



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in IGIENE DENTALE

Presidente: Prof. A. Putignano

**Il ruolo del Porphyromonas
Gingivalis nell'eziopatogenesi dei
tumori**

Relatore: Chiar.mo

Prof. Maria Rita Rippo

Tesi di Laurea di:

Camilla Leli

Anno accademico 2018/2019

INDICE

INTRODUZIONE	4
CAPITOLO 1	
Concetti di salute e di malattia parodontale	6
<i>1.1 Il cavo orale e la saliva</i>	
<i>1.2 Placca dentale: fattore eziologico della malattia parodontale</i>	
<i>1.3 Risposta immunitaria alla malattia parodontale</i>	
CAPITOLO 2	
Problematiche sistemiche associate a parodontite	14
<i>2.1 Parodontite e malattie sistemiche</i>	
<i>2.2 Parodontite e cancerogenesi</i>	
<i>2.2.1 Treponema denticola e cancerogenesi</i>	
<i>2.2.2 Fusobacterium nucleatum e cancerogenesi</i>	
<i>2.3 Porphyromonas gingivalis e cancerogenesi</i>	
<i>2.3.1 Porphyromonas gingivalis e cancro del tratto aerodigestivo</i>	
<i>2.3.2 Porphyromonas gingivalis e cancro orale</i>	
<i>2.3.3 Porphyromonas gingivalis e cancro esofageo squamoso</i>	
<i>2.3.4 Porphyromonas gingivalis e lesioni precancerose gastriche e del colon</i>	
<i>2.3.5 Porphyromonas gingivalis e cancro pancreatico</i>	

CAPITOLO 3	
Livelli sierici di IgG e IgA specifiche per batteri del cavo orale, IL-6 e rischio di insorgenza dei tumori	31
<i>3.1 Livelli sierici di IgA e IgG contro i batteri orali nel cancro pancreatico</i>	
<i>3.2 Livelli sierici di IgA e IgG contro Porphyromonas gingivalis nel cancro esofageo</i>	
<i>3.3 Livelli sierici di IgA, IgG e IL-6 contro i batteri orali nel cancro orale</i>	
CONCLUSIONI	39
BIBLIOGRAFIA	42
RINGRAZIAMENTI	

INTRODUZIONE

Le malattie parodontali rappresentano delle condizioni patologiche molto diffuse di fronte alle quali, costantemente, l'odontoiatra e l'igienista dentale si trovano a dover lavorare. Esse rappresentano un grave problema di salute pubblica e purtroppo, ancora oggi, hanno un'elevata prevalenza nella popolazione mondiale. Nelle loro forme più gravi, le malattie del parodonto vanno a determinare l'insorgenza di disfunzioni masticatorie e, infine, edentulismo [Papapanou PN et al. 2018]. Per ridurre l'insorgenza delle stesse è dunque fondamentale il concetto di prevenzione; fare prevenzione significa infatti promuovere la salute della popolazione attraverso il miglioramento degli stili di vita, attraverso una corretta diagnosi e attraverso un adeguato trattamento, con il conseguente ripristino funzionale ed estetico dei tessuti parodontali. Questo concetto, che viene applicato al fine di definire la salute del cavo orale, ha in realtà una prospettiva più ampia; è infatti fondamentale per il benessere generale dell'organismo, non solo della bocca. Ciò è dovuto al fatto che il cavo orale è il primo significativo punto di contatto tra l'ambiente interno e l'ambiente esterno, e si ritrova ad essere colonizzato da una moltitudine di microrganismi. Se non viene sottoposto ad ottima igiene orale, sia domiciliare sia professionale, questi batteri non solo proliferano all'interno dei solchi gengivali, facendosi strada fino al raggiungimento dell'osso alveolare, con conseguente perdita di supporto parodontale, ma possono anche raggiungere distretti più lontani ed esplicitare il loro potenziale patogeno.

Con questo lavoro di tesi vorrei infatti mettere in evidenza quanto sia importante porre l'attenzione al cavo orale al fine di preservare la salute generale. Per anni sono stati studiati i legami tra la malattia parodontale e le malattie sistemiche [John V et al. 2016]; di recente si è visto che un particolare parodontopatogeno, il *Porphyromonas gingivalis*, è un fattore eziologico per diverse malattie extraorali; in particolare è coinvolto nella cancerogenesi dell'apparato orodigestivo.

Dopo aver affrontato nel primo capitolo in modo approfondito il tema della parodontite e i meccanismi infiammatori innescati dai batteri che la caratterizzano, nel secondo capitolo tratterò il concetto della cancerogenesi associata ai parodontopatogeni; nello specifico, la stretta relazione tra il *Porphyromonas gingivalis* e il cancro dell'apparato orodigestivo. Infine nel terzo capitolo affronterò il tema della prevenzione, attuabile tramite lo studio dei livelli sierici di quegli anticorpi che si generano contro il *Porphyromonas gingivalis* stesso, per sottolineare maggiormente quanto sia importante prevenire le infezioni orali per garantire la salute generale.

CAPITOLO 1

Concetti di salute e di malattie parodontali

Le malattie parodontali comprendono una vasta gamma di condizioni infiammatorie che colpiscono le strutture portanti dei denti, ovvero gengiva, osso e legamento parodontale, e che potrebbero non solo portare alla perdita dei denti ma anche contribuire all'infiammazione sistemica. L'inizio e la propagazione della malattia parodontale avviene attraverso una disbiosi del microbiota orale commensale, che interagisce con le difese immunitarie dell'ospite provocando infiammazione e malattia. Esistono diverse forme di malattie parodontali, più o meno gravi, che dipendono non soltanto dalla suscettibilità dell'ospite, fattore non modificabile, ma anche da fattori di rischio modificabili, quali il fumo, il diabete, l'assunzione di farmaci... Soltanto tramite una buona igiene orale, che si effettua quotidianamente, con le giuste tecniche, e professionalmente, con specifici strumenti, si possono controllare adeguatamente queste condizioni infiammatorie. Con la nuova classificazione, introdotta nel 2017 e completata nel 2019, sono state elencate le diverse malattie parodontali, partendo dall'introduzione del concetto di salute.

L'American Academy of Periodontology (AAP) definiva la salute dell'individuo come *«la condizione di un paziente quando esiste una funzione senza evidenza di malattia o anomalia»* [AAP 2001]; questa definizione, applicata a un piano puramente parodontale, si basava su dei requisiti utopistici in quanto, per definire un soggetto in salute, veniva richiesto un parodonto totalmente incontaminato. Ad oggi sappiamo che è impossibile trovarlo; infatti, un minimo livello di infiltrato infiammatorio è sempre presente, come conseguenza di una continua sorveglianza da parte del sistema immunitario [Mariotti A, Hefti AF. 2015]. Il valore di infiammazione però, rilevabile dall'indice di sanguinamento BoP che si effettua in studio odontoiatrico con sonda parodontale, non deve superare il

10%; in queste condizioni il paziente è definito in salute. Quando il rapporto percentuale tra i siti sanguinanti e i siti totali supera questo valore, allora si esclude inevitabilmente lo stato di salute e si rientra nelle condizioni o di gengivite o di parodontite.

Prima di poter parlare dei processi infiammatori veri e propri è necessario capire come i microrganismi vanno ad aderire alle superfici dentali e cosa fanno, o producono, per poter generare infiammazione ed eventualmente, malattia. Fondamentali sono i “primi colonizzatori”, gli Streptococchi, in grado di legarsi alla superficie dello smalto tramite interazione fisico-chimica tra le molecole cariche sulla cellula e quelle sulla superficie dell’ospite [Busscher & van der Mei, 1997]. Questi microrganismi crescono e vanno a modificare le condizioni ambientali locali, rendendo il sito adatto alla colonizzazione da parte di specie più esigenti; queste, conosciute come “colonizzatori tardivi”, si legano alle specie già adese con un meccanismo di co-aggregazione o coesione [Kolenbrander et al. 2000; Kolenbrander & London, 1993]. A favorire questo legame è responsabile un microrganismo che funge da ponte, il *Fusobacterium nucleatum*, il quale rientra nella categoria delle *specie core* [Anilei Hoare et al. 2019]. Questi fenomeni di aggregazione batterica sono alla base del processo di formazione di un biofilm complesso noto come placca dentale, la quale è un esempio di comunità microbica [Marsh & Bradshaw, 1999]. L’aumento generale della massa della placca attorno al margine gengivale è la principale causa di spostamento dallo stato di salute verso la prima forma di malattia parodontale, la gengivite. Questa è una condizione totalmente reversibile che non influisce sulle strutture portanti dei denti ma, clinicamente, è da considerare il punto di partenza per lo sviluppo delle parodontiti, «*innescate da uno squilibrio tra il microbiota subgengivale residente e la risposta infiammatoria dell’ospite*» [Anilei Hoare et al. 2019].

1.1 Il cavo orale e la saliva

Il cavo orale è un importante punto di contatto tra l'ambiente interno e l'ambiente esterno. Quando vi si fa riferimento lo si considera però non soltanto come un sito di transito da parte dei batteri, ma anche, e soprattutto, come un sito di colonizzazione stabile. Grazie a caratteristiche quali temperatura e PH ottimali, umidità generata dalla saliva, presenza di nutrienti eccetera, la microflora del cavo orale lo rende secondo per densità batterica, dopo l'intestino, e primo per diversità delle specie. Infatti non è un ambiente uniforme, ma è un insieme di habitat che consente la crescita di numerosi e differenti microrganismi [Yangheng Zhang et al. 2018]. Dunque, il microbioma orale si presenta come una complessa comunità ecologica [Arweiler NB et al. 2016]. Le diverse specie batteriche che compongono la microflora orale sono mantenute in equilibrio fra loro per la presenza della saliva, che svolge infatti un'importante azione protettiva, prevenendo l'impianto di specie patogene. La composizione della saliva è fortemente influenzata dalle ghiandole salivari, maggiori e minori, le quali, se funzionano male, determinano arrossamento, irritazione, perdita di sensibilità della lingua e un maggior accumulo di placca batterica e di materia alba; ciò è alla base non solo dello sviluppo delle carie ma anche della rapida progressione della malattia parodontale. Infatti, la saliva ha un fondamentale potere tampone, in quanto aumenta la concentrazione di bicarbonato e rende il PH del cavo orale basico, capace quindi di frenare i processi di demineralizzazione, responsabili della carie, e di formazione del tartaro. La saliva non è un composto omogeneo ma presenta un'ampia varietà di proteine, quali le mucine, le immunoglobuline secretorie, la lattoferrina, il lisozima, la lactoperossidasi, le istatine, le amilasi e le inibine, capaci di svolgere funzioni antibatteriche, antifungine e batteriostatiche. Dalla saliva, sulla superficie del dente, si viene a formare un rivestimento esogeno ed eterogeneo definito pellicola acquisita. Quest'ultima è estrinseca e incolore ma soprattutto è acellulare, il che significa che non

contiene batteri anche se rappresenta la fase iniziale della colonizzazione. La pellicola acquisita svolge un ruolo protettivo fondamentale, in quanto costituisce una barriera contro gli acidi, ma è importante ricordare che ha anche un ruolo ritentivo, poiché è la struttura granulata su cui la placca microbica aderisce, matura e colonizza.

1.2 Placca dentale: fattore eziologico della malattia parodontale

La placca dentale è il risultato di una complessa confluenza di microrganismi relativamente organizzati [Marsh & Bradshaw, 1999]; *«non è residuo alimentare, non è materia alba, non è composta solo di batteri, ma è il comune denominatore della carie e della malattia parodontale»*. La formazione della placca dentale inizia da quella della pellicola acquisita che, come già accennato, subisce la colonizzazione di diverse specie batteriche. Dal microscopio elettronico si evince che la placca è una struttura stratificata nella quale i microrganismi si ritrovano inglobati in una sostanza extracellulare originata dai microbi stessi e dalla saliva. La percentuale dei batteri Gram-positivi contenuti all'interno della placca dentale tende a diminuire nel momento in cui si passa dalla condizione di gengiva sana a quella di gengiva infiammata, per scendere poi radicalmente nella placca di un soggetto affetto da parodontite. Al contrario, i Gram-negativi aumentano fortemente con l'aumentare della severità della malattia, fino al raggiungimento di un 90% nei soggetti con parodontite. Questa osservazione non permette di prevedere in quali siti la patologia tenderà a progredire, ma sicuramente consente di individuare quali sono i siti a rischio. La placca viene distinta in sopragengivale e sottogengivale, la quale a sua volta si divide in placca aderente e placca fluttuante, o libera. Hanno entrambe una simile struttura e sono strettamente correlate tra loro, tanto che il controllo di quella sopragengivale influisce sulla proliferazione batterica sottostante. Ciò per cui differiscono l'una dall'altra è la composizione. Infatti, mentre quella sopragengivale è costituita prevalentemente dai microrganismi aerobi Gram-positivi, quella sottogengivale è composta da Gram-negativi

anaerobi ad alta capacità distruttiva, responsabili del riassorbimento osseo [Carlo Guastamacchia e Viviana Ardizzone; 2001]. Per comprendere l'origine della parodontite occorre analizzare nello specifico le specie microbiche della placca sottogengivale, che si formano e che si accumulano all'interno del solco; quest'ultimo, presente tra il margine libero della gengiva e lo smalto del dente, con profondità fisiologica che va da 1 mm a 3 mm circa, rappresenta una sorta di nicchia ecologica in grado di offrire protezione ai batteri anaerobi non in grado di tollerare l'ossigeno. Questo spiega perché, in condizioni di trascurata igiene orale, la percentuale di specie anaerobiche tende ad accrescersi sempre di più, determinando un aumento della profondità del solco e conseguente genesi della cosiddetta tasca parodontale. Le specie batteriche che si ritrovano nei soggetti affetti da parodontite sono generalmente riconducibili ai colonizzatori tardivi, differentemente dai pazienti in salute nei quali si riscontra una prevalenza di colonizzatori primari. In tutti gli studi che sono stati effettuati al fine di conoscere quali fossero i batteri subgengivali anaerobi in grado di promuovere l'insorgenza e lo sviluppo della parodontite, sono emerse specie come *Filifactor alocis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Tannerella forsythiae* e *Treponema denticola* [Moore & Moore. 1994; Socransky et al. 1998]. L'"ipotesi specifica sulla placca" suggerisce che, sulla diversa raccolta di specie presenti nella placca stessa, solo un numero relativamente piccolo è direttamente coinvolto nella causa della malattia [Loesche, 1976]. Il *Porphyromonas gingivalis* svolge un ruolo fondamentale; è stato infatti individuato come "patogeno-chiave", ovvero come il responsabile dei cambiamenti dell'omeostasi del microbiota normale, in grado di determinare la perdita dell'equilibrio esistente tra tutti i componenti della placca. Ciò scatena una sinergia tra i patogeni-chiave e i patogeni accessori, che provoca un aumento della virulenza non soltanto del patogeno-chiave ma dell'intera comunità microbica [Hajishengallis G. et al. 2012]. Dunque la

parodontite non è semplicemente generata dalla presenza di singoli patogeni, ma è dovuta a sinergie e disbiosi polimicrobiche associate a una risposta immunitaria sregolata che induce danno tessutale mediato da infiammazione.

1.3 Risposta immunitaria alla malattia parodontale

Le infezioni batteriche generate dall'accumulo di microrganismi patogeni all'interno del solco gengivale sono fondamentali per il richiamo delle cellule del sistema immunitario. Quest'ultimo infatti è un fattore protettivo contro le stesse infezioni. Quando si parla di sistema immunitario non è sufficiente considerarlo soltanto come il responsabile della difesa dell'ospite, perché svolge un ruolo molto più importante: è un meccanismo di sorveglianza globale necessario e fondamentale per mantenere l'integrità dei tessuti. Una delle prime risposte del sistema immunitario contro le infezioni è l'infiammazione [Sattler S. 2017]. Essa è per definizione «[...] un processo morboso, detto anche flogosi, consistente in una reazione locale all'azione irritante di stimoli di natura diversa (chimica, fisica, meccanica, e soprattutto batterica) [...]». È un meccanismo di difesa innato, non specifico, che costituisce una risposta protettiva contro l'azione dannosa di agenti fisici, chimici e biologici, il cui obiettivo finale è non solo l'eliminazione della causa iniziale di danno cellulare o tissutale, ma anche l'avvio del processo riparativo. Il sistema immunitario che deve fronteggiare queste condizioni infiammatorie attua dei meccanismi di difesa che si dividono in immunità innata, o aspecifica, e immunità adattiva, o specifica. Mentre la prima rappresenta la generica linea di difesa nei confronti di tutti gli agenti infettivi, la seconda ha l'abilità di riconoscere e distruggere specificatamente il patogeno o i prodotti da esso elaborati. L'immunità innata presenta come prima linea di difesa le barriere esterne; una volta attraversate, entrano in gioco quelle interne. Queste ultime sono rappresentate da componenti cellulari, quali fagociti e cellule Natural Killer, da componenti molecolari, come il sistema del complemento, da fattori solubili con attività antimicrobica e da un

complesso sistema di molecole, dette citochine, che hanno il ruolo di coordinare le attività di tutte le cellule implicate nella risposta immunitaria. Nella risposta aspecifica il riconoscimento dell'antigene avviene da parte dei macrofagi, i quali rilasciano le cosiddette citochine primarie: interleuchina-1, interleuchina-6, interleuchina-10 e interferone- α . Queste aderiscono alle cellule endoteliali e favoriscono l'adesione dei fagociti. A seguito dell'attivazione dell'immunità innata si attiva anche quella adattiva. Quest'ultima si articola in immunità umorale e immunità cellulo-mediata; la prima si basa sulla secrezione degli anticorpi da parte dei linfociti B, i quali si legano alla superficie degli antigeni presenti; la seconda, invece, protegge l'organismo mediante il riconoscimento diretto da parte dei linfociti T dell'antigene estraneo; entrambe portano alla formazione di cellule della memoria, importanti per la difesa dell'organismo da successive esposizioni allo stesso antigene. La risposta infiammatoria può andare incontro a diversi destini a seconda dell'efficacia e della velocità della risposta immunitaria; infatti, se l'immunità agisce repentinamente è possibile avere una guarigione completa con il ripristino dei tessuti in condizioni fisiologiche. Se la risposta avviene in ritardo determina una cicatrizzazione della lesione tissutale, causata dall'infiammazione stessa. Se, invece, la risposta è insufficiente, si induce un'infiammazione cronica dell'area interessata, con distruzione del tessuto. A livello parodontale dunque, la presenza di batteri patogeni nel solco gengivale è la principale causa di gengivite, che si presenta con i tipici segni dell'infiammazione acuta. Questa condizione è ancora reversibile ma, se i microrganismi non vengono adeguatamente rimossi l'infiammazione persiste e tende a cronicizzare, provocando quelli che sono i danni tipici della parodontite: riassorbimento osseo, mobilità e perdita dei denti. Per questo, gengivite e parodontite sono due stadi diversi di una stessa malattia, generata da un'infiammazione non controllata che passa da acuta a cronica. Sebbene i processi infiammatori si verificano localmente nella cavità orale, numerosi studi

hanno stabilito che i mediatori infiammatori prodotti durante la parodontite, così come le specie subgingivali e i componenti batterici, possano diffondere e contribuire alla genesi di varie malattie extraorali. Tra queste, è alto il rischio di sviluppo di diversi tipi di cancro; in particolare, il tumore orodigestivo.

CAPITOLO 2

Problematiche sistemiche associate alla malattia parodontale

Come precedentemente descritto, la cavità orale ospita diversi milioni di batteri che sono responsabili non solo delle principali infiammazioni orali, gengivite e parodontite, ma anche di diverse malattie sistemiche.

La diffusione dei microbi orali è una condizione che si verifica frequentemente e può avvenire in diversi modi, con differenti manovre, sia domiciliari sia professionali. Infatti, alla base della batteremia sono non soltanto le estrazioni dentali e l'igiene orale professionale, che si eseguono in studio odontoiatrico, ma anche e forse soprattutto, le quotidiane tecniche di spazzolamento dentale e, addirittura, la semplice masticazione [Perez-Chaparro PJ et al. 2011]. Queste azioni determinano una rapida diffusione dei batteri orali in tutto il corpo, provocando infiammazione acuta e cronica. Per molti anni è stato quindi affrontato il concetto di cavo orale come fonte di infezione a distanza [Kumar PS, 2013].

2.1 Parodontite e malattie sistemiche

Tra le principali problematiche sistemiche associate alla malattia parodontale rientrano:

1. *Malattie cardiovascolari*; l'American Heart Association (AHA) ha dichiarato che la parodontite è associata in modo indipendente alla malattia vascolare arteriosclerotica [Gaetti-Jardim E Jr et al. 2009]. Numerosi studi condotti negli anni successivi hanno affrontato la solida associazione tra salute orale e malattie cardiovascolari, dimostrando che i soggetti affetti da parodontite cronica presentano un aumentato rischio di malattia aterosclerotica rispetto ai soggetti in salute parodontale [Dietrich T et al. 2017]. Infatti, negli ateromi di quei soggetti che

soffrono di malattia parodontale si è riscontrata un'elevata presenza dei principali batteri parodontopageni, quali *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Fusobacterium nucleatum*. Questi batteri entrano direttamente nella circolazione sistemica e producono endotossine, come i lipopolisaccaridi (LPS), in grado di indurre a produzione di citochine infiammatorie, di sovraregolare le molecole di adesione endoteliale e infine indurre un ambiente protrombotico [Bradley Field Bale et al. 2017].

Uno studio di coorte retrospettivo ha dimostrato che la terapia parodontale è in grado di ridurre il rischio di malattie cardiovascolari, in particolare l'infarto del miocardio e l'insufficienza cardiaca [Peng CH et al. 2017].

2. *Artrite reumatoide*. È stata osservata in diversi studi una stretta relazione tra artrite reumatoide e malattia parodontale; infatti, entrambi i disturbi hanno un'importante caratteristica in comune, ovvero quella di derivare da uno squilibrio nella risposta immunoinfiammatoria. L'artrite reumatoide è definita come una malattia infiammatoria autoimmune, caratterizzata dall'accumulo di leucociti nella membrana sinoviale, il tessuto presente all'interno delle articolazioni, in grado di portare alla sinovite e alla distruzione dell'architettura articolare [Araújo VM et al. 2015].

Anche nell'eziopatogenesi dell'artrite reumatoide gioca un ruolo chiave il *Porphyromonas gingivalis*; «quest'ultimo è l'unico patogeno noto che esprime la *peptidilarginina deiminasi*, la quale catalizza la citrullinazione dei peptidi contenenti arginina. Ciò è degno di nota perché si ritiene che gli antigeni citrullinati determinino risposte immunitarie adattive che sono quasi esclusive dell'Artrite reumatoide» [Mikuls TR et al. 2014].

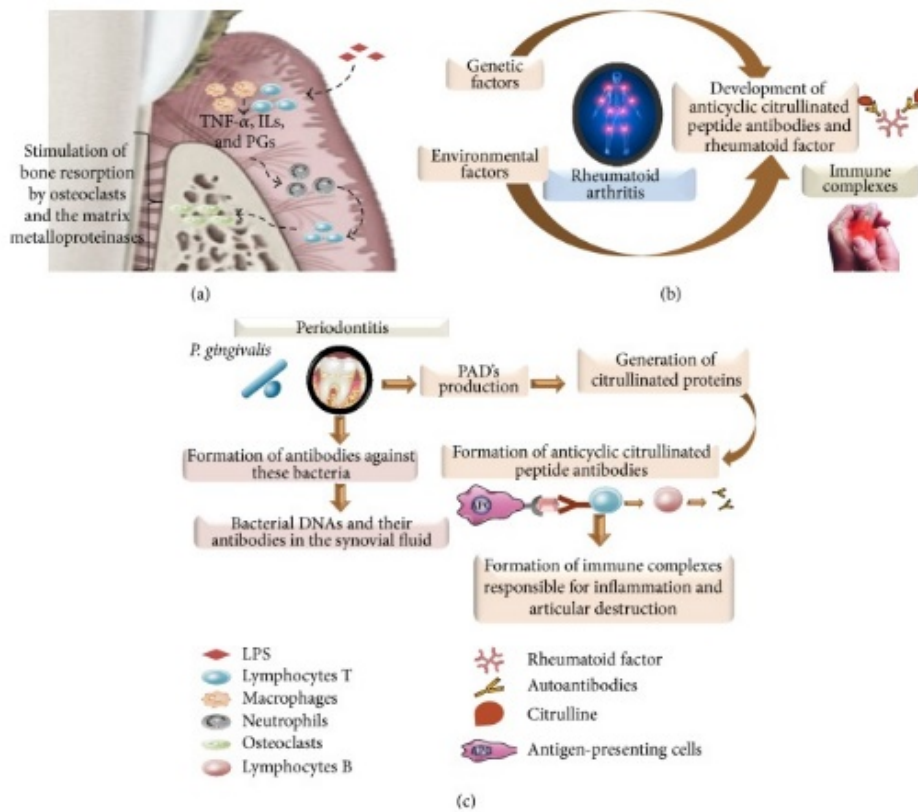


Figura 1. Araújo VM et al. Mediators Inflamm. 2015;2015:259074.

Schema sulla relazione tra parodontite e artrite reumatoide.

- (a) Patogenesi della parodontite e degli effetti promossi dai lipopolisaccaridi presenti nei periodontopatogeni.
- (b) Il coinvolgimento di fattori genetici e ambientali nello sviluppo dell'artrite reumatoide.
- (c) Possibili meccanismi che spiegano la relazione tra l'artrite reumatoide e la parodontite

3. *Cancro*: numerosi studi indicano che una cattiva salute parodontale, e le conseguenti infezioni e infiammazioni, possono essere degli importanti fattori di rischio per il cancro [KS Rajesh et al. 2013]. Hujoel et al. nel 2003 hanno studiato l'associazione tra la parodontite e i diversi tipi di cancro; tra questi particolarmente rilevante è stato il cancro all'apparato digerivo.

Sebbene gli esatti meccanismi coinvolti nella promozione del cancro da parte dei batteri parodontali non siano stati completamente chiariti, gli effetti infiammatori locali innescati dall'infezione batterica sono stati associati alla trasformazione cellulare.

2.2 Parodontite e cancerogenesi

La cancerogenesi è un processo a più stadi che provoca la genesi del cancro; è caratterizzato da una serie di mutazioni le quali contribuiscono alla destabilizzazione del citoscheletro cellulare e alla perdita di adesività alle cellule vicine.

Questi cambiamenti si verificano sotto l'influenza di specifici fattori cancerogeni, che possono essere determinati dalle specie batteriche.

La carcinogenesi consiste in tre fasi: iniziazione, promozione e progressione.

Nella fase di iniziazione si verifica una mutazione irreversibile, che viene trasmessa alle cellule figlie e che a livello morfologico causa iperplasia o displasia.

Nella fase successiva di promozione si ha l'accumulo di cambiamenti genetici ed epigenetici, che conducono alla conversione di una cellula mutata in una cellula cancerosa. Tale cellula subisce divisioni incontrollate ed è caratterizzata da una perdita di differenziazione. Durante questa fase le cellule presentano una maggiore mobilità, invasività e perdita di integrità con le cellule vicine.

L'ultimo stadio è la progressione, in cui le cellule tumorali acquisiscono la capacità di invadere i tessuti e di metastatizzare. Queste cellule, divenute dunque tumorali, sono responsabili della secrezione di fattori di crescita che stimolano altre cellule sane a produrre agenti in grado di aumentare l'invasività delle cellule tumorali [Chojnacki M et al. 2017].

Tra tutte le specie batteriche subgingivali trovate nei tessuti tumorali, esistono informazioni relative ai meccanismi cancerogeni innescati da alcune di esse. Un ruolo particolare è rivestito dal *Porphyromonas gingivalis*, anaerobio orale Gram-negativo, membro naturale del microbioma orale, il quale può diventare altamente distruttivo e

proliferare in un elevato numero di cellule nelle lesioni parodontali grazie al suo arsenale di fattori di virulenza specializzati [Jaroslav Mysak et al. 2014]. Sebbene non siano ancora perfettamente chiari i meccanismi interni più complessi, gli approfondimenti della ricerca relativa a questo batterio hanno riportato che la proteina della membrana esterna contribuisce all'interazione e alla colonizzazione dell'ospite, all'evasione della difesa immunitaria e alla distruzione dei tessuti parodontali. Ciò è in grado di spiegare come il *Porphyromonas gingivalis* sia strettamente associato all'eziopatogenesi dei tumori dell'apparato digerente; tra questi, il carcinoma a cellule squamose nella cavità orale, il carcinoma esofageo squamoso nel tratto digestivo e il carcinoma pancreatico nei tessuti del pancreas. Sebbene il *Porphyromonas gingivalis* sia il batterio principalmente responsabile, un importante contributo è dato anche da altre specie batteriche patogene, tra cui il *Treponema denticola* e il *Fusobacterium nucleatum*.

2.2.1 *Treponema denticola* e cancerogenesi

Il *Treponema denticola* è uno spirochete anaerobico che ha come principale fattore di virulenza una proteinasi simile alla chimotripsina, detta CTLP, legata alla superficie cellulare e nota anche come dentilisina. Numerosi studi hanno confermato la presenza di questo fattore di virulenza nei principali tumori orodigestivi; infatti, questo fattore è in grado di esplicare numerose funzioni: può degradare più proteine ospiti, può idrolizzare i peptidi bioattivi, può contribuire alla penetrazione del *Treponema denticola* nell'epitelio e può migliorare l'integrazione del batterio stesso nelle comunità di biofilm [Grenier et al, 1990]. Inoltre, è in grado di modulare l'immunità e l'infiammazione e guidare l'apoptosi in vari tipi di cellule. Di notevole importanza però è la capacità del CTLP di convertire pro-metallo proteasi-8 e pro-metallo proteasi-9 nelle loro forme attive, le quali sono strettamente associate a metastasi in lingua, esofago, stomaco e pancreas [Nieminen MT et al. 2018]. Le MMP infatti regolano l'invasione e lo stravasamento del tessuto delle cellule

tumorali, l'angiogenesi e l'infiammazione e quindi hanno un impatto notevole sul microambiente tumorale [Kessenbrock et al, 2010].

2.2.2 Fusobacterium nucleatum e cancerogenesi

Diversi studi si sono incentrati sulla valutazione dei meccanismi di carcinogenesi attuati dal *Fusobacterium nucleatum*, in particolare sulla sua stretta relazione con i tumori della cavità orale, del pancreas e del colon-retto. Recenti scoperte hanno dimostrato che questo microrganismo potrebbe essere considerato il fattore di rischio per questi tumori.

I più importanti meccanismi di carcinogenesi sono l'infezione cronica e la soppressione immunitaria. Le principali molecole coinvolte nello spostamento delle normali cellule epiteliali in cellule tumorali sono *FadA*, *Fap2* e *LPS*, fattori di virulenza ben caratterizzati del *Fusobacterium nucleatum* [Gholizadeh P. et al. 2017].

L'adesina *FadA* è una tossina in grado di potenziare la crescita tumorale; induce infiammazione e attiva le vie procarcinogene direttamente nelle cellule del colon-retto, attivando la segnalazione di E-caderina- β -catenina, coinvolta nella sopravvivenza cellulare.

La proteina autotrasportatrice *Fap2* riduce la citotossicità delle cellule immunitarie, favorendo la progressione del cancro.

Il lipopolisaccaride *LPS* del *Fusobacterium nucleatum* induce la produzione di citochine infiammatorie sia nella gengiva sia nel tessuto colico. Coerentemente infatti si è verificato un aumento dell'espressione di citochine proinfiammatorie come IL-6, IL-12, IL-17 e TNF- α in soggetti con adenoma coloretale [Anilei Hoare et al. 2019].

2.3 Porphyromonas gingivalis e cancerogenesi

Il *Porphyromonas gingivalis* è un patogeno caratterizzato dalla presenza sulla membrana esterna di glucosio, galattosamina, glucosamina, composti dell'acido urico e

lipopolisaccaride (LPS) [Amrita Singh et al. 2011]. Numerose prove dimostrano una stretta associazione tra la cancerogenesi e la parodontite e si è visto che questo batterio svolge un ruolo fondamentale. Infatti è il parodontopatogeno anaerobio maggiormente coinvolto nella progressione della malattia parodontale e che si ritrova quindi ad essere il responsabile non solo della disbiosi alla base della parodontite ma anche delle problematiche infiammatorie ad essa associate.

Il *Porphyromonas gingivalis* ha la capacità di invadere, di proliferare e di sopravvivere nelle cellule epiteliali della gengiva e di diffondersi alle cellule contigue, e lo fa tramite specifici fattori di virulenza, coinvolti nella diretta attivazione dell'infiammazione e della proliferazione cellulare. Tra questi vi sono il nucleoside difosfato chinasi (NDK), il FimA, le LPS, le gingipains e il GroEL. I primi tre partecipano ai primi stadi della carcinogenesi, mentre gli ultimi due sono associati a stadi successivi.

Il *nucleoside difosfato chinasi* NDK svolge un ruolo molto importante; esso determina una fosforilazione diretta di HSP27 che, in questa forma fosforilata, va ad inibire la proteina Daxx (proteina 6 associata alla morte), responsabile dell'apoptosi e, inoltre, va a contrastare l'apoptosi indotta da TNF- α . Ciò determina come conseguenza un aumento dei livelli di pro-MMP-9.

La *FimA* è la proteina componente principale delle appendici filamentose adesive, le cosiddette fimbrie, abbondantemente presenti nel *Porphyromonas gingivalis*. Questa ha un ruolo fondamentale nella cancerogenesi; infatti attenua la soppressione tumorale mediata da p53 ospite e la progressione del ciclo cellulare nelle cellule epiteliali orali.

Il *lipopolisaccaride* LPS prodotto dal *Porphyromonas gingivalis*, in particolare la regione dell'antigene O, determina un aumento dell'espressione di TLR4; attraverso i Toll-like receptor, recettori in grado di riconoscere specifici patogeni tra cui le stesse LPS, il batterio

riesce ad interagire con le cellule epiteliali orali, determinando una maggiore proliferazione dell'OSCC.

Le *gingipains* sono proteasi gengivali secrete dal *Porphyromonas gingivalis*, le quali attivano NF-κB e MMP-9. Il primo è un complesso proteico funzionante come fattore di trascrizione; si può trovare in tutti i tipi di cellule ed è coinvolto in tutte le reazioni delle cellule agli stimoli. Gioca un ruolo chiave nella regolazione della risposta immunitaria alle infezioni e le sue disfunzioni sono state collegate al cancro. La MMP-9, matrice metalloproteinasi 9, è una classe di enzimi coinvolta nella degradazione della matrice extracellulare. Entrambi sono dunque fortemente coinvolti nell'invasione delle cellule tumorali e nella metastasi.

Infine il *GroEL*, prodotto dal *Porphyromonas gingivalis*, appartenente alla classe delle chaperonine, è responsabile dell'aumento di volume del tumore.

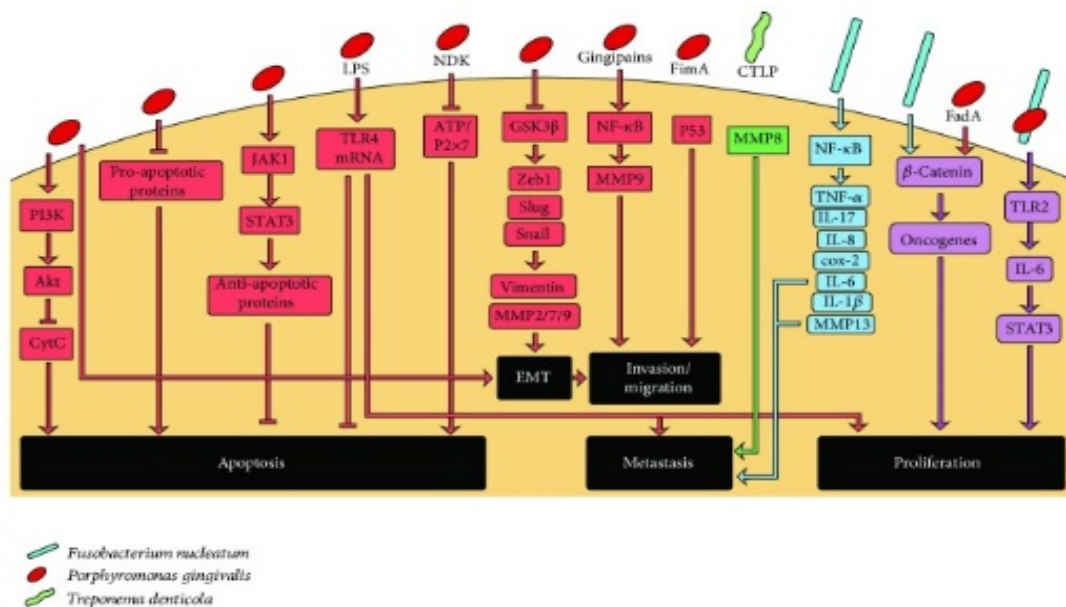


Figura 2. Hoare A et al. Mediators Inflamm. 2019;2019:1029857.

Meccanismi di risposta dell'ospite della trasformazione cellulare indotti da batteri parodontali. L'inibizione dell'apoptosi, la transizione epiteliale-mesenchimale (EMT), l'invasione e la migrazione, la metastasi e la proliferazione sono innescate dall'attivazione di percorsi prooncogenici da parte di *P. gingivalis*, *T. denticola*, *F. nucleatum* e *P. gingivalis* + *F. nucleatum*.

Le vie responsabili della trasformazione cellulare sono l'inibizione dell'apoptosi, la transizione epiteliale mesenchimale, l'invasione e la migrazione, la metastasi e la proliferazione.

L'inibizione della morte cellulare per apoptosi avviene per diversi meccanismi; il primo si basa sull'attivazione del *pathway P13k/Akt* e sull'inibizione del rilascio del *citocromo c*. *P13k* è un enzima che viene attivato in presenza di un determinato ligando, in genere un fattore di crescita, e determina la fosforilazione di vari substrati, tra cui il responsabile dell'attivazione della *Akt*, la proteina determinante la resistenza all'apoptosi. Il rilascio di *citocromo c* viene invece inibito poiché questa proteina è un fondamentale intermedio dell'apoptosi. Il secondo meccanismo consiste invece nell'attivazione della via *JAK/STAT*, la quale tramite le proteine Janus chinasi (*JAK*) e le proteine trasduttrici del segnale (*STAT*), ha un fondamentale ruolo decisionale nel destino delle cellule [Sayehmiri F et al. 2011]. Contribuiscono inoltre all'inibizione della morte cellulare per apoptosi le proteine pro-apoptotiche, le quali vengono disattivate dai batteri parodontali.

La transizione epiteliale mesenchimale è promossa dal *glicogeno sintasi chinasi 3* (*GSK3-β*); questa proteina fosforila 3 residui di serina nel dominio citoplasmatico della E-caderina, provocando un aumento dell'affinità e del numero di interazioni con la β -catenina. Quest'ultima, una sub-unità del complesso proteico della caderina, è associata alla sopravvivenza cellulare; una sua maggiore espressione va a sovraregolare le cicline ZEB1 e MMP, determinando come conseguenza un aumento della proliferazione e della migrazione delle cellule epiteliali.

Da quanto descritto si evince che questo batterio è il patogeno orale chiave alla base dello sviluppo del cancro all'apparato orodigestivo [Ahn J, Segers S, Hayes RB 2012].

Quando si parla di tumore del tratto orodigestivo si fa riferimento al:

- 1) Cancro della testa e del collo (tratto aerodigestivo);
- 2) Cancro orale;
- 3) Cancro del tratto esofageo;
- 4) Lesioni precancerose gastriche;
- 5) Cancro pancreatico.

2.3.1. Porphyromonas gingivalis e cancro del tratto aerodigestivo

Il carcinoma a cellule squamose della testa e del collo, abbreviato in HNSCC, è il sesto tumore più comune al mondo con un tasso di sopravvivenza del 50–60%. Alcuni studi effettuati su campioni di HNSCC hanno evidenziato che l'LPS del *Porphyromonas gingivalis* tende a promuovere l'invasione delle linee cellulari primarie e lo sviluppo di metastasi.

2.3.2 Porphyromonas gingivalis e cancro orale

Numerosi studi hanno indicato che il *Porphyromonas gingivalis* potrebbe essere un importante fattore eziologico del carcinoma orale a cellule squamose OSCC [Lafuente Ibáñez de Mendoza I et al. 2019]. Il cavo orale rappresenta il primo tratto dell'apparato digestivo ed è importante capire a quali rischi può andare incontro se persiste la presenza dei batteri parodontali, soprattutto perché, molte volte, i sintomi del cancro orale possono essere molto simili a quelli delle generiche lesioni parodontali, come gonfiore, sanguinamento, mobilità dei denti, tasca parodontale profonda e distruzione ossea [Yang et al. 2018]. Quando si parla di cancro del cavo orale si fa nella maggior parte dei casi riferimento al carcinoma a cellule squamose, la neoplasia più frequente della cavità orale e dei siti adiacenti [Gholizadeh P et al. 2016]. Il cancro orale comprende neoplasie maligne che possono coinvolgere tutte le strutture, a partire dalle mucose di rivestimento delle

labbra e della bocca fino ai terzi anteriori della lingua [Yao QW et al. 2014]. Gli elementi che contribuiscono alla genesi del cancro orale sono innanzitutto i fattori di rischio associati agli stili di vita, vale a dire fumo, alcool, obesità e scarsa igiene orale; questi facilitano la genesi e la progressione del tumore, in quanto in presenza di etanolo, ad esempio, il *Porphyromonas gingivalis* è in grado di esplicare ancor più facilmente il suo potenziale patogeno convertendolo in acetaldeide, un derivato cancerogeno in grado di contribuire al danno del DNA, alla mutazione e all'eccessiva proliferazione dell'epitelio [Salaspuro MP, 2003].

Nella genesi del carcinoma orale a cellule squamose OSCC si verificano i meccanismi descritti nel paragrafo precedente; infatti il *Porphyromonas gingivalis* va dapprima a infettare la cellula, promuovendone la sopravvivenza e la proliferazione; ciò determina, come conseguenza diretta, l'aumento della segnalazione *P13k/Akt*, responsabile dell'inibizione dell'apoptosi. Inoltre, la secrezione di *nucleoside difosfato chinasi NDK* come fattore di virulenza, blocca la segnalazione di pericolo *ATP/P2x7*, proteggendo la cellula. La transizione epiteliale mesenchimale è promossa dall'attivazione di *GSK3-β*, dalla fosforilazione diretta di *HSP27* e dall'aumento dell'espressione dei marker delle cellule staminali tumorali, quali *CD44* e *CD133*. Il fenotipo pro-sopravvivenza e proliferativo nelle cellule tumorali è mantenuto bloccando la proteina p53, la quale ricopre la funzione di soppressore tumorale; inoltre, il fenotipo invasivo è promosso anche dalle *gingipains*, che vanno a legare ed elaborare il pro-MMP-9 in MMP-9.

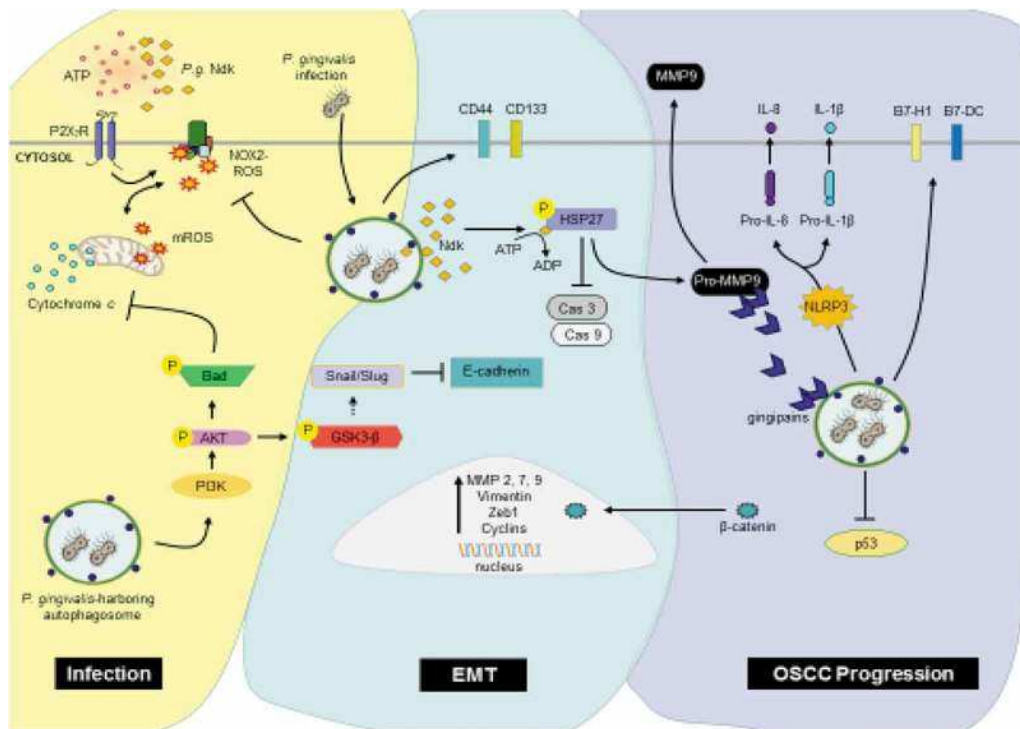


Figura 3. Olsen I et al. J Oral Microbiol. 2019 Jan 9;11(1):1563410.

Il Porphyromonas gingivalis promuove lo sviluppo e la progressione dell'OSCC.

Infezione: l'infezione promuove la sopravvivenza e la proliferazione della cellula epiteliale, aumentando la segnalazione PI3K/Akt, con conseguente inibizione dell'apoptosi intrinseca. Inoltre, attraverso la secrezione di NDK, il Porphyromonas gingivalis blocca la segnalazione di pericolo ATP / P2X7 extracellulare, proteggendo se stessa e la cellula epiteliale ospite dal danno mitocondriale e dal ROS generato da NOX2.

EMT: è promossa dall'inattivazione di GSK3-β, che facilita il passaggio da E-caderina a Vimentina. La β-catenina sovraregola anche le cicline, ZEB1 e MMP, con conseguente aumento della proliferazione e migrazione delle cellule epiteliali. Inoltre, l'EMT è promossa dalla fosforilazione diretta di HSP27 attraverso la sua proteina effettrice NDK, portando a un aumento dei livelli di pro-MMP9. Inoltre, P. gingivalis aumenta l'espressione dei marker di cellule staminali tumorali CD44 e CD133.

Progressione OSCC: il Porphyromonas gingivalis mantiene un fenotipo pro-sopravvivenza e proliferativo nelle cellule tumorali bloccando la p53, e modula l'ambiente immunitario attraverso la secrezione di citochine e chemochine e la maggiore espressione dei recettori B7-H1 e B7-DC, che causano anergia delle cellule T e apoptosi delle cellule T attivate

2.3.3 Porphyromonas gingivalis e cancro esofageo squamoso

Il cancro dell'esofago si può presentare in due forme principali, o come adenocarcinoma esofageo (EAC) o come carcinoma esofageo a cellule squamose (ESCC), e può generarsi a partire da diverse cause. Al di là della predisposizione genetica e dei principali fattori di rischio, un ruolo importante è svolto dai batteri del cavo orale, i quali possono migrare nel tratto esofageo e colonizzarlo; tra questi, la presenza a lungo termine del Porphyromonas gingivalis nel cavo orale può determinare l'infezione delle cellule epiteliali, interrompendo

il ciclo cellulare e le risposte immunitarie dell'ospite, nonché l'apoptosi cellulare [Gao S. et al. 2016].

Questo batterio si è rilevato principalmente coinvolto nello sviluppo di ESCC, che è l'ottavo tumore più frequente e la sesta causa di morte per cancro in tutto il mondo.

Esistono diverse fasi per lo sviluppo del carcinoma esofageo a cellule squamose; l'accumulo di cambiamenti genetici avvia il processo di carcinogenesi, che va a provocare cambiamenti istologici nelle cellule epiteliali. Inoltre, la presenza di infiammazione cronica della mucosa dell'esofago porta alla formazione di neoplasia intraepiteliale, una lesione pre-cancerosa.

I principali fattori di rischio coinvolti nella genesi di entrambe le due forme tumorali sono la malattia da reflusso gastroesofageo, l'obesità, il basso consumo di frutta e di verdura, il fumo e il consumo di alcolici; però, l'eziologia di queste malattie non può essere spiegata completamente da questi fattori. Recentemente è stato suggerito che il microbiota del tratto digestivo superiore ha un ruolo nell'eziologia del cancro esofageo. Infatti, numerosi studi hanno evidenziato nei soggetti affetti da ESCC e da malattia parodontale un elevato livello sierico di IgA e di IgG, formatesi contro il *Porphyromonas gingivalis*; questi valori hanno il potenziale per la diagnosi. Essi vengono considerati i biomarcatori necessari per una rilevazione precoce dell'ESCC e per un miglioramento delle prestazioni diagnostiche e prognostiche.

2.3.4 *Porphyromonas gingivalis* e lesioni precancerose gastriche e del colon

Nei soggetti con malattia parodontale i microrganismi patogeni rilevati nella placca dentale potrebbero essere correlati anche ad un aumentato rischio di lesioni gastriche. Non esistono conferme circa la diretta correlazione tra i batteri parodontali e lo sviluppo dei tumori gastrico e intestinale; però, come verificato da Sun J. et al. nel 2017, i batteri

principalmente coinvolti nelle diverse forme di parodontiti, in particolare il *Porphyromonas gingivalis*, contribuiscono allo sviluppo delle lesioni gastriche precancerose.

2.3.5 *Porphyromonas gingivalis* e cancro pancreatico

Il cancro del pancreas è una malattia a rapida progressione e prognosi infausta. I sintomi del carcinoma del pancreas, tra cui perdita di peso o dolore addominale, non sono specifici e, di conseguenza, a più della metà dei pazienti viene diagnosticato in una fase avanzata della malattia, dove la sopravvivenza a 5 anni è molto bassa.

La diagnosi precoce del carcinoma pancreatico migliorerebbe i tassi di sopravvivenza, tuttavia non ci sono ancora biomarcatori per la diagnosi precoce o strumenti di screening utili a livello di popolazione.

Per migliorare le capacità diagnostiche è necessario comprendere l'eziologia del carcinoma pancreatico che è, come quasi tutti i tumori, una malattia a eziologia multifattoriale; la componente infettiva, che rappresenta uno dei principali fattori eziologici, è pertanto associata ad altri fattori.

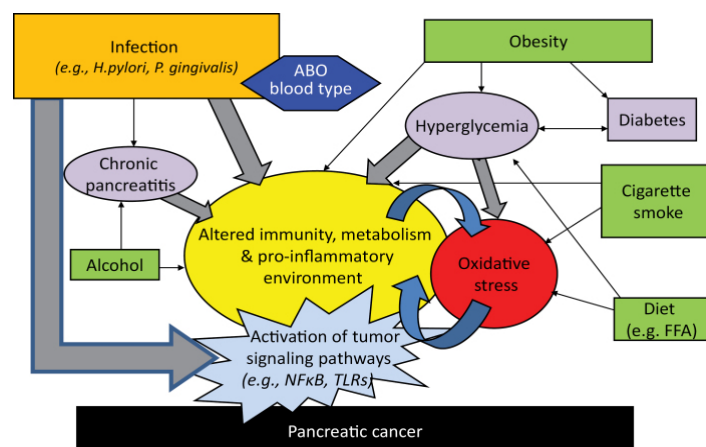


Figura 4. Dominique S. Michaud. Carcinogenesis. 2013 Oct; 34(10): 2193–2197.

Interazione tra infezione batterica cronica, fattori ambientali e genetici e impatto sulla carcinogenesi del pancreas

Il microbioma del cavo orale è il punto di partenza per comprendere il fattore infettivo responsabile della genesi del carcinoma pancreatico; anche qui il *Porphyromonas gingivalis* sembrerebbe il patogeno chiave alla base della malattia. Però, come confermato dallo studio di Swidsinski et al. del 2005, basato sull'ibridazione fluorescente in situ, all'interno del dotto pancreatico di pazienti con pancreatite calcifica è presente un denso biofilm batterico multispecie.

La trasmissione dei batteri parodontali al pancreas può avvenire, come precedentemente scritto, tramite la deglutizione o tramite il sistema circolatorio dopo la masticazione e l'igiene orale [Hayashi C et al. 2010].

Il *Porphyromonas gingivalis* è il punto focale della carcinogenesi pancreatico, in quanto ha il potenziale per sfuggire al sistema immunitario ospite, grazie all'invasione nelle cellule e all'interruzione delle vie di segnalazione e degradazione dei recettori [Duncan L. et al 2004; Stathopoulou PG. et al 2009]. L'infezione da *Porphyromonas gingivalis* può indurre infiammazione cronica e attivare la risposta immunitaria innata tramite i TLR2 e TLR4, gruppi di recettori associati ai patogeni che svolgono un ruolo importante nella segnalazione immunitaria innata in risposta all'infezione microbica e che, come è stato dimostrato, inibiscono l'apoptosi e promuovono la crescita tumorale [Hayashi C et al. 2010].

Esistono altri recettori TLR importanti nel carcinoma pancreatico; tra questi il TLR7, espresso nel microambiente tumorale del tessuto del carcinoma pancreatico, ma non nel tessuto pancreatico sano.

I cofattori che contribuiscono alla genesi del cancro pancreatico sono fumo, alcool, obesità e diabete mellito.

Il fumo di tabacco e il consumo di alcol sono il secondo e il terzo principale fattore di rischio di morte a livello globale; nel contesto del cancro del pancreas, il fumo di tabacco è considerato il fattore di rischio più importante, e dato che il comportamento del fumo è spesso associato al consumo di alcol, è plausibile che vi sia un effetto sinergico tra i due nel promuovere il cancro al pancreas [Maisonneuve P, Lowenfels AB. 2015].

Il tabacco e l'alcool tuttavia non sembrerebbero essere cause dirette della trasformazione neoplastica nel pancreas. Tuttavia l'alcool promuove un aumento del numero di macrofagi M2; questa è un'osservazione importante poiché i macrofagi M2 sono i responsabili della promozione della progressione del cancro. Infatti i macrofagi sono un tipo cellulare impegnato nella risposta immunitaria innata, che però possono essere “corrotti” e diventare degli ottimi alleati del tumore. Quando l'organismo deve far fronte all'attacco di un batterio, sul sito di infezione arrivano i macrofagi M1, che provvedono all'eliminazione degli invasori; successivamente interviene la classe di macrofagi M2 che interrompe l'azione degli M1 e produce importanti fattori per riparare e ricostruire il tessuto danneggiato, in modo che torni ad essere vascolarizzato. Questa è proprio la peculiarità utilizzata dal tumore.

Il diabete è un altro fondamentale fattore coinvolto nella carcinogenesi pancreatica ed è molto spesso associato all'obesità, la quale aumenta già di per sé il rischio di sviluppare il cancro al pancreas [Chari ST et al. 2008]. In particolare, quando si parla di fattore di rischio per il tumore pancreatico si fa riferimento al diabete mellito di tipo II, il quale è associato alla resistenza insulinica; sia l'obesità sia il diabete mellito di tipo II possono portare a lunghi periodi di tempo in cui gli individui che ne soffrono hanno alti livelli di insulina intra pancreatica, che contribuisce all'aumento del rischio di adenocarcinoma duttale pancreatico.

Osservazioni

Secondo quanto descritto è possibile stabilire che esiste un'importante relazione tra l'infezione orale e la cancerogenesi. Nello specifico, è più opportuno parlare di batteri del microbioma orale associati alla parodontite e tumori del tratto digestivo. Di particolare rilevanza è il fatto che questa relazione tra parodontopatogeni e cancro del tratto digestivo esiste anche dopo aver preso in considerazione gli eventuali fattori di confondimento, come il fumo, l'alcool, il diabete e l'obesità; questi ultimi non possono essere considerati esenti dalla relazione con la carcinogenesi, ma svolgono un ruolo fondamentale. Infatti, in combinazione con il *Porphyromonas gingivalis*, aumentano il rischio di sviluppo del cancro [Olsen I, Yilmaz Ö. 2019]. Particolarmente rilevanti sono gli anticorpi sierici contro *Porphyromonas gingivalis*, in grado di fornire informazioni circa lo stadio di avanzamento del tumore ed essere dunque considerati ottimi biomarcatori capaci di migliorare la diagnosi e la prognosi del cancro [Gao S. et al. 2016].

CAPITOLO 3

Livelli sierici di IgG e IgA specifiche per batteri del cavo orale, IL-6 e rischio di insorgenza dei tumori

Nonostante i progressi registrati in medicina nel trattamento dei tumori, molti si presentano ancora con una prognosi infausta e, spesso, vengono rilevati in una fase già avanzata. Per superare questa condizione e salvaguardare al meglio la salute la ricerca sta investendo moltissimo sull'identificazione di biomarker precoci diagnostici e prognostici.

Come si è visto alcune delle numerosissime specie che vivono nel cavo orale e che costituiscono il cosiddetto microbioma sono fattori causali del cancro.

Il *Porphyromonas gingivalis* e il *Fusobacterium nucleatum* sono i due parodontopatogeni fortemente coinvolti nella cancerogenesi, che possono indurre la produzione di citochine infiammatorie, la proliferazione cellulare e l'inibizione dell'apoptosi, nonché l'invasione cellulare, la migrazione e le alterazioni genomiche nella cellula ospite.

Le citochine infiammatorie prodotte possono determinare uno stato di infiammazione cronica, che viene ormai identificata come uno dei più importanti fattori di rischio per lo sviluppo e la progressione del cancro stesso [Park DG et al. 2019].

In accordo con questo principio, alcuni studi epidemiologici hanno suggerito e successivamente dimostrato una correlazione positiva anche tra il cancro orale e la parodontite, la malattia infiammatoria cronica più comune della cavità orale [Shiu-Dong Chung et al. 2016] [Ha NH et al. 2015; Lee J et al. 2017].

3.1 Livelli sierici di IgA e IgG contro i batteri orali nel cancro pancreatico

Un importante studio condotto nel 2013 da Michaud DS et al. ha rilevato un'importante associazione tra i batteri parodontali e il fenomeno della cancerogenesi, ed è stato

effettuato per conoscere ulteriormente questa correlazione, tramite l'analisi dei valori anticorpali contro i batteri orali sviluppati in relazione al rischio di cancro del pancreas. Ciò è stato effettuato misurando i livelli di anticorpi contro 25 batteri orali in campioni di plasma raccolti prima dell'insorgenza della malattia; i risultati hanno mostrato correlazioni molto elevate per i due ceppi di *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Data l'ipotesi a priori per cui i patogeni parodontali sono associati a un rischio più elevato di cancro del pancreas, sono stati esaminati i singoli anticorpi contro quei batteri precedentemente associati alla distruzione del tessuto parodontale, tra cui *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Tannerella forsythia*. Di questi, la massima concentrazione di uno specifico ceppo di *Porphyromonas gingivalis*, ATTC 53978 (> 200 ng / ml), è stata associata ad un rischio doppio di carcinoma pancreatico. Questo studio ha quindi verificato che i soggetti con elevati livelli di anticorpi contro *Porphyromonas gingivalis* presentano un rischio due volte superiore di sviluppo di cancro al pancreas rispetto ai soggetti con livelli di anticorpi più bassi; parallelamente è invece emerso che i soggetti con livelli costantemente alti di anticorpi contro i comuni batteri orali hanno un rischio di sviluppo del cancro inferiore del 45% rispetto ai soggetti con bassi livelli anticorpali contro gli stessi batteri.

I risultati suggeriscono dunque che le persone con alti livelli di anticorpi contro *Porphyromonas gingivalis* ATTC 53978 presentano un rischio più elevato di carcinoma del pancreas, mentre un gruppo distinto di soggetti con elevati anticorpi anti-batteri orali è associato a un rischio inferiore di carcinoma del pancreas.

3.2 livelli sierici di IgA e IgG contro *Porphyromonas gingivalis* nel cancro esofageo

Questi risultati sono stati confermati in uno studio più recente, condotto nel 2018 da Gao SG et al. L'obiettivo è stato quello di verificare in che modo il *Porphyromonas gingivalis* sia associato alle malattie parodontali e alle patologie croniche come il cancro e, soprattutto, quale sia il potenziale diagnostico e prognostico degli anticorpi IgA e IgG di questo batterio. Lo studio è stato condotto utilizzando un test immunoassorbente enzimatico (ELISA), in grado di rilevare i livelli sierici di anticorpi IgA e IgG contro il *Porphyromonas gingivalis*, confrontando 96 casi con carcinoma esofageo a cellule squamose con 50 casi di soggetti con esofagite e 80 casi di soggetti sani.

I risultati dei livelli sierici di anticorpi IgA e IgG tra i controlli sani e il gruppo affetto da esofagite non hanno registrato differenze rilevanti; per cui sono stati successivamente raggruppati sotto la stessa voce di soggetti non affetti da ESCC. Invece, i livelli sierici di IgA e di IgG nei soggetti affetti da ESCC sono molto più alti. La figura seguente mostra le distribuzioni di frequenza degli anticorpi dei tre gruppi.

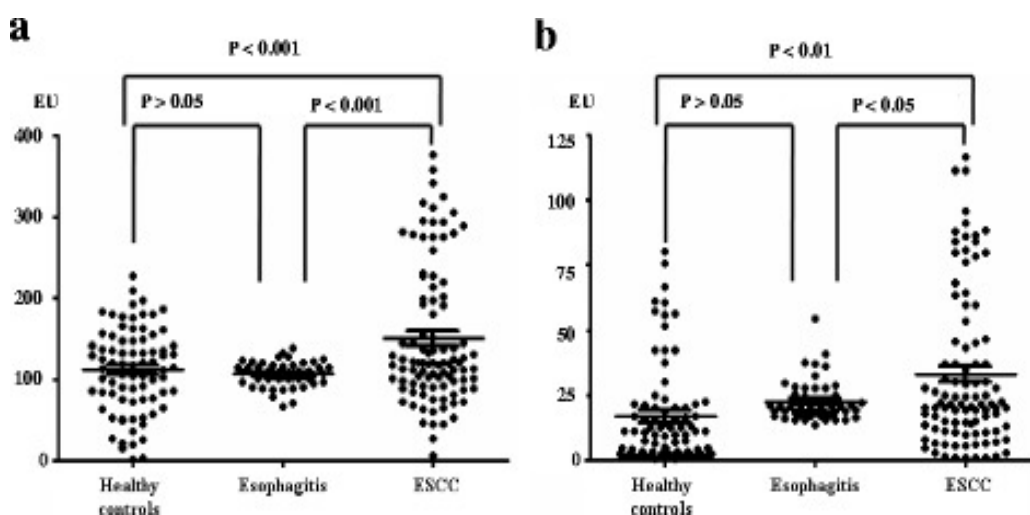


Figura 5. Gao SG et al. BMC Cancer. 2018 Jan 3;18(1):17.

Saggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) di anticorpi IgG e IgA sierici contro *P. gingivalis* in controlli sani (n = 80), pazienti con esofagite (n = 50) ed ESCC (n = 96).

- a) Diagrammi di dispersione delle unità ELISA (UE) dell'anticorpo IgG contro *P. gingivalis* nel siero di controlli sani, pazienti con esofagite ed ESCC.
- b) Diagrammi di dispersione delle unità ELISA (UE) dell'anticorpo IgA *P. gingivalis* nel siero di controlli sani, pazienti con esofagite ed ESCC

Per determinare il potenziale diagnostico degli anticorpi IgA e IgG contro *Porphyromonas gingivalis* sono state tracciate curve ROC, per distinguere i 96 pazienti affetti da ESCC dai 130 controlli non affetti da ESCC. I ROC sono schemi grafici per un classificatore binario. Lungo i due assi si possono rappresentare la sensibilità e la specificità. Dunque, si studiano i rapporti fra allarmi veri (*hit rate*) e allarmi falsi. Le AUC sono invece le aree sotto le curve.

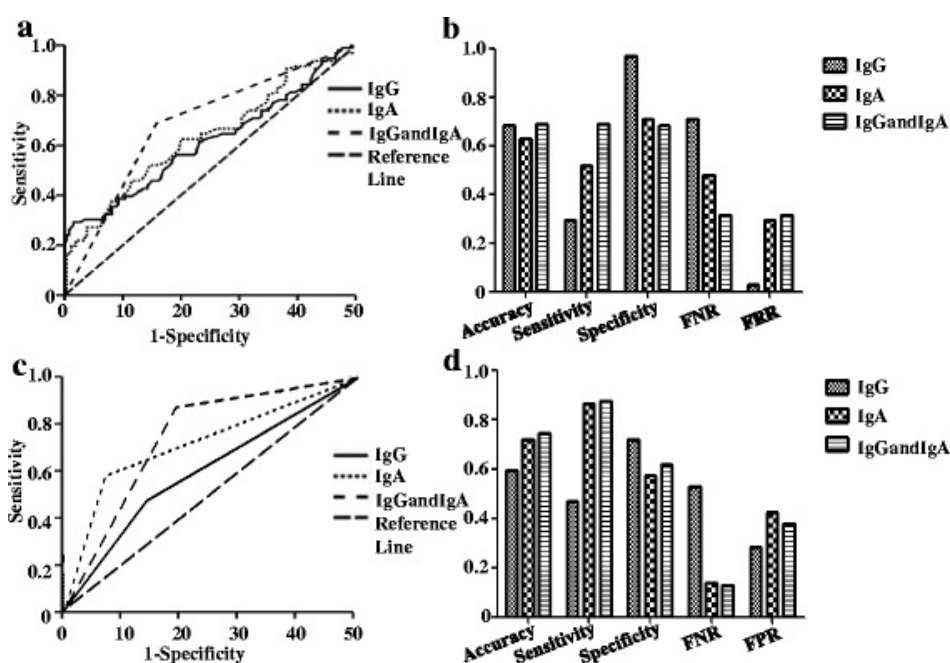


Figura 6. Gao SG et al. BMC Cancer. 2018 Jan 3;18(1):17. Curve caratteristiche operative del ricevitore (ROC) e prestazioni cliniche di *Porphyromonas gingivalis* IgG e IgA.

- a) Curve ROC di IgG, IgA e combinazione di IgG e IgA per *P. gingivalis* come marcatore diagnostico per la discriminazione dei controlli ESCC e non ESCC.
- b) Prestazioni cliniche di IgG, IgA e combinazione di IgG e IgA per *P. gingivalis* come marker diagnostico per la discriminazione dei controlli ESCC e non-ESCC in termini di accuratezza, sensibilità, specificità, tasso di falsi negativi (FNR), tasso di falsi positivi (FPR).
- c) Curve ROC dipendenti dal tempo di IgG, IgA e combinazione di IgG e IgA per *P. gingivalis* come predittori di tassi di sopravvivenza a 3 anni correlati a ESCC.
- d) Prestazioni cliniche di IgG, IgA e combinazione di IgG e IgA per i predittori di *P. gingivalis* dei tassi di sopravvivenza a 3 anni correlati all'ESCC in termini di accuratezza, sensibilità, specificità, tasso di falsi negativi (FNR), tasso di falsi positivi (FPR)

Dallo studio è emerso che il valore medio di IgA del *Porphyromonas gingivalis* nell'ESCC in stadio iniziale è inferiore rispetto a quello dell'ESCC in stadio avanzato, mentre il valore medio di IgG è marginalmente più elevato nell'ESCC in stadio iniziale.

Dunque, con questo studio si segnala per la prima volta che la risposta immunitaria umana contro *Porphyromonas gingivalis* è implicata nella progressione maligna dell'ESCC. Le IgG e le IgA per *Porphyromonas gingivalis* sono i potenziali biomarcatori sierici per ESCC e la combinazione di IgG e IgA migliora le prestazioni diagnostiche e prognostiche. Inoltre, le IgG sieriche e le IgA per *Porphyromonas gingivalis* potrebbero differenziare i pazienti con ESCC in stadio iniziale.

3.3 Livelli sierici di IgA, IgG e IL-6 contro i batteri orali nel cancro orale

Un ultimo recente studio del 2019 condotto da Park DG et al. ha esaminato il potenziale diagnostico dell'anticorpo sierico IgG contro *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*, e i valori sierici di IL-6 per il carcinoma orale a cellule squamose (OSCC).

Anche qui è stato usato un saggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA) per determinare e confrontare i livelli sierici di IL-6, di IgG di *Fusobacterium nucleatum* e di IgG di *Porphyromonas gingivalis*, in 62 pazienti con OSCC e in 46 soggetti sani.

Questo studio si è basato su una prima analisi, necessaria per comprendere la correlazione tra questo batterio parodontale e la genesi dei tumori, che è andata a confrontare i livelli sierici di IgG e IL-6 nei soggetti affetti da OSCC, classificati in base all'età, al sesso e alla presenza di fattori di rischio, quali fumo e alcool. Questo studio non ha registrato differenze significative né dei livelli di IgG né di quelli di IL-6; per cui ha fornito dei risultati statisticamente insignificanti, rendendo necessari ulteriori confronti non soltanto tra soggetti malati, ma tra soggetti sani e soggetti affetti da cancro.

Tuttavia un secondo studio è riuscito a dimostrare questa ipotesi: i livelli sierici di IgG di *Porphyromonas gingivalis* e di IgG di *Fusobacterium nucleatum* sono significativamente più alti nei pazienti con OSCC rispetto ai controlli sani; inoltre, sono state apprezzate elevate concentrazioni di IL-6 nei pazienti con OSCC rispetto ai soggetti sani [Park DG et al. 2019].

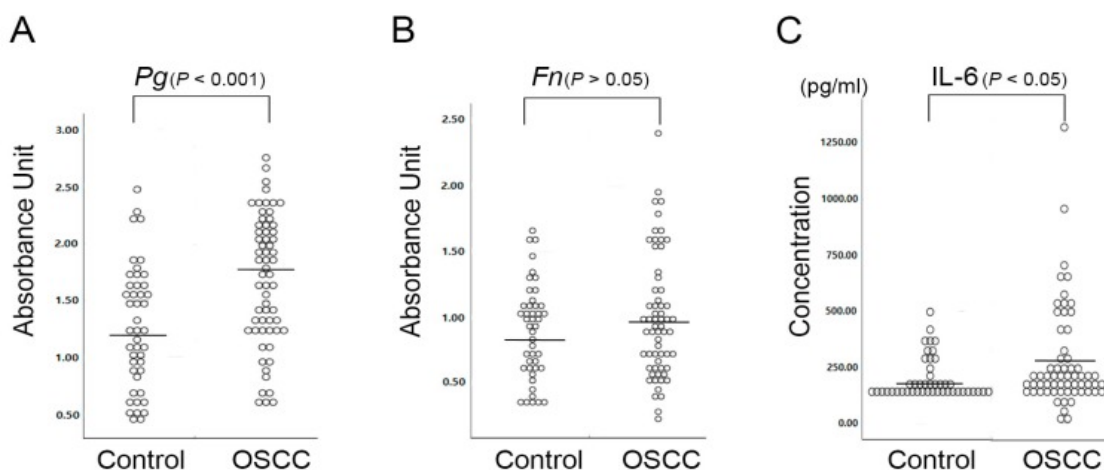


Figura 7. Park DG et al- Int J Mol Sci. 2019 Jun 4; 20(11).

Gli anticorpi sierici contro *P. gingivalis* e *F. nucleatum* e i livelli sierici di IL-6 nei pazienti con OSCC sono stati confrontati con quelli nei controlli sani usando un saggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA). I livelli sierici nei controlli sani (n= 46) e nei pazienti con OSCC (n=62) erano:

- (A) *P. gingivalis* IgG: $1,25 \pm 0,54$ e $1,69 \pm 0,57$ (pg/mL)
- (B) *F. nucleatum* IgG: $0,88 \pm 0,36$ e $1,00 \pm 0,46$ (pg/mL)
- (C) IL-6: $199,51 \pm 89,38$ e $274,93 \pm 228,57$ (pg/mL)

Per chiarire il potenziale diagnostico dei valori sierici testati sono state tracciate curve delle caratteristiche operative del ricevitore (ROC) per distinguere i 62 pazienti con OSCC dai 46 controlli non-OSCC.

I risultati hanno rilevato specificità per le IgG di *Porphyromonas gingivalis* superiore (84,4%) rispetto a quella per IL-6 sierica (71,1%) e sensibilità leggermente inferiore (53,2% vs 59,7%).

La figura seguente mostra le prestazioni diagnostiche di ciascun fattore in termini di accuratezza, sensibilità, specificità, tasso di falsi negativi (FNR) e tasso di falsi positivi

(FPR), indicando una buona accuratezza diagnostica basata sulle IgG sieriche di *Porphyromonas gingivalis* e IL-6.

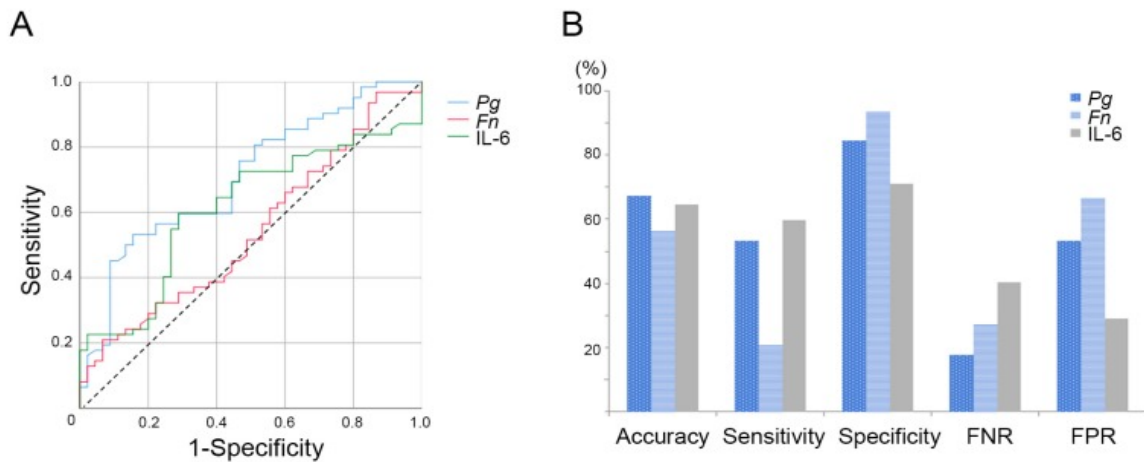


Figura 8. Park DG et al. Int J Mol Sci. 2019 Jun 4;20(11). Curve caratteristiche operative del ricevitore (ROC)

- (A) Utilizzate per la diagnosi di pazienti OSCC rispetto a controlli sani; le AUC (aree sotto le curve ROC) sono 0,708 IgG per *Porphyromonas gingivalis*, 0,543 IgG per *Fusobacterium nucleatum* e 0,613 IL-6 per siero.
- (B) Prestazioni cliniche di *Porphyromonas gingivalis* IgG, *Fusobacterium nucleatum* IgG e siero IL-6 come marcatore diagnostico per la discriminazione dei controlli OSCC e non-OSCC in termini di accuratezza, sensibilità, specificità, tasso di falsi negativi (FNR), tasso di falsi positivi (FPR).

Sono state determinate le correlazioni tra i livelli sierici di IgG e IL-6 di *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*.

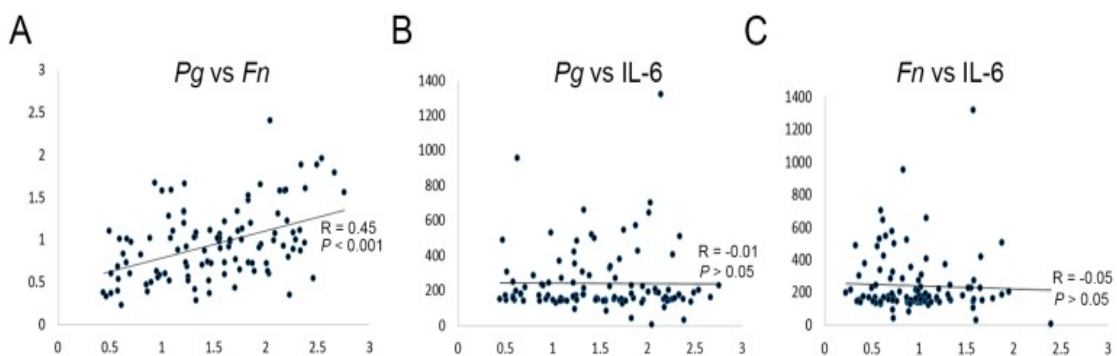


Figura 9. Park DG et al. Int J Mol Sci. 2019 Jun 4;20(11).

Correlazione tra anticorpi IgG sierici contro *Porphyromonas gingivalis* (A, B) e *Fusobacterium nucleatum* (A, C) e IL-6 (B, C) in entrambi i pazienti con OSCC e controlli sani.

Da questo studio è dunque emerso che i livelli sierici di IgG e IL-6 di *Porphyromonas gingivalis* sono molto alti nei pazienti con OSCC rispetto a quelli dei soggetti non affetti da OSCC. Inoltre, un alto livello sierico di IL-6 è associato a prognosi peggiore nei pazienti con OSCC. Quindi, IgG e IL-6 di *Porphyromonas gingivalis* possono essere usati come biomarcatori diagnostici di OSCC, mentre il livello sierico di IL-6 migliora le prestazioni prognostiche.

CONCLUSIONI

L'obiettivo principale di questo lavoro è stato capire i meccanismi patologici innescati dai batteri parodontali, in particolare dal *Porphyromonas gingivalis*, e il suo potenziale cancerogeno, al fine di fornire una panoramica generale per poter comprendere sempre di più la stretta relazione che esiste tra la salute orale e la salute sistemica.

Infatti, il cavo orale è il punto di passaggio di numerosissime specie e, come tale, deve necessariamente essere tenuto sotto controllo per prevenire l'insorgenza di problematiche più gravi. È quindi alla base di tutto il concetto di prevenzione; fare prevenzione significa mettere in atto un insieme di attività, azioni ed interventi finalizzati a promuovere e a conservare lo stato di salute, per evitare l'insorgenza di malattie. In base alla tipologia di intervento e in base allo stato della malattia si distinguono tre diversi tipi di prevenzione: primaria, secondaria e terziaria.

La prevenzione primaria interviene sul soggetto sano e si propone di mantenere le condizioni di benessere, evitando quindi l'insorgenza di malattie. In particolare, è un insieme di interventi finalizzato a ridurre la probabilità che si verifichi un evento avverso non desiderato.

La prevenzione secondaria agisce su un grado successivo rispetto alla prevenzione primaria, intervenendo sui soggetti affetti da uno stadio iniziale di malattia. Rappresenta un intervento di secondo livello che, mediante la diagnosi precoce di malattie, in fase asintomatica, mira ad ottenere la guarigione o, comunque, a limitarne la progressione.

La prevenzione terziaria fa invece riferimento a tutte le azioni volte al controllo e al contenimento degli esiti più complessi di una patologia; ha come obiettivo quello di evitare, o limitare, la comparsa sia di complicazioni tardive sia di esiti invalidanti. Con prevenzione terziaria si intende anche la gestione dei deficit e delle disabilità funzionali

conseguenziali ad uno stato patologico o disfunzionale. Si realizza attraverso misure riabilitative e assistenziali, volte al reinserimento familiare, sociale e lavorativo del malato, e all'aumento della qualità della vita.

Le IgA e le IgG che si generano contro *Porphyromonas gingivalis* possono giocare un ruolo fondamentale nella prevenzione, in quanto l'aspetto cruciale di un biomarcatore è proprio quello di avere un importante valore nel contesto preventivo.

La valutazione di un nuovo marcatore richiede più fasi e l'obiettivo finale da perseguire è quello di valutare quanto sia in grado di modificare la gestione clinico-terapeutica dei soggetti e quanto questo si rifletta sulla possibilità di migliorarne gli esiti. Nonostante alcuni limiti, ci sono stati importanti progressi in questo campo; è auspicabile che, associando questi progressi al miglior inquadramento dei sottogruppi di popolazione che richiedono una più accurata stratificazione del rischio e, pianificando studi randomizzati adeguati, si possa arrivare a una prevenzione biomarcatore-guidata.

Questo aspetto è fondamentale, perché i batteri parodontali sono coinvolti non soltanto nella genesi di diverse tipologie di tumore, come spiegato finora, ma hanno un'importante implicazione anche in altre pericolose problematiche; tra queste vi è la malattia di Alzheimer, una patologia neurodegenerativa la cui insorgenza potrebbe essere facilitata dalla presenza di batteri orali. Infatti, la salute della bocca è collegata anche a quella del sistema nervoso, poiché i batteri orali sono in grado di raggiungere il cervello; anche in questo caso giocano un ruolo diagnostico e prognostico i livelli sierici di IgG, associati al rischio di sviluppare questa malattia [Noble JM et al. 2014]. Studi più recenti hanno confermato il coinvolgimento dei batteri parodontali in questa problematica rilevando, nel cervello di pazienti affetti da Alzheimer, la presenza di proteasi tossiche (gingipain) [Dominy SS et al. 2019].

È quindi bene ricordare che dalla bocca, già con la semplice masticazione, i batteri sono in grado di raggiungere il circolo sanguigno e arrivare ai vari distretti corporei; ancora una volta va sottolineata l'importanza dell'attenzione alla salute orale come fattore preventivo. È proprio a questo livello che interviene l'igienista dentale che, con le sue competenze, mira a ripristinare le condizioni di salute, liberando le gengive dallo stato infiammatorio, ponendosi come obiettivo il raggiungimento della salute orale come fattore di prevenzione di problematiche generali. Ma, al di là della terapia causale, meccanica non chirurgica, l'igienista dentale ha il fondamentale compito di motivare i pazienti a mantenere i risultati ottenuti nel tempo, insegnando le corrette manovre di igiene orale domiciliare e mostrando i rischi verso cui, chi non tiene sotto controllo la sua salute orale, può andare incontro, al fine di riuscire a sensibilizzare maggiormente una popolazione ancora troppo lontana dalla comprensione di questi concetti.

BIBLIOGRAFIA

1. Ahn J, Chen CY, Hayes RB. Oral microbiome and oral and gastrointestinal cancer risk. *Cancer Causes Control*. 2012 Mar;23(3):399-404
2. Ahn J, Segers S, Hayes RB. Periodontal disease, *Porphyromonas gingivalis* serum antibody levels and orodigestive cancer mortality. *Carcinogenesis*. 2012;33(5):1055–1058
3. Amrita Singh et al. The Capsule of *Porphyromonas gingivalis* Leads to a Reduction in the Host Inflammatory Response, Evasion of Phagocytosis, and Increase in Virulence. *Infect Immun*. 2011 Nov; 79(11): 4533–4542
4. Araújo VM et al. Relationship between Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: Review of the Literature. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:259074
5. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet*. 2008 May 17;371(9625):1695-709
6. Arweiler NB, Netuschil L. The Oral Microbiota. *Adv Exp Med Biol*. 2016;902:45-60
7. Berrington de Gonzalez A, Sweetland S, Spencer E. A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2003 Aug 4;89(3):519-23
8. Binder Gallimidi A et al. Periodontal pathogens *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* promote tumor progression in an oral-specific chemical carcinogenesis model. *Oncotarget*. 2015 Sep 8;6(26):22613-23
9. Bradley Field Bale et al. High-risk periodontal pathogens contribute to the pathogenesis of atherosclerosis. *Postgrad Med J*. 2017 Apr; 93(1098): 215–220
10. Bradshaw D. J., Marsh P. D., Watson G. K., Allison C. Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral

- microbial communities during aeration. *Infection and Immunity*. 1998;66(10):4729–4732
11. Busscher HJ, van der Mei HC. Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv Dent Res*. 1997 Apr;11(1):24-32
 12. Carlo Guastamacchia e Viviana Ardizzone. *Collana prevenzione e igiene dentale*. Elsevier, 2001. 4(4),89-90
 13. Chari ST et al. Pancreatic cancer-associated diabetes mellitus: prevalence and temporal association with diagnosis of cancer. *Gastroenterology*. 2008 Jan;134(1):95-101
 14. Chattopadhyay I, Verma M, Panda M. Role of Oral Microbiome Signatures in Diagnosis and Prognosis of Oral Cancer. *Technol Cancer Res Treat*. 2019 Jan 1;18
 15. Chojnacki M et al. The involvement of matrix metalloproteinases in the development and progression of neoplasm diseases. *Postepy Biochem*. 2017;63(4):277-286
 16. Dietrich T et al. Evidence summary: the relationship between oral and cardiovascular disease. *Br Dent J*. 2017 Mar 10;222(5):381-385
 17. Dominique S. Michaud. Role of bacterial infections in pancreatic cancer. *Carcinogenesis*. 2013 Oct; 34(10): 2193–2197
 18. Dominy SS et al. *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Sci Adv*. 2019 Jan 23;5(1)
 19. Dooley J et al. Genetic predisposition for beta cell fragility underlies type 1 and type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2016 May;48(5):519-27

20. Duncan L, Yoshioka M, Chandad F, et al. Loss of lipopolysaccharide receptor CD14 from the surface of human macrophage-like cells mediated by *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles. *Microb Pathog* 2004;36:319–25
21. Fan X et al. Human oral microbiome and prospective risk for pancreatic cancer: a population-based nested case-control study. *Gut*. 2018 Jan;67(1):120-127
22. Farrell JJ et al. Variations of oral microbiota are associated with pancreatic diseases including pancreatic cancer. *Gut*. 2012 Apr;61(4):582-8
23. Gaetti-Jardim E Jr et al. Quantitative detection of periodontopathic bacteria in atherosclerotic plaques from coronary arteries. *J Med Microbiol*. 2009 Dec;58(Pt 12):1568-75
24. Gao SG et al. Preoperative serum immunoglobulin G and A antibodies to *Porphyromonas gingivalis* are potential serum biomarkers for the diagnosis and prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2018 Jan 3;18(1):17
25. Gao S. et al. Presence of *Porphyromonas gingivalis* in esophagus and its association with the clinicopathological characteristics and survival in patients with esophageal cancer. *Infect Agent Cancer*. 2016 Jan 19;11:3
26. Gaonkar PP et al. Oral bacterial flora and oral cancer: The possible link? *J Oral Maxillofac Pathol*. 2018 May-Aug;22(2):234-238
27. Geng F et al. Persistent Exposure to *Porphyromonas gingivalis* Promotes Proliferative and Invasion Capabilities, and Tumorigenic Properties of Human Immortalized Oral Epithelial Cells. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 Feb 24;7:57
28. Gholizadeh P et al. Role of oral microbiome on oral cancers, a review. *Biomed Pharmacother*. 2016 Dec;84:552-558

29. Gholizadeh P et al. Carcinogenesis mechanisms of *Fusobacterium nucleatum*. *Biomed Pharmacother.* 2017 May;89:918-925
30. Grenier D et al. Cellular location of a *Treponema denticola* chymotrypsinlike protease and importance of the protease in migration through the basement membrane. *Infect Immun.* 1990 Feb;58(2):347-51
31. Hajishengallis G. et al. *Porphyromonas gingivalis* as a Potential Community Activist for Disease. *J Dent Res.* 2012 Sep;91(9):816-20
32. Ha NH et al. Prolonged and repetitive exposure to *Porphyromonas gingivalis* increases aggressiveness of oral cancer cells by promoting acquisition of cancer stem cell properties. *Tumour Biol.* 2015 Dec;36(12):9947-60
33. Hayashi C et al. Review: Pathogen-induced inflammation at sites distant from oral infection: bacterial persistence and induction of cell-specific innate immune inflammatory pathways. *Mol Oral Microbiol.* 2010 Oct;25(5):305-16
34. Hoare A, Soto C, Rojas-Celis V, Bravo D. Chronic Inflammation as a Link between Periodontitis and Carcinogenesis. *Mediators Inflamm.* 2019;2019:1029857. Published 2019 Mar 27
35. Homann N et al. High acetaldehyde levels in saliva after ethanol consumption: methodological aspects and pathogenetic implications. *Carcinogenesis.* 1997 Sep;18(9):1739-43
36. Hujoel PP et al. An exploration of the periodontitis-cancer association. *Ann Epidemiol.* 2003 May;13(5):312-6
37. Iodice S et al. Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbecks Arch Surg.* 2008 Jul;393(4):535-45
38. Jaroslav Mysak et al. *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. *J Immunol Res.* 2014;2014:476068

39. Kageyama S et al. Characteristics of the Salivary Microbiota in Patients With Various Digestive Tract Cancers. *Front Microbiol.* 2019 Aug 2;10:1780
40. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010 Apr 2;141(1):52-67
41. Kolenbrander P. E., London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *Journal of Bacteriology.* 1993;175(11):3247–3252
42. Kolenbrander P. E., Palmer R. J., Rickard A. H., Jakubovics N. S., Chalmers N. I., Diaz P. I. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontology 2000.* 2006;42(1):47–79
43. Korc M et al. Tobacco and alcohol as risk factors for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2017 Oct;31(5):529-536
44. Kumar PS. Oral microbiota and systemic disease. *Anaerobe.* 2013 Dec;24:90-3
45. Lafuente Ibáñez de Mendoza I et al. Role of *Porphyromonas gingivalis* in oral squamous cell carcinoma development: A systematic review. *J Periodontal Res.* 2019 Sep 17
46. Lee J et al. Human Primary Epithelial Cells Acquire an Epithelial-Mesenchymal-Transition Phenotype during Long-Term Infection by the Oral Opportunistic Pathogen, *Porphyromonas gingivalis*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017 Dec 1;7:493
47. Maisonneuve P, Lowenfels AB. Risk factors for pancreatic cancer: a summary review of meta-analytical studies. *Int J Epidemiol.* 2015 Feb;44(1):186-98
48. Malinowski B et al. The role of *Tannerella forsythia* and *Porphyromonas gingivalis* in pathogenesis of esophageal cancer. *Infect Agent Cancer.* 2019 Jan 30;14:3

49. Manosha Perera et al. Emerging role of bacteria in oral carcinogenesis: a review with special reference to perio-pathogenic bacteria. *J Oral Microbiol.* 2016 Sep 26;8:32762
50. Mariotti A, Hefti AF. Defining periodontal health. *BMC Oral Health.* 2015;15
51. Michaud DS et al. Plasma antibodies to oral bacteria and risk of pancreatic cancer in a large European prospective cohort study. *Gut.* 2013 Dec;62(12):1764-70
52. Michaud DS et al. A prospective study of periodontal disease and pancreatic cancer in US male health professionals. *J Natl Cancer Inst.* 2007 Jan 17;99(2):171-5
53. Mikuls T. R., Payne J. B., Yu F., et al. Periodontitis and *Porphyromonas gingivalis* in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology.* 2014;66(5):1090–1100
54. Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 1994 Jun;5:66-77
55. Nieminen MT et al. *Treponema denticola* chymotrypsin-like proteinase may contribute to orodigestive carcinogenesis through immunomodulation. *Br J Cancer.* 2018 Feb 6;118(3):428-434
56. Noble JM et al. Serum IgG antibody levels to periodontal microbiota are associated with incident Alzheimer disease. *PLoS One.* 2014 Dec 18;9(12)
57. Öğrendik M et al. Oral bacteria in pancreatic cancer: mutagenesis of the p53 tumour suppressor gene. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015 Sep 1;8(9):11835-6
58. Olsen I, Yilmaz Ö. Possible role of *Porphyromonas gingivalis* in orodigestive cancers. *J Oral Microbiol.* 2019 Jan 9;11(1):1563410
59. Papapanou PN et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol.* 2018 Jun;89 Suppl 1:S173-S182

60. Park DG et al. Serum Levels of Interleukin-6 and Titers of Antibodies Against Porphyromonas gingivalis Could Be Potential Biomarkers for the Diagnosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2019 Jun 4;20(11)
61. Peng CH et al. Periodontal Treatment and the Risks of Cardiovascular Disease in Patients with Type 2 Diabetes: A Retrospective Cohort Study. *Intern Med.* 2017;56(9):1015-1021
62. Perez-Chaparro PJ et al. Bacteremia of oral origin. *Rev Stomatol Chir Maxillofac.* 2011 Nov;112(5):300-3
63. Peters BA et al. Oral Microbiome Composition Reflects Prospective Risk for Esophageal Cancers. *Cancer Res.* 2017 Dec 1;77(23):6777-6787
64. Rajesh KS et al. Poor periodontal health: A cancer risk? *J Indian Soc Periodontol.* 2013 Nov;17(6):706-10
65. S.S. Socransky, A.D. Haffajee, M.A. Cugini, C. Smith, R. L. Kent Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. 1998; 25(2)134-144
66. Salaspuro MP. Acetaldehyde, microbes, and cancer of the digestive tract. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2003 Apr;40(2):183-208
67. Salazar CR et al. Association between selected oral pathogens and gastric precancerous lesions. *PLoS One.* 2013;8(1):e51604
68. Sattler S. The Role of the Immune System Beyond the Fight Against Infection. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1003:3-14
69. Sayehmiri F et al. The prevalence rate of Porphyromonas gingivalis and its association with cancer: A systematic review and meta-analysis. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2015; 28 : 160–167

70. Shiu-Dong Chung et al. A population-based study on the associations between chronic periodontitis and the risk of cancer. *International Journal of Clinical Oncology*, April 2016, Volume 21, Issue 2, pp 219–223
71. Stathopoulou PG, Benakanakere MR, Galicia JC, et al. The host cytokine response to *Porphyromonas gingivalis* is modified by gingipains. *Oral Microbiol Immunol* 2009;24:11–17
72. Sun J et al. Chronic Periodontal Disease, Periodontal Pathogen Colonization, and Increased Risk of Precancerous Gastric Lesions. *J Periodontol*. 2017 Nov;88(11):1124-1134
73. Swidsinski A, Schlien P, Pernthaler A, et al. Bacterial biofilm within diseased pancreatic and biliary tracts. *Gut* 2005;54:388–95
74. Träger MM, Dhayat SA. Epigenetics of epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Int J Cancer*. 2017 Jul 1;141(1):24-32
75. Walter J. Loesche. Clinical and Microbiological Aspects of Chemotherapeutic Agents Used According to the Specific Plaque Hypothesis. 1979;58(12)
76. Wu JS et al. *Porphyromonas gingivalis* Promotes 4-Nitroquinoline-1-Oxide-Induced Oral Carcinogenesis With an Alteration of Fatty Acid Metabolism. *Front Microbiol*. 2018 Sep 4;9:2081
77. Yadav D, Lowenfels AB. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 2013 Jun;144(6):1252-61
78. Yang CY et al. Oral Microbiota Community Dynamics Associated With Oral Squamous Cell Carcinoma Staging. *Front Microbiol*. 2018 May 3;9:862
79. Yangheng Zhang et al. Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomed Pharmacother*. 2018Mar; 99:883-893

80. Yao QW et al. Association of periodontal disease with oral cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol.* 2014 Jul;35(7):7073-7
81. Zhiheng Pei et al. Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 23;101(12):4250-5

RINGRAZIAMENTI

Un ultimo spazio vorrei dedicarlo a ringraziare tutte le persone che, in un modo o nell'altro, mi hanno accompagnato in questo percorso e che mi hanno sostenuto in ogni importante occasione.

Non esito a ringraziare per prima *la mia relatrice*, la dottoressa Maria Rita Rippo, per le sue competenze, che sono state fondamentali nella stesura di questa tesi, ma soprattutto per la disponibilità che ha dimostrato nei miei confronti; sempre gentile e puntuale per darmi le correzioni e gli aiuti necessari.

Sento di dover dire non un solo grazie, ma infiniti grazie *ai miei genitori*; alla mia mamma, per essere la mia fonte di ispirazione, nel lavoro e nella vita, e al mio papà, per apparire così rigido ed essere invece così tenero. Siete i miei punti fermi, i miei più grandi sostenitori. È soltanto grazie a voi se tutto è cominciato, se è continuato e se continuerà, perché avete sempre creduto in me e nelle mie capacità, molte volte più di quanto non ci abbia creduto io.

Grazie *a mia sorella*, la mia amica, la mia confidente. Grazie per esserci ritrovate da qualche tempo così tanto da sentire di aver bisogno di te in ogni momento e, soprattutto, grazie per essere la mia guida, l'esempio da seguire, la sorella maggiore che tutti vorrebbero e che io ho avuto la fortuna di avere.

Un particolare grazie va *ai miei nonni*; a quelli che ho con me, a quelli che ho perso e a quelli che non ho mai conosciuto, ma che tanto avrei voluto.

Grazie nonna *Carla* per le belle parole, per gli insegnamenti che mi accompagnano ogni giorno e per tutto quello che hai sempre fatto e che continui a fare per me;

Grazie nonno *Aldo* per la dolcezza, la simpatia e l'amore incondizionato;

Grazie nonna *Bruna* per il meraviglioso ricordo che ho di te;

Grazie nonno *Toni* per il bene che negli anni insieme mi hai dimostrato e per essere stato capace di farti amare così tanto da mancarmi ancora terribilmente;

Grazie nonno *Bebi* e nonna *Pina*, perché anche se la vita non ci ha dato l'opportunità di conoscerci, conservo da sempre e per sempre una parte di voi.

La mia fortuna è avere sei nonni. So che ci siete tutti e so che siete la cosa più bella di me.

Ringrazio *Stella*, la donna che considero la mia settima nonna; sempre pronta a condividere insieme a me i momenti più belli della vita. Grazie per quello che fai e per quello che sei.

Ringrazio tutti *i miei zii* che si sono liberati degli impegni per essere qui con me oggi.

Ringrazio *le mie cugine*, le mitiche compagne di infanzia e di avventura, che continuano ad essere le mie più grandi complici e che non cambierei con nessun altro al mondo.

Ringrazio *i miei cugini* che, anche se più grandi, sono sempre tornati bambini insieme a me; un grazie va anche *al mio nipotino Cesare* per essere, nonostante la distanza, il gioiellino della zia.

Grazie *alle mie migliori amiche Cristina, Miriam e Sofia*; siete le sorelle che ho scelto che, anche se lontane per scelte universitarie e di lavoro, non tardate mai a farvi sentire costantemente vicine. Non esistono parole in grado di spiegare quanto io sia estremamente felice di avervi nella mia vita e di condividere oggi questo momento insieme; grazie per essere il mio porto sicuro e i miei punti di riferimento.

Grazie a *Federica e Lorena*, compagne di classe e compagne di vita; la combinazione perfetta di serietà e spensieratezza. Un grazie a voi e a ogni attimo da trascorrere con voi.

Grazie a *Flogert* e alla sua famiglia. Sei molto più di un fratello desiderato, sei il punto stabile in cui ripongo fiducia e serenità.

Grazie *ai miei compagni di scuola superiore* che continuano ad essere la mia seconda famiglia; nessuna università è riuscita a separarci fino ad oggi e sono sicura che niente mai sarà in grado di farlo.

Grazie *alle mie compagne di corso*, che hanno reso migliore questa strada, con l'augurio di non perdere mai la complicità che è nata tra di noi.

Ringrazio *l'intera famiglia di Rodolfo*, che è da qualche tempo ormai la mia seconda casa; grazie perché mi avete accolto, tutti, come una figlia, facendomi sentire parte di voi.

Infine dedico un grazie a *Rodolfo*, il mio grande amore.

Ti ringrazio perché sai sopportarmi ogni giorno e perché sai farmi sentire speciale; sai come farmi ridere e come farmi arrabbiare.

Ti ringrazio perché continui a volermi così tanto, nonostante tutte le imperfezioni che conosci bene e che hai reso migliori.

Ma soprattutto ti ringrazio perché sai come rendermi felice.

Grazie a tutte le altre persone che mi sono state vicine, che mi hanno aiutato, sopportato, accompagnato e supportato, soprattutto perché lo hanno fatto con il cuore e con la voglia di condividere le mille emozioni insieme a me.

Camilla Leli