

Caracterización transcriptómica de bacterias relacionadas con eubiosis y disbiosis en pacientes con y sin carcinoma escamocelular oral

Alveiro Erira^{1,*}, Fredy Gamboa², Ángel Cid-Arregui³, Fabian Tobar-Tosse⁴, Dabeiba A. García⁵

Resumen

Objetivo. Caracterizar la expresión génica de 40 especies bacterianas compatibles con procesos de eubiosis y disbiosis en pacientes con y sin OSCC. Material y Método. Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal en muestras de placa y saliva de 10 pacientes con OSCC y 10 sin OSCC con géneros y edades similares, mínimo 4 dientes en boca. ARN total fue extraído y secuenciado mediante HiSeq™ 2500 de Illumina. Se analizaron secuencias con herramientas bioinformáticas (trimmomatic, SortMeRNA, BMTagger, RNA-Seq, bowtie2 y kraken2) y bases de datos (PATRIC, CARD, VICTORS). Resultados. El grupo de eubiosis *S. macedonicus*, *S. lutetiensis*, *S. infantarius*, *S. parauberis*, *L. helveticus*, *T. intermedia*, *S. novella* y *E. asburiae* expresaron 169 genes, y el grupo de disbiosis *L. pneumophila*, *M. hominis*, *M. conjunctivae*, *G. vaginalis*, *C. canimorsus*, *P. stuartii* expresaron 76 genes, la actividad transcripcional se relacionó con metabolismo de carbohidratos, nucleótidos, aminoácidos y energía, que a su vez se asoció con resistencia a antibióticos, factores de virulencia, blancos de medicamentos y transporte. Conclusión. La actividad transcripcional de *S. macedonicus*, *S. infantarius*, *S. lutetiensis*, *S. pasteurianus*, *S. parauberis*, *C. violaceum* y *S. novella* se asocia con procesos de eubiosis y *T. intermedia* y *P. stuartii* con procesos de disbiosis.

Palabras clave: Carcinoma escamocelular oral, transcriptoma, Eubiosis, Disbiosis.

Transcriptomic characterization of bacteria related to eubiosis and dysbiosis in patients with and without oral squamous cell carcinoma

Abstract

Objective. Characterize the gene expression of 40 bacterial species compatible with eubiosis and dysbiosis processes in patients with and without OSCC. Material and method. A descriptive cross-sectional study was carried out on plaque and saliva samples from 10 patients with OSCC and 10 without OSCC with similar genders and ages, minimum of 4 teeth in the mouth. Total RNA was extracted and sequenced using Illumina HiSeq™ 2500. Sequences were analyzed with bioinformatic tools (trimmomatic, SortMeRNA, BMTagger, RNA-Seq, bowtie2, and kraken2) and databases (PATRIC, CARD, VICTORS). Results. The eubiosis group *S. macedonicus*, *S. lutetiensis*, *S. infantarius*, *S. parauberis*, *L. helveticus*, *T. intermedia*, *S. novella*, and *E. asburiae* expressed 169 genes, and the dysbiosis group *L. pneumophila*, *M. hominis*, *M. conjunctivae*, *G. vaginalis*, *C. canimorsus*, *P. stuartii* expressed 76 genes, transcriptional activity was related to the metabolism of carbohydrates, nucleotides, amino acids and energy, which in turn was associated with resistance to antibiotics, factors of virulence, drug targets and transport. Conclusion. The transcriptional activity of *S. macedonicus*, *S. infantarius*, *S. lutetiensis*, *S. pasteurianus*, *S. parauberis*, *C. violaceum*, and *S. novella* is associated with processes of eubiosis and *T. intermedia* and *P. stuartii* with processes of dysbiosis.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma, Transcriptome, Eubiosis, Dysbiosis.

Introducción

El papel que juega el microbioma bacteriano en cavidad oral y su posible asociación con procesos de carcinogénesis es en la actualidad un tema de intensa investigación. En este sentido, se ha descrito que la microbiota en eubiosis es importante en la función normal de los tejidos en el hospedero, mientras

que en los estados de disbiosis podrían conducir a procesos patológicos¹. Los avances en nuevas técnicas de secuenciación han permitido avanzar en el conocimiento de los cambios que se dan en la composición y función de las comunidades bacterianas, lo que ha permitido comprender que factores como la edad, género, estado de salud, pH y nutrientes en los ecosistemas de cavidad oral ejercen un gran impacto en la micro-

1 Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana y Facultad de Odontología, Universidad Cooperativa de Colombia. Bogotá D.C., Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-1509-5631>
2 Departamento de Microbiología (Facultad de Ciencias) y Centro de Investigaciones Odontológicas (Facultad de Odontología), Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-2847-9837>
3 Cancer Research Center (DKFZ), Targeted Tumor Vaccines, Heidelberg, Germany. <https://orcid.org/0000-0003-1433-2922>
4 Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Pontificia Universidad Javeriana, Cali, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-5334-4286>
5 Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Ponti-

ficia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-0770-9138>

* Autor para correspondencia:
Correo electrónico: htupaz@javeriana.edu.co

Recibido: 26/11/2021; Aceptado: 02/06/2022

Cómo citar este artículo: A. Erira *et al.* Caracterización transcriptómica de bacterias relacionadas con eubiosis y disbiosis en pacientes con y sin carcinoma escamocelular oral. *Infectio* 2022; 26(4): 425-434

biota indígena y patógena^{2,3}. Aunque los estudios genómicos taxonómicos han permitido avanzar en la descripción y composición del microbioma bacteriano, en el caso del Carcinoma Oral de Células Escamosas (OSCC), sigue siendo necesario determinar la actividad transcripcional metabólica y de factores de virulencia del bacterioma, ya que podrían relacionarse con mecanismos de control y transformación celular eucariota⁴. En la actualidad no se conocen claramente los mecanismos por los cuales algunas bacterias podrían asociarse con OSCC⁵. Aunque, se ha avanzado en estudios de transcriptomas en patologías de cavidad oral como enfermedad periodontal⁶ y caries⁷, en OSCC los estudios transcripcionales son escasos⁸. En este sentido es importante realizar estudios comparativos de comunidades bacterianas presentes en ambientes sanos (eubiosis) y ambientes afectados (disbiosis)^{9,10}.

Los autores del presente trabajo realizaron un estudio¹¹, que caracterizó y describió el bacterioma mediante análisis de metagenómica, en microambientes orales de pacientes con y sin OSCC, que condujo a proponer un grupo de bacterias compatibles con procesos de eubiosis y disbiosis. Con el fin de seguir avanzando en la comprensión de la relación que se da entre bacterias y cáncer oral, en el presente estudio se caracterizó mediante análisis transcriptómico 40 especies bacterianas previamente propuestas como compatibles con procesos de eubiosis y disbiosis en pacientes con y sin OSCC, comparando los procesos biológicos, las vías metabólicas, la expresión génica, así como el potencial patogénico de las bacterias de los dos grupos de estudio.

Materiales y métodos

Población de estudio

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal en muestras de placa y saliva provenientes de 10 pacientes con OSCC y 10 personas sin OSCC que presentaran por lo menos 4 dientes en boca, con géneros y edades similares. El estudio se centró sobre 40 especies bacterianas perfiladas, previamente mediante análisis metagenómico¹¹ de las cuales 30 se asociaron a estados de eubiosis y 10 a estados de disbiosis (Figura 1).

Extracción del ARN total

Se tomaron 500 microlitros de cada una de las muestras de placa dental y saliva, luego se realizó dilución en buffer de lisis y homogenización mediante filtración y tecnología enzimática con el sistema MasterPure™ RNA Purification Kit de Epicentre. La cuantificación del ARN se realizó por fluorometría usando Quant IT RNA Assay Kit® (Invitrogen, Carlsbad, CA) y evaluación de integridad mediante TapeStation RNA ScreenTape (Agilent Technologies). Para la construcción de bibliotecas, se seleccionaron preparaciones de ARN de alta calidad, con un RIN superior a 7,0.

Secuenciación del ARN total

La secuenciación del ARN total se realizó mediante la plataforma HiSeq™ 2500 (Illumina, San Diego, CA). Brevemente, el ARN total se sometió a agotamiento de ARN ribosómico con el kit

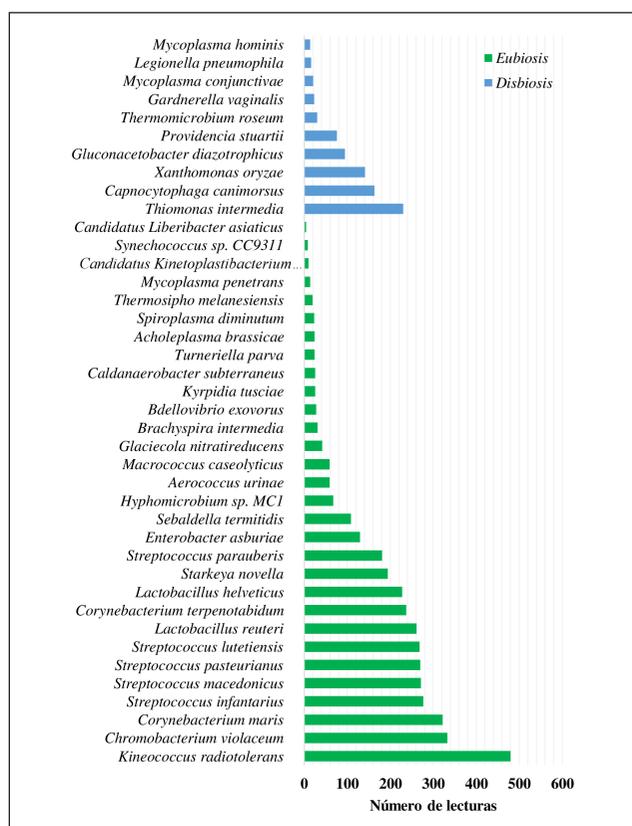


Figura 1. Abundancia relativa en número de lecturas de acuerdo con el análisis transcriptómico de especies bacterianas asociadas a estados de eubiosis y disbiosis en OSCC.

de eliminación ARNr Ribo-Zero Gold (Illumina, San Diego, CA) y seguidamente el ARN restante se fragmentó utilizando cationes divalentes a temperatura elevada. Los fragmentos de ARN obtenidos se transcribieron en ADNc de primera hebra utilizando la transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA) y cebadores aleatorios, seguido por la síntesis de la segunda hebra mediante ADN polimerasa I y RNasa H. Los fragmentos de ADNc se sometieron a un proceso de reparación final, adición de una base "A" y la unión de los adaptadores de indexación. Los productos se purificaron y enriquecieron mediante PCR para crear la biblioteca de ADNc; posteriormente se construyeron bibliotecas de ARN-seq con el kit de preparación SMARTer Low Input Library v2 (Clontech, Mountain View, CA). La calidad de las bibliotecas se evaluó utilizando Tape Station D1000 Screen Tape (Agilent Technologies) y se realizó la secuenciación para generar lecturas de extremo emparejado.

Análisis bioinformático del transcriptoma

Las lecturas se limpiaron mediante trimmomatic V 0.39, los rRNA fueron filtrados con SortMeRNA V 2.1 y los RNA mapeados con genoma humano fueron removidos con BMTagger. El ensamble de las lecturas se realizó con Trinity RNA-Seq, que incluye los paquetes bowtie2 (Alineamiento), jellyfish (Cuento de k-mers), salmon (Cuantificación de transcritos), y samtools (manejo de formatos). Las asignaciones taxonómicas del metatranscriptoma se realizaron con kraken2 y los transcritos fueron agrupados por género y especie. Los

transcritos de especie fueron mapeados a los genomas referencia de cada una de las 40 especies, mediante alineamiento BLAST entre los genomas de referencia y los grupos definidos obtenidos por kraken.

Finalmente, los transcritos fueron anotados mediante asociación fenotípica y enriquecimiento funcional dentro de la plataforma PATRIC (Pathosystems Resource Integration Center), que incluyó la integración de las bases de datos CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database), VICTORS (Virulence Factors database), TCBD (Transporter classification Database) y TTD (Therapeutic Target Database). Las categorías identificadas fueron correlacionadas entre las bacterias de eubiosis y disbiosis.

Análisis estadístico

Un e-value $\leq 1e-10$ fue configurado en kraken para la selección y agrupación de los transcritos de las 40 especies, posteriormente un análisis de correlación de Pearson, Complete linkage y análisis de distancia de Manhattan fue realizado para la correlación de los transcritos en el grupo de bacterias asociadas a eubiosis y disbiosis, finalmente un análisis de chi cuadrado χ^2 , $p < 0.05$ fue realizado para hacer comparaciones inter e intragrupo.

Resultados

Transcritos y procesos biológicos.

En la figura 1 se presenta el número de lecturas obtenidas del transcriptoma de las 40 especies en estudio. Las bacterias asociadas a estados de eubiosis como *Kineococcus radiotolerans*, *Chromobacterium violaceum*, *Corynebacterium maris*, *Streptococcus infantarius*, *Streptococcus macedonicus*, *Streptococcus pasteurianus*, *Streptococcus lutetiensis*, *Lactobacillus reuteri*, *Corynebacterium terpenotabidum* y *Lactobacillus helveticus* presentaron un número de lecturas >200 . De las bacterias asociadas a disbiosis solo *Thiomonas intermedia* presentó lecturas >200 (Figura 1).

En la figura 2 se presentan los procesos biológicos de mayor actividad; los más activos en las bacterias asociadas a estados de eubiosis fueron: procesamiento de proteínas (15%), síntesis de proteínas (14%), biogénesis de ribosomas (10%), respuesta al estrés, defensa y virulencia (9%), resistencia a antibióticos y compuestos tóxicos (5%) y metabolismo (5%). Otros 72 procesos menores representaron el 42%, con frecuencias menores al 4%. En las bacterias asociadas a estados de disbiosis los procesos se distribuyeron de manera diferente y los más activos fueron: procesamiento de proteínas y síntesis de proteínas cada uno con 8%, energía y la sintetasa aminoacil-RNA cada uno con 7%, respuesta al estrés, defensa y virulencia, y generación de metabolitos y precursores de energía cada uno con 6%. Otros 68 procesos menores representaron el 58%, con frecuencias menores al 4%. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de bacterias solo para el proceso de biogénesis de ribosomas ($p=0,005$), que fue más activo en las bacterias eubióticas.

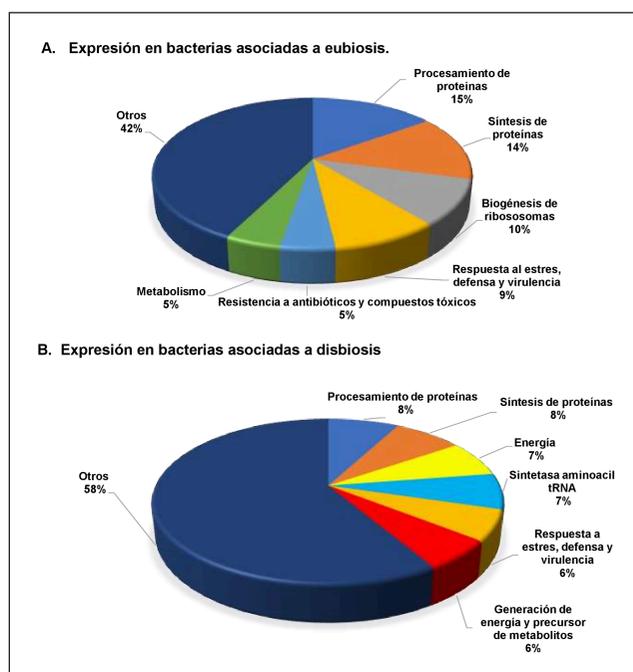


Figura 2. Sistemas biológicos activos en bacterias asociadas a eubiosis y disbiosis. Diferencias significativas se observaron en el proceso de biogénesis de ribosomas ($p=0,005$), de mayor actividad en bacterias eubióticas.

Vías metabólicas de mayor actividad

En el grupo de bacterias asociadas a estados de eubiosis (Figura 3A) las vías más activas fueron metabolismo de carbohidratos, nucleótidos, aminoácidos y energía, principalmente en *C. terpenotabidum*, *C. maris*, *C. violaceum*, *K. radiotolerans*, *Hyphomicrobium sp MC1*, *S. lutetiensis*, *S. infantarius*, *S. macedonicus*, *S. pasteurianus*, *L. reuteri*, *Streptococcus parauberis*, *Enterobacter asburiae*, *Starkeya novella*, *L. helveticus* y *Sebaldella termitidis*. Adicionalmente se observó que el metabolismo y biosíntesis de glucanos estuvo muy activo en *C. maris*, la biosíntesis de metabolitos secundarios en *C. terpenotabidum*, *C. maris*, *K. radiotolerans* y *S. macedonicus*, el metabolismo de lípidos se encontró activo en *C. terpenotabidum*, *C. maris*, *C. violaceum* y *S. infantarius*. Por otro lado, el metabolismo y degradación de xenobióticos se encontró elevado en *C. terpenotabidum*, *C. maris*, *K. radiotolerans*, *Acholeplasma brassicae*, *S. lutetiensis*, *S. infantarius*, *S. parauberis* y *L. helveticus*. El proceso de traducción estuvo muy activo en *C. terpenotabidum*, *C. maris*, *C. violaceum*, *K. radiotolerans*, *S. lutetiensis*, *S. infantarius*, *S. macedonicus*, *S. pasteurianus*, *S. parauberis* y *L. helveticus*, y el metabolismo de cofactores y vitaminas estuvo activo en *C. terpenotabidum*, *C. maris*, *C. violaceum*, *K. radiotolerans*, *S. lutetiensis*, *S. infantarius*, *S. pasteurianus* y *S. novella*.

En el grupo de bacterias disbióticas se encontró que las vías con mayor actividad fueron metabolismo de nucleótidos, aminoácidos, energía y carbohidratos, expresadas principalmente por *T. intermedia*, *Xanthomonas oryzae*, *Capnocytophaga canimorsus*, *Providencia stuartii* y *Gluconacetobacter diazotrophicus*. La traducción se presentó principalmente en *T. intermedia*, *X. oryzae*, *C. canimorsus* y *G. diazotrophicus*.

El metabolismo de cofactores y vitaminas se presentó con mayor actividad en *T. intermedia*, *C. canimorsus* y *G. diazotrophicus* (Figura 3B). Las bacterias disbióticas presentaron mayor actividad en las vías metabólicas de carbohidratos, aminoácidos y energía en comparación con el grupo eubiótico ($p < 0,05$).

Perfil de expresión génica

La figura 4 muestra la expresión génica mayor al 10% y 20% de las bacterias eubióticas y disbióticas respectivamente. Las bacterias eubioticas expresaron 169 genes en total. El 90% de las bacterias expresaron el gen del factor de elongación de la traducción Tu (principalmente *E. asburiae*), el 83% expresaron la subunidad beta de la ARN polimerasa dirigida por ADN (destaca *S. lutetiensis*), el 77% expresaron factor de elongación G (principalmente *S. macedonicus*), el 53% expresaron la subunidad A de la DNA girasa (principalmente *S. pasteurianus*), el 47% expresaron la proteína ribosomal SSU S12p (S23e) en donde destacó *C. terpenotabidum* y el 43% expresaron la subunidad B de la DNA girasa (principalmente *E. asburiae*) y la isoleucyl RNAt sintetasa (principalmente *S. macedonicus*) (Figuras 4A y 5A). Las bacterias destacadas presentaron un número de lecturas > 100 (Figuras 5A).

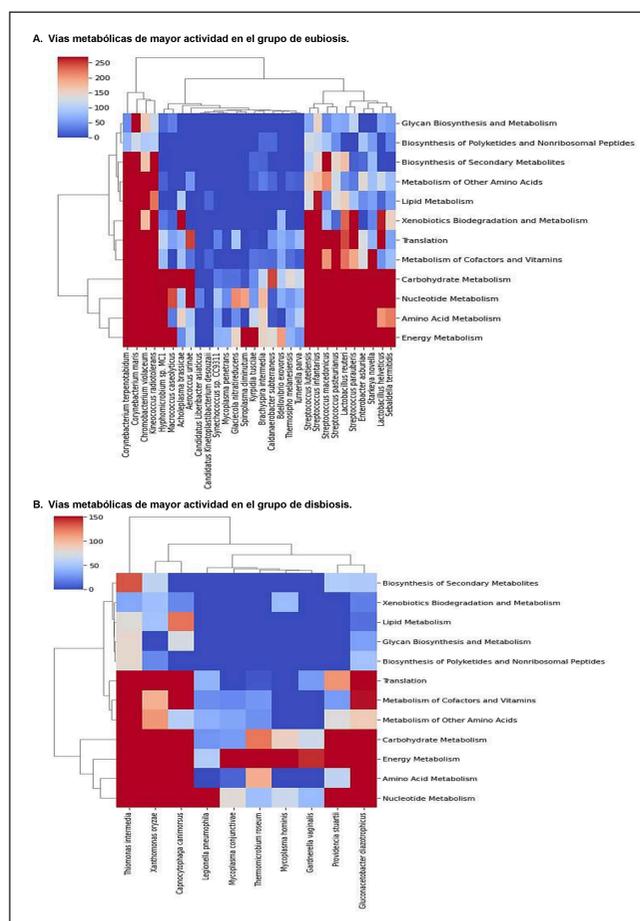


Figura 3. Vías metabólicamente activas en bacterias relacionadas con estados de eubiosis y disbiosis. El grupo de bacterias disbióticas presentó diferencias significativas en el metabolismo de carbohidratos, aminoácidos y energía en comparación con el grupo eubiótico ($p < 0,05$).

El grupo de bacterias asociadas a estados de disbiosis expresaron 76 genes en total. El 90% de ellas expresaron el factor de elongación de la traducción Tu (principalmente *P. stuartii*), el 80% expresaron la Subunidad beta de la ARN polimerasa dirigida por ADN y el factor de elongación de la traducción G (destaca *X. oryzae* y *Mycoplasma hominis*, respectivamente), el 60% expresaron la cadena beta de la ATP sintasa y destaca *G. diazotrophicus*. El 40% expresaron la Subunidad B de la ADN girasa, la poliribonucleotido nucleotidil transferasa y la cadena alfa de la ADN sintasa, se destacan respectivamente *G. diazotrophicus*, *T. intermedia* y *P. stuartii* (Figuras 4B y 5B). Las bacterias destacadas presentaron un número de lecturas entre 50 y 350 (Figura 5B).

Adicionalmente otro grupo de bacterias asociadas a eubiosis y disbiosis expresaron una variedad de genes que podrían ser de gran importancia en la regulación de estados saludables y patológicos (Tabla 1).

T. intermedia fue la única bacteria que expresó el gen del componente de ATPasa del pili tipo IV (T4P) y *P. stuartii* expresó de forma exclusiva genes como la proteína reguladora de la resistencia a la tetraciclina TetR y Proteína chaperona DnaK.

Mecanismos patogénicos de los genes expresados por bacterias asociadas a estados eubioticos y disbioticos.

Para comprender mejor la función de los genes descritos y relación con procesos asociados a patogénesis se realizó un análisis en la plataforma PATRIC con enfoque en cuatro mecanismos patogénicos (resistencia a antibióticos, factores de virulencia, blancos de medicamentos y transporte) (Figuras 6A y 6B). De acuerdo a estos mecanismos las bacterias eubióticas se distribuyeron en cuatro subgrupos: el primero compuesto por *E. asburiae*, *C. violaceum*, *S. macedonicus*, *S. pasteurianus*, *S. lutetiensis*, *S. infantarius* y *S. parauberis* que presentaron alta expresión génica para los cuatro mecanismos analizados; el segundo subgrupo se conformó con *L. helveticus*, *Macrococcus caseolyticus*, *Thermosiphon melanesiensis*, *A. brassicae*, *L. reuteri*, *Brachyspira intermedia*, *Turneriella parva*, *S. termitidis*, *Spiroplasma diminutum* y *C. terpenotabidum* presentó alta expresión de genes relacionados con resistencia a antibióticos; el tercer subgrupo con *Hyphomicrobium sp MC1*, *Aerococcus urinae* y *S. novella* mostraron un incremento en la expresión de genes relacionados a factores de virulencia y resistencia a antibióticos y el cuarto subgrupo estuvo compuesto por *Bdellovibrio exovor*, *Mycoplasma penetrans*, *Candidatus Kinetoplastibacterium desouzaii*, *Synechococcus sp. CC9311*, *Kyrpidia tusciae*, *Caldanaerobacter subterraneus* y *Candidatus Liberibacter asiaticus* mostraron una baja expresión génica para los cuatro mecanismos analizados (Figura 6A).

En las bacterias disbióticas se conformaron dos subgrupos, el primero constituido por *Legionella pneumophila*, *M. hominis*, *C. canimorsus*, *Mycoplasma conjunctivae* y *Gardnerella vaginalis*, que mostraron alta expresión de genes relacionados con resistencia a antibióticos; y el segundo con *P. stuartii*, *X.*

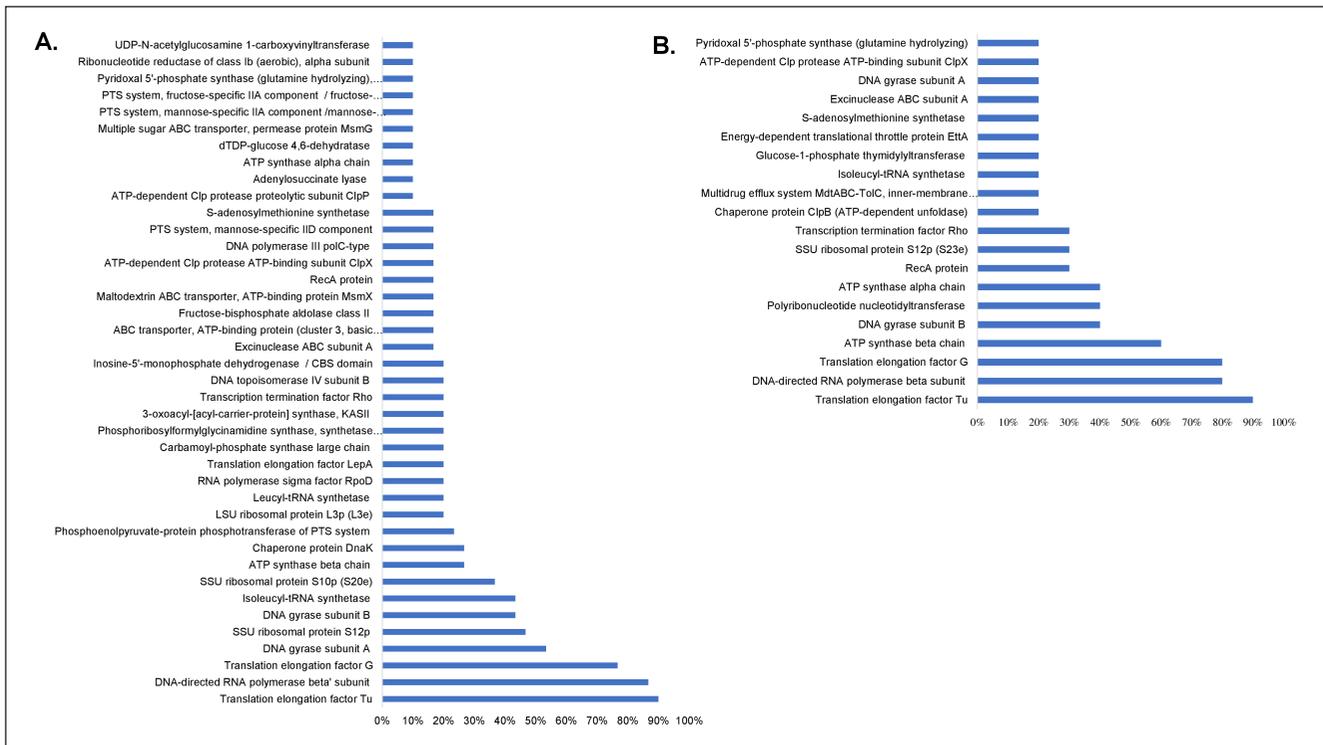


Figura 4. Perfil de genes expresados en bacterias asociadas a eubiosis y disbiosis. A. Expresión génica en bacterias de eubiosis. B. Expresión génica en bacterias de disbiosis.

orizae, *T. intermedia* y *G. diazotrophicus* mostraron una alta expresión de genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia. *Thermomicrobium roseum* fue la única especie que presentó una baja expresión de los genes relacionados con los 4 mecanismos estudiados (Figura 6B).

Discusión

Describir la microbiota de la cavidad oral y su posible relación con el desarrollo de OSCC es un tema de gran interés para la comunidad científica^{12,13}, ya que podría relacionarse directamente el inicio y progresión del OSCC⁸. En los últimos años el desarrollo e implementación de técnicas de secuenciación de alto rendimiento para genomas completos, ha permitido avanzar en el estudio de microbiomas y en la identificación de bacterias a nivel de especie en diferentes procesos patológicos¹⁴. En este sentido varios estudios han descrito diferentes tipos de *Phyla* bacterianos como *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* y *Actinobacteria* con mayor frecuencia en pacientes con carcinoma escamocelular oral¹⁵, carcinoma escamocelular de esófago¹⁶, carcinoma escamocelular de cabeza y cuello¹⁷, lesiones precursoras epiteliales (displasias, hiperplasia, hiperqueratosis), tejido tumoral^{18,19} y tejidos contralaterales sanos de paciente con cáncer oral¹⁹. Otros estudios han identificado con mayor frecuencia y abundancia bacterias como *Saccharibacteria Spirochaetes*, *Tenericutes*, *Cyanobacteria*, *Synergistetes*, *Abconditabacteria*, *Thermi*, *Gracilibacteria*, *Chloroflexi*, *Armatimonadetes*, *Omnitrophica* y *Verrumicrobiota* en saliva de pacientes con carcinoma escamocelular orofaríngeo^{20,21}, y esófago de personas sanas¹⁹.

Aunque los estudios a nivel de transcriptoma son limitados en cavidad oral, se ha visto un gran avance en patologías de como enfermedad periodontal⁶ y caries⁷, sin embargo, en OSCC los estudios transcriptómicos son escasos.

Por lo tanto, sigue siendo necesario determinar la actividad transcripcional de especies bacterianas que podrían estar involucrados en el control y transformación celular⁴, más aún cuando la homeostasis en la que conviven las bacterias en los diferentes nichos ecológicos podría verse afectada, lo que a su vez puede traducirse en enfermedad²². Las enfermedades se pueden generar por una disbiosis bacteriana, debido a que el número de simbiontes beneficiosos para la función normal de los tejidos disminuyen y a su vez aumentan los patógenos²³, lo que a su vez podría promover liberación de mediadores de la inflamación y provocar mutagénesis, proliferación celular descontrolada, angiogénesis, modificaciones epigenéticas, degeneración celular y en algunos casos cáncer⁹. En este sentido se hace necesario realizar estudios comparativos de comunidades bacterianas presentes en ambientes sanos (eubiosis) y ambientes afectados (disbiosis)²³. Previamente publicamos un perfil de especies bacterianas compatible con procesos de eubiosis y disbiosis¹¹, y en el presente estudio describimos la actividad transcripcional de este perfil bacteriano.

En el análisis transcriptómico se describieron los procesos biológicos, vías metabólicas, perfiles de expresión génica y mecanismos patogénicos de 40 especies bacterianas compatibles con procesos de eubiosis y disbiosis. Los hallazgos

señalan que las bacterias asociadas a estados de eubiosis expresaron altos niveles de ARN mensajero en cabeza de las especies *S. macedonicus*, *S. lutetiensis*, *S. infantarius*, *S. parauberis*, *L. helveticus*, *T. intermedia*, *S. novella* y *E. asburiae*. En el caso de estas especies de *Streptococcus* no han sido reportadas previamente en condiciones saludables, sin embargo, otras especies como *S. mitis*, *S. taxon 070 y 058*, *S. sanguinis*, *S. australis* y *S. cristatus* se han identificado con mayor frecuencia en individuos sanos en comparación con individuos con OSCC^{11,24,25}. *S. sanguinis* también se ha encontrado con mayor frecuencia en placa dental de niños sin caries en relación con niños con caries. *S. oralis* y *S. salivarius* se han descrito con mayor frecuencia en placa y saliva de individuos sanos^{26,27,15}. Otros estudios han observado que *S. sanguinis* y *S. mitis* constituyen entre el 60 y 80% de los colonizadores primarios en superficies dentales limpias y se han considerado de gran importancia en individuos sanos²⁸. Se ha sugerido que la producción de bacteriocinas por parte de *S. dentisani* y *S. salivarius* son capaces de inhibir el crecimiento de especies cariogénicas como *S. mutans* y *S. sobrinus*²⁴. *S. salivarius* se ha propuesto como un probiótico con capacidad de proteger de candidiasis²⁸. *S. mitis*, *S. oralis* y *S. sanguinis* pueden inhibir la colonización y virulencia en mucosa oral *Candida albicans*²⁹. *S. gordonii* y *S. intermedius* producen un péptido estimulante de competencia y un péptido inductor sigma X con capacidad de promover la competencia entre bacterias y regular el quorum sensing³⁰. Por lo tanto *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus*, *S. dentisani* y *S. salivarius* han sido propuestos como posibles biomarcadores de procesos saludables y podrían ser de gran importancia en la prevención de enfermedades infecciosas²⁴⁻³⁰. En este sentido,

nuestros resultados nos permiten sugerir que las bacterias, *S. macedonicus*, *S. infantarius*, *S. lutetiensis*, *S. pasteurianus* y *S. parauberis* asociadas a eubiosis podrían conferir beneficios saludables, básicamente porque *S. macedonicus*, *S. lutetiensis* y *S. infantarius*, expresaron genes, como el de la proteína similar a ClpE, (proteasa de Clp dependiente de ATP) un importante regulador de factores de virulencia como el factor de señal difusible, polisacáridos extracelulares, síntesis de flagelos y múltiresistencia a fármacos. Sin embargo, se necesitan realizar más estudios para confirmar su papel en estados saludables y determinar su contribución en el control de bacterias patogénicas.

L. reuteri sintetiza la bacteriocina reuterina, que le da ventaja competitiva contra bacterias periodontopatógenas y cariogénicas, algunas cepas de *Lactobacillus* pueden combatir a bacterias cariogénicas como *S. mitis* mediante diversos mecanismos³¹. Estudios en cáncer cervical han descrito que *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* o *L. jensenii* podrían ser benéficas³² impedir la adherencia de bacterias patógenas por el ácido láctico producido, bacteriocinas, exopolisacáridos, polisacáridos fosforilados y peptidoglicanos que pueden inhibir la proliferación de tumores en ratones³³. Estas bacterias también producen peróxido de hidrógeno que podrían eliminar bacterias patógenas. Algunos *Lactobacillus* han sido de gran utilidad en los tratamientos de cáncer por su sistema proteolítico, sistema de transporte y peptidasas intracelulares³⁴. En el presente estudio *L. helveticus* y *L. reuteri* expresaron altos niveles de transcritos de genes como factor de elongación de traslación Tu, factor de elongación de traslación G, subunidad beta de la ARN polimerasa dirigida por ADN,

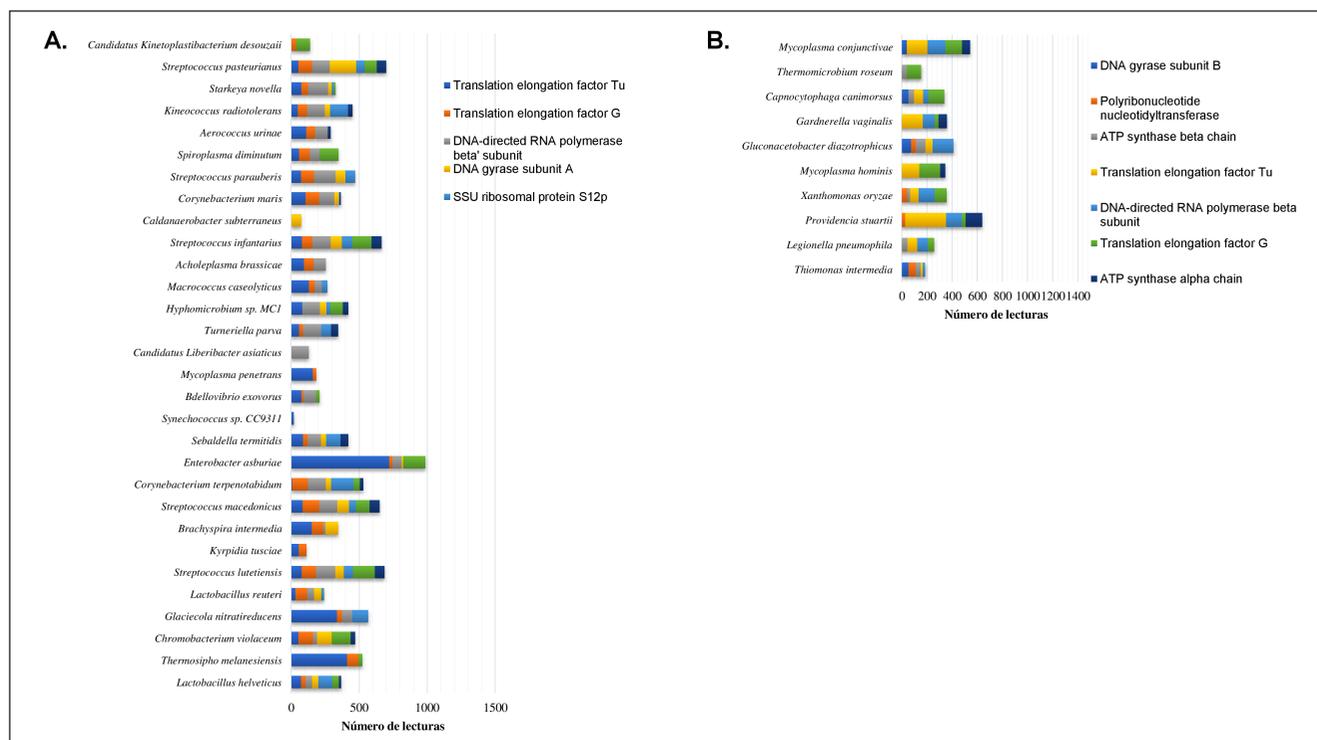


Figura 5. Genes diferencialmente expresados por las bacterias eubióticas y disbióticas. A. Número de lecturas de los genes diferencialmente expresados por las bacterias eubióticas. B. Número de lecturas de los genes diferencialmente expresados por las bacterias disbióticas

Tabla 1. Genes expresados únicamente por bacterias asociadas a eubiosis y disbiosis. Se muestra el nombre y la función de los genes expresados exclusivamente por bacterias del grupo de eubiosis y disbiosis, números representan el número de lecturas de cada gen

| Nombre del gen | Función | Bacterias asociadas a Eubiosis | | | | | | | | | Bacterias asociadas a Disbiosis | |
|---|--|----------------------------------|------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------|----------------------------------|-------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| | | <i>Chromobacterium violaceum</i> | <i>Lactobacillus reuteri</i> | <i>Streptococcus lutetiensis</i> | <i>Streptococcus macedonicus</i> | <i>Streptococcus infantarius</i> | <i>Streptococcus parauberis</i> | <i>Aerococcus urinae</i> | <i>Kineococcus radiotolerans</i> | <i>Starkeya novella</i> | <i>Thiomonas intermedia</i> | <i>Providencia stuartii</i> |
| Proteína similar a ClpE | Regula la producción de factores de virulencia activando o reprimiendo la expresión de un gran conjunto de genes en la vía del factor de señal difusible (DSF). Incluye genes implicados en la síntesis de polisacáridos extracelulares (EPS), síntesis de flagelos, metabolismo de proteínas y ácidos grasos, resistencia a múltiples fármacos, captación de hierro o genes que codifican enzimas extracelulares, componentes de la membrana y algunos factores de transcripción. | | | 14 | 65 | 36 | | | | | | |
| Proteína de exportación de macrólidos ATP union/permeasa (MacB) | Transportador relacionado con el sistema confiere resistencia contra macrólidos | 65 | | | | | | | | 35 | | |
| Proteína de la tríada de histidina estreptocócica | Constituyen una familia de proteínas expuestas a la superficie que existen en muchas especies de estreptococos patógenos, ayuda a <i>Streptococcus</i> a escapar fácilmente del reconocimiento por la inmunidad del huésped | | | | | | 41 | 49 | | | | |
| Parálogo de la proteína del gancho flagelar FlgE | Estos hallazgos sugieren que el gancho flagelar y FlgE son jugadores novedosos de las interacciones huésped-bacteriana a nivel inmunológico. Induce inflamación y citoquinas proinflamatorias | | | | | | | | 34 | | | |
| Antiportador de arginina/omitina (ArcD) | Supervivencia intracelular en células epiteliales | | 12 | | | | 21 | | | | | |
| Resistencia a la tetraciclina-Tet (M) | Resistencia a tetraciclinas | | | | 17 | 43 | | | | | | 38 |
| Proteína chaperona DnaK | Tiene como función ayudar al plegamiento de otras proteínas recién formadas | | | | | | | | | | | 35 |
| Componente de ATPasa del pili tipo IV (T4P) | Un importante factor de virulencia debido a su condición de apéndice que sale de la membrana externa, participando en procesos de adhesión a superficies tanto bióticas como abióticas, captación de DNA foráneo durante procesos conjugativos | | | | | | | | | | 31 | |

subunidad A de ADN girasa, relacionados con metabolismo de carbohidratos, aminoácidos, nucleótidos y energía, que a su vez podrían jugar un papel importante en la regulación de estados saludables.

En el presente estudio *S. novella* expresó altos niveles de transcritos de genes como Factor de elongación de traslación Tu, Factor de elongación de traslación G, Subunidad beta de la ARN polimerasa dirigida por ADN relacionados con metabolismo de carbohidratos, nucleótidos, aminoácidos, y energía que podrían estar asociados a la regulación de los estados saludables. En el momento actual *S. novella* está pobremente caracterizada, sin embargo, algunos análisis sugieren su importancia en biopelículas en humanos³⁵. En relación con *E. asburiae* se encontraron expresiones bajas de genes como el Factor de elongación de traslación Tu, Subunidad B de ADN girasa, asociados con procesos de metabolismo de carbohidratos, aminoácidos, nucleótidos y energía. Se ha descrito que produce *N*- acil homoserina lactona molécula de señalización auto inductora, de gran importancia en el quorum sensing, que podría estar implicada en la regulación de actividades fisiológicas importantes para su supervivencia y de

otros microorganismos entéricos³⁶. La prevalencia de Enterobacterias en cavidad oral de individuos sanos se relaciona con la presencia de éstas en el agua y alimentos entre otros³⁷.

En el grupo eubiótico *C. violaceum* se encontró con baja actividad transcripcional. Esta especie es frecuente en humanos y es de gran utilidad en el tratamiento del cáncer, posiblemente por la actividad de una proteína reguladora del quórum sensing llamada violaceína, que inhibe significativamente la expresión de metaloproteinasas de la matriz mediada por citoquinas en una línea celular de cáncer de mama³⁸. Por otra parte, *C. terpenotabidum* y *C. maris*, expresaron altos niveles de genes como Factor de elongación de traducción G, proteína ribosómica SSU S12p y subunidad beta de la ARN polimerasa dirigida por ADN relacionados con metabolismo de carbohidratos, aminoácidos, nucleótido y energía. Aunque su papel en condiciones saludables no ha sido descrito, estas especies habitan diferentes nichos orales humanos³⁹. Algunas especies no identificadas del género *Corynebacterium* se han reportado disminuidas en tejidos sanos en comparación con tejidos afectados por liquen plano oral (<1%) y en tejidos tumorales de lengua y subrayan que la sobre expresión de

esta bacteria podría reducir el riesgo de carcinoma escamo-celular de cabeza y cuello⁴⁰. El resto de las especies del grupo eubiótico expresaron bajos niveles de ARN mensajero (<150 lecturas) que involucraron genes como Factor de elongación de traducción Tu, factor de elongación de traducción G, subunidad beta de ARN polimerasa dirigida por ADN y proteína ribosómica S12p de SSU.

Del grupo de especies asociadas a estados disbióticos, *L. pneumophila*, *M. hominis*, *M. conjunctivae*, *G. vaginalis*, *C. canimorsus*, *P. stuartii*, los análisis de transcriptoma mostraron que podrían estar relacionadas con estados patológicos. *L. pneumophila*, expresó bajos niveles de genes como cadena beta de ATP sintasa, factor de elongación de traducción Tu y subunidad beta de ARN polimerasa dirigida por ADN que se relacionaron principalmente con metabolismo de nucleótidos; Esta bacteria se encuentra en fuentes de agua y puede generar en el humano la enfermedad del legionario⁴¹. Hasta el momento este microorganismo no ha sido relacionado con ningún tipo de cáncer en seres humanos. *M. conjunctivae* y *M. hominis*, expresaron bajos niveles de genes como Factor de elongación de traducción G, factor de elongación de traducción Tu y subunidad beta de la ARN polimerasa dirigida por ADN que se relacionaron principalmente con metabolismo y energía. Llama la atención que en el grupo eubiótico se encontró a *M. penetrans* con actividad transcripcional reducida. Esta ambivalencia demuestra que pueden existir especies similares con actividades funcionales opuestas. Si bien *M. conjunctivae* no ha sido asociada a procesos carcinogénicos, otras especies de *Mycoplasma* se han relacionado con procesos carcinogénicos en personas positivas para Virus de Papiloma Humano y en pacientes con cáncer oral⁴².

Por otro lado, también se encontró a *G. vaginalis* con baja expresión de genes como Factor de elongación de traducción Tu y subunidad beta de la ARN polimerasa dirigida por ADN relacionados con metabolismo y energía. *G. vaginalis* causa vaginosis bacteriana en mujeres, debido a la alteración de la flora vaginal normal, aumento de pH > 4,5 y el agotamiento de las especies de *Lactobacillus*. *G. vaginalis* inicialmente se adhiere al tejido epitelial del hospedero mediante la vaginolisina, una citolisina dependiente de colesterol que promueve la formación de un poro membranar. Después de la adherencia de la bacteria, esta produce sustancias citotóxicas, induce la formación de biopelícula, promueve la producción de succinato, que incrementa la proliferación de bacterias y aminopeptidasas que son descarboxiladas a diaminas para su supervivencia⁴³. También se encontró a *C. canimorsus*, expresando altos niveles de genes como Factor de elongación de traducción Tu, subunidad beta de la ARN polimerasa dirigida por ADN y Factor de elongación de traducción G, relacionados con procesos de metabolismo de carbohidratos, aminoácidos, nucleótidos y energía. *C. canimorsus* es un bacilo comensal de cavidad oral y la evidencia científica es confusa en cuanto a su papel patogénico. Por un lado, se ha encontrado en abundancia en pacientes con gingivitis y halitosis, en alta prevalencia en pacientes con

carcinomas orales^{24,44}, mientras que otros reportes han relacionado a *Capnocytophaga* con buena salud bucal y ha sido propuesto como biomarcador bacteriano asociado a salud. Por otro lado, habría que tener en cuenta que algunas cepas de *Capnocytophaga* son resistentes a las cefalosporinas y/o fluoroquinolonas de tercera generación y podrían ser un reservorio de genes de resistencia que podría llevar al aumento de su patogenicidad.

P. stuartii expresó altos niveles de genes como Factor de elongación de traducción Tu y subunidad beta de la ARN polimerasa dirigida por ADN relacionados con metabolismo de carbohidratos, nucleótidos y energía. Llama la atención la expresión del gen de la Proteína reguladora de la resistencia a la tetraciclina TetR y Proteína chaperona DnaK, involucradas en procesos de resistencia y transformación celular. La capacidad de estas bacterias para adherirse e invadir las células del hospedero determina la especificidad de la patogénesis. Algunas cepas pueden ser resistentes a múltiples fármacos como gentamicina, cefalosporinas de primera generación y ampicilina. Se ha reportado que esta bacteria puede migrar desde el tracto urinario a otros órganos y producir infecciones⁴⁵. Otras especies bacterianas del grupo de disbio-

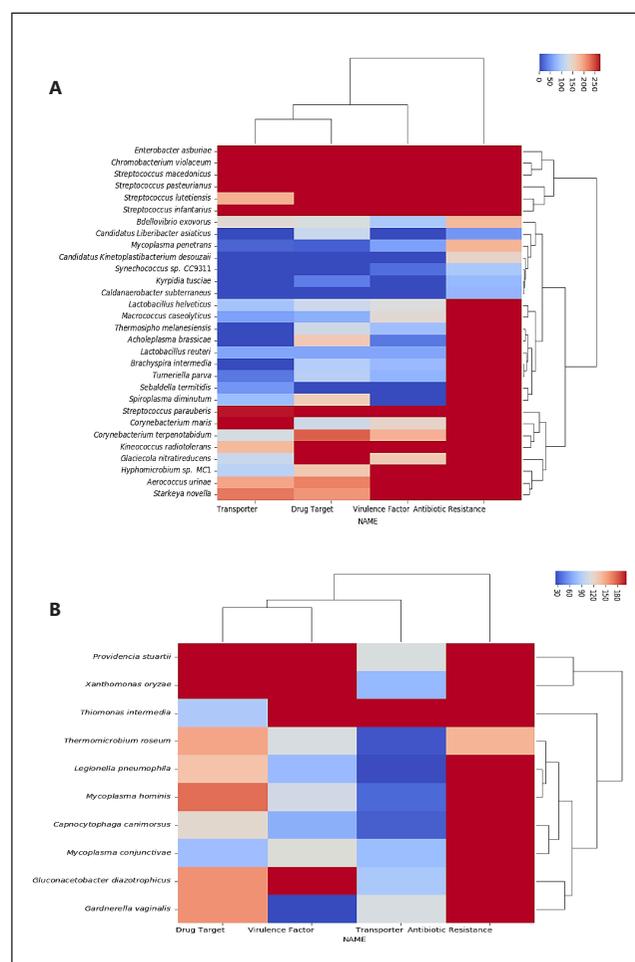


Figura 6. Potencial patogénico de los genes expresados por las bacterias objeto de estudio. A. Perfil de genes patogénicos en bacterias asociadas a eubiós. B. Perfil de genes patogénicos en bacterias asociadas a disbiosis.

sis como *X. orizae*, *T. intermedia* y *G. diazotrophicus* podrían estar implicados en patogénesis por la capacidad de regular el quorum sensing y la virulencia, resistencia a antibióticos y capacidad de secretar lisozimas para el control de otras bacterias respectivamente⁴⁵⁻⁴⁸

Conclusión

El análisis transcripcional permitió la caracterización de procesos biológicos, vías metabólicas, perfiles de expresión génica y mecanismos patogénicos de especies bacterianas asociadas con procesos de eubiosis como *S. macedonicus*, *S. infantarius*, *S. lutetiensis*, *S. pasteurianus*, *S. parauberis*, *C. violaceum* y *S. novella*; así como también de *T. intermedia* y *P. stuartii* asociada a estados de disbiosis que podrían ser de gran utilidad en el diagnóstico y pronóstico del OSCC.

Consideraciones éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que en este artículo no se hicieron experimentos con humanos o animales, El estudio fue aprobado por el comité de ética de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia con número de aprobación OD-0149.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que los datos tuvieron un manejo ético y confidencial de la información según las normas constitucionales y legales sobre protección de datos personales.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiación. La financiación del presente estudio estuvo a cargo de la Pontificia Universidad Javeriana sede Bogotá bajo los proyectos: Proyecto 1 "Correlación del microbioma bacteriano presente en placa dental, saliva y tejido tumoral de pacientes diagnosticados con carcinoma escamocelular oral" con número de identificación 6691; y Proyecto 2 "Análisis integrativo del microbioma y transcriptoma presente en placa dental, saliva y tejido tumoral en carcinoma oral y su relación con el metaboloma microbiano determinado en saliva" con número de identificación 7745.

Conflicto de intereses. Los autores declaran que no existe ningún tipo de conflicto de intereses.

Agradecimientos. Los autores manifiestan agradecimientos a la Pontificia Universidad Javeriana por la financiación del presente estudio y a la Pontificia Universidad Javeriana de Cali por la colaboración en la asesoría para el análisis de los datos.

Contribución de los autores. Conceptualización: Alveiro Erira, Fredy Gamboa, Adriana García. Curación de datos: Alveiro Erira, Fabian Tobar. Análisis formal: Alveiro Erira, Adriana García. Investigación: Alveiro Erira, Adriana García. Metodología: Alveiro Erira, Adriana García. Supervisión: Adriana García. Va-

lidación: Alveiro Erira, Fabian Tobar, Adriana García. Escritura borrador original: Alveiro Erira, Fredy Gamboa, Adriana García, Angel Cid. Redacción, revisión y edición: todos los autores.

Bibliografía

- Solbiati, J., & Frias-Lopez, J. Metatranscriptome of the Oral Microbiome in Health and Disease. *Jdent res.* 2018 97(5): 492-500. <https://doi.org/10.1177/0022034518761644>
- Langfeldt, D., Neuling, S.C., Heuer, W. et al. Composition of microbial oral biofilms during maturation in young healthy adults. *PLoS one.* 2014 9(2):87449. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087449>
- Benítez PA, Belda-Ferre, P., Simón-Soro, A. Microbiota diversity and gene expression dynamics in human oral biofilms. *BMC genomics.* 2014 15: 311. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-311>
- Benedetti, F., Cocchi, F., Latinovic, O.S. et al. Role of Mycoplasma Chaperone DnaK in Cellular Transformation. *Int J Mol Sci.* 2020 21(4):1311. <https://doi.org/10.3390/ijms21041311>
- Chattopadhyay, I., Verma, M., & Panda, M. Role of Oral Microbiome Signatures in Diagnosis and Prognosis of Oral Cancer. *Technol Cancer Res Treat.* 2019 1:18. <https://doi.org/10.1177/1533033819867354>
- Duran A.E., Chen, T., Teles, R., et al. Community-wide transcriptome of the oral microbiome in subjects with and without periodontitis. *The ISME journal.* 2014 8(8):1659-72. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.23>
- Tong X, Hou S, Ma M. et al. The integration of transcriptome-wide association study and mRNA expression profiling data to identify candidate genes and gene sets associated with dental caries. *Arch Oral Biol.* 2020 118:104863. doi: 10.1016/j.archoralbio.2020.104863
- Pushalkar, S., Ji, X., Li, Y. et al. Comparison of oral microbiota in tumor and non-tumor tissues of patients with oral squamous cell carcinoma. *BMC microbiology.* 2012 12:144. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-144>
- La Rosa, G., Gattuso, G., Pedullà, E. Association of oral dysbiosis with oral cancer development. *Oncol Lett.* 2020 19(4): 3045-58. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11441>
- Sathasivam HP, Kist R, Sloan P. et al. Predicting the clinical outcome of oral potentially malignant disorders using transcriptomic-based molecular pathology. *Br J Cancer.* 2021 125(3):413-21. doi: 10.1038/s41416-021-01411-z
- Erira A., García Robayo D.A., Chala A.I. et al. Bacteriome Identified by Next Generation Sequencing in Saliva, Dental Plaque and Tumor Tissue of Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma *TMicroJ.* 2021; 15: 26-35. DOI: 10.2174/1874285802115010098
- Patil S, Rao RS, Sanketh DS, Amrutha N. Microbial flora in oral diseases. *J Contemp Dent Pract.* 2013;14(6):1202-8. DOI: 10.5005/jp-journals-10024-1477
- Stasiewicz M, Karpiński TM. The oral microbiota and its role in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2021; 4:S1044-579 DOI: 10.1016/j.semcancer.2021.11.002
- Irfan M, Delgado RZR, Frias LJ. The Oral Microbiome and Cancer. *Front Immunol.* 2020;11:591088. DOI: 10.3389/fimmu.2020.591088
- Mager DL, Haffajee AD, Devlin PM, Norris CM, Posner MR, Goodson JM. The salivary microbiota as a diagnostic indicator of oral cancer: a descriptive, non-randomized study of cancer-free and oral squamous cell carcinoma subjects. *J Transl Med.* 2005;3:27. DOI: 10.1186/1479-5876-3-27
- Yang SF, Huang HD, Fan WL, Jong YJ, Chen MK, Huang CN, et al. Compositional and functional variations of oral microbiota associated with the mutational changes in oral cancer. *Oral Oncol.* 2018;77:1-8. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2017.12.005
- Wang H, Funchain P, Bebek G, Altemus J, Zhang H, Niazi F, et al. Microbiomic differences in tumor and paired-normal tissue in head and neck squamous cell carcinomas. *Genome Med.* 2017;9(1):14. DOI: 10.1186/s13073-017-0405-5
- Lee WH, Chen HM, Yang SF, Liang C, Peng CY, Lin FM, et al. Bacterial alterations in salivary microbiota and their association in oral cancer. *Sci Rep.* 2017;7(1):16540. DOI: 10.1038/s41598-017-16418-x
- Brian L. Schmidt JK, Aditi Bhattacharya, Bing Huey, Patricia M. Corby, Erica L. S. Queiroz, Kira Nightingale, A. Ross Kerr, Mark D. DeLacure, Ratna Veeramachaneni Adam B. Olshen, Donna G. Albertson. Changes in Abundance of Oral Microbiota Associated with Oral Cancer. *Plos One.* 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0098741
- Chen X, Winckler B, Lu M, Cheng H, Yuan Z, Yang Y, et al. Oral Microbiota and Risk for Esophageal Squamous Cell Carcinoma in a High-Risk Area of China. *PLoS One.* 2015;10(12):e0143603. DOI: 10.1371/journal.pone.0143603
- Chang AH, Parsonnet J. Role of bacteria in oncogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(4):837-57. DOI: 10.1128/CMR.00012-10

22. Le Bars P, Matamoros S, Montassier E, Le Vacon F, Potel G, Soueidan A, et al. The oral cavity microbiota: between health, oral disease, and cancers of the aerodigestive tract. *Can J Microbiol.* 2017;63(6):475-92. DOI: 10.1139/cjm-2016-0603
23. Roberts FA, Darveau RP. Microbial protection and virulence in periodontal tissue as a function of polymicrobial communities: symbiosis and dysbiosis. *Periodontol 2000.* 2015;69(1):18-27 DOI: 10.1111/prd.12087
24. López L.A., Camelo C.A., Ferrer, M.D. et al. Health-Associated Niche Inhabitants as Oral Probiotics: The Case of *Streptococcus dentisani*. *Front Microbiol.* 2017;8, 379. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00379>
25. Perera M, Al-Hebshi NN, Perera I. et al. Inflammatory Bacteriome and Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Dent Res.* 2019; 97(6):725-32. doi: 10.1177/0022034518767118.
26. Becker, M.R., Paster, B.J., Leys, E.J. et al; Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *Journal of clinical microbiology.* 2002; 40(3), 1001-09. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.3.1001-1009.2002>
27. Bik, E.M., Long, C.D., Armitage, G.C. et al. Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *The ISME journal.* 2010;4(8), 962-74. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.30>
28. Diaz, P. I., Xie, Z., Sobue, T. et al. A. Synergistic interaction between *Candida albicans* and commensal oral streptococci in a novel in vitro mucosal model. *Infection and immunity.* 2012;80(2), 620-32. <https://doi.org/10.1128/IAI.05896-11>
29. Vilchez R, Lemme A, Ballhausen B. et al. Streptococcus mutans inhibits *Candida albicans* hyphal formation by the fatty acid signaling molecule trans-2-decenoic acid (SDSF). *Chembiochem.* 2010;11(11):1552-62. doi: 10.1002/cbic.201000086.
30. Marsh PD, Zaura E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *J Clin Periodontol.* 2017; 18:S12-22. doi: 10.1111/jcpe.12679. PMID: 28266111.
31. Agrawal V, Kapoor S, Shah N. Role of "Live Microorganisms" (Probiotics) in Prevention of Caries: Going on the Natural Way Towards Oral Health. *Indian J Multidiscip Dent* 2012; 2(3): 491-96.
32. Smith, W. L., Hedges, S. R., Mordechai, E. et al. Cervical and vaginal flora specimens are highly concordant with respect to bacterial vaginosis-associated organisms and commensal *Lactobacillus* species in women of reproductive age. *Journal of clinical microbiology.* 2014; 52(8), 3078-81. <https://doi.org/10.1128/JCM.00795-14>
33. Lee, T.Y., Kim, Y.H., Lee, K.S. et al. Human papillomavirus type 16 E6-specific antitumor immunity is induced by oral administration of HPV16 E6-expressing *Lactobacillus casei* in C57BL/6 mice. *Cancer immunology, immunotherapy.* 2010;59(11), 1727-37. <https://doi.org/10.1007/s00262-010-0903-4>
34. Yang, X., Da, M., Zhang, W. et al. Role of *Lactobacillus* in cervical cancer. *Cancer management and research.* 2018;10, 1219-29. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S165228>
35. d'Errico, G., Aloj, V., Ventrino, V. et al. Methyl t-butyl ether-degrading bacteria for bioremediation and biocontrol purposes. *PLoS one.* 2020;15(2),e0228936. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228936>
36. Lau, Y. Y., Sulaiman, J., Chen, J. W. et al. Quorum sensing activity of *Enterobacter asburiae* isolated from lettuce leaves. *Sensors Basel, Switzerland.* 2013; 13(10), 14189-99. <https://doi.org/10.3390/s131014189>
37. Chinnasamy, A., Ramalingam, K., Chopra, P. et al. Chronic nail biting, orthodontic treatment and Enterobacteriaceae in the oral cavity. *Journal of clinical and experimental dentistry.* 2019; 11(12), e1157-62. <https://doi.org/10.4317/jced.56059>
38. Platt, D., Amara, S., Mehta, T. et al. Violacein inhibits matrix metalloproteinase mediated CXCR4 expression: potential anti-tumor effect in cancer invasion and metastasis. *Biochemical and biophysical research communications.* 2014; 455(1-2), 107-12. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.10.124>
39. Benabdelkader, S., Boxberger, M., Lo, C.I. et al. *Corynebacterium dentalis* sp. nov., a new bacterium isolated from dental plaque of a woman with periodontitis. *New microbes and new infections.* 2019; 33, 100625. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100625>
40. Mukherjee, P.K., Wang, H., Retuerto, M. et al Bacteriome and mycobiome associations in oral tongue cancer. *Oncotarget.* 2017;8(57), 97273-89. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21921>
41. Schumacher, A., Kocharian, A., Koch et al. Fatal Case of Legionnaires' Disease After Home Exposure to *Legionella pneumophila* Serogroup 3.. *Morbidity and mortality weekly report.* 2020; 69(8), 207-11. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6908a2>
42. Zhao, H., Chu, M., Huang, Z. et al. Variations in oral microbiota associated with oral cancer. *Scientific reports.* 2017; 7(1), 11773. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11779-9>
43. Zúñiga, A., & Tobar-Tosse, F. Vaginosis bacteriana por *Gardnerella vaginalis*: Nuevas enseñanzas desde la ecología molecular. *Salutem Scientia Spiritus.* 2015; 1(1).
44. Takahashi Y, Park J, Hosomi K. et al. Analysis of oral microbiota in Japanese oral cancer patients using 16S rRNA sequencing. *J Oral Biosci.* 2019;61(2):120-28. doi: 10.1016/j.job.2019.03.003.
45. Kurmasheva, N., Vorobiev, V., Sharipova, M. et al. The Potential Virulence Factors of *Providencia stuartii*: Motility, Adherence, and Invasion. *BioMed research international.* 2018; 35 89135. <https://doi.org/10.1155/2018/3589135>
46. Zhao Y, Qian G, Yin F. et al. Proteomic analysis of the regulatory function of DSF-dependent quorum sensing in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Microb Pathog.* 2011;50(1):48-55. doi: 10.1016/j.micpath.2010.09.002
47. Wang YN, Kai Y, Wang L. et al. Key internal factors leading to the variability in CO₂ fixation efficiency of different sulfur-oxidizing bacteria during autotrophic cultivation. *J Environ Manage.* 2020;271:110957. doi: 10.1016/j.jenvman.2020.110957
48. Bertalan, M., Albano, R., de Pádua, V. et al Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pa15. *BMC genomics.* 2009; 10, 450. doi.org/10.1186/1471-2164-10-450