

Marília Gorni Fuller

**O Impacto da Microbiota Oral no Desenvolvimento de Cancro Oral**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2019

Marília Gorni Fuller

**O Impacto da Microbiota Oral no Desenvolvimento de Cancro Oral**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária sob a orientação do Professor Doutor Carlos Palmeira

---

## RESUMO

Segundo a Organização Mundial da Saúde, estima-se que haja 657.000 novos casos de cancro oral e faringe a cada ano, e mais de 330.000 mortes a nível mundial. Além dos fatores de risco físicos e químicos para o cancro oral existem os cancerígenos biológicos, nomeadamente, os microorganismos que interagem com o organismo humano compondo a microbiota. O objectivo deste trabalho é realizar uma revisão bibliográfica narrativa sobre as bactérias orais potencialmente oncogénicas juntamente com os possíveis mecanismos de sua ação na carcinogénese do cancro oral.

Os estudos relatados nesta revisão, em sua maioria, sugerem que há cada vez mais evidências de que a microbiota pode ter um papel no desenvolvimento do cancro oral, sendo que o carcinoma de células escamosas oral é a neoplasia mais conhecida da epiderme da cavidade oral. A disbiose presente nas diversas infecções orais aparentemente possui grande impacto nesta relação. O microambiente modificado e a quantidade aumentada de bactérias patogénicas favorecem que haja condições para o desenvolvimento tumoral e pode potencializar sua progressão e malignidade. A ação das bactérias orais como causadoras de inflamação crónica, sua atividade anti-apoptótica e produção de substâncias carcinogénicas, são alguns dos temas alvo dos estudos atuais. Embora mais estudos sejam necessários para analisar as diversas variáveis e heterogeneidades entre os estudos, os avanços moleculares e a monitorização adicional da microbiota aumentarão nossa compreensão do seu papel na carcinogénese e abrirão novas perspectivas para futuras modalidades terapêuticas e profiláticas. Desta forma, o papel do médico dentista se mostra fundamental na manutenção da homeostasia do ambiente bucal, encontrando meios para que a informação e métodos de prevenção obtenham máximo alcance.

**Palavras-Chave:** Microbiota oral, cancro oral, microbioma oral, inflamação crónica, atividade anti-apoptótica, substâncias carcinogénicas.

## **ABSTRACT**

According to the World Health Organization, there are an estimated 657,000 new cases of oral and pharyngeal cancer each year, and more than 330,000 deaths worldwide. In addition to the physical and chemical risk factors for oral cancer, there are biological carcinogens, namely, microorganisms that interact with the human organism composing the microbiota. The object of this paper is to carry out a narrative bibliographic review about the potentially oncogenic oral bacteria along with the possible mechanisms of their action in oral cancer carcinogenesis. Most of the studies reported in this review suggest that there is increasing evidence that microbiota may play a role in the development of oral cancer, with oral squamous cell carcinoma being the most well-known neoplasm of the oral cavity epidermis. The dysbiosis present in the various oral infections apparently has a great impact on this relationship. The modified microenvironment and the increased amount of pathogenic bacteria favor conditions for tumor development and may potentiate its progression and malignancy. The action of oral bacteria as causes of chronic inflammation, their anti-apoptotic activity and production of carcinogenic substances, are some of the target subjects of current studies. Although further studies are needed to analyze the various variables and heterogeneities between studies, molecular advances and additional microbiota monitoring will increase our understanding of its role in carcinogenesis and open new perspectives for future therapeutic and prophylactic modalities. Thus, the role of the dentist is fundamental in maintaining homeostasis of the oral environment, finding ways for the information and prevention methods to reach maximum reach.

**Keywords:** Oral microbiota, oral cancer, oral microbiome, chronic inflammation, anti-apoptotic activity, carcinogenic substances.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais Renato Fuller e Patrícia Monteiro Gorni, dedico todo o meu amor e todos os meus esforços, pela dedicação e carinho concedidos, pelo exemplo de vida e por estarem sempre ao meu lado transmitindo força para enfrentar as dificuldades desta caminhada.

*“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem a vitória, nem a derrota”*

(Theodore Roosevelt)

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus amados pais Renato Fuller e Patrícia Monteiro Gorni, obrigada por sempre estarem ao meu lado nos momentos mais felizes e também difíceis desta trajetória, nunca me permitindo desanimar, dando-me força, vontade, garra e persistência para não desistir dos meus sonhos. Obrigada pelo exemplo de vida e pela dedicação na construção do meu caráter. Pelo apoio e palavras de incentivo, ensinamentos e carinho. Vocês são e sempre serão o maior e melhor exemplo que levarei por toda a minha vida.

Ao meu namorado Miguel Clemente pelo carinho, amor, compreensão e pela cumplicidade em toda essa trajetória. Você é um dos meus melhores exemplos de vida, e seu companheirismo e paciência me foram guia para superar os desafios desta etapa.

Aos meus queridos amigos, tanto os de longa data do Brasil, como os que fiz em Portugal, por estarem comigo, dividindo momentos de tristezas e alegrias, de fracassos e vitórias e de sonhos e realizações. Tenham a certeza de que todos esses momentos ficarão eternizados em minha memória.

Ao Professor Dr. Carlos Palmeira, por ter me proporcionado momentos de aprendizado pessoal e profissional durante a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

RESUMO.....	v
ABSTRACT .....	vi
DEDICATÓRIA .....	vii
AGRADECIMENTOS .....	viii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....	x
I. INTRODUÇÃO .....	1
1. Materiais e Métodos .....	2
II. DESENVOLVIMENTO .....	3
2.1 Microbiota Oral .....	3
2.2 Microbiota Oral e Cancro .....	5
2.3. Bactérias orais potencialmente oncogénicas.....	6
2.4 Mecanismos de ação carcinogénica das bactérias orais.....	8
III. DISCUSSÃO .....	12
IV. CONCLUSÃO.....	14
BIBLIOGRAFIA .....	15

## **ÍNDICE DE ABREVIATURAS**

**CCEO** – Carcinoma de Células Escamosas Oral

**CO** – Cancro Oral

**MO** – Microbiota Oral

**rRNA** – Ácido ribonucléico ribossomal

## I. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde, estima-se que haja 657.000 novos casos de cancro oral (CO) e faringe a cada ano, e mais de 330.000 mortes a nível mundial. O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) é a lesão maligna oral mais frequente (Saman, 2012) sendo o efeito sinérgico do uso de tabaco e álcool o seu principal fator etiológico (Karpinski, 2019). Outros fatores de risco para o CO incluem doenças sistêmicas, como diabetes (Goutzanis *et al.*, 2007), síndrome metabólica (Chang *et al.*, 2015) e inflamação crônica e infecção (Mantovani *et al.*, 2008).

Além dos fatores de risco físicos e químicos para o CO, existem os cancerígenos biológicos, nomeadamente os microorganismos que interagem com o organismo humano compondo a microbiota. A microbiota e o hospedeiro coevoluíram para um complexo "superorganismo", cujas intrincadas relações desempenham um papel importante na saúde humana, incluindo na resposta imune, no metabolismo carcinogénico e na digestão de nutrientes. No entanto, esta estreita relação também acarreta riscos para o desenvolvimento de doenças, particularmente quando as vias reguladoras do hospedeiro que protegem a homeostase são perturbadas (Schwabe e Jobin, 2013). O desequilíbrio ecológico da comunidade microbiana, chamado disbiose é caracterizado por perda de micróbios benéficos, expansão de micróbios patogénicos e perda geral da diversidade microbiana (Meurman e Uittamo, 2008; Petersen e Round, 2014). Têm sido referidas na literatura algumas evidências que sugerem que a disbiose oral pode levar ao desenvolvimento do cancro (Schwabe e Jobin, 2013).

A má higiene bucal e a doença periodontal também têm sido associadas ao CO, e evidências crescentes sugerem que a microbiota oral (MO) tem um papel no desenvolvimento do CO (García-Castillo *et al.*, 2016).

Devido à relevância do CO na saúde da população e sua crescente incidência, é de suma importância que o médico dentista esteja ciente de que a manutenção da saúde do meio bucal pode ser de grande impacto na prevenção de neoplasias, além de outras formas de doença e, embora apenas no início, a análise da MO poderá ser o próximo passo na evolução da terapia do cancro e ajudando os profissionais de saúde a desenvolver abordagens individualizadas para a prevenção e tratamento do cancro.

Pelo acima exposto, o objectivo deste trabalho é realizar uma revisão bibliográfica narrativa sobre as bactérias orais potencialmente oncogénicas juntamente com os possíveis mecanismos de sua ação na carcinogénese do CO.

## **1. Materiais e Métodos**

Foi feita uma revisão da bibliográfica narrativa onde, para tal, utilizou-se de base de dados online a *PubMed* (US National Library of Medicine National Institutes of Health), *bvs* (Biblioteca Nacional em Saúde) e *Scielo* (Scientific Eletronic Library Online). As palavras chaves de busca utilizadas como critério de seleção dos artigos foram: microbiota, cancro oral, microbioma oral, inflamação crónica, atividade anti-apoptótica e substâncias carcinogénicas e a combinação entre elas.

Relativamente aos critério de inclusão no que tange idioma, o critério de inclusão foi de que os artigos estivessem em inglês ou português. Entretanto, foram selecionados apenas artigos científicos em inglês.

Os artigos incluídos neste trabalho datam de 1990 até 2019. Um dos critérios de inclusão que os artigos pesquisados fossem datados do ano 2000 ou mais recente, entretanto, três artigos datados anterior a este ano, um de 1990, um de 1998 e outro de 1999 foram incluídos por apresentarem dados relevantes a esta revisão. Em relação aos critérios de exclusão, dos artigos pesquisados, foram excluídos todos aqueles que não abordassem temas relevantes ao trabalho.

Buscou-se utilizar trabalhos que tratassem apenas da MO e CO. No entanto, artigos científicos que abordaram MO ou CO separadamente, foram também incluídos por conterem informações relevantes para o desenvolvimento deste trabalho.

Desta forma, durante a busca diversos artigos foram encontrados com os tópicos abordados por esta revisão, mas neste trabalho, 64 foram selecionados como referência bibliográfica final devido à sua maior relevância a este trabalho e por serem mais atualizados.

## II. DESENVOLVIMENTO

### 2.1 Microbiota oral:

O termo “microbiota oral” refere-se ao grupo heterogéneo de espécies microbianas que colonizam todas as superfícies da cavidade oral, sendo este, altamente diversificado, incluindo bactérias, fungos, vírus, archaea e protozoários (Le Bars *et al.*, 2017). Esses microrganismos formam uma comunidade ecológica complexa que influencia a saúde bucal e sistêmica (Zhang *et al.*, 2018).

As bactérias são responsáveis pela principal porção de microrganismos na cavidade bucal (Zhang *et al.*, 2018) sendo que a comunidade da MO está entre as mais diversas do corpo (LeBars *et al.*, 2017). Considera-se que a cavidade oral possui a segunda microbiota mais complexa do corpo humano, atrás apenas do cólon (Wade, 2013). Aproximadamente 700 espécies microbianas estão presentes na cavidade bucal, na sua maioria indígena (Palmer, 2013). Entre essas espécies, aproximadamente 54% foram cultivadas e nomeadas, 14% foram cultivadas, mas sem nome, e 32% são referidas apenas como filotipos, ou, coloquialmente como “incultiváveis” (Zhang *et al.*, 2018). Cerca de 400 a 500 táxones orais foram detectados apenas na fenda subgingival (Paster *et al.*, 2001; Aas *et al.*, 2005). Os táxones restantes são distribuídos em muitos habitats orais, incluindo diferentes áreas da língua, superfície do dente, mucosa bucal, amígdalas, palato mole e duro e vestíbulo labial (Aas *et al.*, 2005; Segata *et al.*, 2012).

Segundo o Banco de Dados de Microbiomas Humanos (*Human Oral Microbiome Database*), a comunidade bacteriana oral saudável é dominada pelos seis principais filos, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* e *Fusobacteria*, que respondem por 94% dos táxones detectados. O género *Streptococcus* é o mais predominante, seguido por *Prevotella*, *Veillonella*, *Neisseria*, e *Haemophilus*, sendo que existe variação dependendo do local da cavidade oral. (Wang e Ganly, 2014).

Essas estimativas baseiam-se em anos de identificação tradicional de bactérias de estudos de caracterização cultural e fenotípica, mas, principalmente, da identificação de bactérias de estudos moleculares independentes de cultura usando análises comparativas do gene do ácido ribonucléico ribossomal (rRNA) 16S, também conhecido como métodos de sequenciação de alto rendimento de DNA ou RNA (Dewhirst *et al.*, 2010). Estes métodos empregam processos paralelos em grande escala para execuções mais rápidas e com melhor custo-benefício em

comparação ao método anterior. As técnicas baseadas no gene que codifica o rRNA 16S são agora uma abordagem padrão para caracterizar as espécies bacterianas presentes nas populações polimicrobianas (Hooper *et al.*, 2007).

O ecossistema oral é muito intrincado porque possui vários nichos significativamente diferentes, incluindo saliva, áreas de tecidos mole como mucosa e língua e superfícies de tecido duro dos dentes. Superfícies diferentes atraem comunidades microbianas distintas, porque cada nicho fornece um ecossistema único, com condições e nutrientes ideais para os micróbios que os povoam (Aas *et al.*, 2005; Avila *et al.*, 2009). Por exemplo, espécies de *Rothia sp.* tipicamente colonizam a língua ou superfícies dentárias, *Simonsiella* coloniza apenas o palato duro, *Streptococcus salivarius* coloniza principalmente a língua, e os *Treponemas* são tipicamente restritos à fenda subgingival (Mager *et al.*, 2003; Aas *et al.*, 2005; Segata *et al.*, 2012).

A saliva engloba todos os sítios bucais, sendo o microbioma salivar essencialmente composto por uma mistura de micróbios provenientes de todos os sítios bucais. Embora haja considerável sobreposição de espécies detectadas em todos os locais orais, como certas espécies de *Streptococcus*, *Gemella*, *Granulicatella*, *Neisseria* e *Prevotella*, muitas vezes há especificidade de sítio (Krishnan, Chen e Paster, 2016).

As superfícies de tecido e biofilmes da cavidade bucal são continuamente infiltrados com saliva. Os microrganismos salivares vêm principalmente do desprendimento do biofilme na superfície do tecido oral (Costalonga e Herzberg, 2014).

Algumas proteínas na saliva podem revestir a superfície dos dentes e da membrana mucosa para promover a adesão microbiana. No entanto, algumas proteínas salivares também promovem a dessorção, aglutinação e remoção de microrganismos pela deglutição de saliva (Costalonga e Herzberg, 2014). Acredita-se que a hipossalivação contribua para o desenvolvimento de doenças orais por desequilibrar estas dinâmicas. Verificou-se que o número de microrganismos acidogénicos e acidúricos aumentou nos sujeitos com hipossalivação por meio da análise da microflora em amostras de lavagem de sujeitos saudáveis e com hipoventilação (Almstahl *et al.*, 2003). Além disso, a microbiota salivar poderia ser usada como um potencial marcador diagnóstico e prognóstico para várias doenças específicas, como cárie dentária e CO (Mager *et al.*, 2005; Crielaard *et al.*, 2011).

## 2.2. Microbiota Oral e Cancro

O desequilíbrio ecológico de uma comunidade microbiana é chamado disbiose e caracteriza-se pela perda de micróbios benéficos, expansão de micróbios patogênicos e perda geral da diversidade microbiana (Meurman e Uittamo, 2008; Petersen e Round, 2014). Uma MO alterada, ou seja, em disbiose, acarreta ao desenvolvimento de várias doenças orais, como cárie dentária, doença periodontal e estomatite oral. As principais patologias infecciosas do tecido bucal, nomeadamente cárie, gengivite e periodontite são todas polimicrobianas na natureza, ou seja, não existe apenas uma bactéria responsável, mas sim, uma diversidade delas. É possível que certas bactérias, por exemplo, provenientes de uma periodontite não tratada, penetrem na corrente sanguínea e tragam consequências para a saúde (LeBars *et al.*, 2017). Desta forma, bactérias orais têm sido associadas a uma série de doenças sistêmicas, incluindo endocardite bacteriana (Dhotre *et al.*, 2018) acidente vascular cerebral isquémico (Joshapura *et al.*, 2003), doença cardiovascular (Beck e Offenbacher, 2005), cancro pancreático (Farrell *et al.*, 2012), e pneumonia (Awano *et al.*, 2008). A doença periodontal mostrou, também, predispor os indivíduos à doença cardiovascular através de sua capacidade de induzir inflamação crônica (Syrjänen, 1990) e, ademais, podemos ainda correlacionar infecções bucais a outras doenças generalizadas, como artrite reumatóide (Zhang *et al.*, 2015).

Relativamente à associação das alterações na MO e o CO, membros da comunidade da microbiota humana desempenham um papel ativo na carcinogénese através de danos no DNA, como é o caso de *Escherichia coli* (Su *et al.*, 2015) e infecção crónica, como é o caso de *Helicobacter pylori* (Kipanyula *et al.*, 2013). O crescimento e o metabolismo dessas espécies pioneiras alteram as condições ambientais locais, como o potencial redox local, o pH, a coagregação e a disponibilidade de nutrientes, permitindo, assim, que organismos mais fastidiosos colonizem-se após eles (Marsh, 2000). Além disso, a má saúde bucal, um dos principais causadores de disbiose oral, tem sido associada ao cancro de cabeça e pescoço, particularmente ao CO (Mascitti *et al.*, 2019).

O microbioma de cada órgão é distinto, o que sugere que os efeitos sobre a inflamação e carcinogénese são provavelmente específicos de órgãos. Além disso, há uma importante variabilidade interindividual dos microbiomas, o que os torna potenciais determinantes do desenvolvimento de doenças, incluindo o cancro (Schwabe e Jobin, 2013). Desta forma, vem se tornando evidente que a disbiose pode levar ao desenvolvimento do cancro (Schwabe e Jobin,

2013). da mesma forma que evidências crescentes sugerem que a disbiose associada à MO tem um papel relevante no desenvolvimento do câncer bucal (García-Castillo *et al.*, 2016).

Entretanto, alguns desafios ainda surgem quanto a estudar a MO, pois, embora o nosso entendimento sobre microorganismos orais tenha se aprofundado gradualmente nos últimos anos, ainda existe uma grande proporção de bactérias orais que não podem ser cultivadas em laboratório. A principal razão para certas espécies microbianas não serem cultiváveis é devido à dificuldade em reproduzir condições ambientais às quais esses microrganismos estão acostumados *in vivo*. Muitos microrganismos têm requisitos únicos de sobrevivência, como nutrientes específicos, temperatura, pH precisos e interação com outros microrganismos de sua comunidade (Zhang *et al.*, 2018.)

Estudos anteriores do microbioma oral usando métodos dependentes de cultura examinaram apenas um pequeno número de espécies e, portanto, não proporcionaram consenso sobre as alterações associadas ao câncer na abundância de espécies (Hooper *et al.*, 2006). O advento da tecnologia de sequenciamento de alto rendimento permitiu o uso de estratégias desenvolvidas recentemente e independentes da cultura para explorar a composição dos ecossistemas microbianos na saúde humana (*The Human Microbiome Project Consortium*, 2012). A criação independente de culturas não descarta, então, as espécies de micróbios tidas como difíceis de cultivar ou, “incultiváveis”, podendo desta forma potencializar a descoberta de novos táxons de grande interesse científico e que, possivelmente, estariam associados ao desenvolvimento de câncer bucal (Yang *et al.*, 2018).

### 2.3. Bactérias orais potencialmente oncogênicas

Atualmente, diversos estudos procuram avaliar se as bactérias podem estar associadas de forma incidental ou causal ao CO. Estas pesquisas relataram que certas bactérias orais comuns estão elevadas nas lesões de CO e esôfago e nos gânglios linfáticos associados. Embora a maior colonização de *Streptococcus* orais facultativos tenha sido relatada com mais frequência as espécies anaeróbias de *Prevotella*, *Veillonella*, *Porphyromonas* e *Capnocytophaga* também foram elevadas (Mager *et al.*, 2005).

Algumas espécies específicas de bactérias foram identificadas e correlacionaram-se fortemente com o CCEO, como *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella*

*intermedia*. O estudo de Lee *et al.*, em 2017, demonstrou que as composições do microbioma oral de cinco gêneros, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Parvimonas*, *Peptostreptococcus* e *Slackia*, revelaram diferenças significativas entre a lesão precursora epitelial e os pacientes com cancro e correlacionaram com sua classificação em dois grupos. Essas diferenças observáveis no microbioma bucal podem ter o potencial de servir como um biomarcador para monitorar o desenvolvimento, progressão e recorrência do CO.

No trabalho realizado por Mager *et al.*, em 2005, foram testadas 40 espécies orais bacterianas de um grupo de indivíduos livres de cancro e de um grupo de indivíduos com CCEO. Os níveis de três espécies (*Capnocytophaga gingivalis*, *Prevotella melaninogenica* e *Streptococcus mitis*) foram elevados na saliva do grupo de doentes com CO. Desta forma, essas três espécies bacterianas foram sugeridas como marcadores de diagnóstico e foram encontradas em 80% dos casos de cancro.

Segundo Hooper *et al.* (2007), foram encontrados 52 diferentes filotipos bacterianos em tecidos tumorais usando hibridização *in situ* fluorescente e sequenciação de 16S rRNA, incluindo *Proteobacteria*, *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Prevotella* e *Veillonella*. A maioria das espécies encontradas nos tecidos tumorais era sacarolítica e acidúrica, refletindo, talvez, a natureza seletiva do microambiente ácido e hipóxico encontrado nos tumores. De fato, a maioria dos táxones isolados das amostras tumorais deste estudo foi previamente detectada em lesões de cárie dentária ácidas. Uma tendência semelhante foi aparente quando essas amostras de tecido foram analisadas anteriormente por análise de cultura (Hooper *et al.*, 2006). Ainda em seu estudo de 2007, Hooper *et al.*, realça que, embora haja uma forte tendência desta relação, todas as etapas envolvidas no isolamento microbiano pode apresentar vieses que, por sua vez, podem distorcer resultados.

No estudo de Nagy *et al.* (1998) foram examinadas áreas de CCEO, bem como de superfícies de mucosas saudáveis do mesmo paciente e mostraram um número maior de bactérias orais associadas a CCEO das seguintes espécies: *Veillonella sp.*, *Fusobacterium sp.*, *Prevotella sp.*, *Porphyromonas sp.*, *Actinomyces sp.*, *Clostridium sp.*, *Haemophilus sp.*, *Streptococcus spp.* e *Enterobacteriaceae*. Entre os estreptococos, o *Streptococcus anginosus* parece ser um marcador especialmente relevante de cancro de cabeça, pescoço e esôfago. Este estudo revelou que, em relação à mucosa oral saudável contígua, os biofilmes de superfície do CO abrigavam níveis significativamente aumentados de aeróbios e anaeróbios, incluindo muitas espécies associadas a infecções orais e com infecção focal de origem oral.

Nos estudos de Sakamoto et al. (1999) os estreptococos orais (*Streptococcus intermedius*, *S. constellatus*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. salivarius*) foram os isolados mais comuns dos gânglios linfáticos cervicais em pacientes com CO. Entre as bactérias anaeróbias, *Peptostreptococcus spp.* foram as mais prevalentes. Também Pushalkar et al. (2012) verificaram locais de tumor CCEO altamente associados às seguintes espécies: *Streptococcus sp.*, *Peptostreptococcus stomatis*, *Gemella sp.* e *Johnsonella ignava*.

Robledo-Sierra et al (2019), em sua revisão, analisaram 23 artigos que pesquisaram sobre a relação entre MO e CCEO. Todos os trabalhos identificaram o microbioma, entretanto, nenhum investigou propriedades microbianas, e, apenas seis artigos complementaram a identificação de espécies com base no gene 16S rRNA. Os estudos analisados não levaram a um conceito comum da microbiota associada à saúde e à doença, provavelmente devido ao diagnóstico impreciso, inúmeras variações metodológicas, alta riqueza de espécies e imensa diversidade entre as amostras.

#### 2.4 Mecanismos de ação carcinogénica das bactérias orais

Diversos estudos demonstram que há certos mecanismos de ação da MO que podem ter maior relevância na patogénese do câncer, sendo que três foram preconizados por sua relevância.

O primeiro mecanismo dita que a estimulação da infecção crónica por parte da ação bacteriana gera mediadores inflamatórios que por sua vez causam ou facilitam a proliferação celular, mutagénese, a ativação oncogénica e a angiogénese (Zhang *et al.*, 2018).

A forma mais comum de infecção crónica encontrada na cavidade oral é a doença periodontal crónica, sendo seu principal fator etiológico a placa bacteriana que abriga diversos tipos de bactérias patogénicas, especialmente as anaeróbicas como: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum* (Szkaradkiewicz e karpinski, 2013). Estas bactérias têm efeitos nocivos sobre fibroblastos, células epiteliais e endoteliais e componentes da matriz extracelular. Os agentes patogénicos periodontais também podem afetar as células imunológicas, estimulando-as a produzir mediadores inflamatórios (Karpinski, 2019).

O MO afeta estes diferentes tipos de células de forma diversa. Ademais, essas bactérias afetam o crescimento de concentrações locais de várias citocinas, incluindo interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). A relevância do biofilme neste caso deve-se ao fato de que as principais células fontes de IL-1 $\beta$ ,

como macrófagos/monócitos, fibroblastos e mastócitos sintetizam a interleucina em resposta à ativação causada pela influência do principal componente da parede celular de bactérias gram-negativas, lipopolissacarídeo (LPS) (Hou *et al.*, 2003).

A IL-1B tem ainda a capacidade de criar um microambiente favorável à angiogénese e crescimento tumoral por estimularem as células endoteliais a produzirem fatores de crescimento vascular (Carmi *et al.*, 2013). Esta interleucina também é responsável pela produção de citocina pró-inflamatória IL-6, fator de necrose tumoral (TNF) e muitas metaloproteinases (MMPs), como a MMP-9 que desempenha um papel na degradação da matriz extracelular local e na invasão tumoral (Karpinski, 2019). A IL-6 afeta o processo de invasão e metástase, bem como, induz o stresse oxidativo causando acúmulo transitório de peróxido de hidrogénio nas mitocôndrias, gerando danos a mesma. Além disso, a maioria dos genes alvos da IL-6 está envolvida na progressão do ciclo celular e na supressão da apoptose, desta forma, podendo ter impacto no desenvolvimento tumoral (Haura, Turkson e Jove, 2005). Segundo Wang *et al.* (2005), o alto conteúdo de IL-1B está relacionado à invasão tumoral, migração e fenótipo tumoral mais agressivo, bem como com a baixa expressão da glicoproteína membranar E-caderina no organismo. A menor quantidade de E-caderina está intimamente relacionada a distúrbios das funções celulares, inibição do crescimento, apoptose, paragem do ciclo celular e diferenciação celular, podendo, desta forma, levar ao desenvolvimento de carcinoma agressivo, maior invasividade e menor sobrevida do doente (Wong *et al.*, 2018).

Outra citocina importante da resposta inflamatória é a TNF- $\alpha$ . Quando em baixas doses, essa molécula está associada a à promoção tumoral (Szlosarek, Charles e Balkwill, 2006). Além disso, a TNF- $\alpha$  possui capacidade de induzir danos ao DNA ao produzir compostos reativos de oxigénio (Yan *et al.*, 2006)

A perda da adesão mediada por E-caderina e o aumento da migração provocada por MMP-9 são significativos marcadores da transição de tumores epiteliais de um estado benigno para um estado invasivo (Wang *et al.*, 2005).

O segundo mecanismo importante de como certas variedades de bactérias do meio oral podem influenciar a patogénese do CO seria afetando a proliferação celular, os rearranjos citoesqueléticos, a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e a inibição da apoptose celular (Karpinski, 2019). A bactéria *P. gingivalis*, por exemplo, age de forma anti-apoptótica por modulação e ativação de vias apoptóticas, bem como acelera a progressão do ciclo celular

através da fase S pela manipulação de ciclina CDK (quinase dependente de ciclina) e diminui o nível total do supressor tumoral p53 (Whitmore e Lamont, 2014).

Estudos de Nakhjiri et al 2001 mostraram que *P. gingivalis* pode, ainda, inibir a apoptose em células gengivais epiteliais por meio da modulação positiva da molécula anti-apoptótica Bcl-2 bem como pela ligação de ATP do receptor purienergético P2X7, que tem papel fundamental na promoção do crescimento celular, neovascularização, metástase e secreção de citocinas inflamatórias.

Dentre outros mecanismos importantes para a promoção tumoral, o trabalho de Inaba et al (2014) demonstrou que *P. Gingivalis* produz gengivases, uma cisteína proteinase capaz de ativar a pró-enzima MMP-9, causando degradação da estrutura da membrana basal, promovendo migração e invasão de células cancerígenas.

A infecção por *Fusobacterium nucleatum* modula diversas vias antiapoptóticas e tem importância no desenvolvimento de cancro devido a sua adesina FadA exclusiva que, por sua vez, liga-se à E-caderina nas células de carcinomas ativando citocinas pró-inflamatórias, oncogenes e estimula a proliferação de células cancerígenas (Rubinstein *et al.*, 2013).

Para além disso, as interações entre *F. nucleatum* e células epiteliais podem afetar o desenvolvimento do fenótipo oncogénico e possui mecanismos que ativam a secreção de metaloproteínases importantes na invasão de células cancerígenas e metástase (Uitto *et al.*, 2005).

Como terceiro mecanismo, é sabido que as bactérias produzem certas substâncias decorrentes de transformações químicas, sendo que, algumas dessas substâncias podem ser cancerígenas para o organismo humano (Karpinski, 2019). Algumas dessas substâncias que podem ter efeito carcinogénico incluem: espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio, compostos voláteis de enxofre e ácidos orgânicos (Mittal *et al.*, 2014).

A metabolização do álcool em acetaldeído por bactérias, tais como leveduras, também desempenha papel importante no desenvolvimento tumoral, tendo em conta que esta substância é indubitavelmente cancerígena. Estudos de Muto et al 2000, demonstraram que dentre as espécies bacterianas identificadas a partir da cavidade oral, o gênero *Neisseria*, quando cultivadas em meio contendo etanol *in vitro*, teve capacidade de produzir acetaldeído mais de 100 vezes

superior à produzida por qualquer outro género. Além disso, a ingestão de álcool influencia a composição bacteriana da microflora oral, resultando em uma proporção aumentada de *Neisseria*, que, embora geralmente não seja patogénica, esses achados sugerem que esse micróbio pode ser uma fonte regional de acetaldeído carcinogénico e, portanto, potencialmente desempenha um papel importante na carcinogénese relacionada ao álcool.

Algumas bactérias da cavidade oral, são consideradas peroxigénicas, tendo a capacidade de produzir peróxido de hidrogénio, tais como algumas do género *streptococcus* e *lactobacillus* por exemplo. A expressão aumentada de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio foram identificados em vários tipos de cancro, suportando, assim, a conexão entre radicais livres com infecção crónica e seu papel no desenvolvimento do cancro e sua progressão maligna (Hussain, Hofseth e Harris, 2003).

Certas bactérias orais, tais como *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* produzem compostos de enxofre voláteis, como o sulfeto de hidrogénio ( $H_2S$ ) que, mesmo em baixas concentrações, são tóxicos para os tecidos e desempenham um papel na infecção crónica oral (Milella, 2015). Quantidades aumentadas de  $H_2S$  afetam o crescimento tumoral e se espalham pela ativação da proliferação e migração e aumentam a angiogénese tumoral (Hellmich e Szabo, 2015).

O ácido láctico, produzido por certas bactérias orais do género *lactobacillus*, *lactococcus*, *streptococcus*, *bifidobacterium*, dentre outras, é capaz de reduzir o pH local na cavidade oral, gerando um microambiente local ácido e hipóxico favorável a metástase tumoral (Lunt, Chaudary e Hill, 2009)

### III. DISCUSSÃO

Há cada vez mais evidências sugerindo que a MO pode ter um papel no desenvolvimento do CO, sendo que o CCEO é a neoplasia mais frequente do epitélio da cavidade oral. A disbiose presente nas diversas infecções orais, aparentemente possui grande impacto nesta relação. O microambiente modificado e a quantidade aumentada de bactérias patogénicas favorecem que haja condições para o desenvolvimento tumoral e pode potencializar sua progressão e malignidade. Além disso, outros fatores de risco para o CO, como álcool e tabaco, podem atuar de forma a potencializar a ação carcinogénica das bactérias. Esta relação entre a MO e o processo neoplásico que poderá dever-se a diversos mecanismos, entre eles a ação das bactérias orais como causadoras de inflamação crónica, a sua atividade anti-apoptótica e produção de substâncias carcinogénicas parece ser o principal alvo dos estudos atuais.

Apesar dos diversos estudos publicados sobre esta relação entre a MO e o desenvolvimento de CO, este tema ainda levanta uma série de questões e surgem ainda algumas dificuldades para avaliá-lo com precisão. Muitas são as variáveis que devem ser cuidadosamente avaliadas em estudos deste género, pois podem impactar os resultados, tais como número de participantes, tecnologia utilizada, leituras filtradas por amostra, nível de detecção e localização geográfica do estudo. A MO é diversificada e muito heterogénica, dificultando a análise da informação disponível.

De acordo com a literatura consultada, as bactérias orais mais frequentemente observadas no CCEO são *Streptococcus sp.*, *Peptostreptococcus sp.*, *Prevotella sp.*, *Porphyromonas gingivalis* e *Capnocytophaga gingivalis*. A maioria dos autores investigou o CCEO por ser a forma mais comumente encontrada de CO, o que acarreta em dificuldade de encontrar artigos sobre outros tipos de CO.

Desta forma, apesar de ainda haver uma alta complexidade acerca do tema, a microbiota salivar pode ser um indicador diagnóstico de pacientes com CCEO em comparação com controlos.

Diversos estudos encontram relação positiva entre o MO e CO. Karpinski (2019), em sua revisão analisou 98 artigos que expuseram de que forma as bactérias orais direta ou indiretamente podem contribuir para o desenvolvimento de CO. O mais bem confirmado é o efeito carcinogénico dos periopatógenos orais: *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*. Outros que desempenham um papel essencial na cancerogénese parecem ser *Streptococcus sp.*,

*Peptostreptococcus sp.*, *Prevotella sp.* e *Capnocytophaga gingivalis*. No entanto, o autor sugere que mais pesquisas são necessárias para definir claramente bactérias bucais específicas como carcinogénicas.

Vários estudos relacionam a má higiene oral e a doença periodontal com aumento da disbiose oral. Por outro lado, cada um destes factores têm sido relacionados com o aparecimento de lesões orais, nomeadamente CO. Estes resultados sugerem que, estes factores, individualmente ou concomitantemente, podem proporcionar um ambiente favorável ao processo de carcinogénese.

Para além das questões acima referidas que dificultam a análise e comparação dos resultados publicados, há outro factor que dificulta o estudo da MO, o facto de ainda existir uma grande proporção de bactérias orais que não podem ser cultivadas em laboratório, ditas “incultiváveis”. A principal razão para esta incapacidade, está relacionada com a dificuldade em reproduzir as condições ambientais que esses microrganismos possuem *in vivo.*, nomeadamente nutrientes específicos, temperatura, pH precisos e interação com outros microrganismos de sua comunidade (Zhang *et al.*, 2018.). O desenvolvimento recente de novas tecnologias como a sequenciação de alto rendimento permitiu o uso de estratégias independentes da cultura, tem permitido o estudo mais aprofundado da composição dos ecossistemas microbianos na saúde humana (*The Human Microbiome Project Consortium*, 2012), nomeadamente destas estirpes tidas como difíceis de cultivar ou, “incultiváveis”, podendo desta forma potencializar a descoberta de novos táxones de grande interesse científico e que, possivelmente, estariam associados ao desenvolvimento de cancro bucal (Yang *et al.*, 2018).

Apesar do acima referido, as evidências que ligam a MO a diferentes tumores, nomeadamente o CO, são promissoras. Por outro lado, análises metatranscriptômicas e metabolómicas estão contribuindo significativamente para a compreensão da relação entre o metabolismo da MO e a saúde humana (García-Castillo *et al.*, 2016).

#### **IV. CONCLUSÃO**

A microbiota é uma parte importante da nossa cavidade oral. No entanto, quando esse ecossistema sensível fica desequilibrado essa microbiota pode provocar respostas importantes na patogénese do CO. Vários mecanismos foram especulados por diversos autores e, na sua maioria, as evidências apontam que de forma direta ou indireta as bactérias orais podem influenciar na patogénese do CO e servir como biomarcadores para detecção precoce destas neoplasias.

Embora mais estudos sejam necessários para analisar e comparar os resultados dos diversos estudos, os avanços moleculares e a monitorização e controlo adicional da MO, aumentarão nossa compreensão do papel da MO na carcinogénese e abrirão novas perspetivas para futuras modalidades terapêuticas e profiláticas.

Desta forma, o papel do médico dentista mostra-se fundamental na manutenção da homeostasia do ambiente bucal, encontrando meios para que a informação e métodos de prevenção obtenham máximo alcance.

## BIBLIOGRAFIA

- Aas, J. A. *et al.* (2005). Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity - *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), pp.5721–5732.
- Almstahl A. *et al.* (2003). Oral microbiota associated with hyposalivation of different origins - *Oral Microbiol. Immunol.* 18(1), pp.1–8.
- Avila, M., Ojcius, D. M., Yilmaz, Ö. (2009). The Oral Microbiota: Living with a Permanent Guest - *DNA and Cell Biology*, 28(8), pp.405–411.
- Awano, S. *et al.* (2008). Oral Health and Mortality Risk from Pneumonia in the Elderly - *Journal of Dental Research*, 87(4), pp.334–339.
- Beck, J. D., Offenbacher, S. (2005). Systemic Effects of Periodontitis: Epidemiology of Periodontal Disease and Cardiovascular Disease - *Journal of Periodontology*, 76(11), pp.2089–2100.
- Carmi, Y. *et al.* (2013). The role of IL-1 in the early tumor cell-induced angiogenic response. – *Journal of Immunology*, 190(7), pp.3500–3509.
- Chang, CC. *et al.* (2015). Metabolic syndrome and health-related behaviours associated with pre-oral cancerous lesions among adults aged 20-80 years in Yunlin County, Taiwan: a cross-sectional study – *BMJ Open*, 5(12), pp.1-7.
- Costalonga, M., Herzberg, M. C. (2014). The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries - *Immunology Letters*, 162(2), pp.22–38.
- Crielaard, W. *et al.* (2011). Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health - *BMC Medical Genomics*, 4(1), pp.1-13.
- Dewhirst, F. E. *et al.* (2010). The Human Oral Microbiome - *Journal of Bacteriology*, 192(19), pp.5002–5017.

- Dhotre, S. *et al.* (2018). Assessment of periodontitis and its role in viridans streptococcal bacteremia and infective endocarditis. *Indian Heart Journal*, 70(2), pp.225–232.
- Farrell, J. J. *et al.* (2011). Variations of oral microbiota are associated with pancreatic diseases including pancreatic cancer - *Gut*, 61(4), pp.582–588.
- García-Castillo, V. *et al.* (2016). Microbiota dysbiosis: a new piece in the understanding of the carcinogenesis puzzle. *Journal of Medical Microbiology*. 65(12), pp.1347–1362.
- Goutzaris, L. *et al.* (2007). Diabetes may increase risk for oral cancer through the insulin receptor substrate-1 and focal adhesion kinase pathway – *Oral Oncology*, 43(2), pp.165-173.
- Haura, E.B, Turkson, J, Jove, R. (2005). Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer - *Nature Clinical Practice. Oncology*, 2(6), pp.315–324.
- Hellmich, M. R., Szabo, C. (2015). Hydrogen Sulfide and Cancer - *Handbook of Experimental Pharmacology*, 230, pp.233–241.
- Hooper, S. J. *et al.* (2006). Viable Bacteria Present within Oral Squamous Cell Carcinoma Tissue – *Journal of Clinical Microbiology*, 44(5), pp.1719–1725.
- Hooper, S. J. *et al.* (2007). A molecular analysis of the bacteria present within oral squamous cell carcinoma - *Journal of Medical Microbiology* 56(12), pp.1651–1659.
- Hou, L.T. *et al.* (2003). Interleukin-1, clinical parameters and matched cellular-histopathologic changes of biopsied gingival tissue from periodontitis patients. *Journal of Periodontal Research*, 38(3), pp.247–254.
- Hussain, S.P., Hofseth, L.J., Harris, C.C. (2003). Radical causes of cancer - *Nature Reviews of Cancer* 3(4), pp.276–285.
- Inaba, H. *et al.* (2014). *Porphyromonas gingivalis* promotes invasion of oral squamous cell carcinoma through induction of proMMP9 and its activation - *Cellular Microbiology*, 16(1), pp.131–145.
- Joshiyura, K. J. *et al.* (2002). Periodontal Disease, Tooth Loss, and Incidence of Ischemic Stroke - *Stroke*, 34(1), pp.47–52

- Karpinski, TM. (2019). Role of oral microbiota in cancer development – *Microorganisms*, 7(20), pp.1-14.
- Kipanyula, M. J. *et al.* (2013). Signaling pathways bridging microbial-triggered inflammation and câncer - *Cellular Signalling*, 25(2), pp.403–416.
- Krishnan, K., Chen, T., Paster, B. (2016). A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease - *Oral Diseases*, 23(3), pp.276–286.
- Le Bars, P. *et al.* (2017). The oral cavity microbiota: between health, oral disease, and cancers of the aerodigestive tract - *Canadian Journal of Microbiology*, 63(6), pp.475–492.
- Lee, W.-H. *et al.* (2017). Bacterial alterations in salivary microbiota and their association in oral cancer - *Scientific Reports*, 7(1), pp.1-11.
- Lunt, S.J., Chaudary, N., Hill, R.P. (2009). The tumor microenvironment and metastatic disease – *Clinical and Experimental Metastasis*, 26, 19–34.
- Mager, D. L. *et al.*(2003). Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces - *Journal of Clinical Periodontology*, 30(7), pp.644–654.
- Mager, D. L. *et al.* (2005). The salivary microbiota as a diagnostic indicator of oral cancer: A descriptive, non-randomized study of cancer-free and oral squamous cell carcinoma subjects - *Journal of Translational Medicine*, 3(1), pp.1-8.
- Mantovani, A. *et al.* (2008). Cancer-related inflammation – *Nature*, 454(7203), pp.433-444.
- Marsh, P. D. (2000). Role of the Oral Microflora in Health - *Microbial Ecology in Health and Disease*, 12(3), pp.130–137.
- Mascitti, M. *et al.* (2019). Beyond head and neck cancer: the relationship between oral microbiota and tumour development in distant organs – *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(232), pp1-8.
- Meurman, J. H., Uittamo, J. (2008). Oral micro-organisms in the etiology of câncer - *Acta Odontologica Scandinavica*, 66(6), pp.321–326.

- Milella, L. (2015). The negative effects of volatile sulphur compounds – *Journal of Veterinary Dentistry*, 32(2), pp.99–102
- Mittal, M. *et al.* (2014). Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury - *Antioxidants and Redox Signaling* , 20(7), pp.1126–1167.
- Muto, M. *et al.* (2000) Acetaldehyde production by non-pathogenic Neisseria in human oral microflora: implications for carcinogenesis in upper aerodigestive tract – *International Journal of Cancer*, 88(3), pp.342-50.
- Nakhjiri, S.F. *et al.* (2001). Inhibition of epithelial cell apoptosis by Porphyromonas gingivalis - *FEMS Microbiology Letters*, 200(2), pp.145–149.
- Nagy, K. N. *et al.* (1998). The microflora associated with human oral carcinomas - *Oral Oncology*, 34(4), pp.304-8.
- Palmer Jr, R. J. (2013). Composition and development of oral bacterial communities - *Periodontology 2000*, 64(1), pp.20–39.
- Paster, B. J. *et al.* (2001). Bacterial Diversity in Human Subgingival Plaque - *Journal of Bacteriology*, 183(12), pp.3770–3783.
- Petersen, C., Round, J. L. (2014). Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease - *Cellular Microbiology*, 16(7), pp.1024–1033.
- Pushalkar, S. *et al.* (2012). Comparison of oral microbiota in tumor and non-tumor tissues of patients with oral squamous cell carcinoma - *BMC Microbiology*, 12(1), pp1-15.
- Robledo-Sierra, J. *et al.* (2019). World Workshop on Oral Medicine VII: Targeting the oral microbiome Part 2: Current knowledge on malignant and potentially malignant oral disorders - *Oral Diseases*, 25(1), pp.28–48.
- Rubinstein, M.R. *et al.* (2013). Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/b-catenin signaling via its FadA adhesion - *Cell Host and Microbe*, 14(2), pp.195–206

Sakamoto, H. *et al.* (1999). Isolation of bacteria from cervical lymph nodes in patients with oral cancer - *Archives of Oral Biology*, 44(10), pp.789–793.

Saman, DM. (2012). A review of the epidemiology of oral and pharyngeal carcinoma: update - *Head & Neck Oncology* 4(1), pp.1-7.

Schwabe, R. F., Jobin, C. (2013). The microbiome and câncer - *Nature Reviews Cancer*, 13(11), pp.800–812.

Segata, N. *et al.* (2012). Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples - *Genome Biology*, 13(6), pp.1-18.

Su, H. *et al.* (2015). Differential roles of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide and Escherichia coli lipopolysaccharide in maturation and antigen-presenting functions of dendritic cells – *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19(13), pp.2482-92.

Syrjänen, J. (1990). Vascular diseases and oral infections - *Journal of Clinical Periodontology*, 17, pp.497–500.

Szkaradkiewicz, A. K., Karpiński, T. M. (2013). Microbiology of chronic periodontitis - *Journal of Biology and Earth Sciences*, 3(1), pp.14-20.

Szlosarek, P, Charles, K.A, Balkwill, F.R. (2006) Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter - *European Journal of Cancer*, 42(6), pp.745–750.

The Human Microbiome Project Consortium (2012). A framework for human microbiome research - *Nature*, 486(7402), pp.215–221.

Uitto, V.J. *et al.* (2005). Fusobacterium nucleatum increases collagenase 3 production and migration of epithelial cells – *Infection and Immunity*, 73(2), pp.1171–1179.

Wade, W. G. (2013). The oral microbiome in health and disease - *Pharmacological Research*, 69(1), pp.137–143.

Wang, F.M. *et al.* (2005). SHP-2 promoting migration and metastasis of MCF-7 with loss of E-

cadherin, dephosphorylation of FAK and secretion of MMP-9 induced by IL-1beta in vivo and in vitro - *Breast Cancer Research and Treatment*, 89(1) pp.5–14.

Wang, L., Ganly, I. (2014). The Oral Microbiome and Oral Cancer - *Clinics in Laboratory Medicine*, 34(4), pp.711–719.

Whitmore, S.E, Lamont, R.J. (2014). Oral bacteria and cancer - *Plos Pathogens*, 10(3), pp.1-3.

Wong, S.H.M. *et al.* (2018). E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications - *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 121, pp.11–22.

Yan, B. *et al.* (2006). Tumor necrosis factor-alpha is a potent endogenous mutagen that promotes cellular transformation - *Cancer Research*, 66(24), pp.11565–11570.

Yang, S.-F. *et al.* (2018). Compositional and functional variations of oral microbiota associated with the mutational changes in oral cancer - *Oral Oncology*, 77, pp.1–8.

Zhang, Y. *et al.* (2018). Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 99, pp.883–893.

Zhang, X. *et al.* (2015). The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment - *Nature Medicine*, 21(8), pp.895–905.