



EGAS MONIZ SCHOOL
of HEALTH & SCIENCE

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO
EGAS MONIZ

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**Evolução da microbiota oral ao longo do tempo e suas
implicações na saúde oral contemporânea.**

Trabalho submetido por

Marie Laurence Valentine Tourtin

para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

julho de 2024



EGAS MONIZ SCHOOL
of HEALTH & SCIENCE

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO
EGAS MONIZ

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

Evolução da microbiota oral ao longo do tempo e suas implicações na saúde oral contemporânea.

Trabalho submetido por

Marie Laurence Valentine Tourtin

para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por

Prof. Doutora Helena Barroso

E coorientado por

Prof. Doutora Nathalie Antunes-Ferreira

julho de 2024

Agradecimento

Desejo expressar o meu agradecimento a Prof. Doutora Helena Barroso por aceitar orientar esta tese e pela constante disponibilidade que demonstrou ao longo da construção desta tese. Agradeço igualmente a Prof. Doutora Nathalie Antunes-Ferreira por o seu apoio.

Gostaria também de agradecer ao júri pelo tempo dedicado à avaliação do meu trabalho de final de curso.

J'ai une pensée particulière pour toutes les personnes qui m'ont permis d'arriver au bout de cette aventure. Ces années n'auraient pas été les mêmes sans vous qui avez accompagné mon chemin et avez participé à le rendre unique et inoubliable.

J'aimerais tout d'abord remercier mes parents qui ont toujours cru en moi et qui m'ont donné l'opportunité de faire ces études sans jamais rien demander en retour (à part le dentiste gratuit pour toutes les prochaines années).

A ma sœur, qui me supporte depuis 25 ans avec une patience sans limite. Merci de toujours être une oreille à l'écoute et de bon conseil.

A tous mes grands-parents et ma marraine, qui m'ont toujours encouragé à poursuivre mes rêves sans jamais me couper les ailes.

Je remercie aussi mes colocataires d'appartement Alexis Roméro et Gaspard Loutaty, sans qui la vie au Portugal n'aurait pas eu la même saveur. Merci pour tous ces beaux moments et tous ces rires.

Ces 5 ans m'ont aussi permis de rencontrer une toute nouvelle famille, aussi j'aimerais remercier tous ceux qui y ont participé : Alex (les 2), Axel, Capucine, Charlotte (les 2), Ema, Élise, Lola, Léna, Pierre, Romain.

Merci.

Resumo

A microbiota oral compreende várias centenas a milhares de diversas espécies microbianas. Estes microrganismos, que formam um complexo ecológico único, influenciam a nossa saúde e são particularmente responsáveis por patologias orais como a cárie dentária ou a doença periodontal.

Os fatores contemporâneos, como a dieta, por exemplo, desempenham um papel fundamental na composição da microbiota oral e na prevalência das doenças orais modernas. Em particular, é possível destacar o aumento de bactérias cariogênicas após a industrialização.

Através da paleomicrobiologia, que visa estudar fósseis bacterianos, é possível estudar hoje a microbiota oral antiga e observar a sua evolução. Pode-se contar com técnicas como a análise do ADN preservado no tártaro dentário, que segundo Weyrich e colaboradores, representa uma fonte significativa de informação sobre o comportamento e a saúde dos antigos hominídeos, mas também sobre a evolução.

Neste contexto, pretende-se realizar uma revisão narrativa que se baseará na análise e na partilha de artigos que abordam os diferentes elementos-chave do tema de estudo, publicados a partir de 2012. Serão utilizadas como base de dados as plataformas: Pubmed/Medline, Scielo, Google Académico, B-on, tendo como objetivo reunir artigos que correspondem aos critérios essenciais para a elaboração desta tese.

Através deste trabalho de pesquisa procurar-se-á destacar a evolução da microbiota oral ao longo do tempo entre populações antigas (desde o Paleolítico) e populações contemporâneas; mas também demonstrar a importância do seu envolvimento nas doenças orais atuais.

Palavras-chaves : Microbiota oral, Paleomicrobiota, Evolução, Doenças orais

Abstract

The oral microbiota comprises several hundred to thousands of diverse microbial species. These microorganisms, which form a unique ecological complex, influence our health and are particularly responsible for oral diseases such as tooth decay or periodontal disease.

However, it is known that contemporary factors, such as diet, for example, play a fundamental role in the composition of the oral microbiota and the prevalence of modern oral diseases. In particular, the increase in cariogenic bacteria after industrialization.

Through paleomicrobiology, which aims to study bacterial fossils, we can today study the ancient oral microbiota and observe its evolution. We can count on techniques such as the analysis of ADN preserved in dental tartar, which according to Weyrich and collaborators, represents a significant source of information about the behavior and health of ancient hominids, but also about microbial evolution.

In this context, the aim is to carry out a narrative review that will be based on the analysis and sharing of articles that address the different key elements of the study topic, published since 2012. The following platforms will be used as a database: Pubmed/Medline, Scielo, Google Scholar, B-on, aiming to bring together articles that correspond to the essential criteria for the preparation of this thesis.

Through this research work we will seek to highlight the evolution of the oral microbiota over time between ancient populations (since the Paleolithic) and contemporary populations; but also demonstrate the importance of its involvement in current oral diseases.

Keywords : Oral microbiota, Paleomicrobiota, Evolution, Oral diseases

Résumé

Le microbiote oral comprend plusieurs centaines, voire milliers d'espèces microbiennes diverses. Ces micro-organismes, qui forment un complexe écologique unique, influencent notre santé et sont particulièrement responsables de maladies bucco-dentaires telles que la carie dentaire ou les maladies parodontales.

Or, il est connu que des facteurs contemporains, comme l'alimentation par exemple, jouent un rôle fondamental dans la composition du microbiote buccal et la prévalence des maladies bucco-dentaires modernes. Par exemple il est possible de souligner l'augmentation des bactéries cariogènes après l'industrialisation.

Grâce à la paléomicrobiologie, qui vise à étudier les fossiles bactériens, on peut aujourd'hui étudier le microbiote oral ancien et observer son évolution. On peut compter sur des techniques telles que l'analyse de l'ADN conservé dans le tartre dentaire, qui selon Weyrich et collaborateurs, représente une source importante d'informations sur le comportement et la santé des hominidés anciens, mais aussi sur l'évolution microbienne.

Dans ce contexte, l'objectif est de réaliser une revue narrative qui s'appuiera sur l'analyse et le partage d'articles abordant les différents éléments clés du sujet d'étude, publiés depuis 2012. Les plateformes suivantes serviront de base de données : Pubmed /Medline, Scielo, Google Scholar, B-on, visant à rassembler des articles correspondant aux critères essentiels à la préparation de cette thèse.

A travers ce travail de recherche nous chercherons à mettre en évidence l'évolution du microbiote oral dans le temps entre populations anciennes (depuis le Paléolithique) et populations contemporaines ; mais démontrent également l'importance de son implication dans les maladies bucco-dentaires actuelles.

Mots-clés : Microbiote oral, Paléo-microbiote, Évolution, Maladies bucco-dentaires

Índice

<i>I. INTRODUÇÃO</i>	15
<i>II. DESENVOLVIMENTO</i>	19
1. Microbiota oral de populações antigas	19
1.1. Métodos de análise.....	19
1.1.1. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	20
1.1.2. 16S ARNr.....	22
1.1.3. Novas técnicas de sequenciação.....	23
1.2. Bactérias.....	26
1.2.1. Definição	26
1.2.2. Interação dente/tártaro/polpa.....	27
1.2.2.1. Composição do dente	27
1.2.2.2. O tártaro dentário na paleomicrobiologia.....	28
1.2.2.3. A polpa dentária em paleomicrobiologia.....	29
1.2.3. Composição bacteriana das populações passadas	30
1.3. Dieta Passada e Doenças Paleolíticas	34
1.3.1. Evolução da Dieta	34
1.3.1.1. Caçadores-coletores.....	34
1.3.1.2. Agricultura.....	35
1.3.2. Doenças Paleolíticas.....	36
1.3.2.1. Cárie dentária e Periodontite	36
2. Fatores contemporâneos e influência na microbiota oral	39
2.1. Evolução da dieta.....	39
2.1.1. O Ponto de Viragem da Revolução Industrial.....	39
2.1.2. Composição bacteriana oral contemporânea.....	41
2.2. Impacto dos medicamentos na microbiota oral	42
2.2.1. Uma sociedade que vive mais tempo	43
2.2.2. Uma sociedade mais ansiosa.....	43
2.2.3. Impacto na saúde oral.....	44
2.3. Tabaco e álcool	46

2.3.1. Definição	46
2.3.2. Impacto na saúde oral e na composição microbiana	47
3. Prevenção nas populações modernas.....	49
3.1. Modificação nas práticas de higiene oral.....	49
3.1.1. A escova de dentes	49
3.1.2. O fio dentário	51
3.2. Sensibilização à higiene oral.....	52
3.2.1. Educação dos jovens	52
3.2.2. Campanhas de sensibilização nas comunidades.....	53
3.3. Acesso a atendimento odontológico	53
3.3.1. Ajuda implementada	53
3.3.2. Novas estratégias para reduzir as barreiras	55
<i>III. CONCLUSÃO</i>	57
<i>IV. BIBLIOGRAFIA</i>	59

Índice de Figuras

Figure 1 Técnica de PCR	21
Figure 2 Electroforese em gel de agarose	22
Figure 3 Foto de eletroforese em gel de agarose.....	22
Figure 4 Etapas da tecnologia de NGS (adaptado de Francioli et al., 2021).....	25
Figure 5 Tamanho dos microrganismos	26
Figure 6 Anatomia do dente (adaptado de Nikita, 2016)	27
Figure 7 Fotos de Dente e Tártaro dentário antigo.....	29
Figure 8 Gráfico comparando a presença de bactérias patogénicas em diferentes amostras (modernas ou antigas) (adaptado de Rascovan et al., 2016)	30
Figure 9 Frequência (em %) da composição bacteriana de diferentes amostras ao longo do tempo (adaptado de Adler et al., 2013).	32
Figure 10 Composição bacteriana (ao nível do filo) da microbiota oral sobre amostras de neandertais e humanos modernos (adaptado de L. Weyrich et al., 2017).....	33
Figure 11 A cárie dentária (adaptado de Union Française pour la santé Bucco-Dentaire, 2021)	36
Figure 12 A doença periodontal (adaptado de Union Française pour la santé Bucco-Dentaire, 2017).....	37
Figure 13 Distribuição (em %) de S.mutans e P.gingivalis ao longo do tempo (adaptado de Adler et al., 2013).....	38
Figure 14 Distribuição (em %) de S.mutans e P.gingivalis segundo sexo (adaptado de Adler et al., 2013).....	39
Figure 15 Linha do tempo com momentos cruciais na evolução da microbiota oral.....	41
Figure 16 Diversidade filogenética da microbiota oral ao longo do tempo (adaptado de Adler et al., 2013).....	42
Figure 17 As diferentes opções terapêuticas para a disfunção salivar (adaptado de Łysik et al., 2019).....	46
Figure 18 Frequência de escovar os dentes (em em %) nos últimos 3 três anos (Ordem dos Médicos Dentistas, 2023).....	50
Figure 19 Frequência por dia/semana de escovar os dentes (em em %) nos últimos 3 três anos (Ordem dos Médicos Dentistas, 2023)	50

Figure 20 Frequência de uso do fio dental dentário (em%) nos últimos 3 três anos (Ordem dos Médicos Dentistas, 2023).	51
Figure 21 Comportamentos alimentares e impacto no pH oral (adaptado de Braeckvelt, 2022)	52
Figure 22 A influência da situação económica na saúde geral e oral (adaptado de Fiorillo, 2019)	54

Índice de Tabelas

Tableau 1 Resumo das técnicas de análise de ADN	25
Tableau 2 Presença ou ausência do microrganismos patogénicos na amostra.....	31

Índice de Siglas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

F. nucleatum: *Fusobacterium nucleatum*

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

NGS: Next-generation sequencing

NIH: National Library of Medicine

OMD: Ordem dos Médicos Dentistas

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

P.gingivalis: *Porphyromonas gingivalis*

S.mutans: *Streptococcus mutans*

SNS: Serviço Nacional de Saúde

T.denticola: *Treponema denticola*

16S ARNr: ARN ribossômico 16S

I. INTRODUÇÃO

O corpo humano é composto por bilhões de células, reunindo suas próprias células, bem como as dos microrganismos que vivem na pele, por exemplo. Essa microflora é composta principalmente por bactérias (Samaranayake et al., 2017), e a cavidade oral constitui o segundo microbioma mais abundante após o sistema intestinal (Verma et al., 2018).

A descoberta dos micróbios remonta ao século XVIII; Antonie Van Leeuwenhoek fez uma primeira observação através de um microscópio usando uma amostra de placa dentária e os designou como "Dierken", que se traduz como "pequenos objetos vivos" (Gao et al., 2018).

A aquisição da microflora oral ocorre ao longo do tempo. Ao nascer, a boca está quase estéril e é o contato com outros indivíduos, saliva ou mesmo o ambiente que permite estabelecer o complexo sistema que é o microbioma oral (Samaranayake et al., 2017). Como primeiro colonizador, podemos citar o *Streptococcus salivarius*, mas também outros colonizadores que chegam durante o primeiro ano de vida, como *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, entre outros (Deo et al., 2019). Esse conjunto dará origem à microflora residente do hospedeiro (Samaranayake et al., 2017).

Os micróbios instalam-se, particularmente, na superfície dura dos dentes ou nos tecidos moles (mucosa: língua, bochechas, gengivas, palato) da boca. A temperatura de 37°C e o pH estável (em torno de 6,5-7) da boca garantem o seu desenvolvimento. Esse conjunto microbiano então forma o que chamamos de biofilme (Deo et al., 2019).

O biofilme pode ser encontrado em vários lugares, seja no ambiente, na água ou mesmo em nosso corpo. Ele desempenha um papel crucial na medicina e interessa especialmente por sua presença na cavidade oral (Eick, 2021).

Quando o biofilme (supra o infra gengival) se acumula nos dentes sem ser removido a placa dentária irá formar-se, esta última induz um ambiente propício ao desenvolvimento de bactérias patogênicas e, por conseguinte, a doenças orais como a cárie, por exemplo. Essa placa dentária é um local de produção de ácido láctico e favorece a acidificação da cavidade oral. Essa acidificação é especialmente propícia ao desenvolvimento de bactérias acidogênicas, prejudicando o equilíbrio do meio e ameaçando a integridade dos dentes (Bowen, 2015).

Quando a placa dentária ainda mole não é removida, ela acumula-se e mineraliza-se em menos de duas semanas, resultando na formação do que se denomina de tártaro dentário (Radini et al., 2023). Assim, a estratégia mais eficaz para evitar a sua acumulação permanece sendo a escovagem regular dos dentes e uma higiene oral adequada (Arweiler & Netuschil, 2016).

O homem percorre a terra há vários milhões de anos, a sua evolução é escrita na história através de diferentes períodos, desde a sua primeira aparição no Paleolítico (há cerca de 3 milhões de anos) até os dias atuais. A compreensão da evolução humana sempre se baseou na descoberta e análise de ossos que rastreiam os vestígios do tempo e os antigos costumes (Alt et al., 2022).

No que diz respeito a este trabalho, é focado especialmente no estudo da cavidade oral do passado. Mas como determinar a composição biológica de um indivíduo antigo quando só temos ossos à disposição ?

Com a evolução das técnicas científicas, descobriu-se que ossos e dentes podem revelar uma variedade de informações e segredos sobre os hábitos de nossos ancestrais (Dagli et al., 2015). De fato, como já discutido acima, a placa dentária mineraliza-se com o tempo, e é esse estado de tártaro que interessa particularmente (Radini et al., 2023).

Quando o tártaro se forma, ele pode prender partículas de diferentes naturezas (por exemplo: restos de amido, detritos fúngicos ou estruturas bacterianas mineralizadas), mas também fornece valiosas informações biomoleculares, sobre proteínas, ADN, bactérias do microbioma oral humano e também a composição da saliva (Radini et al., 2023). Recentemente, foi demonstrado que o tártaro representa uma fonte abundante de informações e que preserva sua integridade ao longo do tempo, permitindo assim o estudo de um antigo microbioma oral humano (Warinner et al., 2015). Além disso, a polpa dentária também seria uma reserva de informações sobre antigos ADN microbianos (Dagli et al., 2015).

O estudo e a análise dos restos dos remanescentes humanos são comumente referidos como Bioarqueologia (Nikita, 2016).

No que diz respeito a este trabalho, o interesse está em elementos ainda menores chamados microfósseis (como os fósseis de bactérias), ou seja a Micropaleontologia. Será centrado especialmente num ramo desta última: a Paleomicrobiologia. Esta concentra-se

no estudo dos fósseis de bactérias e traça os vestígios de uma antiga microflora humana, mas também aborda o estudo da evolução humana, movimentos de migração e evolução bacteriana (Dagli et al., 2015).

Nos últimos anos, o campo da paleomicrobiologia desenvolveu-se graças aos avanços da ciência e às ferramentas disponíveis. Assim, através do estudo do tártaro dentário humano, em conjunto com as ferramentas modernas de sequenciação biomolecular, é possível ser cada vez mais precisos na escrita da história evolutiva e na ecologia dos micróbios associados ao homem e ao seu ambiente (Warinner et al., 2015).

Também seria interessante focar outro aspeto deste todo ecológico complexo: o impacto na saúde bucal. De fato, o microbioma oral está frequentemente associado às doenças orais mais conhecidas, como cáries ou doenças periodontais (Zhang et al., 2018).

Assim, neste trabalho, é abordada a evolução do microbioma oral humano ao longo do tempo, bem como a prevalência das doenças orais mais comuns nas populações contemporâneas. Poder-se-á questionar uma possível mudança na composição microbiana oral, relacionada com a evolução do ser humano através da modificação de seu ambiente e também de seus hábitos alimentares, por exemplo. Serão também abordados novos meios de prevenção. Para isso, serão utilizadas ferramentas representadas pela Paleomicrobiologia, bem como o tratamento e análise dos artigos que abordam todas as questões levantadas.

II. DESENVOLVIMENTO

Ao longo dos últimos anos, tem-se observado o desenvolvimento e a crescente precisão das técnicas de análise do ADN. Graças a essas novas fontes de conhecimento, bem como à recolha de informações sobre os primeiros seres humanos, hoje é possível rastrear os componentes bacterianos de um microbioma oral antigo. É importante destacar que existem muitas técnicas disponíveis, e este trabalho abordará apenas uma parte delas. Assim, como mencionado anteriormente, com a descoberta de microfósseis e as ferramentas disponíveis, é possível detetar vestígios de ADN bacteriano antigo (Dagli et al., 2015). Ao longo do trabalho procurar-se-á explicar as diferentes técnicas empregadas para extrair essas informações.

1. Microbiota oral de populações antigas

1.1. Métodos de análise

O estudo do microbioma oral passado fornece informações valiosas sobre o mundo antigo, incluindo mudanças na dieta, estilo de vida das populações, impacto no microbioma; permitindo observar correlações e diferenças. Serão utilizados, especialmente, os indicadores contidos no ADN, principalmente aqueles presentes no tártaro dentário e na polpa dentária (Dagli et al., 2015). Muitos estudos concentram-se especialmente no tártaro supra e subgingival (Adler et al., 2013).

Historicamente, o primeiro ADN descoberto fossilizado foi extraído dos músculos de uma espécie extinta semelhante à zebra (*Equus quagga*); logo depois, foi o primeiro ADN humano a ser descoberto numa amostra do músculo de uma múmia egípcia. Mais tarde, o ADN de um molar encontrado na caverna de Denisova (localizada na Sibéria) foi usado para reconstruir uma sequência completa do genoma de Neandertal (Dagli et al., 2015).

O ADN (ácido desoxirribonucleico) é uma molécula capaz de armazenar informações hereditárias. Esta é composta por duas longas cadeias de polinucleotídeos, que agrupam quatro tipos de nucleotídeos (adenina, citosina, guanina, timina), formando assim uma dupla hélice (Victor, 2012).

O tártaro dentário fossilizado guarda os ‘segredos’ de uma época passada, e para “fazê-lo falar”, foram desenvolvidas uma série de técnicas e etapas para analisar e decifrar o ADN que ele contém (Adler et al., 2013).

O maior desafio da Paleomicrobiologia é a quantidade de material recolhido da amostra. No entanto, graças ao avanço da ciência, os pesquisadores desenvolveram ferramentas para facilitar o estudo de substratos em pequenas quantidades, sendo a mais conhecida a PCR (Dagli et al., 2015).

1.1.1. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Introduzida em 1985, por Kary Mullins, que foi laureado com o Prémio Nobel por esta descoberta, tornou-se uma ferramenta indispensável na biologia molecular (Khehra et al., 2023). A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é uma técnica de replicação do ADN *in vitro*, que permite rapidamente fazer cópias de uma região específica do ADN. O princípio é amplificar um fragmento de ADN a partir de uma amostra complexa e escassa, com o objetivo de obter uma quantidade maior para uso futuro (Canene-Adams, 2013). A técnica de PCR consiste em três grandes fases: desnaturação do ADN, hibridação e alongamento, que se repetem em vários ciclos. O protocolo segue uma série de etapas: introdução da cadeia a ser replicada, adição dos "primers" (oligonucleótidos), hibridação com as bases nucleotídicas, alongamento/polimerização com a *Taq polimerase* que permite ligar as cadeias entre si, e finalmente o ADN replicado (figura 1). São necessários 20 a 40 ciclos como este para obter uma quantidade suficiente de amostra (Khehra et al., 2023).

Essa prática é amplamente utilizada no diagnóstico de doenças como o HIV, a COVID-19, e também na identificação de bactérias (Canene-Adams, 2013), (Dagli et al., 2015).

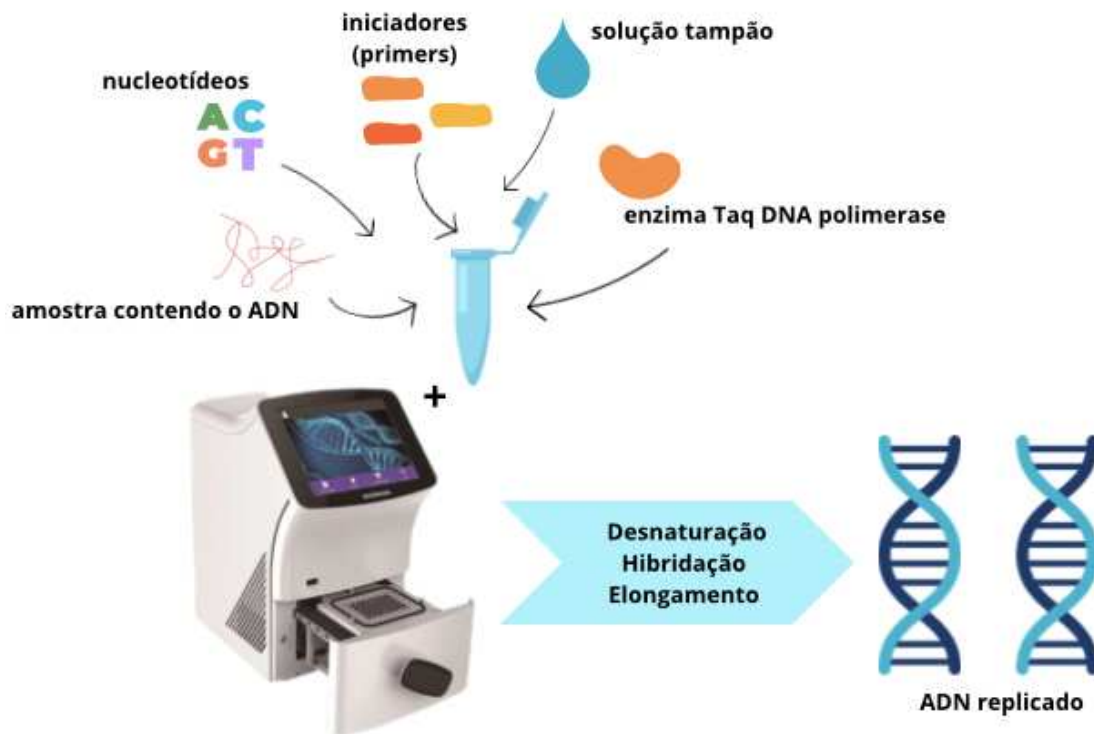


Figure 1 Técnica de PCR

Uma vez concluída a amplificação, a identificação pode ser efetuada por exemplo, por eletroforese em gel de agarose (Canene-Adams, 2013). Este método consiste em fazer migrar as moléculas dos filamentos de ADN selecionados com base na sua rapidez (relacionada com o tamanho e o peso) dentro de uma matriz de gel, sujeita a um campo elétrico (figura 2). Quando a migração estiver completa, é possível comparar a localização da amostra de ADN com bandas de tamanhos conhecidos (marcador de pesos moleculares) (figura 3). O gel permite ainda a purificação e análise dos fragmentos de ADN (Hanada, 2020).

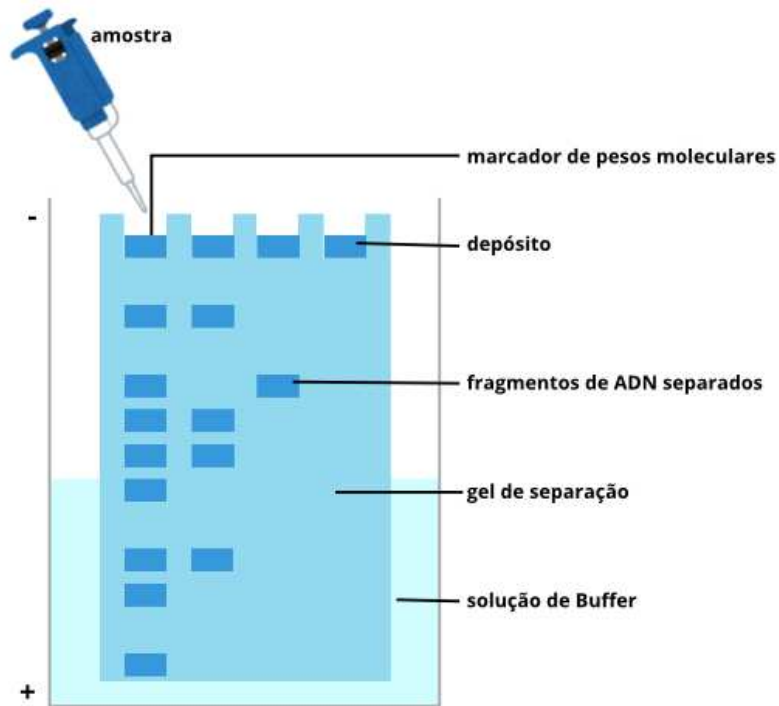


Figure 2 Electroforese em gel de agarose

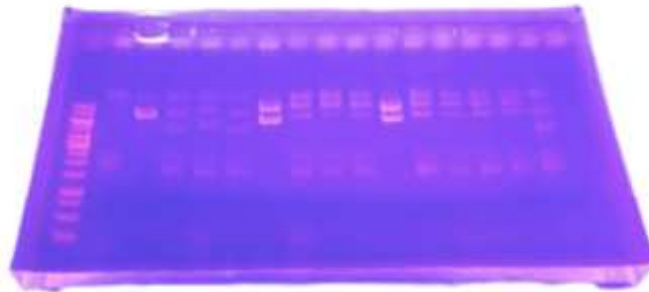


Figure 3 Foto de eletroforese em gel de agarose

1.1.2. 16S ARNr

O ARN (Ácido Ribonucleico) possui uma estrutura semelhante à do ADN. Ele representa a forma transcrita deste último. Existem três formas de ARN: ARN mensageiro, ARN de transferência e ARN ribossômico. O ARN mensageiro é um filamento complementar ao filamento de ADN, sintetizado através de uma enzima (ARN polimerase). Ele transporta a informação genética até ao citoplasma. Em seguida, vem o ARN de transferência, que permite a transferência para os ribossomas. E, finalmente, o ARN ribossômico, que é o

componente principal dos ribossomas (decodifica a informação do ARN mensageiro e sintetiza as proteínas) (Larousse, 2024).

Observado pela primeira vez na década de 1960 por Dubnau e colaboradores (Dagli et al., 2015) o 16S ARNr é um marcador taxonómico encontrado no ARN ribossómico de bactérias. Este gene, apresentando uma relativa estabilidade, tornou-se uma ferramenta central na identificação de diversas espécies microbianas, ajudando principalmente na classificação das bactérias em que está presente. Além disso, o gene 16S ARNr está amplamente documentado, com mais de 90000 sequências armazenadas no GenBank, por exemplo (Dagli et al., 2015).

O GenBank é um banco de dados mantido pelo NIH (National Library of Medicine), que cataloga e fornece acesso a um conjunto de sequências de ADN. O funcionamento desta organização é baseado numa colaboração internacional (DataBank of Japan, European Nucleotide Archive e GenBank National Center for Biotechnology Information). Os dados são atualizados regularmente e constituem uma das ferramentas na análise e comparação de ADN (GenBank Overview, 2013).

A sequençação do gene 16S ARNr representa uma ferramenta estatística suficientemente abrangente para ser relevante na identificação e comparação de estirpes bacterianas (Dagli et al., 2015).

Para estudar o microbioma oral antigo, a sequenciação do gene 16S ARNr é especialmente utilizado para identificar bactérias como *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) e *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) após a extração de ADN bacteriano de tártaro dentário antigo (Adler et al., 2013).

1.1.3. Novas técnicas de sequenciação

Nas últimas décadas, as tecnologias de NGS (Next-generation sequencing), têm sido aplicadas ao ADN antigo. Esta tecnologia relativamente recente abre novas perspectivas no estudo dos genomas antigos e baseia-se na análise das sequências de ADN e ARN. Ao contrário da sequenciação tradicional de Sanger por eletroforese capilar, que só pode analisar uma cadeia de ADN de cada vez, o NGS permite sequenciar múltiplos fragmentos de ADN simultaneamente, aumentando assim a quantidade de dados gerados (Yoshinaga et al., 2018).

A rapidez e precisão do NGS tem revolucionado a análise genética e aberto novos caminhos em áreas como pesquisa genômica, clínica, saúde e até mesmo agricultura (Qin, 2019). A técnica de NGS requer a criação de uma biblioteca a partir de fragmentos de ADN a serem analisados; o objetivo é usar os fragmentos de interesse e adicionar pequenas sequências sintéticas para permitir a subsequente sequenciação (Yoshinaga et al., 2018). Uma vez criada a biblioteca, existem por exemplo três abordagens de sequenciação: *Shotgun*, *Captura* e *Metabarcoding*.

Na sequenciação *Shotgun*, todas as moléculas de ADN presentes na biblioteca criada são sequenciadas. A análise de ADN é não direcionada e, portanto, proporciona uma visão geral de todas as espécies presentes na amostra (por exemplo, durante a análise de espécies bacterianas). Aplicada ao estudo do tártaro dentário antigo, essa abordagem permitirá obter uma ideia geral de todas as espécies presentes no microbioma oral (Wensel et al., 2022).

A técnica denominada *Captura* permite o direcionamento/captura/sequenciação específica de um genoma alvo presente na biblioteca. Baseia-se no uso de primers específicos que hibridizam com uma sequência de ADN alvo conhecida (Lin et al., 2012). Por exemplo, se estivermos especificamente à procura de um microrganismo patogénico como *P. gingivalis* ou *S. mutans*.

Por fim, o *Metabarcoding* utiliza primers universais específicos para regiões do ADN alvo. Esta técnica é uma extensão da codificação de barras do ADN, que literalmente se traduz como "código de barras de ADN". São as regiões altamente conservadas de certos fragmentos de ADN dentro de uma mesma espécie ou não que permitem a implementação destes "códigos de barras". Combinando novas técnicas de sequenciação como NGS, o *Metabarcoding* pode ser eficaz na reconstrução de paleo-ecossistemas (Francioli et al., 2021).

Para resumir, a tecnologia de NGS organiza-se em quatro grandes etapas (figura 4):



Figure 4 Etapas da tecnologia de NGS (adaptado de Francioli et al., 2021)

No que respeita as três tecnologias mencionadas acima, podemos observar o resumo das mesmas através da tabela 1 :

Tableau 1 Resumo das técnicas de análise de ADN

Tecnologias	Princípio	Vantagens	Desvantagens
PCR	Amplificação de uma região de um gene usando primers e repetição de ciclos de desnaturação/hibridação / alongamento	Amostra de tamanho pequeno facilmente usada Identificação de bactérias cultiváveis e não cultiváveis Custo baixo	Pouco produto final em comparação com a quantidade de matriz de ADN original Formação de produto pouco específico
NGS	Análise de sequências de ADN e ARN a partir da criação de uma biblioteca	Sequenciação de um grande número de fragmentos de ADN	Pode ser caro Baixa resolução taxonómica Erros possíveis durante a fase de PCR
ARNr 16S	Utilização na classificação das bactérias	Grande base de dados Omnipresente nas bactérias, portanto, bom objeto de medição	Fornecer apenas informação filogenética, mas nada sobre a funcionalidade do gene

1.2. Bactérias

O organismo humano é uma incubadora de uma miríade de bactérias. Os dois maiores reservatórios estão localizados no sistema digestivo e na cavidade oral (com mais de 700 espécies) (Deo & Deshmukh, 2019).

Como mencionado anteriormente, graças às novas tecnologias de sequenciação de ADN, é possível encontrar vestígios de organismos antigos até em fósseis dos primeiros humanos. Esse avanço baseia-se principalmente na capacidade de reconhecer bactérias, particularmente o gene 16S ARNr (Dagli et al., 2015).

Assim, pode se estudar a composição bacteriana da cavidade oral antiga e suas correlações com a dos seres humanos modernos. Nas seções seguintes, serão abordados os elementos dentários nos quais as bactérias se alojam e se conservam ao longo do tempo, bem como as diferentes espécies que coabitavam na cavidade oral dos primeiros humanos.

1.2.1. Definição

As bactérias são microrganismos unicelulares, com a maioria tendo um diâmetro em torno de 1 a 2 μm (figura 5) (Volland et al., 2022).

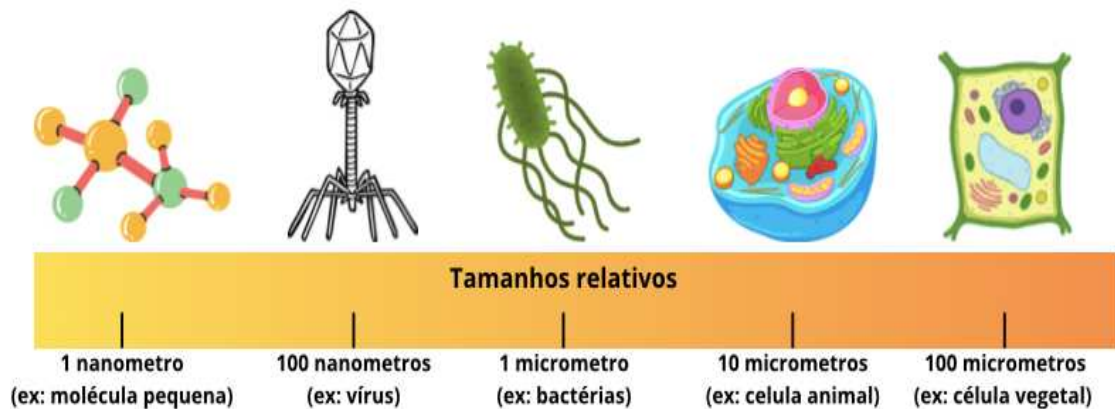


Figure 5 Tamanho dos microrganismos

Estas existem desde há muito tempo e até se considera serem a forma de vida mais antiga na Terra. Ao longo do tempo, as mesmas evoluíram e adaptaram-se a novos ambientes, como o corpo humano.

A estrutura típica das bactérias é constituída por: parede celular, membrana plasmática, nucleóide, citoplasma e ribossomas. Algumas bactérias apresentam flagelos e cílios, e algumas possuem cápsula (Bush, 2024).

As bactérias podem apresentar várias formas (cocos, bacilos, outros) (Bush, 2024).

Também se distinguem entre si por sua natureza aeróbia ou anaeróbia.

As aeróbias são aquelas que requerem a presença de oxigénio para sobreviver, ao contrário das bactérias anaeróbias, que podem-se multiplicar num ambiente sem oxigénio. No entanto, como mencionado anteriormente, as bactérias nem sempre são negativas para os indivíduos, e frequentemente contribuem para o equilíbrio da microbiota humana (Bush, 2024).

1.2.2. Interação dente/tártaro/polpa

1.2.2.1. Composição do dente

Ao estudar restos humanos ou ossos fossilizados, os dentes são geralmente a parte mais bem preservada do esqueleto. Sua anatomia é dividida em várias partes (figura 6) :

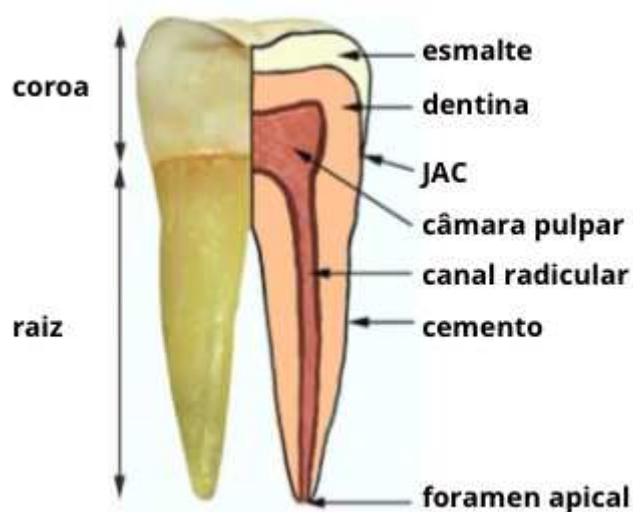


Figure 6 Anatomia do dente (adaptado de Nikita, 2016)

Consistem em três elementos: o esmalte, a dentina e o cimento. O esmalte representa a parte mais externa do dente e cobre a coroa (figura 6), sendo o componente mais duro deste último. Abaixo do esmalte encontra-se a dentina, que também percorre a raiz e protege o que chamamos de polpa (que contém nervos e vasos sanguíneos). Quanto à sua composição :

- O esmalte: 95% inorgânico (hidroxiapatite), 4% de água e 1% de material orgânico.
- A dentina: 70% inorgânica (hidroxiapatite), 20% orgânica (colágeno) e 10% de água.
- O cimento: 45% inorgânico (hidroxiapatite), 33% orgânico (colágeno) e 22% de água.

(Nikita, 2016).

Essa configuração e a natureza dos compostos do dente permitem que o biofilme encontre um substrato para se "agarrar" e se tornar depois em tártaro com o tempo se não é removido (Warinner et al., 2015).

1.2.2.2. O tártaro dentário na paleomicrobiologia

O tártaro dentário é obtido quando a placa bacteriana se acumula (ao longo de vários dias) e mineraliza. Como a placa bacteriana é em si mesma um nicho de bactérias, o tártaro dentário é também um elemento diretamente relacionado com a presença de bactérias (Radini et al., 2023).

Assim, o tártaro dentário fossilizado é um substrato ideal na pesquisa de um microbioma oral antigo (figura 7). Vários estudos mostraram que o tártaro dentário é facilmente encontrado na boca e que sua integridade permanece estável ao longo do tempo. Ele não sofre contaminação e, portanto, o ADN antigo, aprisionado nele, também não. Todas essas características o tornam uma das fontes mais ricas de ADN microbiano da cavidade oral (Dagli et al., 2015).

Como explicado por Adler e colaboradores (2013), o estudo do tártaro fossilizado envolve a recolha de amostras antigas de vários homínídeos em diferentes períodos. No seu estudo, eles concentram-se na análise e colheita de tártaro supra e subgingival de dentes

de esqueletos humanos pré-históricos europeus. O período sobre o qual estendem o seu estudo abrange desde o Mesolítico até o Medieval. Graças a essas amostras, eles foram capazes de extrair ADN bacteriano. Em seguida, compararam esses dados com amostras de tártaro "moderno", o que lhes permitiu determinar as diferenças e correlações entre os supostos microbiomas passados e os modernos. Eles afirmaram que "o cálculo dentário de amostras que têm milhares de anos preservam assinaturas microbianas representativas e informativas do microbiota humano associado ao passado".



Figure 7 Fotos de Dente e Tártaro dentário antigo

1.2.2.3. A polpa dentária em paleomicrobiologia

Se o tártaro constitui um reservatório de informações sobre o microbioma oral antigo, a polpa dentária também apresenta uma fonte muito valiosa como testemunha do microbioma passado. Composta principalmente por vasos sanguíneos e nervos, a polpa dentária fica encapsulada num conjunto mineral (esmalte, dentina e cemento) que constitui a sua proteção. É graças a essa organização que a polpa dentária representa uma fonte excepcional de ADN antigo, especialmente de elementos patogênicos ; tudo isso protegido de potenciais contaminações ambientais (Rascovan et al., 2016).

Por exemplo, em 2005, foi descoberta a bactéria *Bartonella quintana* (responsável por muitas infecções durante a Primeira Guerra Mundial) na polpa dentária humana datada de 4000 anos (Dagli et al., 2015).

Como no uso do tártaro dentário, a análise de amostras de polpa dentária antiga baseia-se no gene 16S ARNr. Após a interpretação dos resultados, parece que a polpa dentária contém diferentes comunidades microbianas, permitindo detectar o ADN de antigos

microrganismos patogênicos orais, mesmo séculos após a morte dos indivíduos (Rascovan et al., 2016).

1.2.3. Composição bacteriana das populações passadas

Ao mineralizar-se, o tártaro dentário aprisiona uma série de elementos, incluindo bactérias. Pode-se questionar sobre a composição bacteriana do antigo microbioma oral e sua correspondência com a das populações contemporâneas (Dagli et al., 2015).

De acordo com Velsko e colaboradores (2019), o estudo deste microbioma oral antigo e sua mudança ao longo do tempo (com o aparecimento de novas práticas de higiene ou a modificação da dieta) permitiria rastrear a "coevolução homem-microbioma" (Velsko et al., 2019).

Na figura 8, é possível observar a composição bacteriana de acordo com o tipo de amostra (polpa dentária antiga, dente antigo, tártaro dentário antigo, etc.).

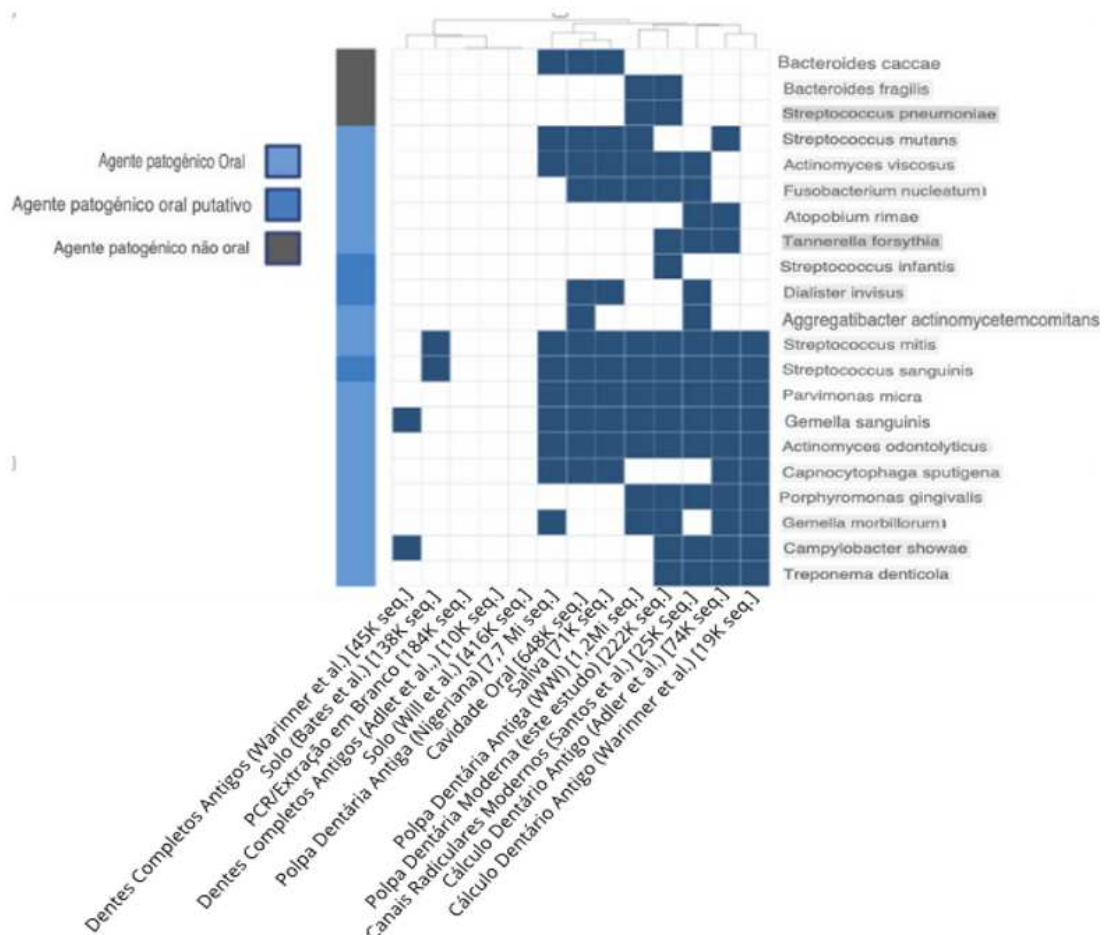


Figure 8 Gráfico comparando a presença de bactérias patogênicas em diferentes amostras (modernas ou antigas) (adaptado de Rascovan et al., 2016)

Esta figura foi elaborada comparando os dados obtidos com a sequenciação do gene 16S ARNr, e utilizando apenas as sequências com 100% de similaridade com espécies patogênicas não ambíguas (Rascovan et al., 2016).

Focando particularmente três bactérias patogênicas que colonizam a cavidade oral: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Streptococcus mutans*. Em relação à sua atividade patogênica, *P.gingivalis* está envolvida no mecanismo da gengivite, *T. denticola* é um agente patogênico da periodontite e, por fim, *S. mutans* está associada à cárie dentária. Essas bactérias são comuns como colonizadores dos espaços gengivais e subgengivais, causando uma perturbação no microbioma oral do hospedeiro (Lemos et al., 2019; Yadalam et al., 2023).

A tabela 2 sintetiza as informações da figura 8, elaborada por Rascovan e seus colaboradores (2016) :

Tableau 2 Presença ou ausência do microrganismos patogênicos na amostra

	<i>S.mutans</i>	<i>T.denticola</i>	<i>P.gingivalis</i>
Polpa dentária antiga (Nigeriano)	+	-	+
Polpa dentária antiga (WWII)	+	-	+
Cálculo dentário antigo (Adler et al.)	+	+	+
Cálculo dentário antigo (Warinner et al.)	-	+	+

Legendas : Presença + ; Ausência –

Parece que estas três bactérias patogênicas já estavam presentes nas populações passadas de hominídeos. Apenas *T.denticola* não foi detetada na polpa dentária antiga, sendo apenas detetada no tártaro dentário antigo.

No estudo realizado por Adler e colaboradores (2013), foram obtidas informações sobre o conteúdo do microbioma oral de populações antigas, conforme o período histórico (figura 9) :

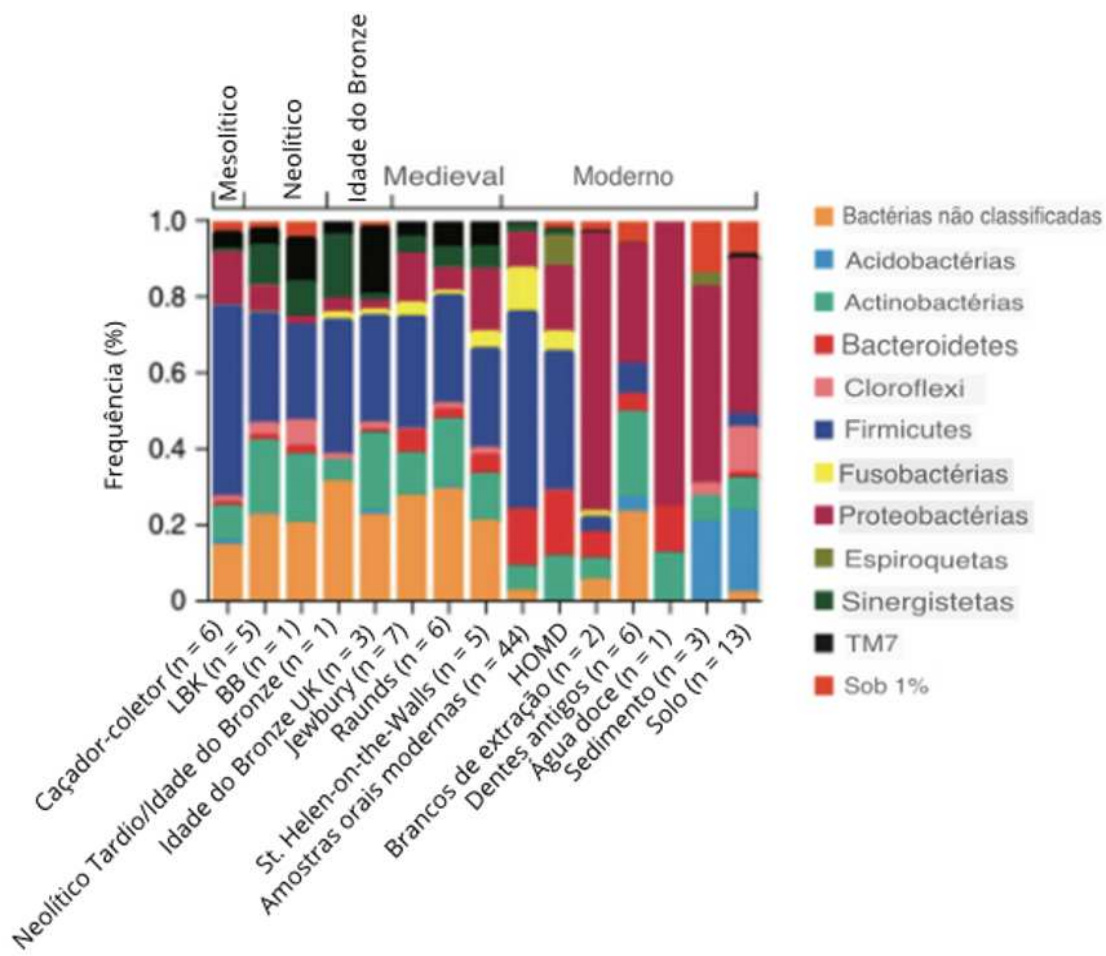


Figure 9 Frequência (em %) da composição bacteriana de diferentes amostras ao longo do tempo (adaptado de Adler et al., 2013).

Através da figura 9, Adler e seus colaboradores (2013) estabelecem diversas conexões:

- A composição bacteriana entre tártaro antigo/amostras modernas/sequências modernas do Human Oral Microbiome Database (HOMD) é semelhante.
- O filo dos Firmicutes dominam o cálculo dentário arqueológico, mas também sequências HOMD e amostras modernas.

- O filo das Proteobactérias dominam as sequências bacterianas dos dentes antigos e amostras ambientais.
- O filo das Actinobactérias (comumente encontradas na cavidade oral moderna) são encontradas em amostras de tártaro antigo, mas também no tártaro moderno.

Ao mostrar a presença das mesmas bactérias em amostras orais antigas e modernas, Adler e colaboradores (2013) mostram que o cálculo dentário antigo é uma boa fonte de informação sobre a microbiota humana passada (Adler et al., 2013). Esta ideia é reforçada pelo estudo realizado por Weyrich e seus colaboradores (2017) (figure 10) :

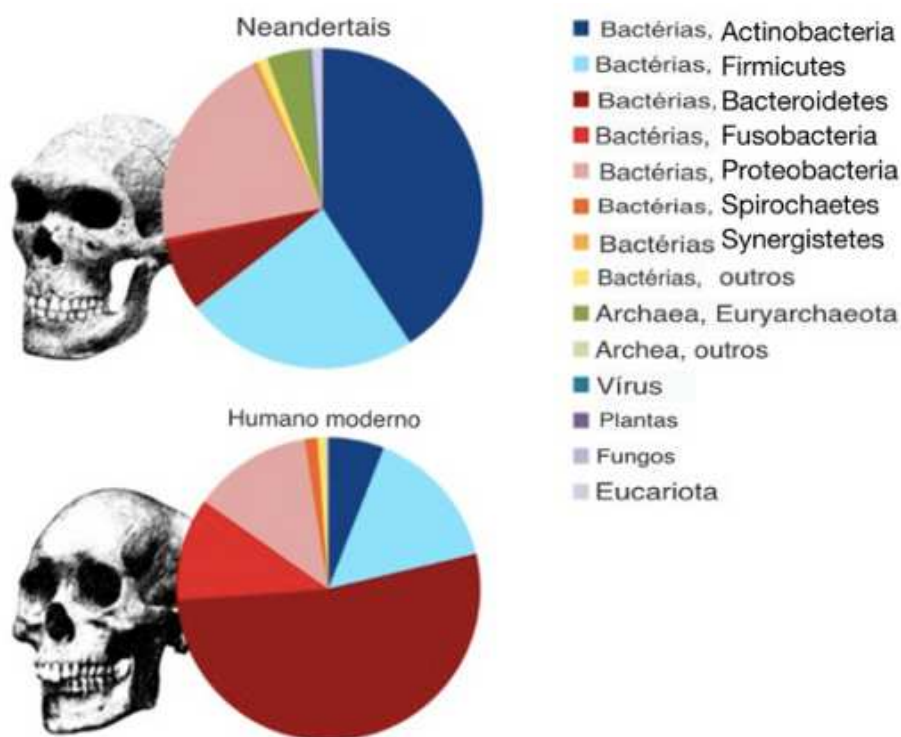


Figure 10 Composição bacteriana (ao nível do filo) da microbiota oral sobre amostras de neandertais e humanos modernos (adaptado de L. Weyrich et al., 2017)

Os grandes filios bacterianos da boca humana moderna também estavam presentes e dominantes em populações passadas (aqui nos Neandertais) (L. Weyrich et al., 2017).

Reunindo as informações das Figuras 8, 9 e 10, parece que os microbiomas orais passados e modernos já partilhavam semelhanças.

1.3. Dieta Passada e Doenças Paleolíticas

As doenças orais atuais, como cáries, gengivite (Lemos et al., 2019) e periodontite, estão amplamente associadas as bactérias patogénicas (Yadalam et al., 2023). Parece que elas sempre acompanharam os seres humanos, independentemente da época, mas em proporções e prevalências diferentes. Pode questionar-se quais foram as mudanças e os fatores que levaram a essas alterações dos microbiomas orais.

1.3.1. Evolução da Dieta

A cavidade oral é um local de equilíbrio delicado entre microrganismos e saúde oral, e muitas vezes fatores podem levar à sua modificação, resultando no surgimento de doenças (Zhang et al., 2018).

A saliva na cavidade oral desempenha um papel crucial como o primeiro local do processo de digestão de alimentos e líquidos (Pedersen et al., 2018). Se o tártaro tem a capacidade de conter informações como o ADN de bactérias antigas, ele também pode testemunhar os hábitos alimentares dos primeiros seres humanos ; traçando assim "uma janela única sobre o microbioma oral ancestral" (Warinner, 2016).

Nesta seção, o foco estará no impacto da dieta sobre o microbioma oral, quais informações os dados recolhidos no tártaro fossilizado oferecem e quais eram os hábitos alimentares dos primeiros seres humanos.

1.3.1.1. Caçadores-coletores

No início dos tempos, o ser humano era um “caçador-coletor”. É somente muito mais tarde que aprendeu a domesticar animais e plantas, introduzindo assim a criação de gado e a agricultura no seu modo de vida. Isso ocorreu há cerca de 12 000 anos. Quanto aos caçadores-coletores, a sua alimentação dependia das estações do ano e era essencialmente baseada em plantas (80%) e proteínas animais como carne ou peixe (20%) (Alt et al., 2022). Através de um estudo conduzido por Scorrano e seus colaboradores (2022), análises realizadas em tártaro fossilizado antigo permitiram encontrar vestígios de colágeno do tipo I característico de um bovino que habitava a terra naquela época, o auroque (*Bos primigenius*). Também foram identificadas evidências de proteínas de porco

ou peixe (Scorrano et al., 2022). Essa alimentação já tinha um impacto na saúde dos dentes, por exemplo, as plantas consumidas durante o Mesolítico (período dos caçadores-coletores) tendiam a ser muito abrasivas para os dentes (Alt et al., 2022).

Os dados coletados do tártaro fossilizado antigo sugerem que a alimentação tem, de fato, um impacto no microbioma oral humano (Weyrich et al., 2017).

1.3.1.2. Agricultura

O aparecimento da agricultura e da capacidade humana de cultivar e explorar a terra ocorreu no período Neolítico. Essa época marcou uma mudança importante no padrão alimentar, que passou a ser muito mais rico em cereais. Com essa mudança na alimentação, e com base em dados recolhidos de esqueletos antigos, observou-se um aumento nas patologias orais, bem como na presença de tártaro oral associado. Esse aumento na prevalência explica-se em parte pelo caráter rico em carboidratos dos cereais (Weyrich, 2020).

Os carboidratos, ou glícidos são um dos principais componentes dos alimentos e bebidas. De acordo com Adler e colaboradores (2013), as populações agrícolas apresentam uma prevalência mais elevada de bactérias associadas à doença periodontal do que as populações de caçadores-coletores. Entre essas bactérias, destaca-se especialmente *P. gingivalis*. De fato, outros estudos revelaram que amostras de populações neandertais tinham menos microrganismos patogênicos Gram-negativo, responsáveis principalmente pela periodontite, do que amostras de indivíduos contemporâneos. A diferença observada foi de 18,9% para as amostras de neandertais e de 77,6% para as amostras de humanos modernos (Weyrich et al., 2017).

Todas essas bactérias patogênicas estão associadas a doenças orais, e a sua presença em amostras de populações passadas sugere que os primeiros homens também eram afetados por algumas patologias orais, assim como os homens dos tempos modernos (Alt et al., 2022).

1.3.2. Doenças Paleolíticas

1.3.2.1. Cárie dentária e Periodontite

No capítulo anterior, foi possível observar que a evolução do homem e a evolução da sua alimentação tiveram um impacto na sua saúde. De fato, todas essas mudanças estão especialmente associadas à modificação da sua dieta e, portanto, à composição bacteriana intraoral (Weyrich et al., 2017).

Assim, com a mudança do microbioma oral, foi possível observar uma mudança na prevalência de doenças orais.

Quando bactérias acidogênicas como *S. mutans* ou *Lactobacillus* se estabelecem na cavidade oral, o pH do meio diminui. Essa alteração do equilíbrio será particularmente benéfica para a proliferação da cárie dentária. Esta doença manifesta-se pela desmineralização do dente e pode afetar tanto a coroa quanto a raiz do dente (figura 11) (Dayo et al., 2021).



Figure 11 A cárie dentária (adaptado de Union Française pour la santé Bucco-Dentaire, 2021)

Segundo Sołtysiak (2012), as cáries eram menos frequentes no Homem de Neandertal. Foi atrás abordada a dieta dos caçadores-coletores (Weyrich, 2020), e Sołtysiak (2012) fornece informações adicionais, explicando que a baixa prevalência de cáries estaria relacionada ao fato de que o consumo de açúcar era muito menor nessas populações, sendo composto principalmente por derivados de animais (Sołtysiak, 2012).

No entanto, as cáries não eram a única doença oral das populações do passado; elas também estavam sujeitas à periodontite, por exemplo (Weyrich et al., 2017). Quando o equilíbrio do ecossistema da cavidade oral é ameaçado, o ambiente torna-se propício para bactérias patogênicas. Isso pode resultar em inflamação das gengivas, caracterizada por inchaço ou sangramento. Esse estágio inicial, conhecido como gengivite, precede a evolução para a periodontite. A periodontite é uma doença inflamatória crônica que afeta os tecidos de suporte dos dentes, incluindo o osso alveolar (figura 12). Frequentemente, a bactéria associada é *P. gingivalis* (Borsa et al., 2021).

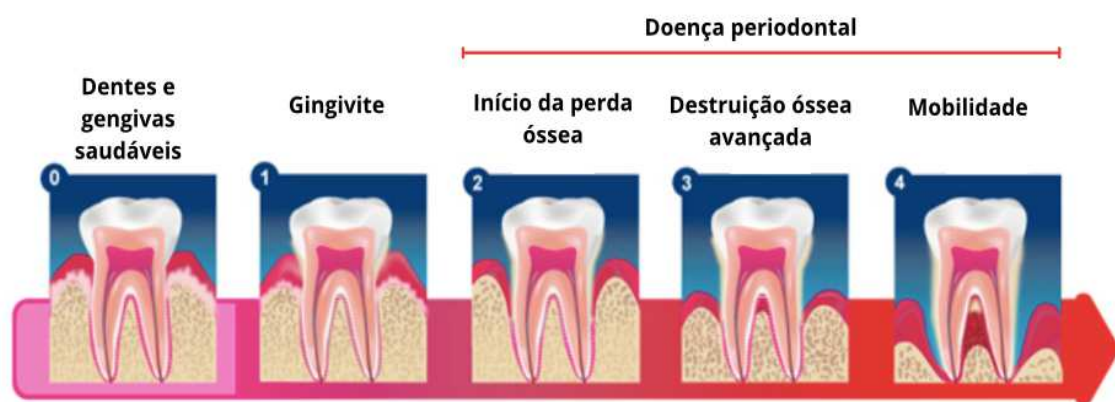


Figure 12 A doença periodontal (adaptado de Union Française pour la santé Bucco-Dentaire, 2017)

Assim, de acordo com Weyrich e colaboradores (2017), embora a doença periodontal fosse mais rara nas populações passadas, ela já estava presente.

Por meio da figura 13, a frequência de *S. mutans* e *P. gingivalis* é comparada ao longo do tempo (do Mesolítico ao Moderno). Observa-se um aumento de *S. mutans* após o Neolítico, o que corresponde à primeira mudança nos hábitos alimentares e à introdução da agricultura. Quanto a *P. gingivalis*, a bactéria está presente desde as populações mais antigas e continua a evoluir com o homem ao longo do tempo.

Ela experimenta um primeiro aumento na prevalência por volta do Neolítico, com o surgimento da agricultura e, portanto, de uma dieta mais rica em cereais e carboidratos em comparação com as populações de caçadores-coletores do Mesolítico (Adler et al., 2013). Por fim, parece que após essa transição para a agricultura no Neolítico, a composição microbiana oral permanecerá relativamente constante até o período medieval (Weyrich et al., 2017).

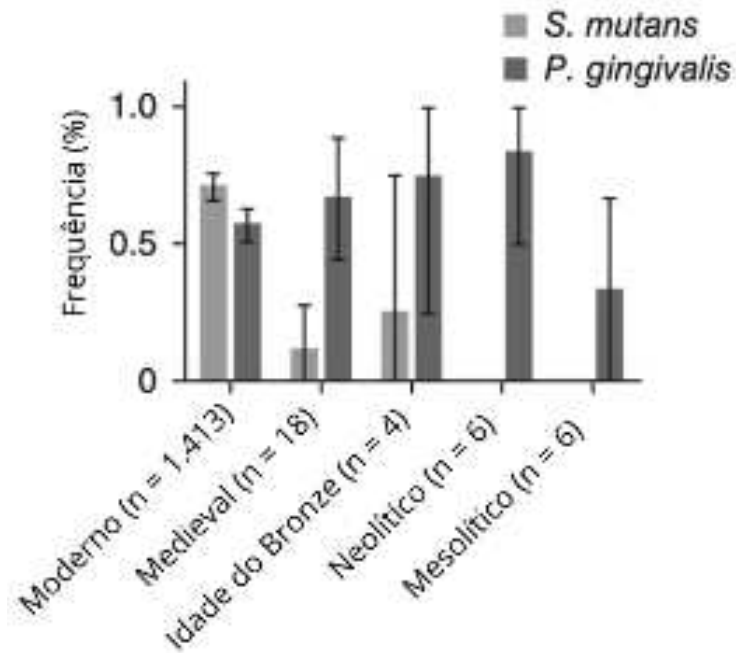


Figure 13 Distribuição (em %) de *S. mutans* e *P. gingivalis* ao longo do tempo (adaptado de Adler et al., 2013)

Em extensão, Adler e colaboradores (2013) procuraram mostrar que a prevalência das bactérias *S. mutans* e *P. gingivalis* (em amostras antigas) entre homens e mulheres não apresenta uma diferença significativa. O sexo, portanto, não pareceu ser um fator agravante (figura 14).

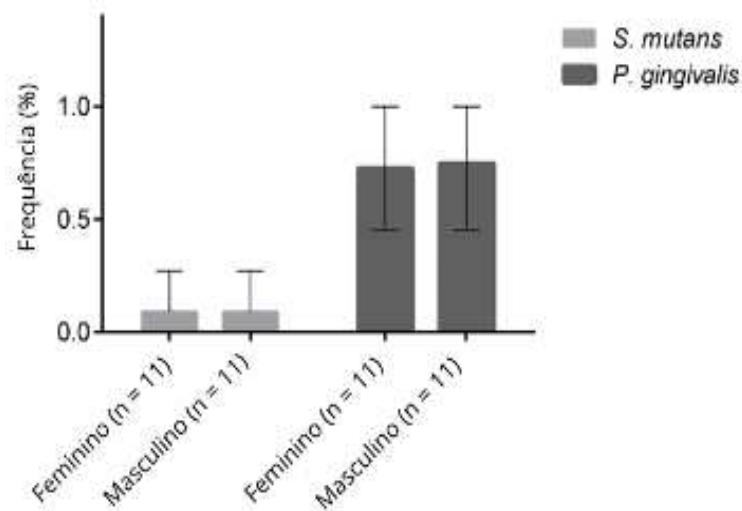


Figure 14 Distribuição (em %) de *S. mutans* e *P. gingivalis* segundo sexo (adaptado de Adler et al., 2013)

Resumindo, as populações passadas já estavam sujeitas a doenças orais como cárie dentária ou doença periodontal, embora a prevalência fosse muito menor do que nas populações modernas, principalmente devido à influência dos ambientes. A primeira mudança significativa ocorreu no Neolítico com a introdução de uma dieta dominada pela agricultura, mas outra mudança marcou um aumento real das doenças orais: a Revolução Industrial (Weyrich, 2020).

2. Fatores contemporâneos e influência na microbiota oral

2.1. Evolução da dieta

2.1.1. O Ponto de Viragem da Revolução Industrial

O mundo tem evoluído constantemente, assim como o Homem e o seu ambiente, incluindo os seus hábitos alimentares e recursos. As condições de vida hoje são mais diferentes do que no passado, permitindo que o homem moderno se desenvolva num ambiente mais propício à saúde, embora com os seus próprios desafios. O segundo grande ponto de viragem na história da evolução humana, que marca a transição para o microbioma oral dito "moderno", ocorre com a Revolução Industrial (Alt et al., 2022).

A Revolução Industrial teve início no século XVIII, na Inglaterra, com uma onda de inovações técnicas que posteriormente se espalhou pela Europa e pelo mundo. Entre as evoluções, destacam-se a invenção da máquina a vapor, que revolucionou as trocas comerciais em todo o mundo, bem como o transporte de passageiros para além das fronteiras. Nessa época, a sociedade passou por uma completa remodelação, incluindo um novo sistema monetário e novos recursos disponíveis. Foram também introduzidos alimentos como o açúcar refinado e muitos outros alimentos com alto teor de açúcar (Allen, 2017).

Com a descoberta de uma multiplicidade de novas culturas, os hábitos alimentares do homem foram mais uma vez alterados. A Revolução Industrial marcou o início de uma dieta muito mais rica em açúcar, com uma demanda em constante crescimento. A forma de transformar e conservar alimentos também evoluiu, podendo-se citar, por exemplo, a introdução da conserva que, combinada com o açúcar, marcou o início da era dos alimentos altamente processados. Uma nova dieta nasceu (Alt et al., 2022).

Foi neste período, e devido a todas estas mudanças, que as bactérias cariogénicas se tornaram dominantes na microbiota oral. A cárie dentária é uma das doenças orais mais comuns nas sociedades modernas, tornando-se uma doença endémica que afeta cerca de 60-90% das crianças (nos países industrializados). A periodontite também experimenta uma prevalência sem precedentes, com 5-20% da população adulta afetada em todo o mundo. Vimos anteriormente o acesso a novos alimentos com a Revolução Industrial, principalmente compostos por monossacarídeos e dissacarídeos (Adler et al., 2013).

Os monossacarídeos e dissacarídeos são os termos científicos que designam os carboidratos simples, ou mais simplesmente o açúcar (Marques, 2017). Estes são os principais responsáveis pela fermentação microbiana que, entre outros efeitos, acidifica o ambiente oral e conseqüentemente causa a desmineralização do esmalte (Dayo et al., 2021).

A figura 15 mostra um resumo dos diferentes momentos cruciais na evolução da microbiota oral através do tempo e da mudança na dieta :

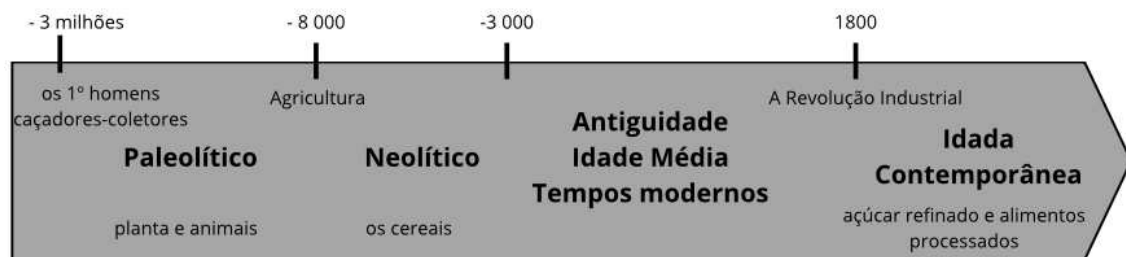


Figure 15 Linha do tempo com momentos cruciais na evolução da microbiota oral

A dieta constitui uma parte importante do estilo de vida e da saúde humana, desempenhando um papel central na formação do microbioma oral, e suas alterações influenciam a evolução do homem, bem como a evolução microbiana (Scorrano et al., 2022).

2.1.2. Composição bacteriana oral contemporânea

Como mencionado anteriormente, as mudanças no estilo de vida tiveram um impacto na saúde oral. De fato, as populações atuais têm uma composição bacteriana oral muito menos diversificada (figura 16), são dominadas por bactérias potencialmente cariogênicas (Weyrich, 2020) e têm menos bactérias associadas a uma boa saúde oral (por exemplo *Ruminococcaceae*) (Adler et al., 2013).

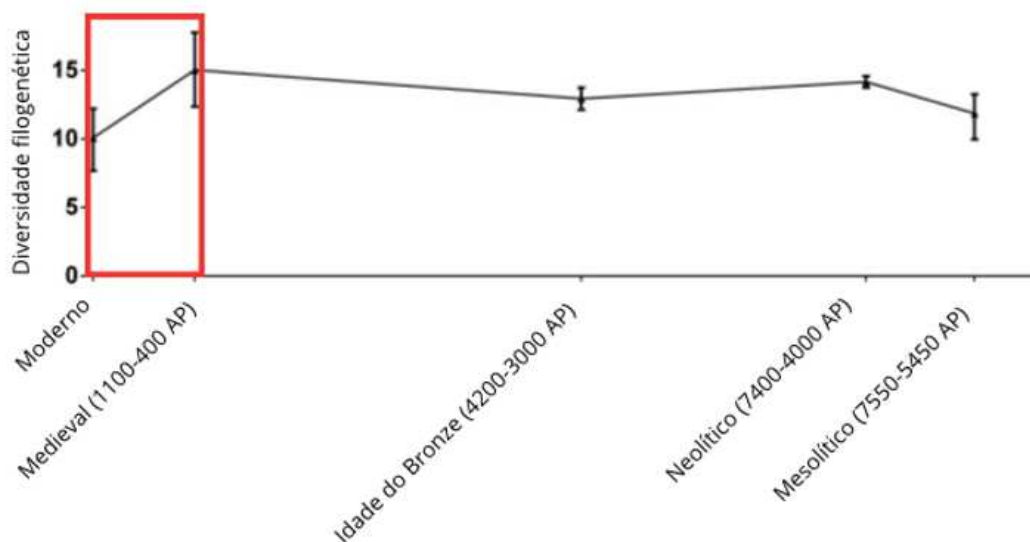


Figure 16 Diversidade filogenética da microbiota oral ao longo do tempo (adaptado de Adler et al., 2013)

Observando a figura 16, proveniente do estudo de Adler e colaboradores (2013), observa-se uma queda entre o período Medieval e o período Moderno em relação à diversidade filogenética (AP = anos antes do presente).

Se algumas comunidades bacterianas estão presentes há séculos, outras desapareceram ao longo do tempo. Um exemplo disso são as colônias de *Methanobrevibacter*, cujos vestígios foram descobertos em amostras antigas, mas que permanecem raras no microbioma oral das populações atuais. Esse desaparecimento é atribuído principalmente às mudanças na alimentação, à adoção de novas técnicas de higiene oral, como escovagem dos dentes, produtos como pasta de dente, e bochechos, entre outros mas também à introdução de medicamentos (Hellyer, 2024).

2.2. Impacto dos medicamentos na microbiota oral

Hoje a saúde está no centro das preocupações do Homem e com o desenvolvimento das tecnologias e o avanço da medicina é possível combater muitas doenças. No entanto, estas descobertas têm um preço e por vezes levam a efeitos indesejáveis.

A parte seguinte procurará mostrar o impacto que os medicamentos podem ter no microbioma oral dos humanos contemporâneos através de dois exemplos: o envelhecimento da população e a gestão das doenças mentais que constituem hoje um dos grandes desafios que as populações modernas enfrentam.

2.2.1. Uma sociedade que vive mais tempo

A população está a viver cada vez mais. Nas décadas de 1950, pessoas com 65 anos ou mais representavam 11% da população na maioria dos países. Nas décadas de 2000, essa percentagem aumentou para 18%. Até 2050, as estatísticas indicam que esse número chegará a 38%, estabelecendo uma situação em que pessoas com 60 anos ou mais serão mais numerosas do que adolescentes de 10 a 24 anos. Essa dinâmica de uma população mais idosa torna-se um desafio central nas nossas sociedades modernas, tanto do ponto de vista médico quanto social (Rudnicka et al., 2020).

Viver mais tempo frequentemente implica estar mais suscetível a doenças, o que significa que uma pessoa idosa tem mais possibilidades de precisar de um tratamento polifarmacêutico. Isso traduz-se na prescrição de vários medicamentos para um único paciente, especialmente pessoas idosas (Dovjak, 2022). Estamos a falar de uma rotina de cinco ou mais medicamentos (Pazan & Wehling, 2021). No entanto, essa prática às vezes pode representar um risco para a saúde (Dovjak, 2022).

As doenças mais associadas aos idosos incluem, por exemplo, diabetes, pressão alta, enfartes, entre outras. Devido ao estado de saúde dessa faixa etária, a polifarmacoterapia muitas vezes é indispensável e torna-se parte do quotidiano de muitos idosos (Diyane et al., 2013). No entanto, é importante lembrar que eles frequentemente têm comorbilidades e que a polifarmacoterapia não torna a sua gestão e acompanhamento fáceis (Morais, 2018).

Os idosos constituem uma população vulnerável, e é crucial garantir seu bem-estar físico (e psicológico) através da implementação de medidas especiais (Maltais, 2022).

Devido ao tratamento, essas populações tendem a desenvolver a síndrome conhecida como "boca seca", também chamada de xerostomia, que é um dos efeitos colaterais medicamentosos mais comuns entre os idosos (Barbe, 2018).

2.2.2. Uma sociedade mais ansiosa

O século XXI marca a transição de nossas sociedades para a era da inteligência artificial, das novas tecnologias e da realidade virtual (Malbos, 2020). Embora graças a todas essas descobertas o homem moderno tenha conseguido combater muitas doenças, algumas, pelo contrário, viram a sua prevalência aumentar: as doenças mentais. As doenças

mentais, como a ansiedade, continuam a representar um desafio significativo e seu controle permanece complexo (Lejzerowicz, 2021).

A ansiedade é um transtorno observado há séculos ; os filósofos e médicos da antiguidade greco-romana já a haviam elevado à categoria de doença. Mais tarde, no século XVII, Robert Burton abordaria o assunto em uma obra chamada "A Anatomia da Melancolia". No século seguinte, Boissier de Sauvages descreveu o transtorno através dos termos "ataques de pânico" e "ansiedade generalizada". Desde o século XX, ela encontrou seu lugar nas classificações psiquiátricas (Crocq, 2015).

Por definição, a ansiedade é uma reação normal, mas pode-se tornar uma doença se ocorrer sem justificativa de um evento específico (Anxiété - Symptômes, Causes, Traitements Et Prévention - VIDAL, 2021).

Quando a ansiedade se torna uma doença e afeta a qualidade de vida do paciente, é necessário recorrer a tratamentos como a ingestão de antidepressivos, ansiolíticos ou antipsicóticos, por exemplo. No entanto, muitos estudos sugerem que pacientes em tratamento apresentam uma saúde oral comprometida. Essa observação pode ser explicada pelo uso de medicamentos que afetam o bom funcionamento das glândulas salivares, resultando em uma diminuição do fluxo salivar na boca. Esse efeito colateral desconfortável e impactante para a vida do paciente é chamado de xerostomia (Frigaard et al., 2023).

2.2.3. Impacto na saúde oral

Os medicamentos têm tido um impacto significativo na composição do microbioma oral (Helyer, 2024), são nomeadamente responsáveis pela disfunção dos sistemas salivares que conseqüentemente conduzirá à secagem do ambiente e, portanto, à proliferação de certas patologias orais (Barbe, 2018).

A saliva é um fluido da cavidade oral secretado pelas glândulas salivares (submandibular, sublingual, parótida) e que auxilia na mastigação, mas também protege os dentes e a mucosa, pois os reveste continuamente. A saliva desempenha um papel importante na manutenção de um pH neutro na cavidade oral e também atua como guardião do equilíbrio

microbiano. Sua característica de ação tamponante evita a desmineralização dos dentes e possui ações antimicrobianas (Pedersen et al., 2018).

A xerostomia é uma condição que afeta de 1 a 29% da população (Tanasiewicz et al., 2016), geralmente mais comum em mulheres do que em homens (Rani et al., 2023). É frequentemente causada pelo uso de medicamentos, doenças crônicas ou radiação na cabeça e pescoço. Está associada a um mau funcionamento das glândulas salivares, resultando em uma diminuição do fluxo salivar. A qualidade de vida e a saúde oral dos pacientes são afetadas por isso (Dreyer et al., 2021).

Segundo Rani e colaboradores (2023), um fluxo normal de saliva não estimulada é de 0,29-0,41 ml/min. A hipossalivação é definida por um fluxo salivar inferior a 0,1 ml/min. Quando esse fluxo é reduzido, toda a ação salivar é comprometida, o papel tampão não é mais respeitado e o meio oral tende a acidificar-se (Rani et al., 2023). Esse ambiente tornar-se-á particularmente propício a doenças orais como cárie dentária, erosão dentária e infecções fúngicas (Pedersen et al., 2018).

Hoje, existem meios de compensar e tratar a xerostomia, que podem ser classificados em duas categorias de abordagens : endógena ou exógena (figura 17). A abordagem endógena envolve a melhoria do funcionamento das glândulas salivares através de modificações farmacêuticas ou genéticas. A abordagem exógena, por outro lado, baseia-se no uso de substitutos de saliva, ou aumentando o consumo de água, com o objetivo de substituir ou compensar as funções perdidas (Łysik et al., 2019).

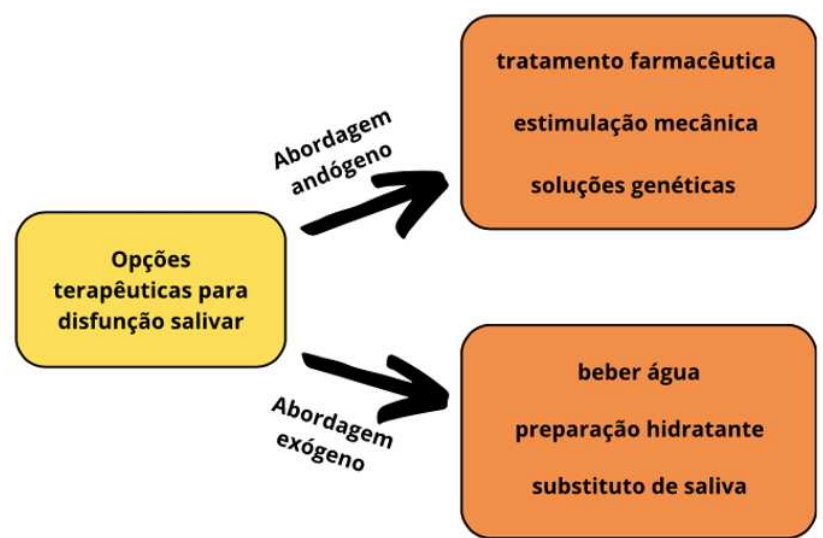


Figure 17 As diferentes opções terapêuticas para a disfunção salivar (adaptado de Łysik et al., 2019)

Os medicamentos são um ator importante na modificação do microbioma oral (Hellyer, 2024). A sua utilização na sociedade tornou-se diária e, portanto, representa um fator de risco significativo no que diz respeito à saúde oral (Frigaard et al., 2023).

2.3. Tabaco e álcool

2.3.1. Definição

O tabaco e o álcool representam uma das dependências mais mortais e causam muitas vítimas a cada ano. Embora nos últimos anos as campanhas de conscientização e as políticas de saúde pública tenham conseguido reduzir significativamente o consumo, esses produtos continuam entre os mais prejudiciais para as populações (Falissard, 2021). De fato, a associação do tabaco e do álcool acarreta riscos significativos para a saúde (N'Tcha et al., 2024).

O álcool é uma bebida fermentada que está intimamente ligada à nossa cultura e a muitas tradições ao redor do mundo. Frequentemente, foi associada ao aspeto espiritual de várias religiões. Somente com o aumento do seu consumo, especialmente durante o século XIX, é que se tomou consciência do flagelo que ele representa (Falissard, 2021).

Segundo Falissard (2021), o tabaco, por sua vez, foi descoberto e relatado por Cristóvão Colombo durante sua expedição no território dos índios. Originária de uma planta, o tabaco tornou-se rapidamente muito popular nos séculos seguintes. Somente no final do século XVIII é que seu potencial de perigo foi mencionado (como, por exemplo, seu caráter cancerígeno).

2.3.2. Impacto na saúde oral e na composição microbiana

O consumo excessivo de álcool e tabaco, bem como uma higiene oral deficiente e inadequada, têm efeitos negativos na cavidade oral (Baghaie et al., 2017). Até 2030, estima-se que o número de mortes por ano relacionadas ao consumo de tabaco ultrapassará os 8 milhões (Thomas et al., 2014). Thomas e seus colaboradores (Thomas et al., 2014) conduziram um estudo no qual demonstraram que o consumo de tabaco e álcool afeta a diversidade bacteriana do nosso microbioma oral. Utilizando o gene 16S ARNr como alvo, juntamente com a técnica de PCR e as novas tecnologias de sequenciamento, eles procuraram perfilar as comunidades microbianas de acordo com diferentes grupos de análise.

Com 32 participantes e por meio de um questionário sobre a saúde oral, hábitos de higiene e também o consumo de álcool/cigarro, eles distinguiram três categorias de estudo: fumador/bebedores, fumador apenas e grupo controle. Os resultados mostram que a diversidade microbiana em fumador e fumador/bebedores é reduzida em comparação com o grupo controle. Parece que o uso dessas substâncias origina perturbações microbianas dentro de nossa cavidade oral, o que pode ter potenciais consequências para as doenças orais (Thomas et al., 2014).

O consumo de álcool, por exemplo, está associado a um maior risco de desenvolver doenças como periodontite ou cáries. Estudos em animais mostraram que uma dieta com 20% mais etanol aumentava a colonização do meio pela bactéria *S. mutans* (associada à cárie dentária); o etanol sendo um substrato de escolha no metabolismo de certas bactérias (Fan et al., 2018).

Nos últimos 125 anos, muitos estudos demonstraram que o tabagismo está associado a uma série de problemas gengivais, como perda de adesão epitelial, diminuição da altura

do osso alveolar, perda de dentes, acumulação de placa e tártaro dentário (Chaffee et al., 2021). Também tende a aumentar a formação do biofilme oral e a criar aderências maiores para certos patógenos, como *S. mutans*, por exemplo. Devido à disbiose que causa na cavidade oral, o tabaco muitas vezes é responsável por doenças bucais como periodontite, cáries, mas também infecções do tipo cancerosas (Bataneh et al., 2020).

As bactérias, assim como o biofilme que cobre os dentes e as mucosas bucais, representam a "maior parte do microambiente tumoral". De todas as bactérias orais, algumas parecem ter uma correlação significativa com o cancro oral, incluindo *P. gingivalis* e *F. nucleatum*, sugerindo assim que a modificação do microbioma oral desempenha um papel importante na indução do cancro oral (Zhao et al., 2017).

Entre os cânceros de cabeça e pescoço, o cancro da cavidade oral representa metade dos casos. Em termos de percentagem, continua a ser um cancro muito letal, pois a taxa de sobrevivência em cinco anos é relativamente baixa (50-60%), sendo os principais fatores de risco o álcool e o cigarro (Zhang et al., 2020). O seu tratamento pode ser feito através de várias intervenções, como cirurgia (ressecção), radioterapia, quimioterapia ou mesmo uma combinação destas. Geralmente, a opção terapêutica mais comum é a radioterapia (Alfouzan, 2021). No entanto, embora seu uso seja amplamente difundido hoje em dia, às vezes causa lesões nos tecidos circundantes, especialmente nas glândulas salivares. Existem vários estudos que destacam o efeito que o tratamento com raios-X teria no hipofuncionamento das glândulas salivares, levando os pacientes a se queixarem frequentemente do síndrome da boca seca, também conhecido como xerostomia (Jensen et al., 2019). Após tal tratamento e com as consequências resultantes, os pacientes frequentemente experimentam uma deterioração de sua saúde oral. As doenças que eles são suscetíveis de desenvolver geralmente incluem infecções, alterações salivares, cáries dentárias ou doenças periodontais (Sroussi et al., 2017).

Em síntese, as sociedades contemporâneas têm assistido ao desenvolvimento de outras doenças orais ligadas a fatores e atores novos, relacionados diretamente aos microbiomas orais. É agora importante estar atento às doenças orais e à sua gravidade, e tentar implementar meios de prevenção.

3. Prevenção nas populações modernas

"A saúde começa pela boca", é o que Fiorillo (Fiorillo, 2019) afirma em um de seus artigos. Muitas literaturas e pesquisas científicas demonstram consistentemente que a saúde geral do corpo, bem como o bem-estar, passam por uma higiene oral adequada. Além disso, se o microbioma é essencial para o bom funcionamento da nossa cavidade oral, também é essencial controlá-lo através de diferentes medidas para evitar que cause doenças bucais (Bowen, 2015). Assim é importante adotar uma rotina adequada e saudável, tudo isso implementando medidas preventivas adequadas e acessíveis nas nossas populações (Fiorillo, 2019).

3.1. Modificação nas práticas de higiene oral

A escova de dentes e o fio dental, por exemplo, representam práticas de higiene oral relativamente recentes dentro de nossas populações ; são em parte responsáveis por uma mudança na composição do nosso microbioma oral (Charlier et al., 2019).

3.1.1. A escova de dentes

Desde o século XIX, a escova de dentes tornou-se um instrumento de prevenção das doenças dentárias amplamente difundido (Shang et al., 2020). A sua utilização diária, duas vezes por dia (Ménard et al., 2016), permite remover os resíduos alimentares, manter um hálito fresco, eliminar a placa bacteriana da superfície dos dentes e das mucosas. Resumidamente, protege o esmalte dos dentes e previne uma potencial inflamação das gengivas (Shang et al., 2020).

A Ordem dos Médicos Dentistas (OMD) é a organização responsável pela regulamentação da prática da medicina dentária em Portugal. Esta entidade elabora anualmente um barómetro da saúde oral, que permite expressar estatisticamente o estado de saúde da população, abordando temas como hábitos de higiene, visitas ao dentista, acessibilidade aos cuidados de saúde, bem como perceções e motivação da população portuguesa (Ordem dos Médicos Dentistas, 2023).

"78% dos portugueses afirmam escovar os dentes com frequência". Um aumento de 5,5% em comparação ao ano anterior (Ordem dos Médicos Dentistas, 2023) (figura 18).



Figure 18 Frequência de escovar os dentes (em em %) nos últimos 3 três anos (Ordem dos Médicos Dentistas, 2023)

A figura 20, retirado do Barómetro de Saúde Oral de 2023 em Portugal, mostra a evolução percentual da prática de escovar os dentes ao longo dos anos de 2021, 2022 e 2023. Observam-se também dados mais elevados no sexo feminino (Ordem dos Médicos Dentistas, 2023). De acordo com Ménard e seus colaboradores (2016), os homens teriam uma tendência menos pronunciada de escovar os dentes diariamente em comparação com as mulheres, independentemente da idade.

Conforme indicado pela OMD (Ordem dos Médicos Dentistas, 2023), ao utilizar o termo "com frequência", pressupõe-se pelo menos duas vezes por dia (figura 19).

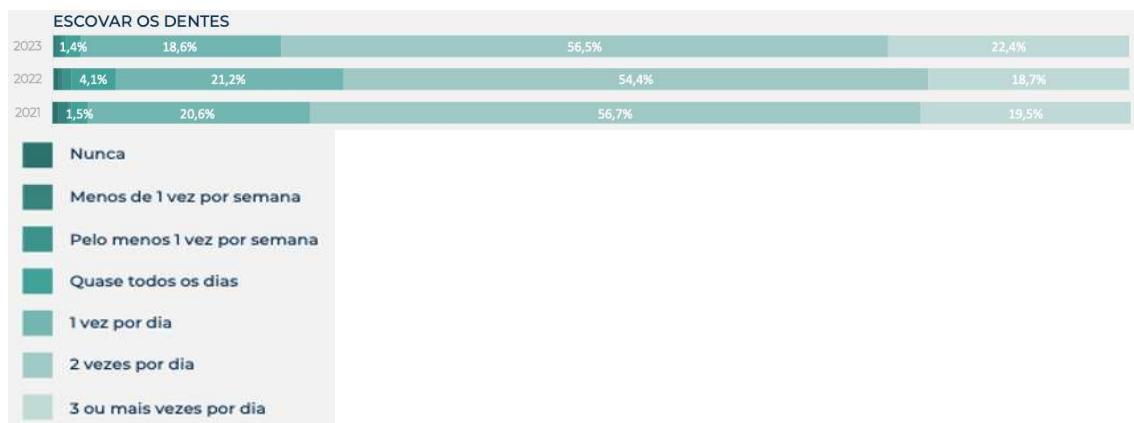


Figure 19 Frequência por dia/semana de escovar os dentes (em em %) nos últimos 3 três anos (Ordem dos Médicos Dentistas, 2023)

A figura 19 demonstra que os hábitos de escovar os dentes e o número de vezes por dia ao longo dos últimos dois anos têm aumentado.

3.1.2. O fio dentário

A placa bacteriana acumula-se na superfície dos dentes. O uso de uma escova de dentes permite remover manualmente essa placa. No entanto, existem espaços que a escova de dentes não consegue alcançar : os espaços interdentais. Portanto, à rotina de escovar os dentes, é importante adicionar um passo : o uso do fio dentário (ou escova interdental, conforme o espaço disponível) (Londero et al., 2022).

Segundo a OMD (2023), o uso do fio dentário na população portuguesa continua baixo, e a prática está aquém do que deveria ser (figura 20).

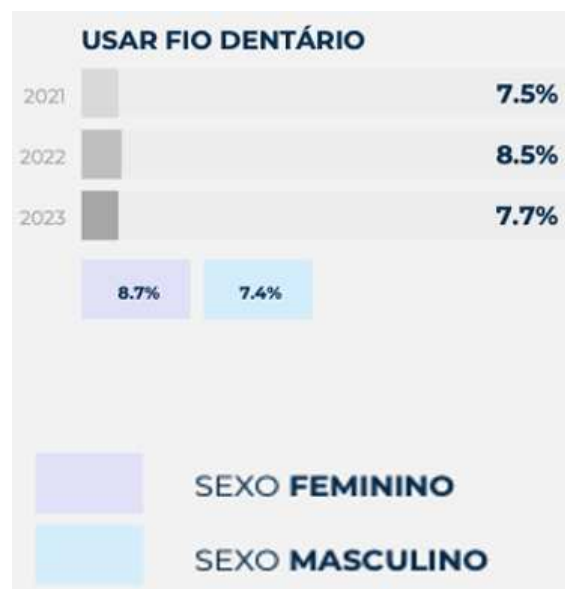


Figure 20 Frequência de uso do fio dental dentário (em%) nos últimos 3 três anos (Ordem dos Médicos Dentistas, 2023).

Através da figura 20 do Barómetro de Saúde Oral de 2023 em Portugal, observa-se que o uso do fio dentário não é muito comum e sua prevalência não aumentou nos últimos anos. O sexo feminino parece ser mais propenso a utilizá-lo em comparação com o sexo masculino (Ordem dos Médicos Dentistas, 2023). Apesar de não ser muito difundido, é importante salientar que a escovagem dentária por si só remove a placa localizada nas áreas interproximais, mas o efeito é ainda melhor quando combinado com o uso do fio dentário (Londero et al., 2022).

3.2. Sensibilização à higiene oral

3.2.1. Educação dos jovens

«53,5% das crianças com menos de seis anos nunca visitam um dentista “ (Ordem dos Médicos Dentistas, 2023).

A cárie dentária é a doença oral mais comum entre as crianças. Muitas vezes, está associada a maus hábitos alimentares ou falta de higiene oral ; o contexto socioeconómico também é um fator predominante (Larrañaga et al., 2019). Para combater o aparecimento dessas doenças orais, é importante implementar medidas preventivas nas populações e educar sobre boas práticas de higiene oral desde tenra idade. É importante promover, por exemplo, a escovagem diária dos dentes (pelo menos duas vezes ao dia por dois minutos), o uso de métodos de limpeza interdental e uma alimentação equilibrada (Braeckvelt, 2022).

A figura 21 é um exemplo mostrando que uma alimentação inadequada leva a riscos de acidificação do ambiente oral e, portanto, a uma maior prevalência de cáries. Também mostra a importância de uma escovagem regular para eliminar os agentes que perturbam o equilíbrio da cavidade oral.

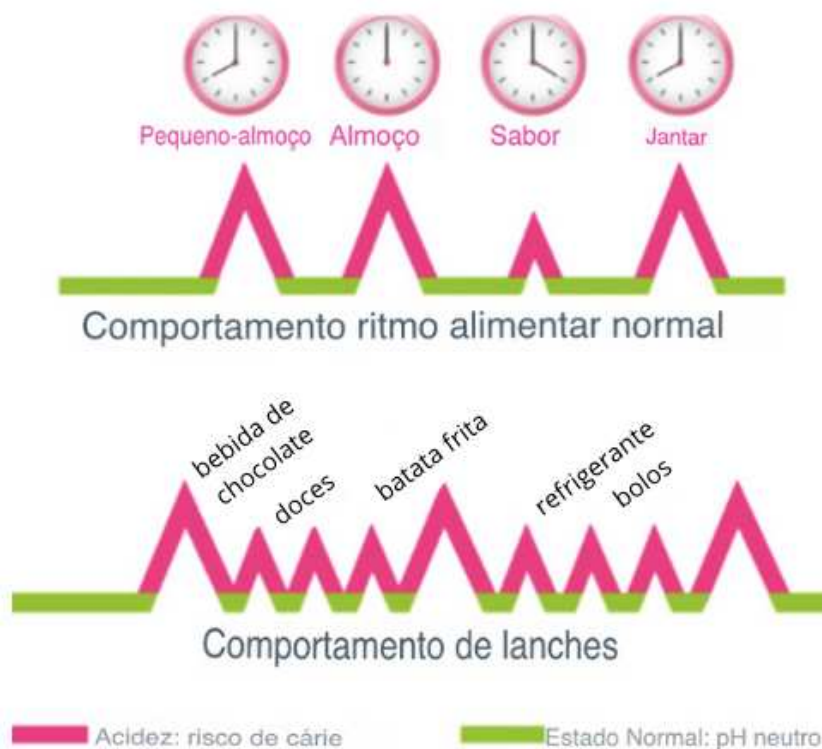


Figure 21 Comportamentos alimentares e impacto no pH oral (adaptado de Braeckvelt, 2022)

Atualmente, são implementadas intervenções nas escolas para promover boas práticas de higiene oral, envolvendo professores e pais. Vários estudos tendem a demonstrar que esses métodos têm um efeito benéfico nas populações e na saúde, ajudando a melhorar o conhecimento e o comportamento dos alunos (Larrañaga et al., 2019).

3.2.2. Campanhas de sensibilização nas comunidades

Se a escola representa um bom meio de educar os jovens, ainda é importante estender a prevenção ao restante da população; este é o papel dos serviços de saúde. Estes permitem melhorar e manter a saúde através de meios implementados pelo governo, agências e instituições. O objetivo é simples: detetar, promover, sensibilizar, educar e intervir. Nos últimos anos, vários meios de prevenção têm sido implementados e parecem ter um efeito positivo nas populações. Fala-se, por exemplo, de campanhas de fluoretação para evitar cáries dentárias (através de dentífricos, bochechos ou até mesmo água potável), mas também de financiamento para cuidados prestados a idosos, sensibilização para o consumo e impacto do tabaco e do álcool, e por fim, como último exemplo, campanhas contra o consumo excessivo de açúcar (Petersen et al., 2020).

3.3. Acesso a atendimento odontológico

3.3.1. Ajuda implementada

"64,4% dos portugueses visitam o médico dentista pelo menos uma vez por ano" (Ordem dos Médicos Dentistas, 2023).

O acesso aos cuidados dentários, quer seja para prevenção ou tratamento, é essencial para promover a saúde oral. No entanto, as desigualdades persistem e muitas vezes as populações de baixo estatuto socioeconómico são as mais afetadas pelas doenças orais. A maioria dos cuidados não é reembolsada ou requer assistência privada para cobrir parte dos custos. Como resultado, as famílias com baixos rendimentos não conseguem garantir consultas regulares ao dentista ou tratamentos quando necessários (Fiorillo, 2019) (figura 22).

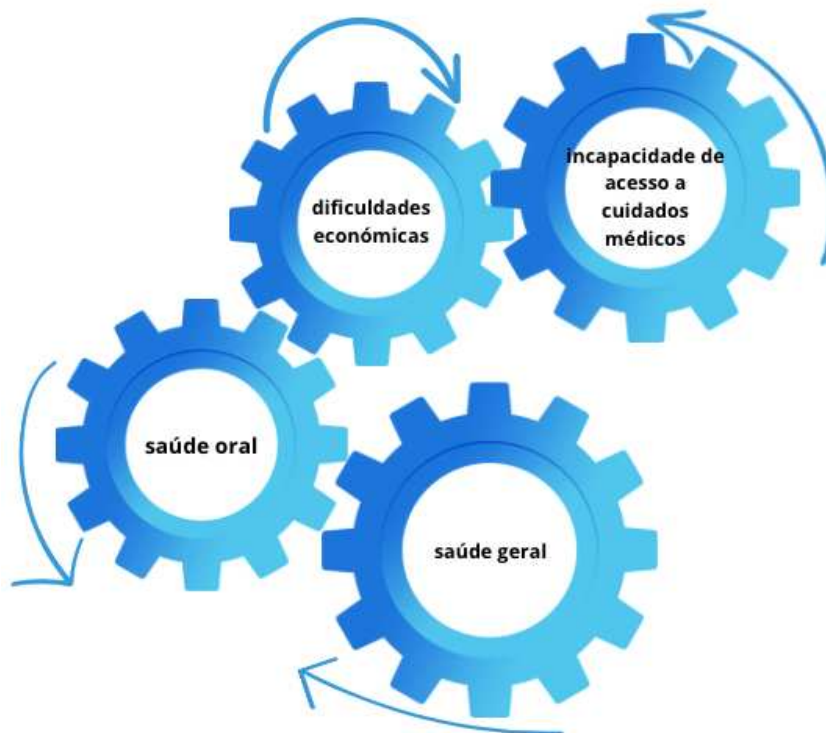


Figure 22 A influência da situação económica na saúde geral e oral (adaptado de Fiorillo, 2019)

Em Portugal, a falta de dinheiro é a segunda razão mais citada pelos portugueses que nunca vão ao dentista, representando 24,4% (Ordem dos Médicos Dentistas, 2023). Diante desse desafio, os estados buscam implementar políticas de oferta pública para incentivar as populações a procurar tratamento. O Serviço Nacional de Saúde (SNS) implementou, nas últimas décadas, uma série de programas com o objetivo de melhorar a saúde oral em Portugal ; alguns exemplos incluem (Serviço Nacional de Saúde, 2018) :

- a criação do Programa Nacional de Promoção da Saúde Oral, visando prevenir e tratar doenças bucais em crianças e também melhorar o conhecimento dentro das escolas.
- a implementação de serviços especiais no contexto da intervenção precoce no cancro oral.
- o estabelecimento de consultas de medicina dentária nos cuidados de saúde primários, com o Despacho n.º 8591-B/2016.
- além disso, a criação dos cheques-dentista que permitem o acesso a determinados tratamentos em dentistas aderentes ao Programa Nacional de Saúde Oral.

(Serviço Nacional de Saúde, 2018)

No entanto, o desafio ainda persiste e a política informativa deve continuar ; pois em 2023 em Portugal, 66,8% dos portugueses não sabiam que o SNS disponibiliza serviços de medicina dentária (Ordem dos Médicos Dentistas, 2023).

3.3.2. Novas estratégias para reduzir as barreiras

Enquanto medidas são implementadas para ajudar os mais desfavorecidos, existem outras barreiras no acesso aos cuidados básicos: a barreira geográfica. As áreas urbanas frequentemente têm muito mais centros de saúde do que as áreas rurais; isso contribui ativamente para uma desigualdade na capacidade de receber tratamento ou adotar boas práticas de higiene oral. Portanto, é importante continuar a promover estratégias na promoção da saúde oral por meio da implementação de programas, campanhas em centros comunitários e acesso a serviços básicos, como escovas de dentes ou pasta de dentes (Hernández-Vasquez et al., 2020).

Com o desenvolvimento de novas tecnologias, estratégias de promoção da saúde estão sendo implementadas para tentar fornecer acesso aos cuidados em áreas remotas. Em um estudo conduzido por Madhi e seus colaboradores (2021), sistemas de Tele-odontologia foram desenvolvidos com o objetivo de fornecer treinamento por meio de cursos digitais sobre cuidados de higiene oral, técnicas de escovagem e saúde oral. Esses programas podem expandir o acesso à saúde oral em áreas remotas. Na verdade, essa forma de consulta teve um aumento significativo durante a pandemia de Covid-19. No entanto, o desafio persiste, pois muitas áreas e populações ao redor do mundo ainda estão sem acesso aos cuidados de saúde oral (Madhi et al., 2021).

III. CONCLUSÃO

O microbioma oral é a chave para o equilíbrio dentro da nossa cavidade oral. Composto por uma variedade de elementos (bactérias, fungos, vírus, ...), acompanha o ser humano desde os primeiros passos na Terra. Graças a ramos como a Paleomicrobiologia, hoje podemos abrir uma verdadeira janela para o passado e tentar entender melhor a relação entre o ser humano, o microbioma oral e a evolução.

Algumas bactérias do passado são hoje muito raras nos microbiomas modernos, enquanto outras, pelo contrário, viram sua prevalência aumentar. Como exposto no presente trabalho, os microbiomas passados e atuais não diferem completamente, sendo que as suas modificações acompanharam muitas vezes transições da história da humanidade (introdução da agricultura, revolução industrial, avanços nas ciências, ...). As patologias mais conhecidas, como a cárie dentária ou a periodontite, cujos agentes etiológicos são as bactérias *S. mutans* e *P. gingivalis/T. denticola*, respectivamente, não apenas acompanham as populações atuais, mas também já eram um desafio para os nossos ancestrais. Se hoje o ser humano implementou meios de tratamento para essas doenças bucais através da adoção de novas práticas de higiene oral, também enfrentou novos flagelos, como o cancro oral (que aumentou significativamente nos últimos séculos). Portanto, é fundamental continuar a lutar pela sensibilização das comunidades e pela educação dos mais jovens, a fim de promover boas práticas de higiene oral ; pois ainda hoje uma grande parte da população não tem acesso aos tratamentos, cuidados e conhecimentos necessários quando sabemos que "A saúde começa pela boca".

IV. BIBLIOGRAFIA

- Adler, C., Dobney, K., Weyrich, L. S., Kaidonis, J., Walker, A. W., Haak, W., Bradshaw, C. J. A., Townsend, G., Sołtysiak, A., Alt, K. W., Parkhill, J., & Cooper, A. (2013). Sequencing ancient calcified dental plaque shows changes in oral microbiota with dietary shifts of the Neolithic and Industrial revolutions. *Nature Genetics*, 45(4), 450–455. <https://doi.org/10.1038/ng.2536>
- Alfouzan, A. F. (2021). Radiation therapy in head and neck cancer. *Saudi Medical Journal*, 42(3), 247–254. <https://doi.org/10.15537/smj.2021.42.3.20210660>
- Allen, R. C. (2017). The Industrial Revolution: A very short introduction. In *Oxford University Press eBooks*. <https://doi.org/10.1093/actrade/9780198706786.001.0001>
- Alt, K. W., Al-Ahmad, A., & Woelber, J. P. (2022). Nutrition and Health in Human Evolution—Past to Present. *Nutrients*, 14(17), 3594. <https://doi.org/10.3390/nu14173594>
- Anxiété - symptômes, causes, traitements et prévention - VIDAL*. (2021). VIDAL. <https://www.vidal.fr/maladies/psychisme/anxiete.html>
- Arweiler, N. B., & Netuschil, L. (2016). The oral microbiota. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (pp. 45–60). https://doi.org/10.1007/978-3-319-31248-4_4
- Baghaie, H., Kisely, S., Forbes, M., Sawyer, E., & Siskind, D. (2017). A systematic review and meta-analysis of the association between poor oral health and substance abuse. *Addiction*, 112(5), 765–779. <https://doi.org/10.1111/add.13754>
- Barbe, A. G. (2018). Medication-Induced xerostomia and Hyposalivation in the elderly: Culprits, complications, and management. *Drugs & Aging*, 35(10), 877–885. <https://doi.org/10.1007/s40266-018-0588-5>
- BARÓMETRO DA SAÚDE ORAL. (2023). *Ordem dos Médicos Dentistas*. <https://www.omd.pt>
- Bataineh, M. T. A., Dash, N. R., Elkhazendar, M., Alnusairat, D. M. H., Darwish, I. M. I., Al-Hajjaj, M. S., & Hamid, Q. (2020). Revealing oral microbiota composition and functionality associated with heavy cigarette smoking. *Journal of Translational Medicine (Online)*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02579-3>
- Borsa, L., Dubois, M., Sacco, G., & Lupi-Pégurier, L. (2021). Analysis the Link between Periodontal Diseases and Alzheimer’s Disease: A Systematic Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(17), 9312. <https://doi.org/10.3390/ijerph18179312>
- Bowen, W. H. (2015). Dental caries – not just holes in teeth! A perspective. *Molecular Oral Microbiology*, 31(3), 228–233. <https://doi.org/10.1111/omi.12132>
- Braeckvelt, X. (2022). La santé orale, un axe majeur de prévention. *Actualités Pharmaceutiques*, 61(614), 8–11. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2021.12.033>

- Bush, L. M. (2024, February 5). *Présentation des bactéries*. Manuels MSD Pour Le Grand Public. <https://www.msmanuals.com/fr/accueil/infections/infections-bact%C3%A9riennes-pr%C3%A9sentation/pr%C3%A9sentation-des-bact%C3%A9ries>
- Canene-Adams, K. (2013). General PCR. In *Methods in Enzymology* (pp. 291–298). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-418687-3.00024-0>
- Chaffee, B. W., Couch, E. T., Vora, M., & Holliday, R. (2021). Oral and periodontal implications of tobacco and nicotine products. *Periodontology 2000*, 87(1), 241–253. <https://doi.org/10.1111/prd.12395>
- Charlier, P., Gaultier, F., & Héry-Arnaud, G. (2019). Interbreeding between Neanderthals and modern humans: Remarks and methodological dangers of a dental calculus microbiome analysis. *Journal of Human Evolution/Journal of Human Evolution*, 126, 124–126. <https://doi.org/10.1016/j.jhevol.2018.06.007>
- Crocq, M. (2015). A history of anxiety: from Hippocrates to DSM. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 17(3), 319–325. <https://doi.org/10.31887/dens.2015.17.3/macrocq>
- Dagli, N., Dagli, R., Baroudi, K., & Tarakji, B. (2015). Oral Paleomicrobiology: Study of ancient oral microbiome. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 16(7), 588–594. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1726>
- Dayo, A., Wolff, M., Syed, A. Z., & Mupparapu, M. (2021). Radiology of dental caries. *Dental Clinics of North America*, 65(3), 427–445. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2021.02.002>
- Deo, P. N., & Deshmukh, R. (2019). Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 23(1), 122. https://doi.org/10.4103/jomfp.jomfp_304_18
- Diyane, K., Ansari, N. E., Mghari, G. E., Anzid, K., & Cherkaoui, M. (2013). Caractéristiques de l’association diabète type 2 et hypertension artérielle chez le sujet âgé de 65 ans et plus. *The Pan African Medical Journal*, 14. <https://doi.org/10.11604/pamj.2013.14.100.1880>
- Dovjak, P. (2022). Polypharmacy in elderly people. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 172(5–6), 109–113. <https://doi.org/10.1007/s10354-021-00903-0>
- Dreyer NS, Lynggaard CD, Jakobsen KK, Pedersen AML, von Buchwald C, Grønhøj C. [Xerostomia]. *Ugeskr Laeger*. 2021 Jul 5;183(27):V11200814. Danish. PMID: 34219641. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34219641/>
- Eick, S. (2020). Biofilms. In *Monographs in oral science* (pp. 1–11). <https://doi.org/10.1159/000510184>
- Falissard, B. (2021). Les addictions, problème du XXIe siècle ? *Bulletin De L’Académie Nationale De Médecine*, 205(7), 744–747. <https://doi.org/10.1016/j.banm.2021.05.009>
- Fan, X., Peters, B. A., Jacobs, E. J., Gapstur, S. M., Purdue, M. P., Freedman, N. D., Alekseyenko, A. V., Wu, J., Yang, L., Pei, Z., Hayes, R. B., & Ahn, J. (2018). Drinking alcohol is associated with variation in the human oral microbiome in a large study of American adults. *Microbiome*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0448-x>

- Fiorillo, L. (2019). Oral Health: The First Step to Well-Being. *Medicina*, 55(10), 676. <https://doi.org/10.3390/medicina55100676>
- Francioli, D., Lentendu, G., Lewin, S., & Kolb, S. (2021). DNA Metabarcoding for the characterization of Terrestrial Microbiota—Pitfalls and Solutions. *Microorganisms*, 9(2), 361. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020361>
- Frigaard, J., Hynne, H., Randsborg, K., Mellin-Olsen, T., Young, A., Rykke, M., Singh, P. B., Hove, L. H., Hofgaard, A. K., & Jensen, J. L. (2023). Exploring oral health indicators, oral health-related quality of life and nutritional aspects in 23 medicated patients from a short-term psychiatric ward. *Frontiers in Public Health*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1083256>
- GenBank Overview. (2013). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- Hanada, K. (2020). Introduction and Perspectives of DNA Electrophoresis. In *Methods in molecular biology* (pp. 1–13). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0323-9_1
- Hellyer, P. (2024). History is hidden in calculus. *British Dental Journal*, 236(3), 192. <https://doi.org/10.1038/s41415-024-7078-4>
- Hernández-Vasquez, A., Vargas-Fernández, R., & Azañedo, D. (2020). Rural and urban disparities in oral hygiene practices among Peruvian children aged less than 12 years: Demographic and Family Health Survey 2018. *Rural and Remote Health*. <https://doi.org/10.22605/rrh5933>
- Jensen, S. B., Vissink, A., Limesand, K. H., & Reyland, M. E. (2019). Salivary gland hypofunction and xerostomia in head and neck radiation patients. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, 2019(53). <https://doi.org/10.1093/jncimonographs/lgz016>
- Khehra, N., Padda, I. S., & Swift, C. J. (2023, March 6). *Polymerase chain Reaction (PCR)*. StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>
- L, G., Xu, T., Huang, G., Jiang, S., Gu, Y., & Chen, F. (2018). Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body. *Protein & Cell*, 9(5), 488–500. <https://doi.org/10.1007/s13238-018-0548-1>
- La maladie carieuse - UFSBD. Union Française pour la santé Bucco-Dentaire* (2021, February 3). UFSBD. <https://www.ufsbd.fr/espace-grand-public/votre-sante-bucco-dentaire/la-maladie-carieuse/>
- La maladie parodontale - UFSBD.* (2017, June 30). UFSBD. *Union Française pour la santé Bucco-Dentaire* <https://www.ufsbd.fr/espace-grand-public/votre-sante-bucco-dentaire/la-maladie-parodontale/>
- Larousse, É. (2024.). *acide ribonucléique ARN - LAROUSSE*. https://www.larousse.fr/encyclopedie/divers/acide_ribonucl%C3%A9ique_ARN/88477
- Larrañaga, S. C., Ruíz, M. E., Vela, P. C., Conde, A. C. C., Villarroya, L. A., Gómez, A. G., Hernández, A. R., & López, I. T. (2019). Atención Primaria y promoción de la salud bucodental: evaluación de una intervención educativa en población infantil. *Atención Primaria*, 51(7), 416–423. <https://doi.org/10.1016/j.aprim.2018.05.003>

- Lejzerowicz, M. (2021). LESZEK KOCZANOWICZ, ANXIETY AND LUCIDITY: REFLECTIONS ON CULTURE IN TIMES OF UNREST. *Society Register*, 5(3), 113–120. <https://doi.org/10.14746/sr.2021.5.3.07>
- Lemos, J. A., Palmer, S., Zeng, L., Wen, Z. T., Kajfasz, J. K., Freires, I. A., Abranches, J., & Brady, L. J. (2019). The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiology Spectrum*, 7(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0051-2018>
- Lin, X., Tang, W., Ahmad, S., Lü, J., Colby, C. C., Zhu, J., & Yu, Q. (2012). Applications of targeted gene capture and next-generation sequencing technologies in studies of human deafness and other genetic disabilities. *Hearing Research*, 288(1–2), 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2012.01.004>
- Londero, A. B., Reiniger, A. P. P., Tavares, R. C. R., Ferreira, C. M., Wikesjö, U. M., Kantorski, K. Z., & Moreira, C. H. C. (2022). Efficacy of dental floss in the management of gingival health: a randomized controlled clinical trial. *Clinical Oral Investigations*, 26(8), 5273–5280. <https://doi.org/10.1007/s00784-022-04495-w>
- Łysik, D., Niemirowicz-Laskowska, K., Bucki, R., Tokajuk, G., & Mystkowska, J. (2019). Artificial saliva: Challenges and future Perspectives for the treatment of xerostomia. *International Journal of Molecular Sciences (Online)*, 20(13), 3199. <https://doi.org/10.3390/ijms20133199>
- Madhusoodanan, J. (2016). Ancient teeth reveal clues about microbiome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(21), 5764–5765. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606592113>
- Mahdi S, S., Allana, R., Amenta, F. (2021, April 1). *Teledentistry-based program to improve Oral Hygiene Indicators in Rural Pakistan-A Protocol*. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34267011/>
- Malbos, E., Rodolphe Oppenheimer, R. (2020). *Psychothérapie et réalité virtuelle*. GoogleBooks. https://books.google.pt/books?hl=fr&lr=&id=nhoIEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT2&dq=soci%C3%A9t%C3%A9+moderne+et+anxi%C3%A9t%C3%A9&ots=WxgWLVil1&sig=fr5vE5g6KwDIV_UFli8onT9I2V8&redir_esc=y#v=onepage&q=soci%C3%A9t%C3%A9%20moderne%20et%20anxi%C3%A9t%C3%A9&f=false
- Maltais, D. (2022). Personnes âgées ayant des incapacités et désastres naturels : vulnérabilité des aînés et post-trauma. *Développement Humain, Handicap Et Changement Social*, 22(1), 119–130. <https://doi.org/10.7202/1086385ar>
- Marques, C. (2017). O consumo da frutose e o seu impacto na saúde humana: a alimentação nos dias de hoje e o risco das doenças cardiovasculares. *Revista Portuguesa De Cardiologia*, 36(12), 943–944. <https://doi.org/10.1016/j.repc.2017.10.002>
- Ménard, C., Grizeau-Clemens, D., Wemaere, J. (2016). *Santé bucco-dentaire des adultes*. Ufsbd. <https://www.ufsbd.fr/wp-content/uploads/2014/06/Evolutions-n°-35-Mars-2016-Santé-bucco-dentaire-des-adultes-INPES-UFSBD.pdf>
- Monchaud, D. (2017). Quadruplexes d'ADN : structures, fonctions et détection. *Medsci*, 33(12), 1042–1045. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173312008>

- Morais, J. A. (2018). Particularités du traitement du diabète de type 2 chez la personne âgée. *Nutrition, Science En Évolution*, 16(1), 13.
<https://doi.org/10.7202/1048941ar>
- Nikita, E. (2016). *Osteoarchaeology*.
 GoogleBooks. https://books.google.pt/books?hl=fr&lr=&id=GmGZCwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=osteoarchaeology&ots=nKaXuXqqjH&sig=0fI3fXoaay uSr3qZ3mU9XXvuXsY&redir_esc=y#v=onepage&q=osteoarchaeology&f=false
- N'Tcha, K., Houéto, D., & Sambieni, N. E. (2024). Prévalence et facteurs associés à la co-consommation d'alcool et de tabac dans la commune de Natitingou, Bénin. *Global Health Promotion*. <https://doi.org/10.1177/17579759241232391>
- Pazan, F., & Wehling, M. (2021). Polypharmacy in older adults: a narrative review of definitions, epidemiology and consequences. *European Geriatric Medicine*, 12(3), 443–452. <https://doi.org/10.1007/s41999-021-00479-3>
- Pedersen, A. M. L., Sørensen, C. E., Proctor, G., Carpenter, G., & Ekström, J. (2018). Salivary secretion in health and disease. *Journal of Oral Rehabilitation*, 45(9), 730–746. <https://doi.org/10.1111/joor.12664>
- Pedersen, A. M. L., Sørensen, C., Proctor, G., & Carpenter, G. (2018). Salivary functions in mastication, taste and textural perception, swallowing and initial digestion. *Oral Diseases*, 24(8), 1399–1416. <https://doi.org/10.1111/odi.12867>
- Peng, X., Cheng, L., You, Y., Tang, C., Ren, B., Li, Y., Xu, X., & Zhou, X. (2022). Oral microbiota in human systematic diseases. *International Journal of Oral Science*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41368-022-00163-7>
- Petersen, P. E., Báez, R., & Ogawa, H. (2020). Global application of oral disease prevention and health promotion as measured 10 years after the 2007 World Health Assembly statement on oral health. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 48(4), 338–348. <https://doi.org/10.1111/cdoe.12538>
- Qin, D. (2019). *Next-generation sequencing and its clinical application*. *Cancer Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0055>
- Radini, A., & Nikita, E. (2023). Beyond dirty teeth: Integrating dental calculus studies with osteoarchaeological parameters. *Quaternary International*, 653–654, 3–18. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2022.03.003>
- Rascovan, N., Huynh, H. T. T., Chouin, G., Adekola, K., Georges-Zimmermann, P., Signoli, M., Desfossés, Y., Aboudharam, G., Drancourt, M., & Desnues, C. (2016). Tracing back ancient oral microbiomes and oral pathogens using dental pulps from ancient teeth. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/s41522-016-0008-8>
- Rudnicka, E., Napierała, P., Podfigurna, A., Męczekalski, B., Smolarczyk, R., & Grymowicz, M. (2020). The World Health Organization (WHO) approach to healthy ageing. *Maturitas*, 139, 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2020.05.018>
- Samaranayake, L., & Matsubara, V. H. (2017). Normal oral flora and the oral ecosystem. *Dental Clinics of North America*, 61(2), 199–215. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2016.11.002>

- Saúde oral.* (2018). SNS. *Serviço Nacional de Saúde*
<https://www.sns.gov.pt/cidadao/saude-oral/>
- Scorrano, G., Nielsen, S. H., Lo Vetro, D., Sawafuji, R., Mackie, M., Margaryan, A., Fotakis, A. K., Martínez-Labarga, C., Fabbri, P. F., Allentoft, M. E., Carra, M., Martini, F., Rickards, O., Olsen, J. V., Pedersen, M. W., Cappellini, E., & Sikora, M. (2022). Genomic ancestry, diet and microbiomes of Upper Palaeolithic hunter-gatherers from San Teodoro cave. *Communications Biology*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04190-2>
- Shang, Q., Gao, Y., Qin, T., Wang, S., Shi, Y., & Chen, T. (2020). Interaction of oral and toothbrush microbiota affects oral cavity health. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00017>
- Sołtysiak, A. (2012). Comment: Low dental caries rate in Neandertals: The result of diet or the oral flora composition? *Homo-journal of Comparative Human Biology*, 63(2), 110–113. <https://doi.org/10.1016/j.jchb.2012.02.001>
- Sroussi, H., Epstein, J. B., Bensadoun, R. J., Saunders, D., Lalla, R. V., Migliorati, C. A., Heavilin, N., & Zumsteg, Z. S. (2017). Common oral complications of head and neck cancer radiation therapy: mucositis, infections, saliva change, fibrosis, sensory dysfunctions, dental caries, periodontal disease, and osteoradionecrosis. *Cancer Medicine*, 6(12), 2918–2931. <https://doi.org/10.1002/cam4.1221>
- Tanasiewicz, M., Hildebrandt, T., & Obersztyn, I. (2016). Xerostomia of Various Etiologies: A Review of the literature. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 25(1), 199–206. <https://doi.org/10.17219/acem/29375>
- Thomas, A. M., Gleber-Netto, F. O., Fernandes, G. R., Amorim, M. F., Barbosa, L. F., Francisco, A. L. N., De Andrade, A. G., Setúbal, J. C., Kowalski, L. P., Nunes, D. N., & Dias-Neto, E. (2014). Alcohol and tobacco consumption affects bacterial richness in oral cavity mucosa biofilms. *BMC Microbiology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0250-2>
- Vatchala Rani, R. M., Kumar, D., Dheer, S. S., Pathania, A. S., Dasara, M. R., & Kaur, N. (2023). Stress depression and anxiety with xerostomia among young Indian adults. *Bioinformation*, 19(13), 1365–1370. <https://doi.org/10.6026/973206300191365>
- Velsko, I. M., Yates, J. a. F., Aron, F., Hagan, R., Frantz, L., Loe, L., Martinez, J. B. R., Chaves, E., Gosden, C., Larson, G., & Warinner, C. (2019). Microbial differences between dental plaque and historic dental calculus are related to oral biofilm maturation stage. *Microbiome*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0717-3>
- Verma, D., Garg, P. K., & Dubey, A. K. (2018). Insights into the human oral microbiome. *Archives of Microbiology*, 200(4), 525–540. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1505-3>
- Victor, J. (2012). La structure de l'ADN en double hélice. *BibNum*. <https://doi.org/10.4000/bibnum.503>

- Volland, J., Gonzalez-Rizzo, S., Gros, O., Tyml, T., Ivanova, N. V., Schulz, F., Goudeau, D., Elisabeth, N. H., Nath, N., Udwary, D. W., Malmstrom, R. R., Guidi-Rontani, C., Bolte-Kluge, S., Davies, K. M., Jean, M., Mansot, J., Mouncey, N. J., Angert, E. R., Woyke, T., & Date, S. V. (2022). A centimeter-long bacterium with DNA contained in metabolically active, membrane-bound organelles. *Science*, 376(6600), 1453–1458.
<https://doi.org/10.1126/science.abb3634>
- Warinner, C. (2016, July 1). *Dental calculus and the evolution of the human oral microbiome*. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27514153/>
- Wensel, C. R., Pluznick, J. L., Salzberg, S. L., & Sears, C. L. (2022). Next-generation sequencing: insights to advance clinical investigations of the microbiome. *Journal of Clinical Investigation*, 132(7). <https://doi.org/10.1172/jci154944>
- Weyrich, L., Duchêne, S., Soubrier, J., Arriola, L. A., Llamas, B., Breen, J., Morris, A., Alt, K., Caramelli, D., Dresely, V., Farrell, M., Farrer, A., Francken, M., Gully, N., Haak, W., Hardy, K., Harvati, K., Held, P., Holmes, E., . . . Cooper, A. (2017). *Neanderthal behaviour, diet, and disease inferred from ancient DNA in dental calculus*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Neanderthal-behaviour%2C-diet%2C-and-disease-inferred-Weyrich-Duch%C3%A4ne/386808454e5733716a73ceb2971a7b220915f1a2>
- Weyrich, L. S. (2020). The evolutionary history of the human oral microbiota and its implications for modern health. *Periodontology 2000*, 85(1), 90–100.
<https://doi.org/10.1111/prd.12353>
- Yadalam, P. K., Arumuganainar, D., Anegundi, R. V., Shrivastava, D., Alftaikhah, S. a. A., Almutairi, H. A., Alobaida, M. A., Alkaberi, A. A., & Srivastava, K. C. (2023). CRISPR-CAS-Based adaptive immunity mediates phage resistance in periodontal red complex pathogens. *Microorganisms*, 11(8), 2060.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11082060>
- Yoshinaga, Y., Daum, C., He, G., & O'Malley, R. (2018). Genome sequencing. In *Methods in molecular biology* (pp. 37–52). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7804-5_4
- Zhang, L., Liu, Y., Zheng, H., & Zhang, C. P. (2020). The oral microbiota may have influence on oral cancer. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00476>
- Zhao, H., Chu, M. K., Huang, Z., Yang, X., Ran, S., Hu, B., Zhang, C., & Ji, L. (2017). Variations in oral microbiota associated with oral cancer. *Scientific Reports (Nature Publishing Group)*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11779-9>