata  
Fonseca, Benedito  
Lourenço, Alan  
Nascimento, Cássio  
Motta, Ana Carolina

**Date Submitted**

03-Feb-2021

---



ANEXO E: Artigo científico submetido para publicação no periódico *Journal of Clinical Periodontology*



Journal of Clinical Periodontology - PROOF

**Non-surgical periodontal treatment increases the bacterial diversity in HIV-1-infected patients with periodontitis: a quasi-experimental study.**

Journal:	<i>Journal of Clinical Periodontology</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article Clinical Periodontology
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Ramos, Diana; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Odontologia de Ribeirao Preto, Oral & Maxillofacial Surgery, and Periodontology Santos, Emerson; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Ciencias Farmaceuticas de Ribeirao Preto, Clinical Analyses, Toxicology and Food Science Bezerra, Rafael; University of Sao Paulo Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, Blood Center of Ribeirao Preto Nobre, Atila ; Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Oral & Maxillofacial Surgery, and Periodontology Pólvora, Tábata; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Odontologia, Stomatology Fonseca, Benedito; Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Internal Medicine Lourenço, Alan; Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Basic and Oral Biology Nascimento, Cássio; Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Dental Materials and Prosthodontics Motta, Ana Carolina; Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Stomatology, Public Health and Forensic Dentistry
Topic:	Treatment
Keywords:	periodontitis, HIV-1 infection, non-surgical periodontal therapy, oral microbiota
Main Methodology:	Other

SCHOLARONE™  
Manuscripts

Journal of Clinical Periodontology - PROOF

**Title:** Non-surgical periodontal treatment increases the bacterial diversity in HIV-1-infected patients with periodontitis: a quasi-experimental study.

**Running title:** Microbiota in HIV-1 infected patients

Diana Estefania Ramos Peña\*, MsC; Emerson de Souza Santos<sup>##</sup>, MsC; Rafael dos Santos Bezerra\*\*, MsC; Átila V. V. Nobre\*, MsC; Tábata L. S. Pólvora<sup>†</sup>, MsC; Benedito A. L. da Fonseca<sup>#</sup>, PhD; Alan G. Lourenço<sup>††</sup>, PhD; Cássio do Nascimento<sup>¶</sup>, PhD; Ana Carolina F. Motta<sup>‡</sup>, PhD

\*Department of Oral & Maxillofacial Surgery, and Periodontology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

<sup>†</sup>Department of Stomatology, School of Dentistry, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

<sup>‡</sup>Department of Stomatology, Public Oral Health and Forensic Dentistry, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

<sup>#</sup>Department of Medical Clinic of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

<sup>¶</sup>Department of Dental Materials and Prosthodontics, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

<sup>††</sup>Department of Basic and Oral Biology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

<sup>##</sup>Department of Clinical Analyses, Toxicology and Food Science of the School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto.

\*\*Blood Center of Ribeirão Preto, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

### Corresponding author:

Ana Carolina Fragoso Motta

University of São Paulo, School of Dentistry of Ribeirão Preto

1  
2  
3 Department of Stomatology, Public Health and Forensic Dentistry

4  
5 Av. do Café, s/n, CEP: 14040-904, Ribeirão Preto, São Paulo – Brazil

6  
7  
8 Phone/Fax: +55 – 16 – 3315-4067

9  
10 E-mail address: anacfm@usp.br

11  
12  
13  
14  
15 Diana Estefania Ramos Peña (ORCID ID: 0000-0003-4880-4780)

16  
17 Emerson de Souza Santos (ORCID ID: 0000-0002-3544-6745)

18  
19 Rafael dos Santos Bezerra (ORCID ID: 0000-0001-7250-5153)

20  
21 Átila V. V. Nobre (ORCID ID: 0000-0002-5416-3994)

22  
23  
24 Tábata L. S. Pólvora (ORCID ID

25  
26  
27 Benedito A. L. da Fonseca (ORCID ID: 0000-0003-3159-5687)

28  
29 Alan G. Lourenço (ORCID ID: 0000-0002-4005-157X)

30  
31 Cássio do Nascimento (ORCID ID: 0000-0002-2220-0148)

32  
33 Ana Carolina F. Motta (ORCID ID: 0000-0002-3887-9239)

## 34 35 36 37 38 39 Conflict of interest

40  
41 The authors declare that there are no conflicts of interest.

## 42 43 44 45 46 Acknowledgements

47  
48 The authors would like to thank all the investigators involved in this study, including the staff  
49  
50 members of the UETDI-HC-FMRP-USP and FORP-USP. Particular thanks to Dr. Ana Laura  
51 P Ranieri and Prof. Camila Tirapelli for assisting with recruitment of the HIV-1-infected  
52 patients and control patients, respectively. We are very grateful to all participating patients  
53  
54 who volunteered to take part in this quasi-experimental trial.  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Funding

This study was supported by grants from the São Paulo Research Foundation – FAPESP (Grants: 2016/22476-5, 2018/23031-2 and 2020/07862-1), the National Council for Scientific and Technological Development – CNPq (Grant: 404092/2016-0), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) – Brasil (CAPES) – Finance Code 001, and the University of São Paulo and Comité Français d’Evaluation de la Coopération Universitaire avec le Brésil program - USP/COFECUB/2017

## Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## Abstract

**Aim:** To determine the subgingival microbiological profile of periodontitis patients with or without HIV-1 infection undergoing non-surgical periodontal therapy (NSPT).

**Materials and methods:** We assessed, using 16S rRNA-based PCR sequencing, bacterial profile of subgingival biofilm samples of HIV-1-infected and non-HIV-1-infected patients with periodontitis that received NSPT. The samples were collected at baseline, 30 and 90 days after the NSPT. Association of microbiote with CD4+ T-cell and viral load was performed.

**Results:** Both groups (HIV, N=18; Control, N=14) showed similar stages and grades of periodontitis. *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Veillonella* and *Prevotella* were the most abundant genera in the samples. A low abundance of periodontal bacteria was observed. Analyses of the immunological parameters, alpha-diversity and relative abundance revealed that the NSPT induced shifts in the subgingival biofilm, leading to a microbiota profile similar to that in non-HIV-1 infected patients.

**Conclusion:** Our results suggest two different microbiota profiles for the periodontitis patients. NSPT changed the microbiota profile of both HIV and control groups. A higher impact was shown in the HIV group, with a significant increase in microbial diversity. In the control group, a significant reduction in microbial diversity was seen in periodontal sites, in contrast to an increased diversity in the healthy sites.

**Keywords:** Periodontitis, HIV-1 infection, non-surgical periodontal therapy, oral microbiota

## Clinical Relevance

**Scientific rationale for study:** Previous studies of periodontitis microbiota in HIV-1-infected patients have been performed, however, changes in the subgingival microbial profile after non-surgical treatment in these patients are still unknown.

**Principal findings:** The subgingival microbiota of periodontitis sites of HIV-1 patients differed both in diversity and pathogen profile in comparison to non-HIV- infected patients. The non-surgical periodontal treatment induces shift in the microbiota in both groups.

**Practical implications:** These findings provide new insights into the oral microbiota of patients with periodontitis and HIV-1 infection, and can be useful in the management of periodontal diseases in immunocompromised patients.

## Introduction

Periodontal diseases (PD) are a group of conditions that can cause progressive destruction of the periodontal tissues and alveolar bone, resulting in periodontal pocket, gingival recessions, or both (Lang, Lindhe, 2015; Newman et al., 2018). While its etiology is primarily bacterial, currently, it is more accepted that the pathogenesis of PD is host-response-mediated with the influence of local or systemic dysbiosis (Gonçalves et al., 2013). When associated with diseases like the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection, periodontitis has a great impact on the development of clinical attachment loss (Groenewegen et al., 2019; Jepsen et al., 2018). Immunosuppression in HIV-1-infected patients favors the imbalance between microbial aggression and host immune response, with the potential to destroy periodontal tissues (Barr et al., 1992). This may be aggravated by other factors like the use of antiretroviral therapy (ART) (Mataftsi et al., 2011; Vernon et al., 2009).

The prevalence of periodontal pathogenic bacteria and commensal pathogens from the gut, urinary and respiratory tract is relatively high in HIV-1- infected patients (Alpagot et al., 2004; Gonçalves et al., 2007; Kinane et al., 1999; Pereira et al., 2014). With the new metabolomic and transcriptomic technologies, as the Next Generation DNA sequencing, the study of microorganisms involved in PD has become more feasible, contributing to the analysis of the interaction of PD and HIV-1 infection (Barnes et al., 2014; Santiago-Rodriguez et al., 2015). Considering that microbial communities in HIV-1-infected patients with PD may be altered, and information on periodontal issue is scarce or still lacking in the literature, the aim of this study was to determine the microbiological profile of patients with periodontitis and HIV-1 infection after non-surgical periodontal therapy (NSPT), and compare it with non-HIV-1 infected patients. Our hypothesis is that: 1) the microbiological profile of HIV-1 patients with periodontitis differs from that of non-HIV-1 infected patients; and 2) NSPT can induce changes in the periodontal microbiota and serological immune markers to a pattern similar to that present in non-HIV-1 infected patients with periodontitis.

## Material and Methods

### *Samples and study design*

Biological samples of subgingival biofilm from 22 HIV-1-infected patients (HIV group) and 26 non-HIV-1 infected patients (control group) with PD enrolled in a previous quasi-experimental study (NCT03262402) were analyzed (Nobre et al., 2019). HIV-1-infected patients were recruited from the Special Unit for the Treatment of Infectious Diseases of

Ribeirao Preto General Hospital, University of São Paulo, Brazil (UETDI-HC-FMRP-USP), and control patients were recruited at the dental care clinics of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil (FORP-USP). The inclusion criteria for both groups were: patients with periodontitis aged 18 years or older, with at least 12 teeth, and at least two sites with probing depth  $\geq 5$ mm and two teeth with clinical attachment level  $\geq 4$ mm. Diagnosis of PD was made according to the 1999 classification of PD (Armitage, 1999) and later re-evaluated according to the last World Workshop classification system (G. Caton et al., 2018). For HIV-1-infected patients, the inclusion criteria were HIV-1 seropositivity, determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and confirmed by Western Blot, and ART with a nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor, a non-nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor, an integrase inhibitor, and a protease inhibitor. In addition, only patients diagnosed with AIDS (CD4+ T-cell count below 200 cells /mm<sup>3</sup> and/or presence of opportunistic infections) were enrolled. The protocol was approved by the local Institutional Review Board (CAAE #: 54415.1.000.5419) and all patients provided written informed consent.

All included patients underwent a full-mouth periodontal examination. Pocket probing depth was measured at six sites per tooth with a manual periodontal probe. Clinical level of attachment, pocket probing depth, and bleeding on probing were registered. Samples of subgingival biofilm from healthy sites (HS) and sites with active PD (PS) were collected using sterilized paper cones in three different times, T0-baseline: before the NSPT, Time 1 (T1): 30 days after NSPT, Time 2 (T2): 90 days after NSPT.

#### *Oral microbiota characterization using 16S rRNA gene amplification and sequencing*

Bacterial genomic DNA was extracted from the samples using a modified protocol for DNA extraction using CTAB (cetyl trimethylammonium bromide) (Doyle & Doyle, 1990; Nascimento et al., 2004), and sequencing of amplified samples by the 16S rRNA-based PCR method was applied using the next-generation sequencing system MiSeq (Illumina®). The

primers	(Reverse:	5'
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC		
3';	Forward:	5'
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG		3')

were obtained by IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, EUA) allowing the sequencing of the variable regions V3 to V4. Briefly, a PCR was performed to amplify V3-V4 region of 16S using NEBNext® Q5 Hot Start HiFi PCR Master Mix (New England Biolabs).



1  
2  
3 Amplicons were purified with Agencourt AMPure XP Kit (Beckman Coulter, EUA). Samples  
4 were submitted to agarose gel electrophoresis to confirm the amplicon size. A second PCR  
5 was performed to allow barcoding of samples. After a second round of purification with  
6 Agencourt AMPure, libraries were quantified by real-time PCR using the NEBNext® Library  
7  
8 Quant Kit for Illumina. Pipetting was performed using an automated system (Eppendorf  
9  
10 epMotion® 5070). Purified and diluted amplicons (4nM) were pooled and submitted to  
11  
12 quality analysis using the Agilent DNA 1000 kit and the 2100 BioAnalyzer (Agilent  
13  
14 Technologies). Library size was confirmed, and the pool of samples was denaturized and  
15  
16 diluted to 10pM for sequencing. Next generation sequencing system MiSeq (Illumina®) was  
17  
18 carried out according to the manufacturer's instructions (Illumina, 2013).  
19  
20  
21  
22

### 23 *Statistical and Bioinformatics analysis of 16S rRNA sequencing*

24  
25 Demographic and clinical data were evaluated using descriptive statistics, categorical  
26  
27 variables were described as frequency, and expressed as mean and standard deviation. We  
28  
29 divided HIV samples/patients into three categories based on CD4<sup>+</sup> T-cell count and viral load  
30  
31 to determine the influence of CD4<sup>+</sup> T-cell count and viral load on bacterial diversity. Then,  
32  
33 CD4<sup>+</sup> T-cell count categories were as follows: <100 cells/mm<sup>3</sup>, <200 cells/mm<sup>3</sup> (101-199  
34  
35 cells/mm<sup>3</sup>), and <500 cells/mm<sup>3</sup> (200-500 cells/mm<sup>3</sup>); and viral load categories consisted of  
36  
37 <1,000 copies/mL (50-999 copies/ml), <100,000 copies/mL (1,000-100,000 copies/mL), and  
38  
39 >100,000 copies/mL.  
40

41  
42 Data were checked for normality using the Shapiro-Wilk test. The t-test and the Mann-  
43  
44 Whitney test were used to access parametric and non-parametric variables, respectively. One-  
45  
46 Way ANOVA test was used for comparisons between three or more variables. The Shannon  
47  
48 diversity index (H) was applied to assess alpha diversity in different groups. The beta  
49  
50 diversity was calculated by Bray-Curtis Index with PERMANOVA statistical test. The level  
51  
52 of significance was set at 0.05. A random forest model was used to determine the main  
53  
54 features of the analyzed groups. All statistical analyses were performed using R software (R  
55  
56 Core Team, version 3.3.1. Vienna, Austria, 2016).  
57  
58  
59  
60

61  
62 The FastQC software version 0.11.9 (Andrews, 2019) was used to check the quality of  
63  
64 the sequence reads, as well as the number of duplicates, ambiguous bases, and truncated  
65  
66 sequences. Subsequently, the sequences were processed via R script, using the pipeline of the  
67  
68 DADA2 package (Callahan et al., 2016). First, the low-quality sequences were filtered with  
69  
70

1  
2  
3 the following parameters: the maximum allowed number of 0 ( $\text{maxN} = 0$ ), the maximum  
4 allowed number of expected errors of 2 and 5 for forward and reverse sequences, respectively  
5 ( $\text{maxEE} = 2.5$ ). Then, a machine learning model was used to correct possible erroneous bases  
6 with the use of a parametric error model. The method learns this error model from the data, by  
7 alternating estimation of the error rates and inference of the sample composition until they  
8 converge into a consistent solution set. Then, the similar sequences were grouped for later  
9 creation of the count table (ASV, Amplicon Sequence Variant), and after this, chimeras were  
10 removed to minimize potential PCR bias. The taxonomic analysis was performed considering  
11 the SILVA database version 132 (Callahan, 2018) available online, and the composition table  
12 was generated from this process.  
13  
14

15  
16  
17  
18  
19  
20  
21 These sequence data have been submitted to the GenBank database under accession  
22 number PRJNA678700.  
23  
24

## 25 26 **Results**

### 27 *Samples and patients' characteristics*

28  
29  
30 The original sample of subgingival biofilm from HS and PS (collected at T0, T1 and  
31 T2) of HIV ( $N=22$ ) and control group ( $N=26$ ) consisted of 132 and 156 samples, respectively.  
32 However, after the sequencing was completed, 108 samples of the HIV group and 84 of the  
33 control group were analyzed. Samples containing errors in the sequences (96 samples) were  
34 excluded from analysis in the present study and will be analyzed in further studies. Then, we  
35 present the results from samples from 32 patients (16 men, median age 46 years), 18 HIV-1  
36 infected patients and 14 controls. All patients completed the study.  
37  
38  
39  
40  
41

42 Most patients (93.7% of the patients in both groups) had generalized periodontitis;  
43 44% of the HIV group had periodontitis stage IV, and 50% of the control group had stage III.  
44 Considering periodontitis grading, both groups had a high prevalence of periodontitis grade B,  
45 with 77.8% in the HIV group and 57.1% in the control group; however, no significant  
46 differences in periodontitis stages or grades were found between the groups. Mean number of  
47 teeth was 22 in both groups, and the HIV group had a significantly lower mean number of  
48 teeth ( $p=0.039$ ) (Table 1).  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55

### 56 *Immunological parameters*

57 Of the 18 patients included in the HIV group, only three patients had more than 20  
58 years of HIV-1 infection, the mean time of seropositivity was 14 years at the time the medical  
59  
60

1  
2  
3 history was taken. Regarding the CD4<sup>+</sup> T-cell count, all patients except one had a CD4<sup>+</sup> T-cell  
4 count of <200 cells/mm<sup>3</sup>, and an increase was observed at T1 and T2. With respect to viral  
5 load, undetectable levels were more common in HIV-1 patients, in 10 patients (55.6%) at T0,  
6 12 (67%) at T1, and 11 (61%) at T2. Sixteen of the 18 patients of the HIV group had a history  
7 of HIV-related opportunistic infections – 10 cases of coinfections, including pneumonia and  
8 oral candidiasis; pneumonia and herpes zoster; pneumonia, cytomegalovirus, and herpes  
9 zoster; pneumonia and cryptococcosis; oral candidiasis and herpes simplex; oral candidiasis  
10 and toxoplasmosis. Other infections included cryptococcosis and tuberculosis. All patients in  
11 the HIV-1 group (100%) were in ART, and nucleoside reverse transcriptase inhibitors  
12 (NRTIs) were the most common therapy. The ART regimens included NRTIs (5.6%),  
13 combinations of NRTIs and protease inhibitors (29%), NRTIs and non-nucleoside reverse  
14 transcriptase inhibitors (11.1%), NRTIs and integrase inhibitors and CCR5 inhibitors (11.1%),  
15 and protease inhibitors and integrase inhibitors (11.1%) (Table 2).

### 26 27 *Microbial diversity and clinical characteristics*

28  
29 Overall, the microbiota community structures differed significantly between the HIV  
30 and control group. The control group showed a wider range of bacterial species in alpha (p-  
31 value: 2.6582e-10) and beta (p-value: 3.8142e-08) diversity in comparison to the HIV group  
32 (Figure 1a. and 1.b).  
33

34  
35 The presence of HIV-1 seropositivity had an influence on the relative abundance of  
36 oral and periodontal pathogens, as observed in Figure 1c. Overall, the most abundant genus  
37 among the samples was *Streptococcus* spp. Both groups showed high proportions of  
38 *Stenotrophomonas* and *Veillonella*. The HIV group also showed an abundance of  
39 *Fusobacterium*, and the control group revealed a significant enrichment of *Porphyromonas*,  
40 *Peptostreptococcus* and *Haemophilus* in comparison to the HIV group.  
41  
42

### 43 44 45 46 47 *Periodontal disease classification and oral microbiota*

48  
49 The association between periodontal parameters and bacterial distribution is shown in  
50 a heat map in Figure 2. Based on the grading of PD, grade B showed a more diverse  
51 microbiota in comparison to grade A and C. Based on stage classification, stage III showed  
52 the most diverse microbial communities, followed by stage IV and II. None of patients had  
53 periodontitis stage I. Generalized periodontitis was characterized by the presence of  
54 periodontal pathogens, like *Porphyromonas*, *Treponema* and *Fretibacterium*, while the  
55 indicators for localized periodontitis were *Veillonella*, *Leptotrichia* and *Actinomyces*, among  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 other genera. *Porphyromonas*, *Methylobacterium*, *Filifactor* and *Tannerella* were detected in  
4 the control group (Supplementary Figures 1). The number of teeth was associated with  
5 bacterial diversification, in that patients with 26 to 29 teeth had a higher diversity of species,  
6 while patients with less than 15 teeth had a lower diversity (p-value: 1.5814e-05)  
7  
8 (Supplementary Figure 2).  
9  
10  
11  
12

### 13 *Comparison of the microbiota in HS and PS*

14  
15 Figures 3a, 3b and 3c exhibit the bacterial alpha diversity of subgingival biofilm  
16 samples collected from HS and PS. In general, PS showed a lower bacterial diversity in  
17 comparison to HS (p-value: 0.0432076). At T0, there was an increased tendency in bacterial  
18 diversity in HS compared to PS of both control and HIV groups (p-value: 0.056117). At T1  
19 (p-value: 5.3561e-11) an increase in bacterial diversity was observed in both groups,  
20  
21 however, while bacterial diversity was not different between PS and HS in the HIV group, a  
22 higher bacterial diversity was found in HS than PS in controls. At T2, bacterial diversity was  
23 reduced in PS, mainly in the control group (Figures 3b and 3c). The increase in bacterial  
24 diversity from T0 to T1 and T2 relates to the performance of NSPT; however, in the PS  
25 samples, despite the increase in bacterial diversity, it was still lower than in HS samples.  
26  
27

28  
29 With regard to the genera identified in PS and HS in the HIV and control group, the  
30 following genera were found abundant in in both groups: *Streptococcus*, *Veillonella*, *Kingella*,  
31  
32 *Neisseiria*, *Capnocytophaga*, *Peptostreptococcus*, *Leptotrichia*, *Fusobacterium* and  
33  
34 *Campylobacter*. In the HIV group, *Veillonella*, *Stenotrophomonas*, and *Prevotella* were the  
35 most abundant periodontal pathogens in the PS, whereas in the control group, the most  
36 abundant were *Porphyromonas*, *Treponema* and *Tannerella*. There was a significant reduction  
37  
38 in the diversity of genera in PS samples at T1 and T2 of the HIV group, with detection of  
39 *Anaeroglobus* and *Actinomyces*. On the other hand, in the PS samples of the control group,  
40 *Porphyromonas*, *Treponema* and *Tannerella* at T1 and T2 were as abundant as at T0, along  
41  
42 with *Filifactor*, *Treponema* and *Defluviitaleaceae* genera in the same cluster (Supplementary  
43  
44 Figure 3) .  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52

### 53 *Immunological status and microbial diversity*

54  
55 Associations between the relative abundance of each bacterial genus, CD4<sup>+</sup> T-cell  
56 counts, and viral load at the three time points (T0, T1 and T2) were evaluated in HIV group.  
57  
58 The control group was included only for comparison of bacterial diversity, since we did not  
59  
60

1  
2  
3 check CD4<sup>+</sup> levels and viral load counts in this group. The results of bacterial diversity based  
4 on CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes categories are demonstrated in the Table 2 and Supplementary  
5  
6 Figures 4,5 and 6. An increase in alpha diversity (Shannon index) was observed after NSPT in  
7  
8 both T1 (p-value: 4.9469e-08) and T2 (p-value: 2.8709e-09) in comparison to T0 (baseline)  
9  
10 (p-value: 2.8652e-10) in the three CD4<sup>+</sup> T-cell count categories (Figures 4a, 4b and 4c).

11  
12 Patients with CD4<sup>+</sup> T-cell counts of <100 cell/mm<sup>3</sup> showed a significant abundance of  
13 *Streptococcus*, *Stenotrophomonas*, *Fusobacterium* and *Veillonella* at T0, T1 and T2. An  
14 enrichment of *Prevotella* and a decrease of the *Stenotrophomonas* genus were observed at T2.  
15  
16 In patients with counts of <200 cells/mm<sup>3</sup>, the most abundant genus was *Streptococcus* in all  
17  
18 the times. *Fusobacterium*, *Prevotella* and *Veillonella* were more abundant at T0 and T1, and  
19 *Veillonella* and *Stenotrophomonas* at T2. Patients with CD4<sup>+</sup> T-cell counts of <500 cells/mm<sup>3</sup>  
20 showed greater variation in alpha diversity (genus richness) over time. At T1 and T2,  
21  
22 *Streptococcus* was the most abundant genus, followed by different abundances of  
23  
24 *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Stenotrophomonas* and *Prevotella*. At T0, besides the genera  
25 previously identified at T1 and T2 (*Fusobacterium*, *Veillonella*, *Stenotrophomonas* and  
26  
27 *Prevotella*), an enrichment of *Parvimonas*, *Leptotrichia*, *Gemella*, *Treponema*,  
28  
29 *Campylobacter* and *Dialister* was observed, however, this result was seen in a single patient  
30 (T0 <500 cells/mm<sup>3</sup> n=1). Only two patients had CD4<sup>+</sup> T-cell count >500 cell/mm<sup>3</sup> (at T2),  
31 which represented the lowest abundance of periodontal pathogens among all CD4<sup>+</sup> T-cell  
32 counts at the three times. The graphs of relative abundance over time and its association with  
33  
34 CD4<sup>+</sup> T-cell count are provided in Supplementary Figures 4, 5 and 6.

35  
36  
37  
38  
39  
40 Regarding the overall viral load, when all samples from HIV-1 infected patients were  
41 analyzed together, a higher bacterial relative abundance was observed in patients with  
42  
43 undetectable viral load over time, and a reduced diversity was observed in patients with  
44 detectable load (Figures 5a, 5c, and 5c) (p-value: 4.704e-10, 5.3561e-11 and 6.0381e-10  
45 respectively). In undetectable viral load, similar abundance of *Streptococcus*,  
46  
47 *Stenotrophomonas*, *Fusobacterium*, *Veillonella* and *Prevotella* was observed over time. At  
48  
49 T2, an enrichment of *Capnocytophaga*, *Leptotrichia* and *Gemella* was also observed. The  
50 results regarding bacterial diversity based on viral load categories are demonstrated in the  
51 Table 2 and Supplementary Figures 7, 8 and 9.

52  
53  
54  
55  
56 In patients with a viral load <1,000 copies/mL, *Fusobacterium* abundant at T0, and  
57 later reduced at T1 and T2. A decrease in the relative abundance of periodontal-related  
58 pathogens was shown at T1 and T2. The *Streptococcus* genus showed similar abundance in  
59  
60

1  
2  
3 the three time points. Only three patients had a viral load of <100,000 copies/mL, registered at  
4  
5 T0, who showed a higher diversity of genera in comparison to patients with <1,000  
6  
7 copies/mL. *Streptococcus* was the most abundant genus, and *Veillonella*, *Leptotrichia*,  
8  
9 *Prevotella*, *Campylobacter* and *Fusobacterium* were also abundant genera. In patients with a  
10  
11 viral load of >100,000 copies/mL, at baseline (T0), *Streptococcus*, *Veillonella* and  
12  
13 *Fusobacterium* were the most abundant genera, and a marked decrease in the relative  
14  
15 abundance of periodontal pathogens was observed at T1 and T2 after the NSPT. Graphs  
16  
17 showing the association of the times of sampling and viral load are provided in  
18  
19 Supplementary Figures 7, 8, and 9.  
20

## 21 Discussion

22 Our study compared the subgingival microbiota of HIV-1 and non-HIV-1 patients  
23  
24 with PD. We performed a comparative analysis of the changes in the microbiota based on  
25  
26 clinical and immunological parameters and time after NSPT, including sites with and without  
27  
28 clinical signs of PD. Our results revealed that HIV-1 infection was associated with lower  
29  
30 bacterial diversity in the subgingival biofilm as compared with a non-infected control group.  
31  
32 This is in accordance with the study of Annavajhala et al. (2020) who observed significant  
33  
34 lower oral and gut bacterial diversity in patients with HIV infection. Li et al., (2014) also  
35  
36 reported a lower bacterial diversity in saliva samples of HIV-1 infected patients. Since all  
37  
38 patients included in the HIV group in the current study were on ART, the lower bacterial  
39  
40 diversity may be related to the restorative effect of ART on the microbiota, comparably to  
41  
42 non-HIV-infected patients (Beck et al., 2015). In addition, the difference between oral  
43  
44 microbiota of HIV-1 and non-HIV- infected patients has also been related to the development  
45  
46 of PD; in more advanced stages of periodontitis, a less diverse microbiota tend to be  
47  
48 established in the oral tissues (Griffen et al., 2019; Noguera-Julian et al., 2017; Stern et al.,  
49  
50 2019).

51 *Streptococcus* was the most abundant genus in the subgingival samples of both PS and  
52  
53 HS of our study groups followed by *Fusobacterium*, *Veillonella* and *Prevotella*, whose  
54  
55 relative abundance order changed depending on sampling time, and periodontal and  
56  
57 immunological parameters. *Streptococcus* and *Veillonella* had been previously reported as  
58  
59 dominant genera in HIV-1 patients with PD (Noguera-Julian et al., 2017). These two genera  
60  
are early colonizers and seem to coaggregate in oral biofilm formation. *Fusobacterium* has a  
role in subgingival biofilm structure, with a potential synergistic pathogenic effect with

1  
2  
3 *Prevotella*. These two genera are related to tissue destruction and changes in host response,  
4 and are found both in health and disease (Holt & Ebersole, 2005; Socransky et al., 1998)

6 In our study, bacterial genera that are traditionally linked to PD, such as  
8 *Porphyromonas*, *Treponema* and *Tannerella*, were found in lower abundance in the  
9 microbiota of HIV-1-infected patients compared to control group. Despite the higher  
10 abundance of these pathogens in PS samples, these periodontal pathogens were not found in  
11 higher abundance compared with the other genera identified in this study. Such variation in  
12 microbial communities among PD patients has been previously reported, with description of  
13 two types of microbiota in periodontitis, one where pathogenic species are predominant, and  
14 another where commensal species are predominant (Annavaajhala et al., 2020; Hong et al.,  
15 2015; Noguera-Julian et al., 2017; Zhou et al., 2014). The latter was the type of microbiota  
16 found in our HIV group. In addition, the presence of *Porphyromonas*, *Treponema* and  
17 *Tannerella* was predominant in non-HIV-infected patients, and associated with generalized  
18 periodontitis, and PD stage IV and grade B.

20 Regarding the association of bacterial diversity with sampling sites (PD and PS), PS  
21 showed a lower bacterial diversity at the three time points. This result is in contrast with the  
22 results reported by Tsai et al., 2018 and Chen et al., 2018, where a higher diversity of bacteria  
23 was found in diseased than in healthy samples. However, while in those studies the healthy  
24 samples were collected from patients without PD, in our study, the HS samples were collected  
25 from sites with probing depth <4mm from the same periodontal patients, which could result in  
26 differences in bacterial diversity observed between the samples. The increase in bacterial  
27 alpha diversity in both PS and HS at T1 and T2 suggests a positive effect of NSPT on the  
28 proliferation of health-related species, as reported by Chen et al., 2018 and Lu et al., 2019.

30 In addition, changes in microbial abundance were detected at T1 and T2 compared  
31 with T0. In the analysis of the association between CD4<sup>+</sup> T-cell count, bacterial diversity, and  
32 time of sample collection, at T2, bacterial diversity in patients with <100 cells/mm<sup>3</sup> and <200  
33 cells/mm<sup>3</sup> was the most similar to controls. In the group with CD4<sup>+</sup> T-cell >500 cells/mm<sup>3</sup>, a  
34 reduced diversity was found, however, only two patients were included in this group,  
35 resulting in an insufficient sample size.

37 With respect to viral load, in samples from patients with undetectable viral load the  
38 bacterial diversity was closer to that in the control group, with no changes after the NSPT  
39 compared with baseline. At T2 (90 days after the NSPT), samples from patients with viral  
40 loads of less than 1,000 copies/mL showed an increase in bacterial diversity. Pereira et al.,  
41 2014 reported higher bacterial abundance in patients with detectable levels of viral load,

1  
2  
3 including periodontal pathogens and commensals, in contrast with our results, where the  
4  
5 highest bacterial abundance was found in the undetectable levels of viral load.

6 Our study had some limitations, including the small sample size, which limited the  
7  
8 possibility of performing more robust statistical analyses. Moreover, limitations inherent to  
9  
10 the 16S rRNA sequencing procedure, such as the relativity of the result obtained with this  
11  
12 technique and the lack of determination of pathogenic and synergistic relationships within the  
13  
14 microbiota (Jo et al., 2016). In addition, Other than that, our methodology was based on the  
15  
16 sequencing of the V3-V4 region of the 16S rRNA gene. Kim et al. (2011) showed that OTUs  
17  
18 (Operational Taxonomic Unit), or as in our case ASV' definition and richness are more  
19  
20 reliably estimated by sequencing of nearly full-length 16S rRNA gene, instead of a partial  
21  
22 region. However, the V1-V4 regions were shown to provide more accurate estimates than  
23  
24 other regions (Kim et al., 2011). This limitation did not allow us to classify the sequencing  
25  
26 reads at more specific levels (species or subspecies).

27 Despite these limitations, our results suggest that NSPT produced a reorganization of  
28  
29 the subgingival biofilm, and improved bacterial diversity, making it more similar to that in the  
30  
31 control group. Also, the microbiota identified among the HIV group has been correlated with  
32  
33 less aggressive forms of periodontitis, with a combination of disease-associated, health-  
34  
35 associated and core species, such as *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Leptotrichia*,  
36  
37 *Rothia* and *Actinomyces* (Hong et al., 2015). The wide presence of *Streptococcus*,  
38  
39 *Fusobacterium*, *Leptotrichia* and *Actinomyces* was also reported by Lu et al., 2019 in patients  
40  
41 with PD three months after the NSPT. Although we did not find a significant shift in bacteria  
42  
43 genera over the time points analyzed, a change in the abundance of the already established  
44  
45 genera was noted in the subgingival biofilm. These findings support the importance of the  
46  
47 NSPT for HIV-1 patients with periodontitis.

## 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 **Conclusion**

Different subgingival microbiota profiles were identified in HIV patients with  
periodontitis as compared with non-HIV patients. In HIV patients, a less diverse microbiota,  
composed mostly of commensal and health-associated genera was found, in contrast to a more  
diverse microbiota, with more abundance of periodontal pathogens detected in non-HIV  
patients with periodontitis.



## Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the research ethics committee (CAAE: 50004415.1.0000.5419) and all patients provided written informed consent. The study was also registered at ClinicalTrials.gov (NCT03262402).

## References

1. Alpagot, T., Duzgunes, N., Wolff, L. F., & Lee, A. (2004). Risk factors for periodontitis in HIV+ patients. *Journal of Periodontal Research*, 39(3), 149–157. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2004.00718.x>
2. Andrews, S. (2019). *Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data*. Retrieved from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
3. Annavajhala, M. K., Khan, S. D., Sullivan, S. B., Shah, J., Pass, L., Kister, K., Kunen, H., Chiang, V., Monnot, G. C., Ricupero, C. L., Mazur, R. A., Gordon, P., de Jong, A., Wadhwa, S., Yin, M. T., Demmer, R. T., & Uhlemann, A.-C. (2020). Oral and Gut Microbial Diversity and Immune Regulation in Patients with HIV on Antiretroviral Therapy. *MSphere*, 5(1). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00798-19>
4. Armitage, G. C. (1999). Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Annals of Periodontology*, 4(1), 1–6. <https://doi.org/10.1902/annals.1999.4.1.1>
5. Barnes, V. M., Kennedy, A. D., Panagakos, F., Devizio, W., Trivedi, H. M., Jönsson, T., Guo, L., Cervi, S., & Scannapieco, F. A. (2014). Global Metabolomic Analysis of Human Saliva and Plasma from Healthy and Diabetic Subjects, with and without Periodontal Disease. *PLoS ONE*, 9(8), e105181. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105181>
6. Barr, C., Lopez, M. R., & Rua-Dobles, A. (1992). Periodontal changes by HIV serostatus in a cohort of homosexual and bisexual men. *Journal of Clinical Periodontology*, 19(10), 794–801. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1992.tb02173.x>
7. Beck, J. M., Schloss, P. D., Venkataraman, A., Twigg, H., Jablonski, K. A., Bushman, F. D., Campbell, T. B., Charlson, E. S., Collman, R. G., Crothers, K., Curtis, J. L., Drews, K. L., Flores, S. C., Fontenot, A. P., Foulkes, M. A., Frank, I., Ghedin, E., Huang, L., Lynch, S. V., ... Young, V. B. (2015). Multicenter Comparison of Lung and Oral Microbiomes of HIV-infected and HIV-uninfected Individuals. *American*

- 1  
2  
3 *Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 192(11), 1335–1344.  
4  
5 <https://doi.org/10.1164/rccm.201501-0128OC>  
6  
7 8. Callahan, B. (2018). Silva taxonomic training data formatted for DADA2 (Silva  
8 version 132)[Data set]. *Zenodo*. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.1172783>  
9  
10 9. Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., &  
11 Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina  
12 amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>  
13  
14 10. Chen, C., Hemme, C., Beleno, J., Shi, Z. J., Ning, D., Qin, Y., Tu, Q., Jorgensen, M.,  
15 He, Z., Wu, L., & Zhou, J. (2018). Oral microbiota of periodontal health and disease  
16 and their changes after nonsurgical periodontal therapy. *The ISME Journal*, 12(5),  
17 1210–1224. <https://doi.org/10.1038/s41396-017-0037-1>  
18  
19 11. Doyle, J. J., & Doyle, J. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*,  
20 12(13), 39–40.  
21  
22 12. G. Caton, J., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L. C., Jepsen, S., S. Kornman,  
23 K., L. Mealey, B., Papapanou, P. N., Sanz, M., & S. Tonetti, M. (2018). A new  
24 classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions –  
25 Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Clinical*  
26 *Periodontology*, 45(March), S1–S8. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12935>  
27  
28 13. Gonçalves, L. de S., Soares Ferreira, S. M., Souza, C. O., Souto, R., & Colombo, A. P.  
29 (2007). Clinical and Microbiological Profiles of Human Immunodeficiency Virus  
30 (HIV)–Seropositive Brazilians Undergoing Highly Active Antiretroviral Therapy and  
31 HIV-Seronegative Brazilians With Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontology*,  
32 78(1), 87–96. <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060040>  
33  
34 14. Gonçalves, L. S., Gonçalves, B. M. L., & Fontes, T. V. (2013). Periodontal disease in  
35 HIV-infected adults in the HAART era: Clinical, immunological, and microbiological  
36 aspects. *Archives of Oral Biology*, 58(10), 1385–1396.  
37 <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.05.002>  
38  
39 15. Griffen, A. L., Thompson, Z. A., Beall, C. J., Lilly, E. A., Granada, C., Treas, K. D.,  
40 DuBois, K. R., Hashmi, S. B., Mukherjee, C., Gilliland, A. E., Vazquez, J. A.,  
41 Hagensee, M. E., Leys, E. J., & Fidel, P. L. (2019). Significant effect of HIV/HAART  
42 on oral microbiota using multivariate analysis. *Scientific Reports*, 9(1), 19946.  
43 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55703-9>  
44  
45 16. Groenewegen, H., Bierman, W. F. W., Delli, K., Dijkstra, P. U., Nesse, W., Vissink,  
46 A., & Spijkervet, F. K. L. (2019). Severe periodontitis is more common in HIV-

- 1  
2  
3 infected patients. *Journal of Infection*, 78(3), 171–177.  
4  
5 <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2018.11.008>  
6  
7 17. Holt, S. C., & Ebersole, J. L. (2005). Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola,  
8 and Tannerella forsythia: the “red complex”, a prototype polybacterial pathogenic  
9 consortium in periodontitis. *Periodontology* 2000, 38(1), 72–122.  
10  
11 <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00113.x>  
12  
13 18. Hong, B.-Y., Furtado Araujo, M. V., Strausbaugh, L. D., Terzi, E., Ioannidou, E., &  
14 Diaz, P. I. (2015). Microbiome Profiles in Periodontitis in Relation to Host and  
15 Disease Characteristics. *PLOS ONE*, 10(5), e0127077.  
16  
17 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127077>  
18  
19 19. Illumina. (2013). 16S Metagenomic Sequencing Library. *Illumina.Com*, B, 1–28.  
20  
21 20. Jepsen, S., Caton, J. G., Albandar, J. M., Bissada, N. F., Bouchard, P., Cortellini, P.,  
22 Demirel, K., de Sanctis, M., Ercoli, C., Fan, J., Geurs, N. C., Hughes, F. J., Jin, L.,  
23 Kantarci, A., Lalla, E., Madianos, P. N., Matthews, D., McGuire, M. K., Mills, M. P.,  
24 Preshaw, P.M., Reynolds, M. A., Sculean, A., Susin, C., West, N. X., Yamazaki, K.  
25  
26 (2018). Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and  
27  
28 acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop  
29 on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions.  
30  
31 *Journal of Clinical Periodontology*, 45, S219–S229.  
32  
33 <https://doi.org/10.1111/jcpe.12951>  
34  
35 21. Jo, J.-H., Kennedy, E. A., & Kong, H. H. (2016). Research Techniques Made Simple:  
36 Bacterial 16S Ribosomal RNA Gene Sequencing in Cutaneous Research. *Journal of*  
37 *Investigative Dermatology*, 136(3), e23–e27. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.01.005>  
38  
39 22. Kim, M., Morrison, M., Yu, Z. Evaluation of different partial 16S rRNA gene  
40 sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. *Journal of*  
41 *microbiological methods*, 84(1), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.10.020>  
42  
43 23. Kinane, D.F., Lappin, D.F., Koulouri, O., & Buckley, A. (1999). Humoral immune  
44 responses in periodontal disease may have mucosal and systemic immune features.  
45  
46 *Clinical & Experimental Immunology*, 115(3), 534–541.  
47  
48 <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1999.00819.x>  
49  
50 24. Lang, N. P., & Lindhe, J. (2015). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, 2  
51 Volume Set, 6th Edition (6th ed.). Wiley Blackwell.  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60
25. Li, Y., Saxena, D., Chen, Z., Liu, G., Abrams, W. R., Phelan, J. A., Norman, R. G., Fisch, G. S., Corby, P. M., Dewhirst, F., Paster, B. J., Kokaras, A. S., & Malamud, D. (2014). HIV Infection and Microbial Diversity in Saliva. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(5), 1400–1411. <https://doi.org/10.1128/JCM.02954-13>
26. Lu, H., Zhao, Y., Feng, X., He, L., & Meng, H. (2019). Microbiome in maintained periodontitis and its shift over a single maintenance interval of 3 months. *Journal of Clinical Periodontology*, 46(11), 1094–1104. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13177>
27. Mataftsi, M., Skoura, L., & Sakellari, D. (2011). HIV infection and periodontal diseases: an overview of the post-HAART era. *Oral Diseases*, 17(1), 13–25. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2010.01727.x>
28. Nascimento, E., Martinez, R., Rodrigues Lopes, A., de Souza Bernardes, L. A., Pomponio Barco, C., Goldman, M. H. S., Taylor, J. W., McEwen, J. G., Pasetto Nobrega, M., Nobrega, F. G., & Goldman, G. H. (2004). Detection and Selection of Microsatellites in the Genome of *Paracoccidioides brasiliensis* as Molecular Markers for Clinical and Epidemiological Studies. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(11), 5007–5014. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.5007-5014.2004>
29. Newman, M. G., Takei, H., R. Klokkevold, P., & Carranza, F. (2018). Newman and Carranza's Clinical Periodontology. (13th ed.).
30. Nobre, Á. V. V., Pólvara, T. L. S., Silva, L. R. M., Teles, V. de O., Villafuerte, K. V., da Motta, R. J. G., Fortes, J. H. P., Silva, G. A., Ranieri, A. L. P., de Macedo, L. D., Morejon, K. M. L., da Fonseca, B. A. L., Tirapelli, C., Saraiva, M. C. P., Taba, M., Lourenço, A. G., & Motta, A. C. F. (2019). Effects of non-surgical periodontal therapy on clinical and immunological profile and oral colonization of *Candida* spp in HIV-infected patients with chronic periodontitis. *Journal of Periodontology*, 90(2), 167–176. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0197>
31. Noguera-Julian, M., Guillén, Y., Peterson, J., Reznik, D., Harris, E. V., Joseph, S. J., Rivera, J., Kannanganat, S., Amara, R., Nguyen, M. L., Mutembo, S., Paredes, R., Read, T. D., & Marconi, V. C. (2017). Oral microbiome in HIV-associated periodontitis. *Medicine*, 96(12), e5821. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000005821>
32. Pereira, V. T., Pavan, P., Souza, R. C., Souto, R., Vettore, M. V., Torres, S. R., Vieira Colombo, A. P., de Uzeda, M., Sansone, C., & Gonçalves, L. S. (2014). The Association Between Detectable Plasmatic Human Immunodeficiency Virus (HIV) Viral Load and Different Subgingival Microorganisms in Brazilian Adults With HIV:

- 1  
2  
3 A Multilevel Analysis. *Journal of Periodontology*, 85(5), 697–705.  
4 <https://doi.org/10.1902/jop.2013.130273>  
5  
6  
7 33. Santiago-Rodriguez, T. M., Naidu, M., Abeles, S. R., Boehm, T. K., Ly, M., & Pride,  
8 D. T. (2015). Transcriptome analysis of bacteriophage communities in periodontal  
9 health and disease. *BMC Genomics*, 16(1), 549. [https://doi.org/10.1186/s12864-015-](https://doi.org/10.1186/s12864-015-1781-0)  
10 [1781-0](https://doi.org/10.1186/s12864-015-1781-0)  
11  
12  
13 34. Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent, R. L. (1998).  
14 Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*.  
15 <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1998.tb02419.x>  
16  
17  
18  
19 35. Stern, J., Miller, G., Li, X., & Saxena, D. (2019). Virome and bacteriome: two sides of  
20 the same coin. *Current Opinion in Virology*, 37, 37–43.  
21 <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2019.05.007>  
22  
23  
24 36. Tsai, C.-Y., Tang, C. Y., Tan, T.-S., Chen, K.-H., Liao, K.-H., & Liou, M.-L. (2018).  
25 Subgingival microbiota in individuals with severe chronic periodontitis. *Journal of*  
26 *Microbiology, Immunology and Infection*, 51(2), 226–234.  
27 <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.04.007>  
28  
29  
30  
31 37. Vernon, L. T., Demko, C. A., Whalen, C. C., Lederman, M. M., Toossi, Z., Wu, M.,  
32 Han, Y. W., & Weinberg, A. (2009). Characterizing traditionally defined periodontal  
33 disease in HIV+ adults. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 37(5), 427–  
34 437. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.2009.00485.x>  
35  
36  
37  
38 38. Zhou, Y., Mihindukulasuriya, K. A., Gao, H., La Rosa, P. S., Wylie, K. M., Martin, J.  
39 C., Kota, K., Shannon, W. D., Mitreva, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M.  
40 (2014). Exploration of bacterial community classes in major human habitats. *Genome*  
41 *Biology*, 15(5), R66. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-5-r66>  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59

## Tables

Table 1. Clinical profile and periodontal parameters of HIV-infected patients with periodontitis (n=18) and non-HIV patients with periodontitis (control group, n=14)

Characteristics	HIV group (%) (n= 18)	Control group (%) (n= 14)	Total (n= 32)	P value
<b>Age (mean)</b>	44 ± 6.2	48 ± 9.5	46 ± 8	0.264
<b>Male</b>	10 (62.5)	6 (37.5)	16	0.243
<b>Female</b>	8 (50)	8 (50)	16	0.218
<b>Periodontal parameters</b>				
Number of teeth (mean)	20 ± 6	24 ± 4	22 ± 6	0.264
Extent				
Generalized	16 (89)	14 (100)	30 (93.75)	0.09
Localized	2 (11)		2 (6.25)	
Stages				0.5614
II	3 (16.6)	2 (14.3)	5 (15.6)	
III	7 (39)	7 (50)	14 (43.8)	
IV	8 (44.4)	5 (35.7)	13 (40.6)	
Grades				0.4761
A	2 (11.1)	2 (14.3)	4 (12.5)	
B	14 (77.8)	8 (57.1)	22 (68.75)	
C	2 (11.1)	4 (28.6)	6 (18.75)	
Probing depth (mean)				
T0	2.77 ± 0.6	2.84 ± 0.7	2.79 ± 0.6	<b>0.0102</b>
T1	2.29 ± 0.7	2.60 ± 0.7	2.40 ± 0.7	
T2	1.95 ± 0.6	2.43 ± 0.5	2.17 ± 0.6	
<b>P-value</b>	<b>0.0102</b>	<b>0.002049</b>		
Clinical attachment (mean)				
T0	3.05 ± 0.7	3.42 ± 0.8	3.21 ± 0.8	<b>0.002756</b>
T1	2.70 ± 0.8	3.26 ± 0.6	2.93 ± 0.7	
T2	2.56 ± 1.0	3.08 ± 0.6	2.79 ± 0.8	
<b>P-value</b>	<b>0.002756</b>	<b>0.00091</b>		
Bleeding on probing (mean)				
T0	39.22 ± 30.1	34.96 ± 23.8	37.44 ± 26.6	<b>0.06778</b>
T1	21.05 ± 27.4	15.40 ± 13.7	17.72 ± 21.3	
T2	16.23 ± 15.0	10.92 ± 8.4	13.30 ± 12.2	
<b>P-value</b>	<b>0.06778</b>	<b>0.1095</b>		

T0: baseline, T1: 30 days from baseline T2: 90 days from baseline, ±: standard deviation

**Table 2.** Immunological parameters of HIV-infected patients with periodontitis (n=18)

<b>Immunological parameters</b>	<b>Total (%) (n=18)</b>		
Time of HIV-infection (years) (mean)	14 ± 7.9		
≤10	7		
10-20	8		
>20	3		
Opportunistic infections	16 (89)		
Candidiasis	8 (44)		
Pneumonia	8 (44)		
Herpes Zoster	6 (33)		
Herpes simples	3 (17)		
Toxoplasmosis	4 (22)		
Cytomegalovirus	3 (17)		
Other infections	4 (22)		
Coinfections	10 (55)		
CD4 <sup>+</sup> T-cells (cells/mm <sup>3</sup> )	T0	T1	T2
<100	9 (50)	4 (22)	5 (28)
101-199	8 (44)	5 (28)	5 (28)
200-500	1 (6)	8 (44)	6 (33)
>500	0	0	2 (11)
N/A		1 (6)	
Viral load copies/mL	T0	T1	T2
Undetectable	10 (55.6)	12 (67)	11 (61)
50 – 999	2 (11)	4 (22)	5 (28)
1.000-100.000	3 (16.7)	0	0
>100.000	3 (16.7)	2 (11)	2 (11)
ART regimen			
NTRIs	1 (5.6)		
NTRIs + PI	10 (55.5)		
NTRIs + PI + INIs	1 (5.6)		
NTRIs + NNTRIs	2 (11.1)		
NTRIs + INIs + CCR5I	2 (11.1)		

2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
  
1

PI + INIs	2 (11.1)
-----------	----------

F: female, M: male, T0: baseline, T1: 30 days from baseline, T2: 90 days from baseline, CD4+: CD4+ T lymphocytes' count, N/A: not applied, NTRIs: nucleoside reverse transcriptase inhibitors, PI: protease inhibitors, INIs: integrase inhibitors, NNRTIs: non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, CCR5I: CCR5 inhibitors.

For Peer Review



## Figures legends

**Figures 1a.** Beta-diversity (Bray-Curtis Index with PERMANOVA statistical test) of subgingival microbiota of the HIV group and control group ( $p=3.8142e-08$ ) **1b.** Shannon Index alpha-diversity of subgingival microbiota in of the HIV group and control group ( $p=2.6582e-10$ ) **1c.** Relative abundance of bacterial genera of the HIV group and control group

**Figure 2.** Heat map of the relative abundance of microbial genera of each amplicon sequence variant (192 samples), with taxonomic identities, and relation to grading and staging of periodontitis, viral load, CD4+ count and patients' characteristics

**Figures 3a.** Bacterial alpha diversity (Shannon index) of subgingival biofilm samples collected from healthy and periodontitis sites ( $p= 0.0432076$ ). **3b.** Alpha diversity of healthy and periodontitis sites at the three sampling times in the HIV group. **3c.** Alpha diversity of healthy and periodontitis sites at the three sampling in the control group. PS: periodontitis sites, HS: healthy sites, (T0  $p= 0.056117$ ), (T1  $p= 5.3561e-11$ ), (T2  $p= 2.8709e09$ )

**Figures 4.** Bacterial alpha-diversity (Shannon Index) of subgingival biofilm samples collected from healthy and periodontitis sites of HIV patients and controls by CD4+ T-cell counts at **4a.** T0 ( $p= 2.8652e-10$ ) **4b.** T1 ( $p= 4.9469e-08$ ) **4c.** T2 ( $p= 2.8709e-09$ )

**Figure 5.** Bacterial alpha-diversity (Shannon Index) of subgingival biofilm samples collected from healthy and periodontitis sites of HIV patients and controls by viral load at **5a.** T0 ( $p= 4.704e-10$ ) **5b.** T1 ( $p= 5.3561e-11$ ) **5c.** T2 ( $p= 6.0381e-10$ ). 0= control group

## Supplementary figures legends

**Supplementary Figure 1a.** Distribution of bacterial genera in the subgingival microbiota of HIV patients and non-HIV patients with periodontitis **1b.** Distribution of bacterial genera in generalized and localized periodontitis

**Supplementary Figure 2.** Bacterial alpha diversity (Shannon index) in relation to the number of teeth present ( $p= 1.5814e-05$ ).

**Supplementary Figure 3.** Heat map of the relative abundance of microbial genera in each amplicon sequence variant (192 samples) and its relation to sampling times, sampling sites and seropositivity status

**Supplementary Figures 4.** Relative abundance of genera in relation with CD4+ counts at T0 **3a.**  $<100 \text{ cell/mm}^3$  **3b.**  $<200 \text{ cell/mm}^3$  **3c.**  $<500 \text{ cell/mm}^3$

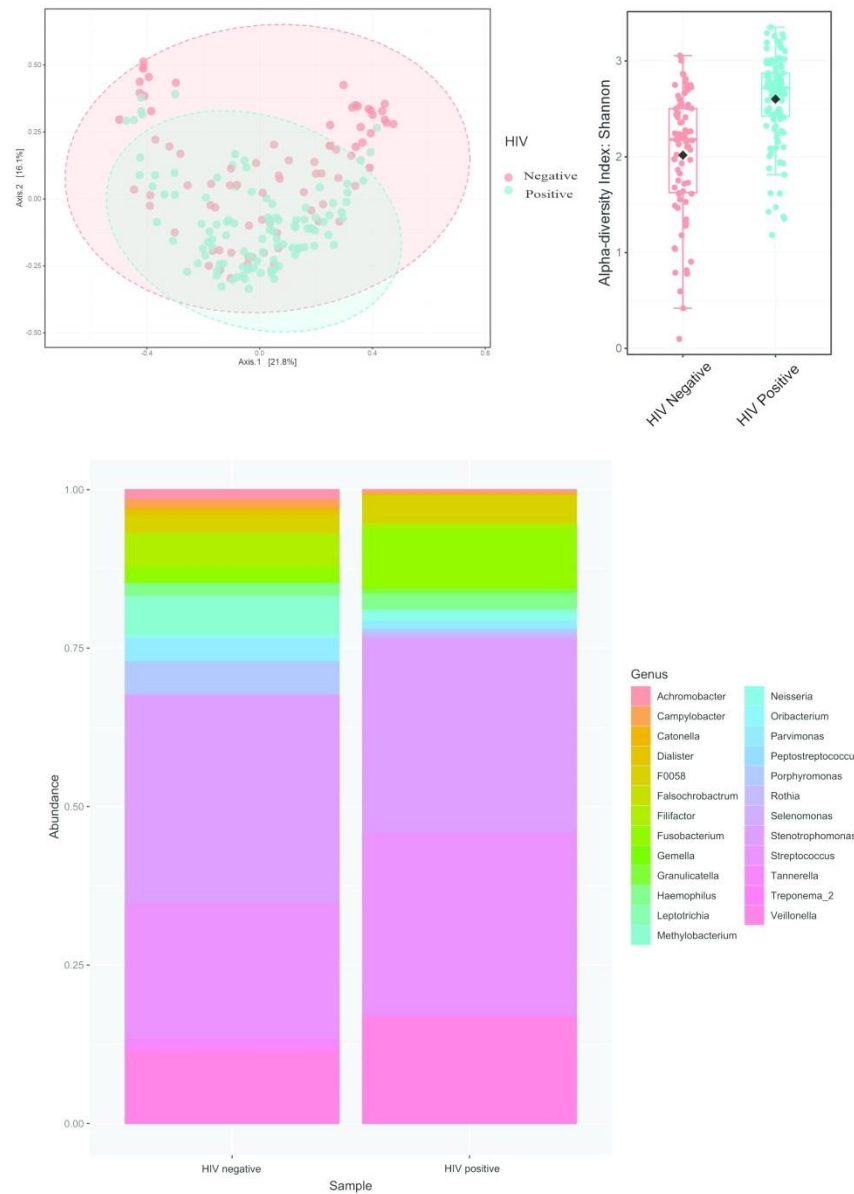
**Supplementary Figures 5.** Relative abundance of genera in relation with CD4+ counts at T1 **5a.**  $<100 \text{ cell/mm}^3$  **5b.**  $<200 \text{ cell/mm}^3$  **5c.**  $<500 \text{ cell/mm}^3$

**Supplementary Figures 6.** Relative abundance of genera in relation with CD4+ counts at T2 **6a.**  $<100 \text{ cell/mm}^3$  **6b.**  $<200 \text{ cell/mm}^3$  **6c.**  $<500 \text{ cell/mm}^3$  **6d.**  $>500 \text{ cell/mm}^3$

**Supplementary Figures 7.** Relative abundance of genera in relation with the levels of viral load at T0 **7a.** Undetectable viral load **7b.**  $<1,000 \text{ copies/mL}$  **7c.**  $<100,000 \text{ copies/mL}$  **7d.**  $>100,000 \text{ copies/mL}$

**Supplementary Figures 8.** Relative abundance of genera in relation with the levels of viral load at T1 **8a.** Undetectable viral load **8b.**  $<1,000 \text{ copies/mL}$  **8c.**  $<100,000 \text{ copies/mL}$  **8d.**  $>100,000 \text{ copies/mL}$

**Supplementary Figures 9.** Relative abundance of genera in relation with the levels of viral load at T2 **9a.** Undetectable viral load **9b.**  $<1,000 \text{ copies/mL}$  **9c.**  $<100,000 \text{ copies/mL}$  **9d.**  $>100,000 \text{ copies/mL}$



Figures 1a. Beta-diversity (Bray-Curtis Index with PERMANOVA statistical test) of subgingival microbiota of the HIV group and control group ( $p=3.8142e-08$ ) 1b. Shannon Index alpha-diversity of subgingival microbiota in of the HIV group and control group ( $p=2.6582e-10$ ) 1c. Relative abundance of bacterial genera of the HIV group and control group  
198x277mm (300 x 300 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

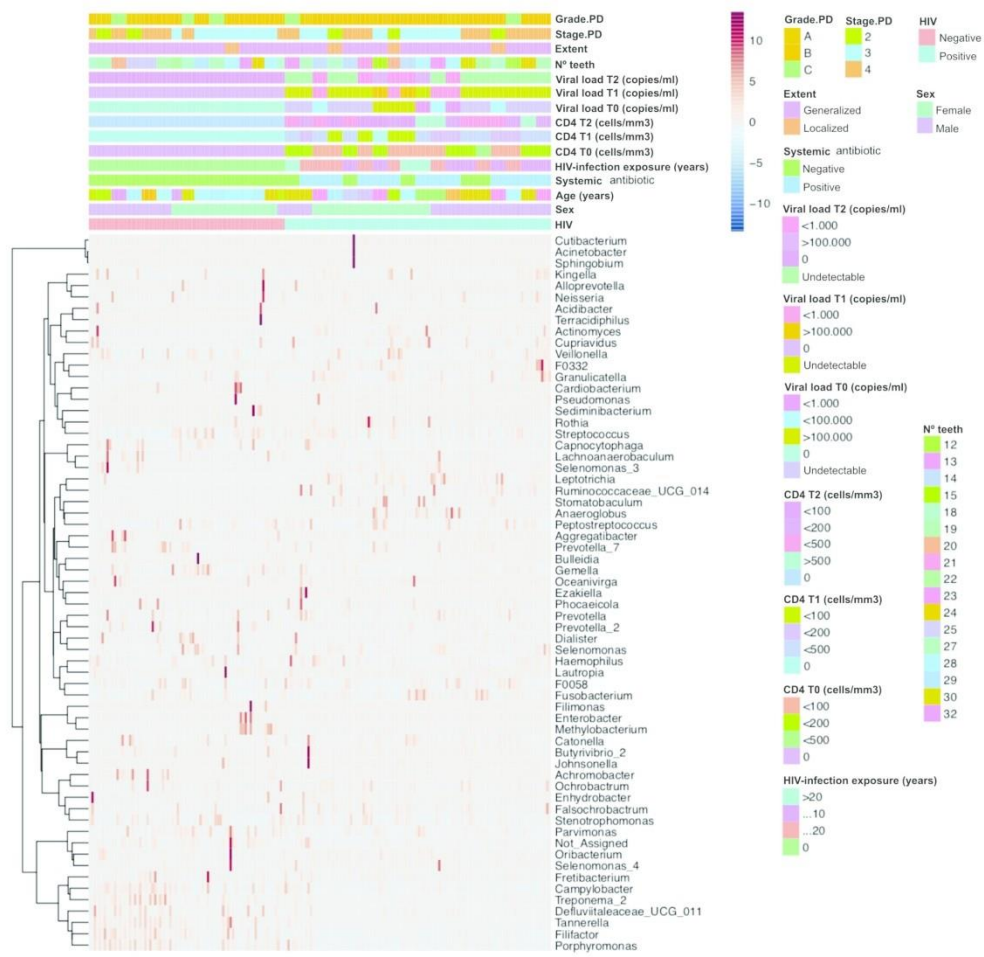
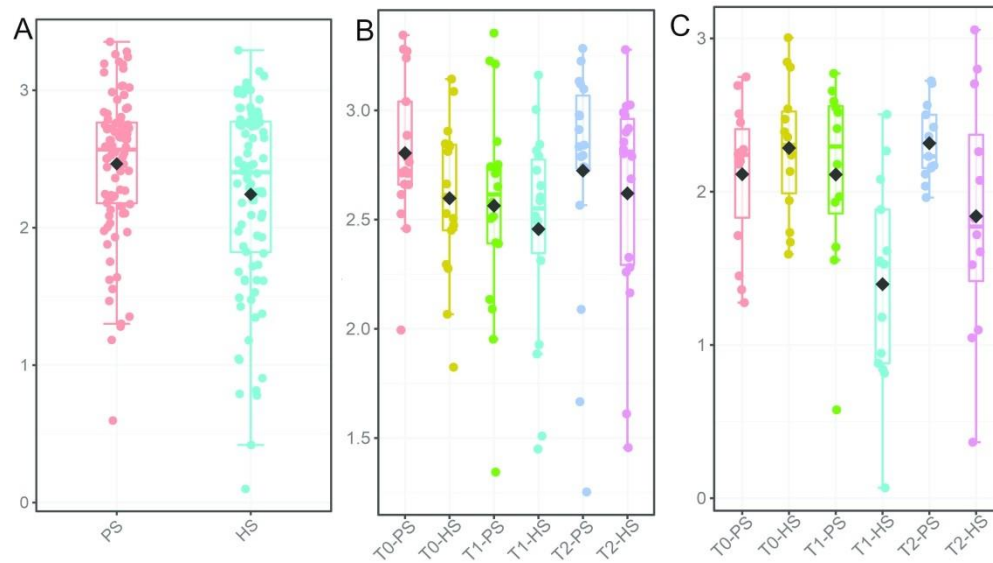


Figure 2. Heat map of the relative abundance of microbial genera of each amplicon sequence variant (192 samples), with taxonomic identities, and relation to grading and staging of periodontitis, viral load, CD4+ count and patients' characteristics

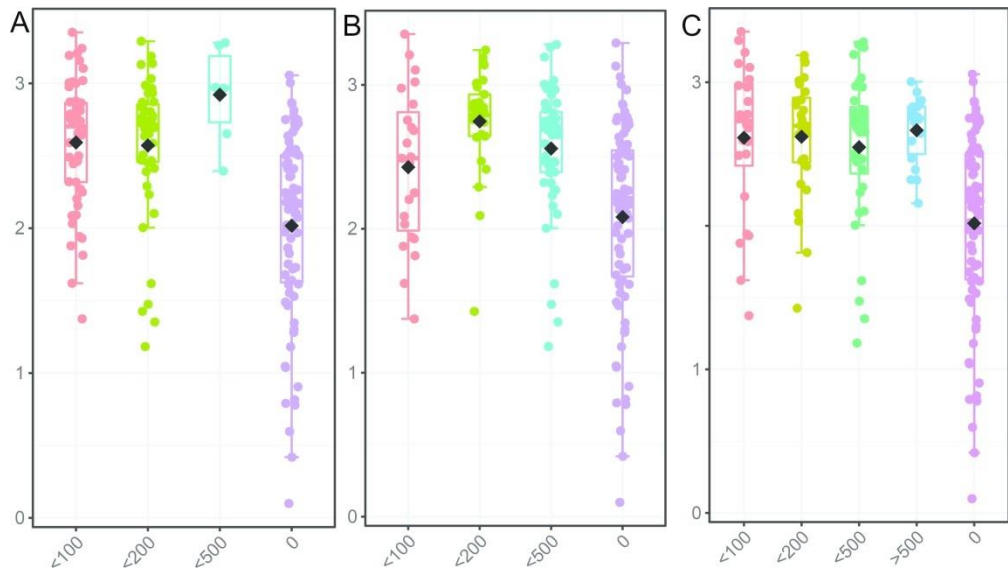
201x200mm (300 x 300 DPI)



Figures 3a. Bacterial alpha diversity (Shannon index) of subgingival biofilm samples collected from healthy and periodontitis sites ( $p=0.0432076$ ). 3b. Alpha diversity of healthy and periodontitis sites at the three sampling times in the HIV group. 3c. Alpha diversity of healthy and periodontitis sites at the three sampling times in the control group. PS: periodontitis sites, HS: healthy sites, (T0  $p=0.056117$ ), (T1  $p=5.3561e-11$ ), (T2  $p=2.8709e09$ )

285x164mm (300 x 300 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58



Figures 4. Bacterial alpha-diversity (Shannon Index) of subgingival biofilm samples collected from healthy and periodontitis sites of HIV patients and controls by CD4+ T-cell counts at 4a. T0 (p= 2.8652e-10) 4b. T1 (p= 4.9469e-08) 4c. T2 (p= 2.8709e-09)

289x162mm (300 x 300 DPI)

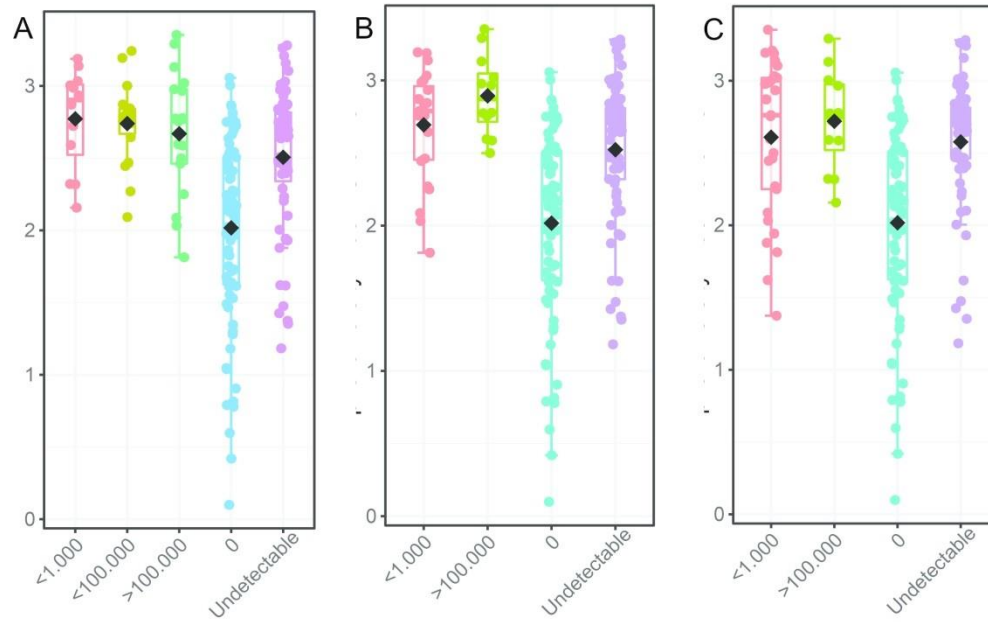
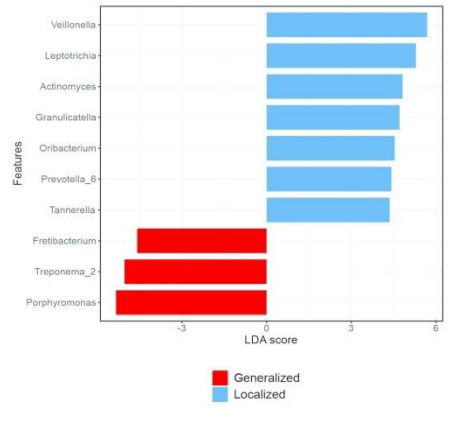
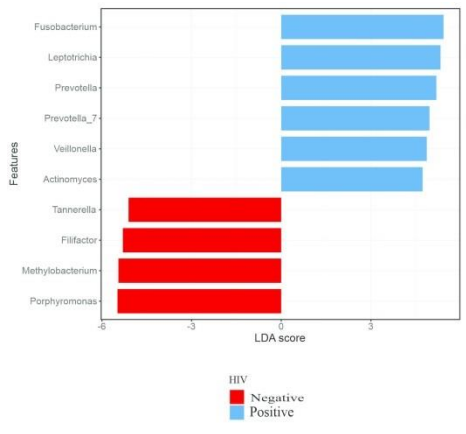


Figure 5. Bacterial alpha-diversity (Shannon Index) of subgingival biofilm samples collected from healthy and periodontitis sites of HIV patients and controls by viral load at 5a. T0 ( $p=4.704e-10$ ) 5b. T1 ( $p=5.3561e-11$ ) 5c. T2 ( $p=6.0381e-10$ ). 0= control group  
282x177mm (300 x 300 DPI)

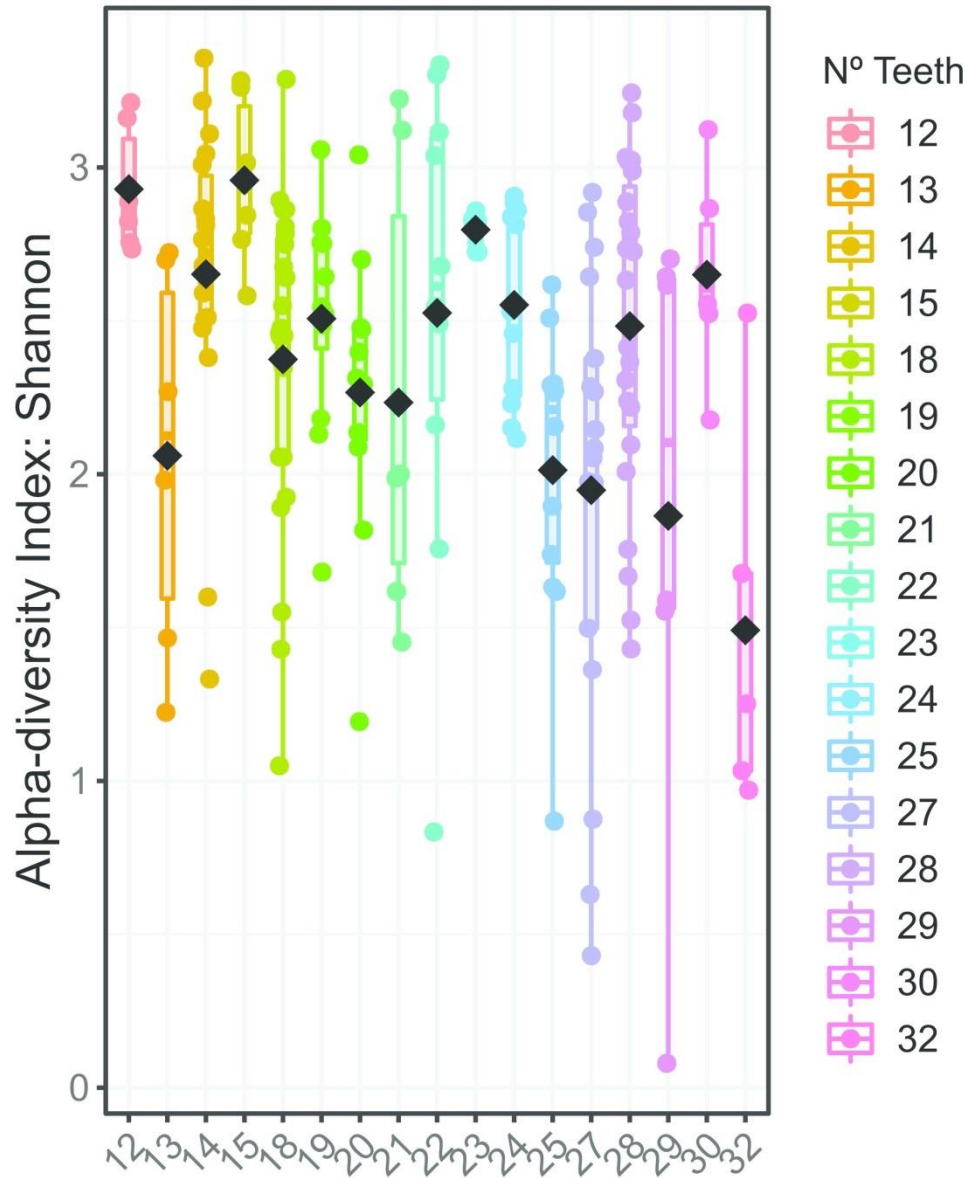
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58



274x119mm (300 x 300 DPI)

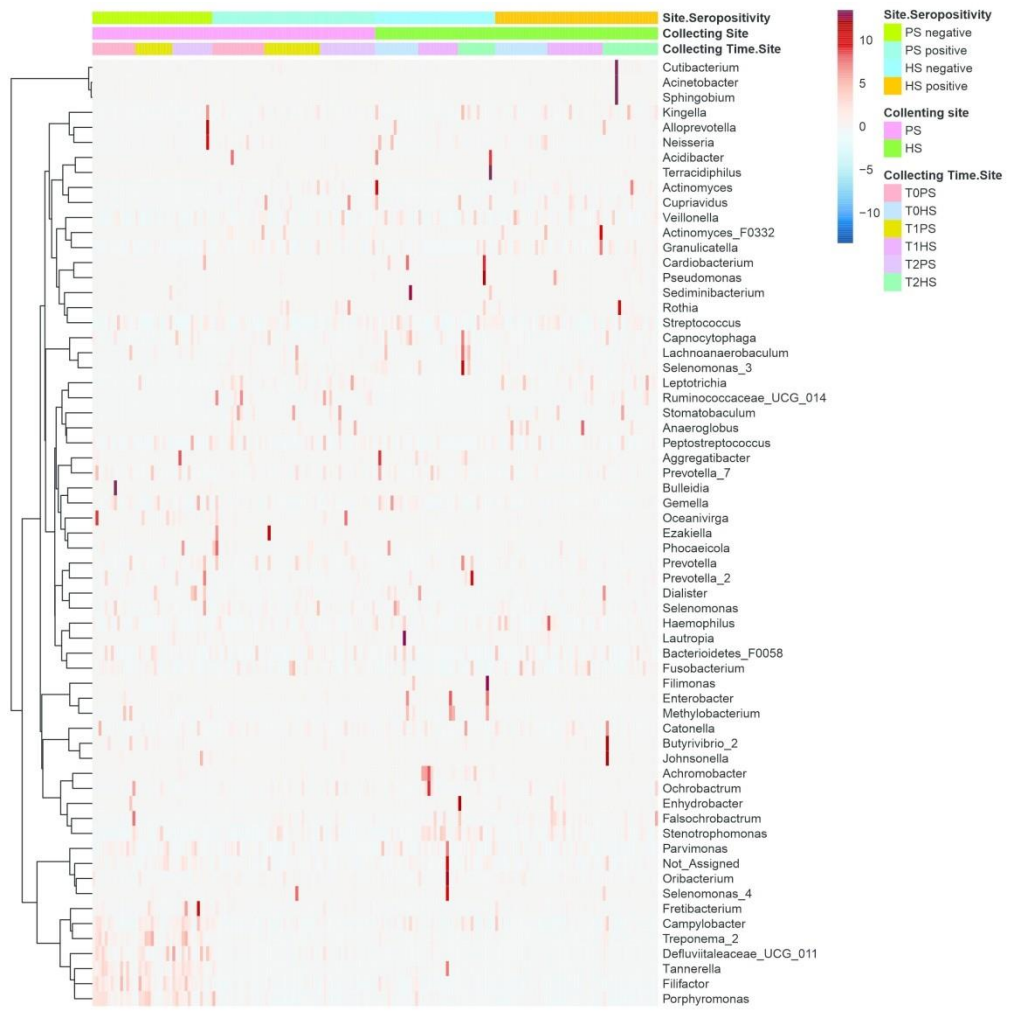


1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58



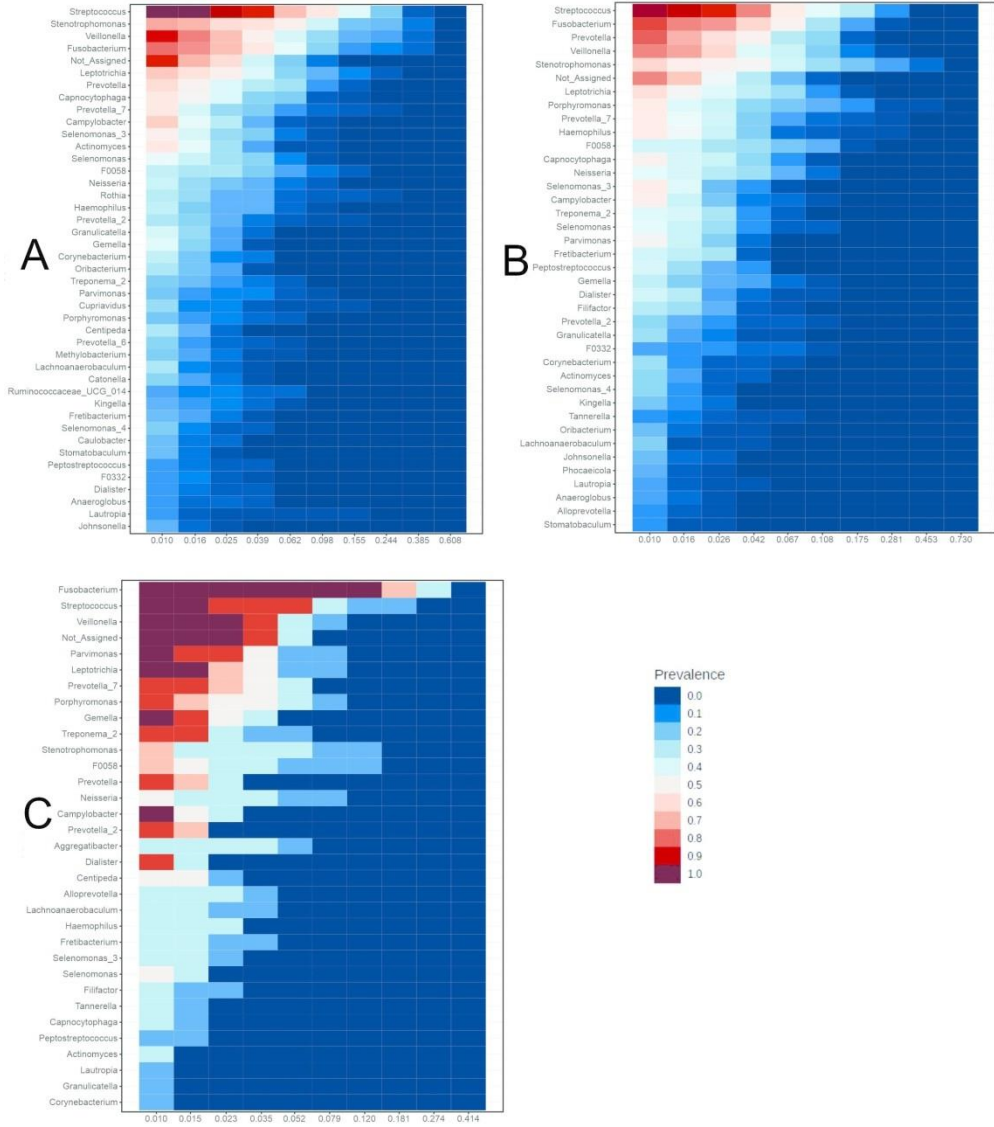
201x246mm (300 x 300 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57



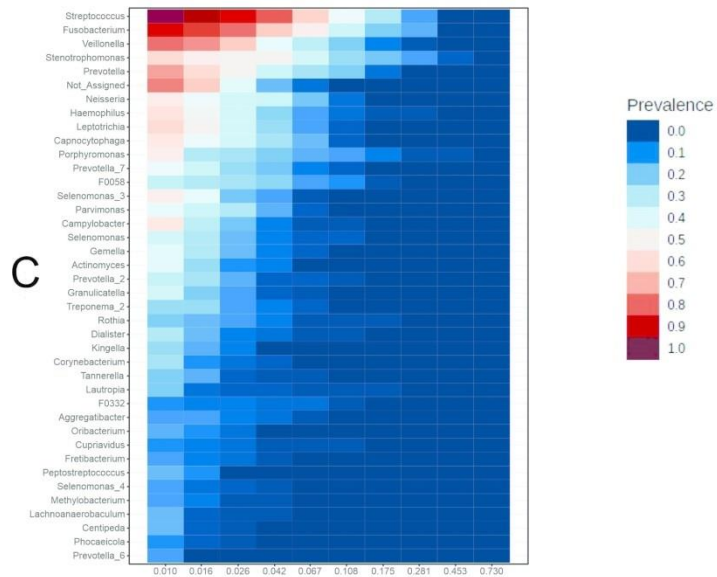
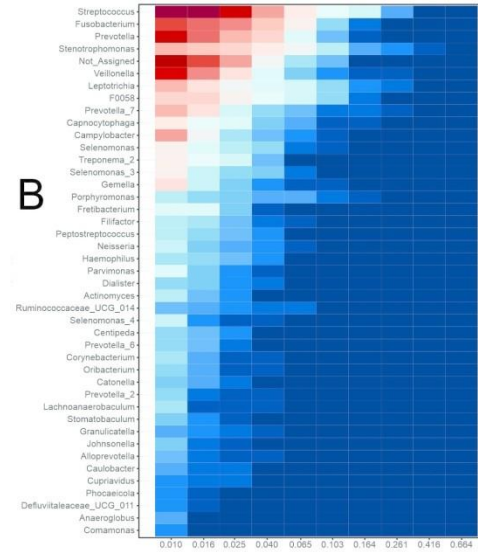
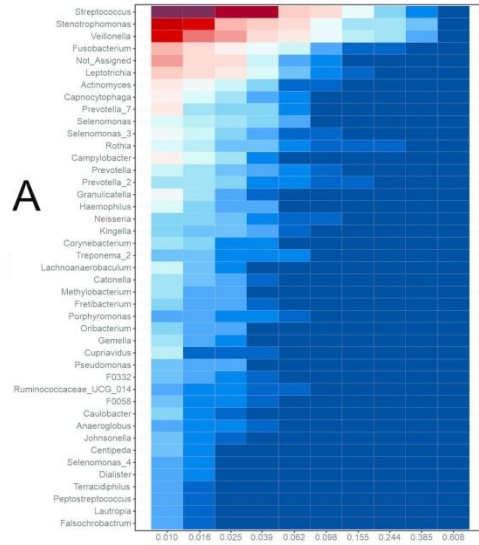
238x240mm (300 x 300 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57



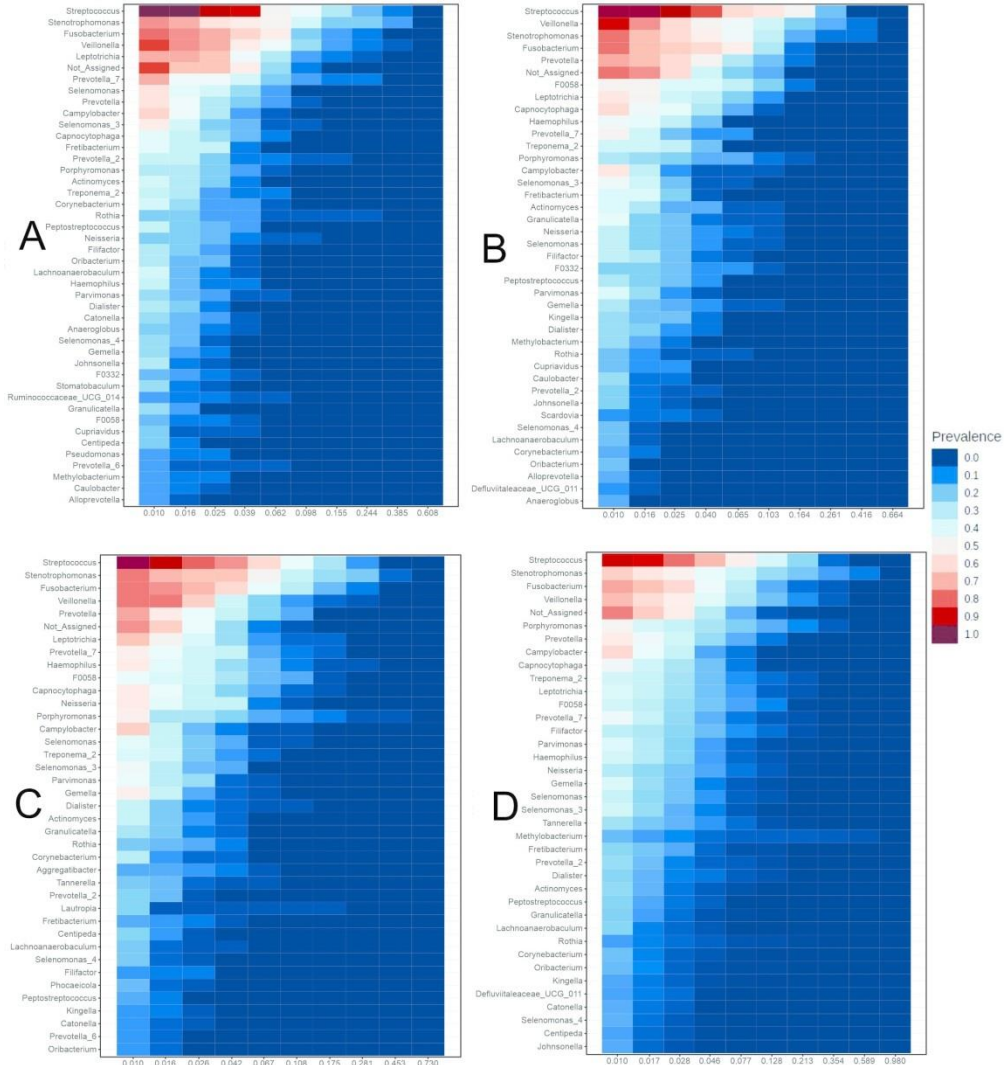
197x222mm (300 x 300 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57



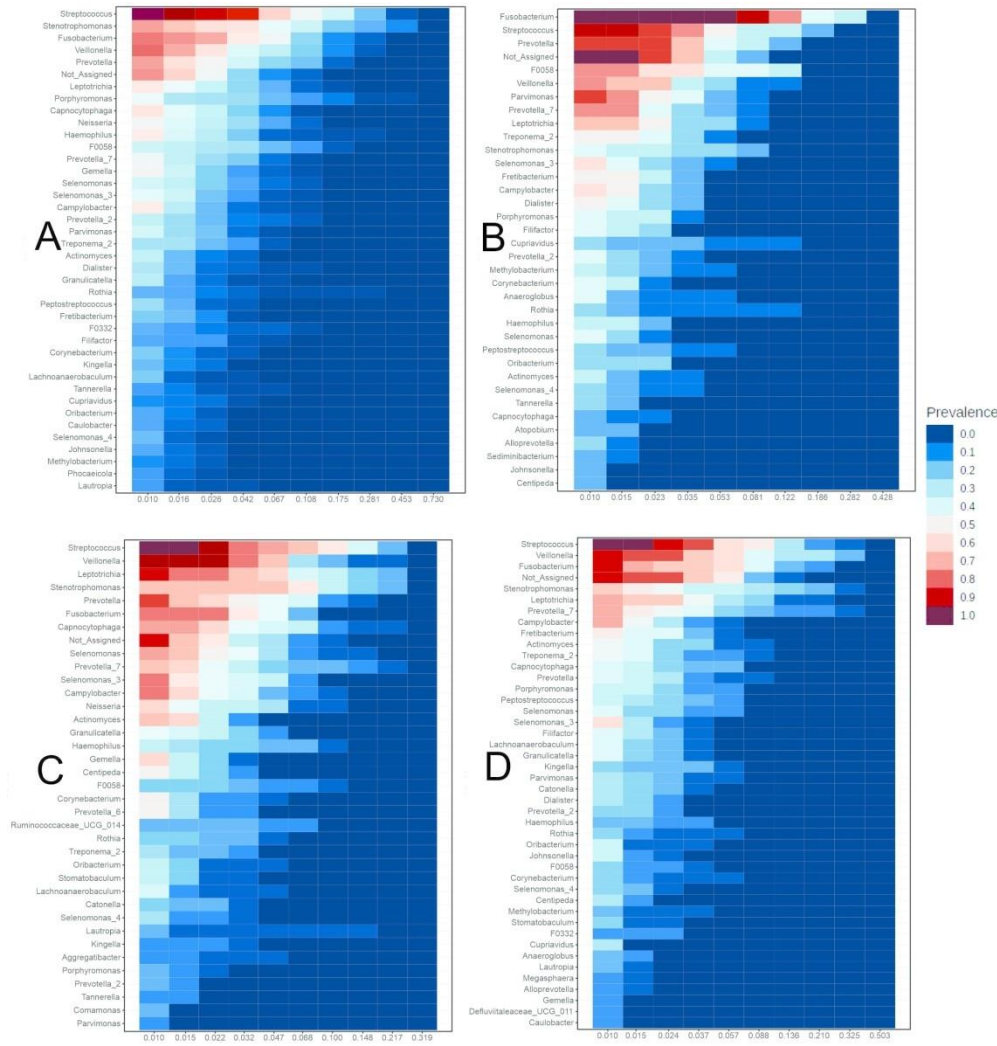
198x234mm (300 x 300 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57



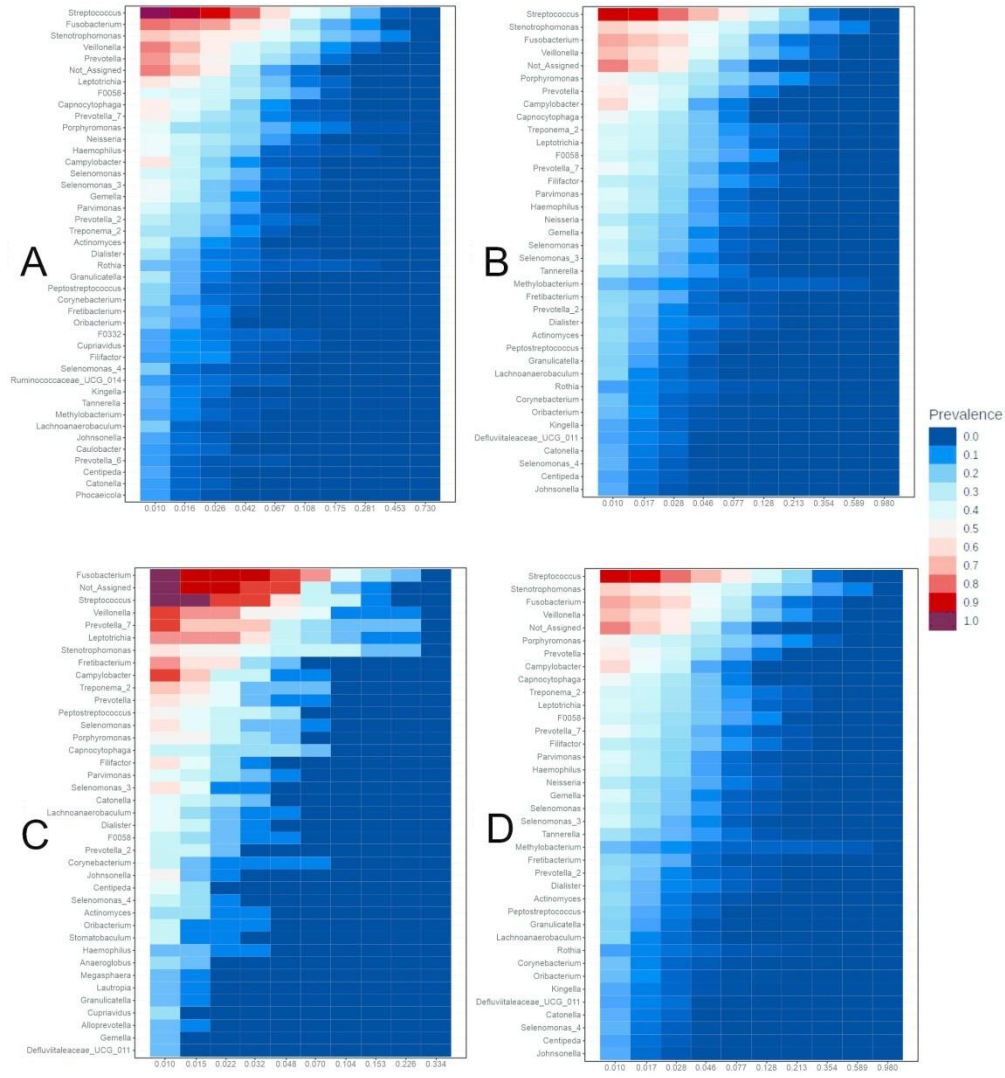
209x225mm (300 x 300 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57



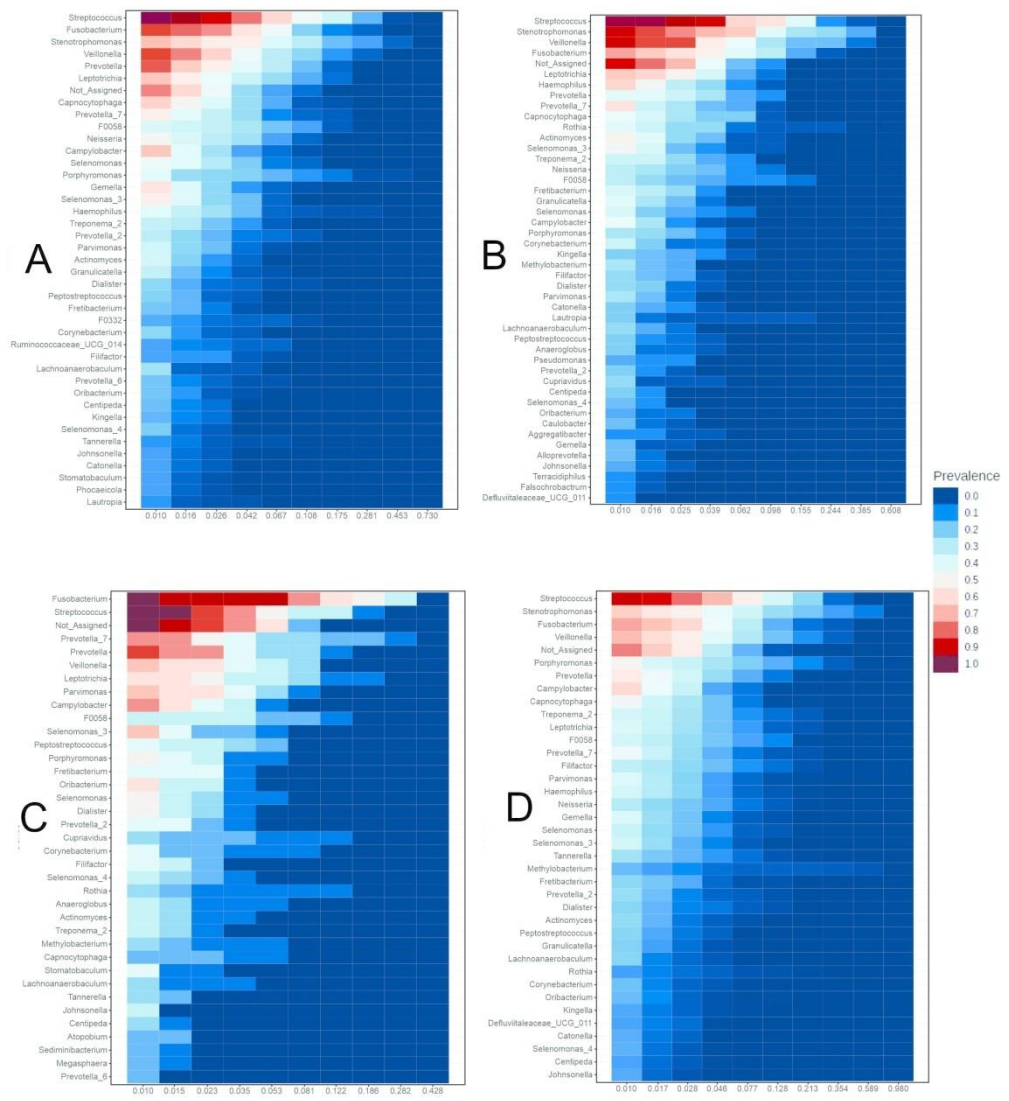
212x221mm (300 x 300 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58



207x222mm (300 x 300 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52



208x227mm (300 x 300 DPI)