



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea triennale in Scienze Biologiche (L-13)

Associazione tra la presenza di *Porphyromonas gingivalis* nel biofilm della lingua e esito clinico in pazienti con artrite reumatoide.

Porphyromonas gingivalis in the tongue biofilm is associated with clinical outcome in rheumatoid arthritis patients.

Tesi di Laurea di:
Giannotti Lucia

Docente Relatore:
Biavasco Francesca

Anno Accademico 2018/2019
Sessione Febbraio 2020

1

INTRODUZIONE

2

METODI

3

RISULTATI

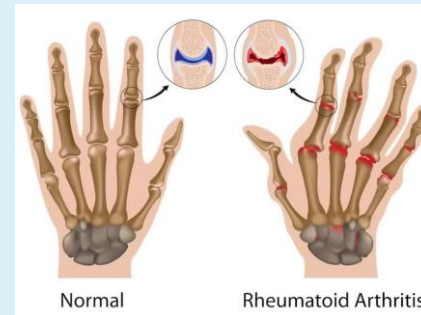
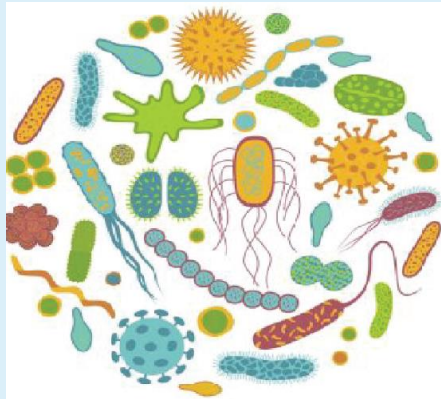
4

DISCUSSIONE

1

INTRODUZIONE.

La disbiosi intestinale è stata associata allo sviluppo di numerosi disturbi patologici tra cui l'insorgenza di malattie autoimmuni come l'artrite reumatoide(AR) dove, inoltre, anche i commensali della cavità orale sono coinvolti nell'avvio della malattia.



Cos'è l'artrite reumatoide?

E' una malattia autoimmune sistemica che coinvolge principalmente le articolazioni la cui causa dipende da un'interazione tra fattori genetici e ambientali.

Una patologia del cavo orale correlata alla comparsa dell'artrite reumatoide è la parodontite.

Porphyromonas gingivalis (Fig.1) è il principale microrganismo responsabile dello sviluppo e progressione della parodontite.(Fig.2)

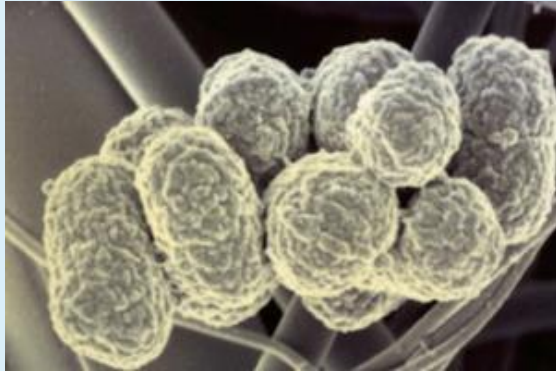


Fig. 1



Fig. 2

Come agisce *Porphyromonas gingivalis* ?

E' un batterio Gram-negativo. Esprime una peptidilarginina deaminasi (PAD) che induce la citrullinazione nel fibrinogeno umano. La citrullinazione porta alla perdita di tolleranza di proteine «self» determinando l'insorgenza di AR.



2

METODI.

Materie di studio: 143 pazienti affetti da AR diagnosticata secondo i criteri dell' American College of Rheumatology (ACR).

Come controlli: 36 pazienti affetti da parodontite senza comorbità reumatologica(PD).

57 pazienti affetti da osteoartrosi del ginocchio o fibromialgia(CS).

Si fa riferimento ad almeno un sito parodontale con un livello di attacco di 1-2 mm e profondità ≥ 4 mm.

Valutazione clinica di pazienti con AR: conteggio delle articolazioni gonfie e doloranti. Valutazione globale della malattia su scala analogica visiva(VAS= 0-100mm) e in base al punteggio dell'attività della malattia in 28 articolazioni (DAS28).

Valutazione di laboratorio:- VES (velocità di eritrosedimentazione); v.n. ≤ 20 mm/h.

- PCR (proteina C reattiva); v.n. ≤ 5 mm/dl.

- Presenza di ACPA (anti-CCP2); positività 25 U/ml

Campione di biofilm della lingua: raccolto mediante tampone citologico standard posizionato sulla superficie del dorso della lingua ed inserito in una provetta Eppendorf contenente 0,5 ml di brodo Sheddler con glicerolo al 20 % e mantenuto a -20° fino a estrazione DNA.

Estrazione del DNA: 0.4 ml di sospensione di biofilm nel brodo di Shaedler sono stati aggiunti 0.07 ml di dodecil solfato di sodio al 10% (SDS) e 0.005 ml di proteinasi K a concentrazione di 10 mg / ml. E' stata vortexata. Questa miscela è stata incubata per 10 minuti a 65 ° C. Successivamente, sono stati aggiunti alla provetta 0.1 ml di NaCl (5 M) e 0.1 µ / l CTAB / NaCl, brevemente vortexato e incubato a 65 ° C per 10 minuti; Si aggiungono 75 ml di Sevag e la miscela viene agitata su vortex per 10 secondi. Dopo centrifugazione per 5 minuti (a 24000 g), 0 - 6 volumi di etanolo al 90% sono stati aggiunti al surnatante. Dopo 30 minuti a -20 ° C e dopo essere stati centrifugati per 30 minuti a 24000 g; 0 - 002 ml sono stati usati come sospensione di DNA effettuare la real time PCR.

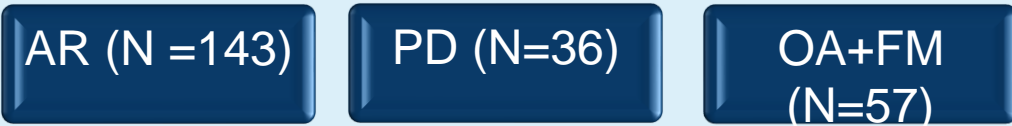
Analisi statistica: Test Kruskal – Wallis ➡ confronto tra gruppi di pazienti
Test Mann – Whitney ➡ confronto tra coppie tra gruppi di pazienti
Test esatto di Fisher ➡ confronto tra dati non continui
Test di Spearman ➡ analisi di correlazione
Analisi multivariata

Analisi microbiche: mediante real time PCR è stata quantificata la presenza di *Porphyromonas gingivalis* utilizzando dei primer a oligonucleotidi, progettato sul gene *prtC*, specifico per questo microorganismo mentre il microbioma totale è stato valutato mediante dei primer universali progettati su *E. Coli* .

La quantità di estratto di DNA analizzata mediante real time PCR è 0.02 ml per ogni reazione dove sono 3 le distinte repliche biologiche per ogni analisi.

Le fasi dello studio:

I^a fase



DAS28



Analisi di laboratorio: (ESR, PCR, ACPA)

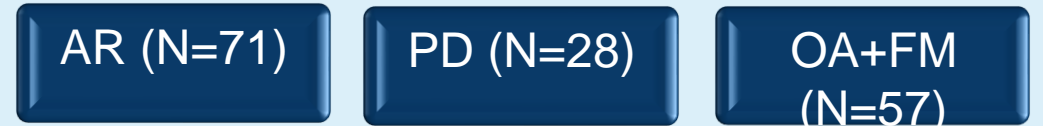
Campione di biofilm della lingua.

Estrazione di DNA → analisi microbiologica mediante PCR



Presenza di *Porphyromonas gingivalis*

II^a fase



Estrazione di DNA → analisi microbiologica mediante PCR

PCR con oligonucleotidi specifici per *P. gingivalis*

PCR con oligonucleotidi per microbioma



Percentuale di *Porphyromonas gingivalis* nel totale del biofilm della lingua.

3

RISULTATI.

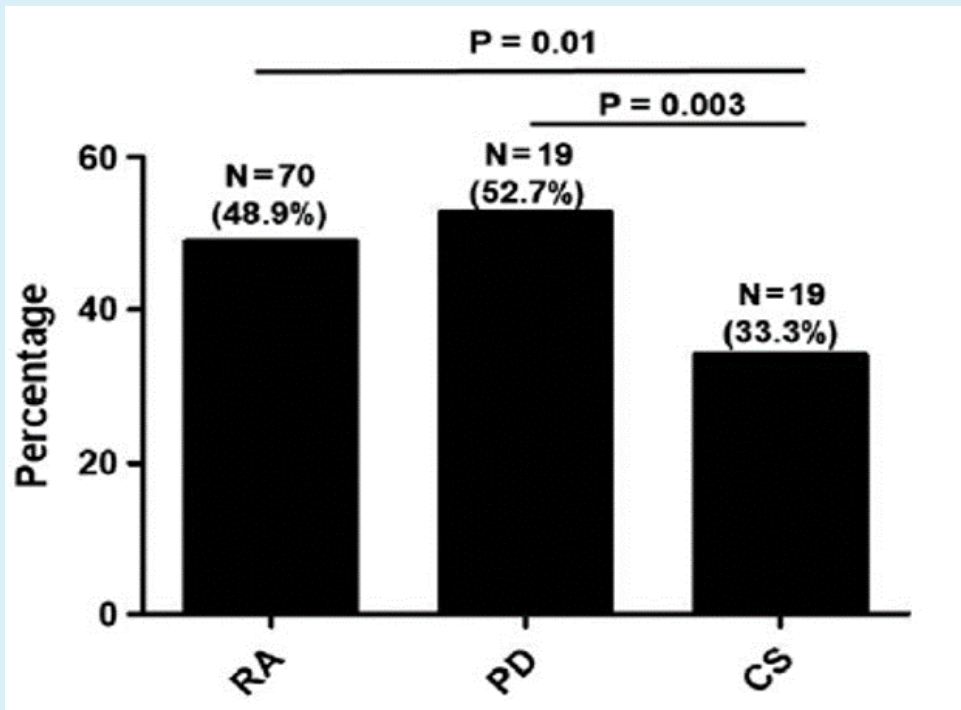
I^a fase dello studio: valutazione della presenza di *P.gingivalis*.

	AR(n=143)	PD(n=36)	OA+FM(n=57)	P
M/F	32/111	11/45	12/45	n.s.
Media± s.d. età' (anni)	57.5±19.8	56.0±9.9	61.4±10.9	n.s.
Media±s.d. durata malattia (mesi)	155.9±114.7	25.5±20.9	62.3±66.9	AR vs PD/OA P<0.0001
Status di fumatore				
Mai (n/%)	86(60.1)	12(33.4)	34(59.6)	AR/OA vs PD P=0.002
Passato(n/%)	22(15.4)	8(2.2)	9(15.8)	n.s.
Attuale(n/%)	35(24.5)	16(44.4)	14(24.6)	AR/OA vs PD P=0.004

Tab.1

Sono stati presi in considerazione i 3 gruppi del caso studio in base al genere, età media e status di fumatore.

Nei pazienti con AR si ha una durata della malattia più elevata rispetto agli altri gruppi mentre la parodontite si presenta con una percentuale più alta nei soggetti fumatori.



Valutazione della percentuale di soggetti risultanti positivi per *P. gingivalis* sulla totalità dei batteri presenti nel biofilm della lingua; percentuale rivelatasi maggiore in pazienti con AR e PD rispetto a CS (Fig.5).

La valutazione è stata effettuata mediante il procedimento di real-time PCR.

Fig. 5

Sono, invece, gli ACPA ad essere maggiormente presenti in AR rispetto agli altri due gruppi (Fig.6)

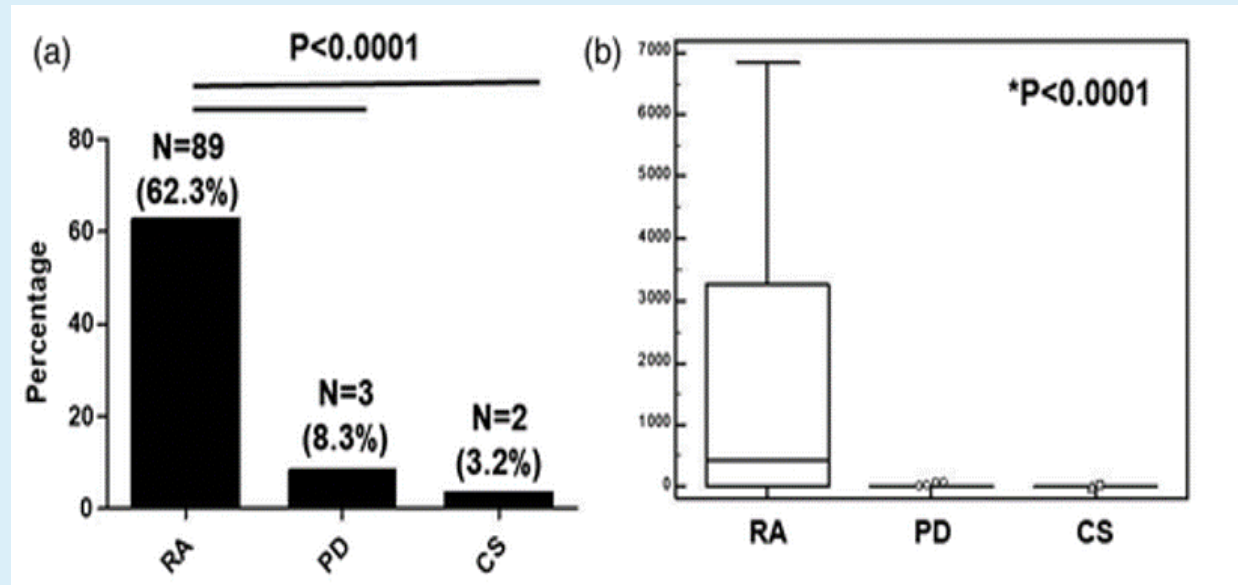


Fig. 6

In particolare gli ACPA sono stati rilevati nei pazienti positivi per *P.gingivalis* e, secondo i valori DAS28, questo dimostra un'associazione tra l'attività della malattia ed il batterio.

Una percentuale più elevata di *Porphyromonas gingivalis* nel microbioma totale della lingua è correlato ad una maggiore attività della malattia, valutata da DAS28 (Fig.8a), valori che tendono a diminuire in pazienti in remissione (Fig.8b).

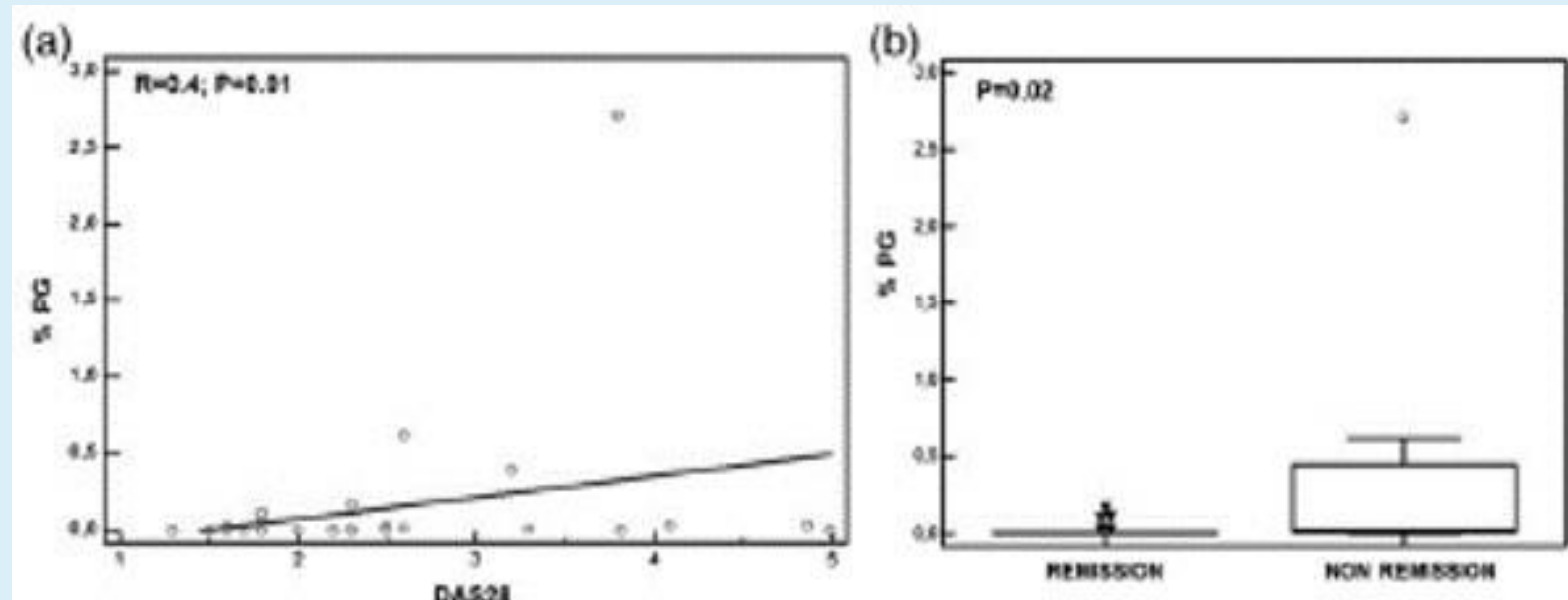
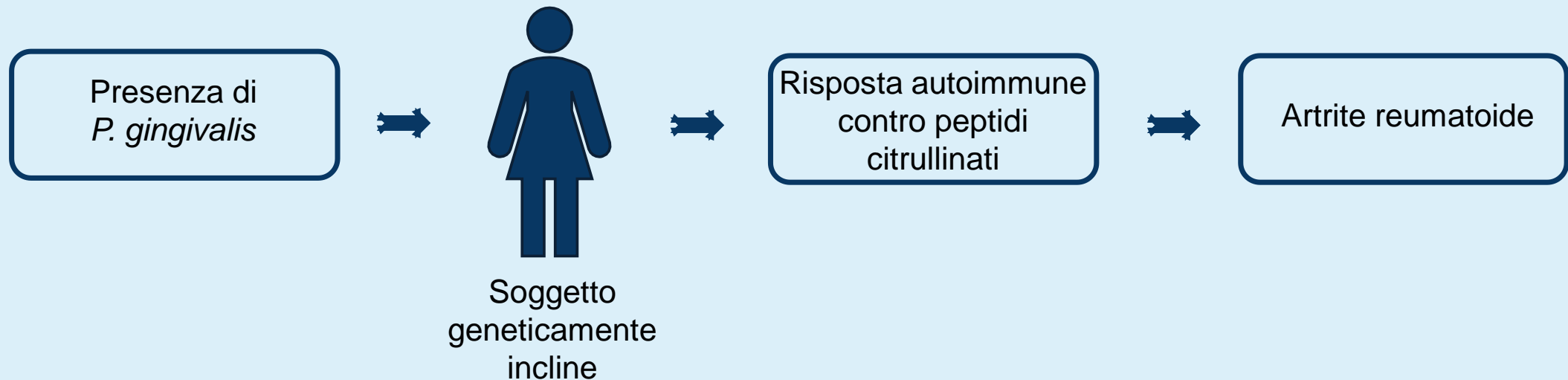


Fig. 8

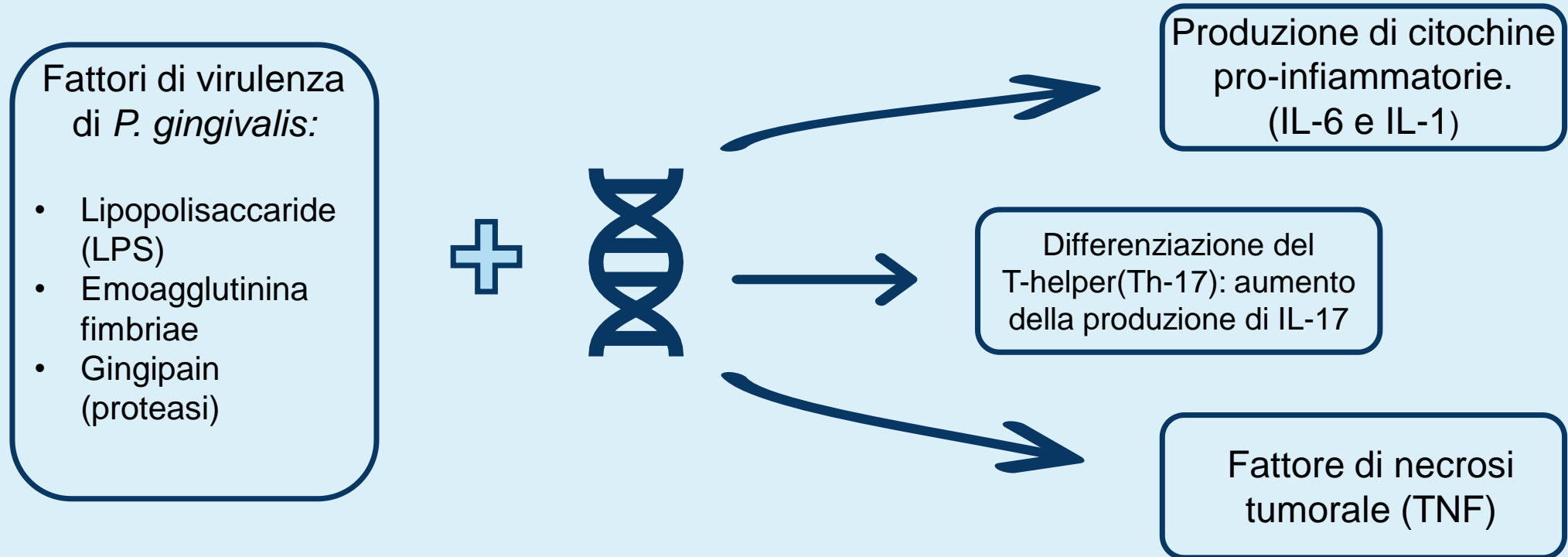
4

DISCUSSIONE.

Scopo: Valutare la percentuale di *P. gingivalis* nel biofilm della lingua e la sua possibile influenza nelle caratteristiche della malattia indipendentemente dalla presenza di parodontite e gengivite.



Qual' è il «ruolo» di *P. gingivalis*?



La produzione di citochine avviene mediante la via di segnalazione del recettore Toll-like TLR-9, altamente espresso nel tessuto parodontale patologico.

Valutazione della presenza di *P.gingivalis*



QUALITATIVO:

Prevalenza simile di *P. gingivalis* nei pazienti con AR e PD



QUANTITATIVO:

Percentuale nel biofilm della lingua.
Correlazione tra quantità di *P.gingivalis* e valori DAS28.
Risultato rafforzato: tasso più elevato in pazienti con malattia non in remissione.

P. gingivalis induce l'attivazione dei meccanismi precedentemente descritti con conseguente produzione di citochine pro-infiammatorie.



- Malattia clinicamente attiva
- Stato di infiammazione cronica

I **LIMITI** di questo caso studio:

- Siti dell'arco orale, diversi dalla lingua, non sono stati valutati in termini di microbiota.
- La composizione del microbioma potrebbe essere influenzata da farmaci assunti da pazienti con la patologia reumatica.

CONCLUSIONI

Mediante questo studio è stata analizzata la percentuale di *Porphyromonas gingivalis* nel biofilm della lingua, identificando un'associazione tra questo valore e l'attività della malattia; in particolare la persistenza di questo microrganismo potrebbe svolgere un ruolo nei meccanismi infiammatori patogeni.

GRAZIE PER L'ATTENZIONE!

Numerose ricerche hanno rilevato un'associazione tra il microbioma umano e lo sviluppo di artrite reumatoide. In questo caso studio è stata valutata la presenza e la quantificazione di *Porphyromonas gingivalis* nel biofilm della lingua in una coorte di pazienti sana e con AR. Sono stati analizzati 143 pazienti con AR, 36 soggetti con parodontite e 57 con osteoartrosi al ginocchio o fibromialgia. Mediante real time PCR è stato analizzato il tampone citologico standard cui tutti gli individui sono stati sottoposti per andare a valutare la percentuale di *P.gingivalis* su batteri totali della lingua, valori rivelatisi molto simili e significativamente più alti in pazienti con AR e parodontite rispetto ai soggetti di controllo. Inoltre è stata osservata una correlazione tra la quantità di *P.gingivalis* nei genomi totali dei batteri e l'attività della malattia valutata secondo DAS28, teoria rafforzata dal fatto che pazienti in remissione mostrano una prevalenza di *P.gingivalis* più bassa rispetto a quelli non in remissione. Quindi il microbioma della cavità orale potrebbe svolgere un ruolo importante nei meccanismi infiammatori patogeni e questo è stato dimostrato dall'associazione tra la percentuale di *Porphyromonas ginigivalis* nel biofilm della lingua e l'attività della malattia in pazienti con artrite reumatoide.

<http://www.centroames.it/2019/07/il-fattore-rh/>

<https://www.ricercaorale.it/2015/12/31/porphyromonas-gingivalis-e-artrite-reumatoide/>

<http://www.farodiroma.it/scoperto-gene-che-controlla-i-meccanismi-dellartrite-reumatoide-2/>

<https://www.salutelab.it/artrite-reumatoide-cose-e-8-sintomi-comuni/>

<https://www.microbiologiaitalia.it/batteriologia/la-cura-di-gengiviti-e-parodontiti-passa-per-i-probiotici/>