

Biofilmes Orais

Mecanismos de formação, arquitetura e potencial patogênico

- **Profa. Dra. Maria Regina Simionato**

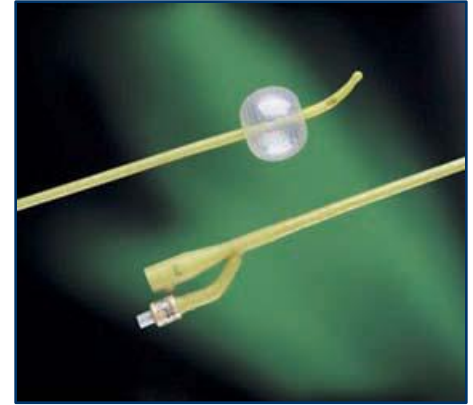
The mouth is an open system, rather like a river, with a continual flow of liquid washing out particles that do not attach and hold fast to surfaces.

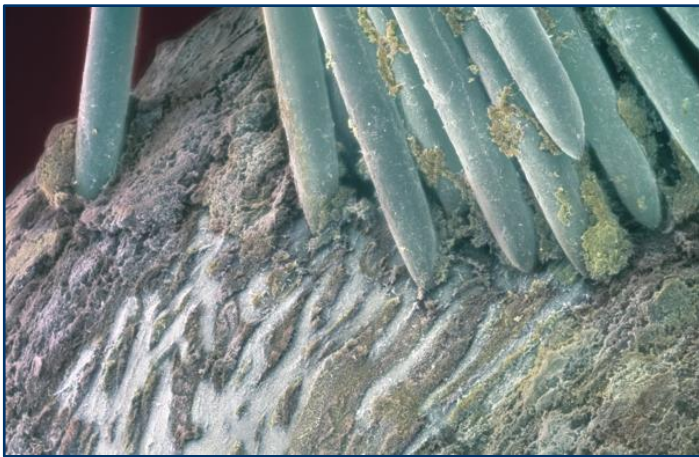
Nobbs et al. 2011. J. Dent Res 90: 1271-8



BIOFILMES: Comunidades de microrganismos **altamente organizadas** embebidos em **matriz orgânica** acelular, cujos constituintes tornam-se **fenotipicamente diferentes** dos seus pares não aderidos. (Stoodley et al, 2002)

> 95% das bactérias existentes na natureza estão em biofilmes

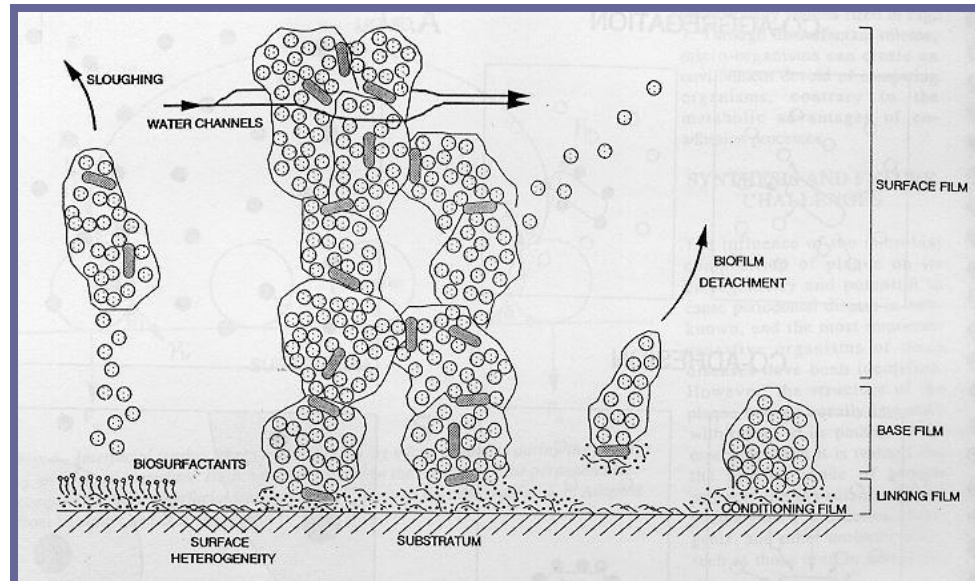




Biofilme na superfície dental
=
Placa dental

Arquitetura do biofilme dental

- ① **Microcolônias** com aspecto de pilares ou cogumelos
- ② **Sistema de canais** - favorece o fluxo de nutrientes, produtos de excreção, enzimas, metabólitos e oxigênio



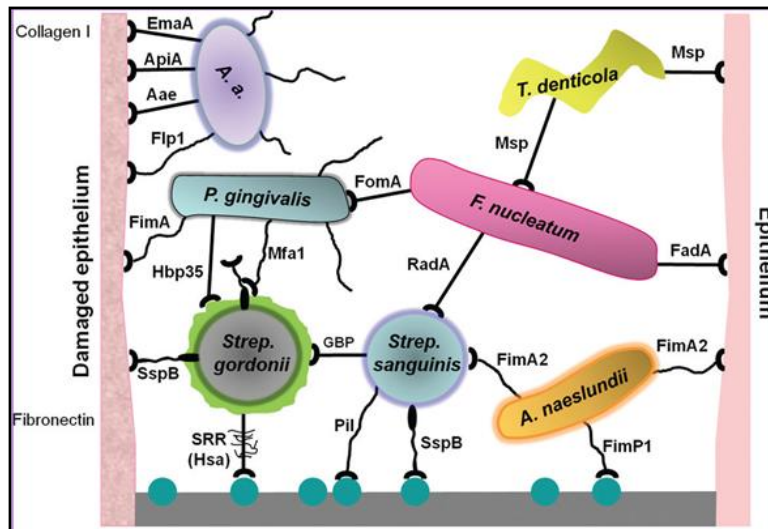
- ③ **Matriz funcional** formada por polímeros extracelulares (bacterianos e do hospedeiro) - colonização, proteção das defesas do hospedeiro e dessecação

Vantagens para os microrganismos que vivem em biofilmes orais

① Persistência em ecossistemas com fluxo

② Heterogeneidade espacial e ambiental

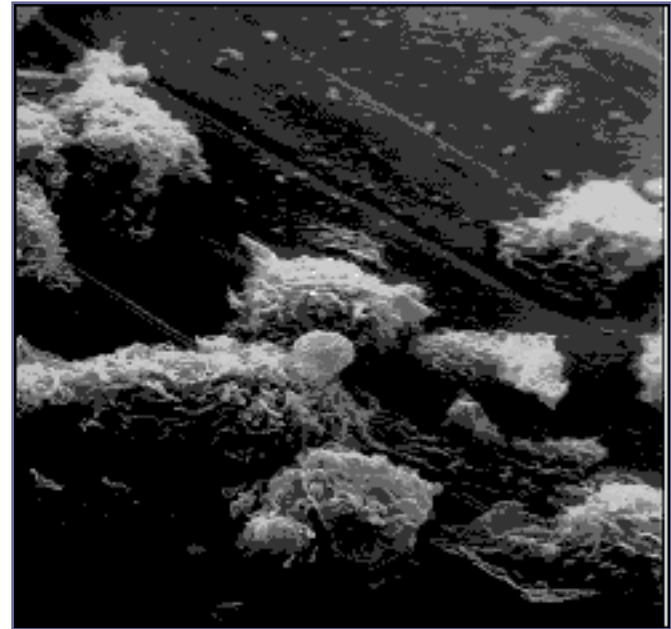
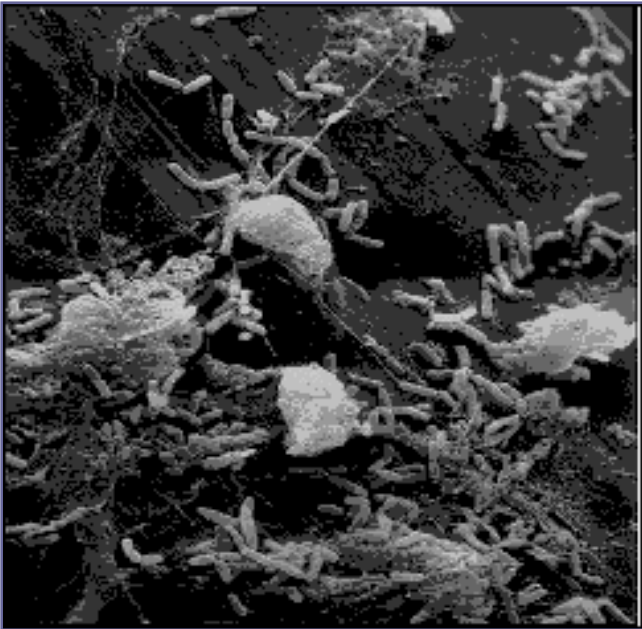
Ampla variedade de habitats com diversidade nutricional, de concentração de oxigênio e de pH



③ Maior **tolerância** (fenotípico) e **resistência** (genotípico) bacteriana

- ☆ a mecanismos de defesa do hospedeiro
- ☆ a formas reativas de oxigênio
- ☆ a proteases
- ☆ a antimicrobianos

- Matriz – reduz penetração do AM
- Taxa de crescimento baixa
- Células persistentes
- eDNA – quelante de cátions e aumenta a tolerância a AM com carga + (aminoglicosídeos por ex)
- Transferência de genes

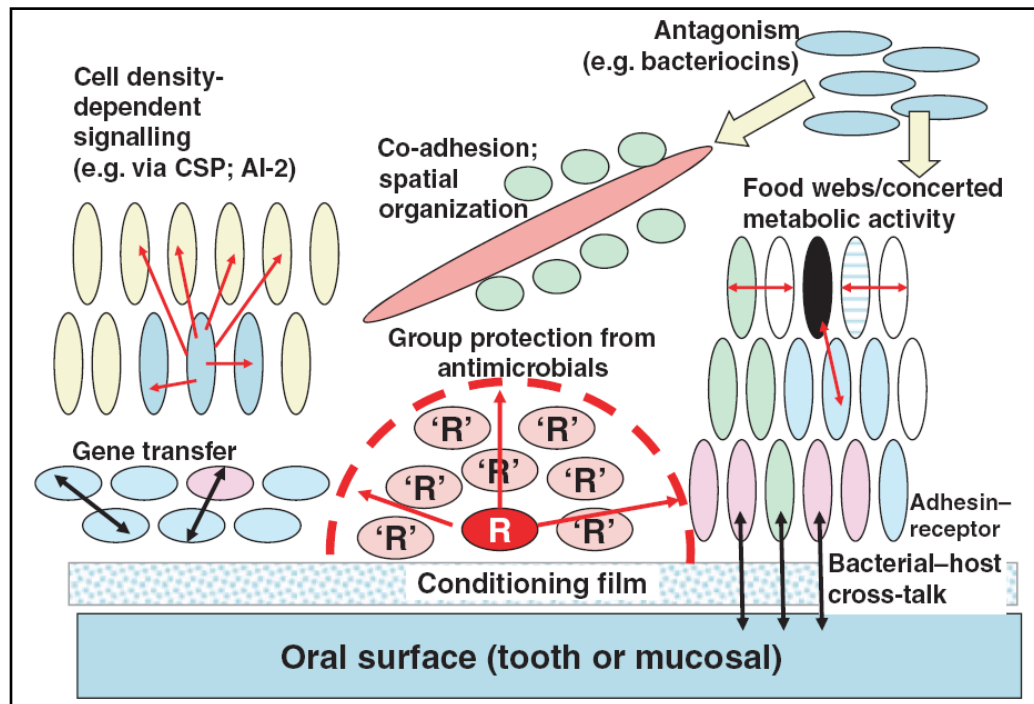


Proximidade, disposição espacial possibilitam:

④ Aquisição de novos genes, expressão de novas características



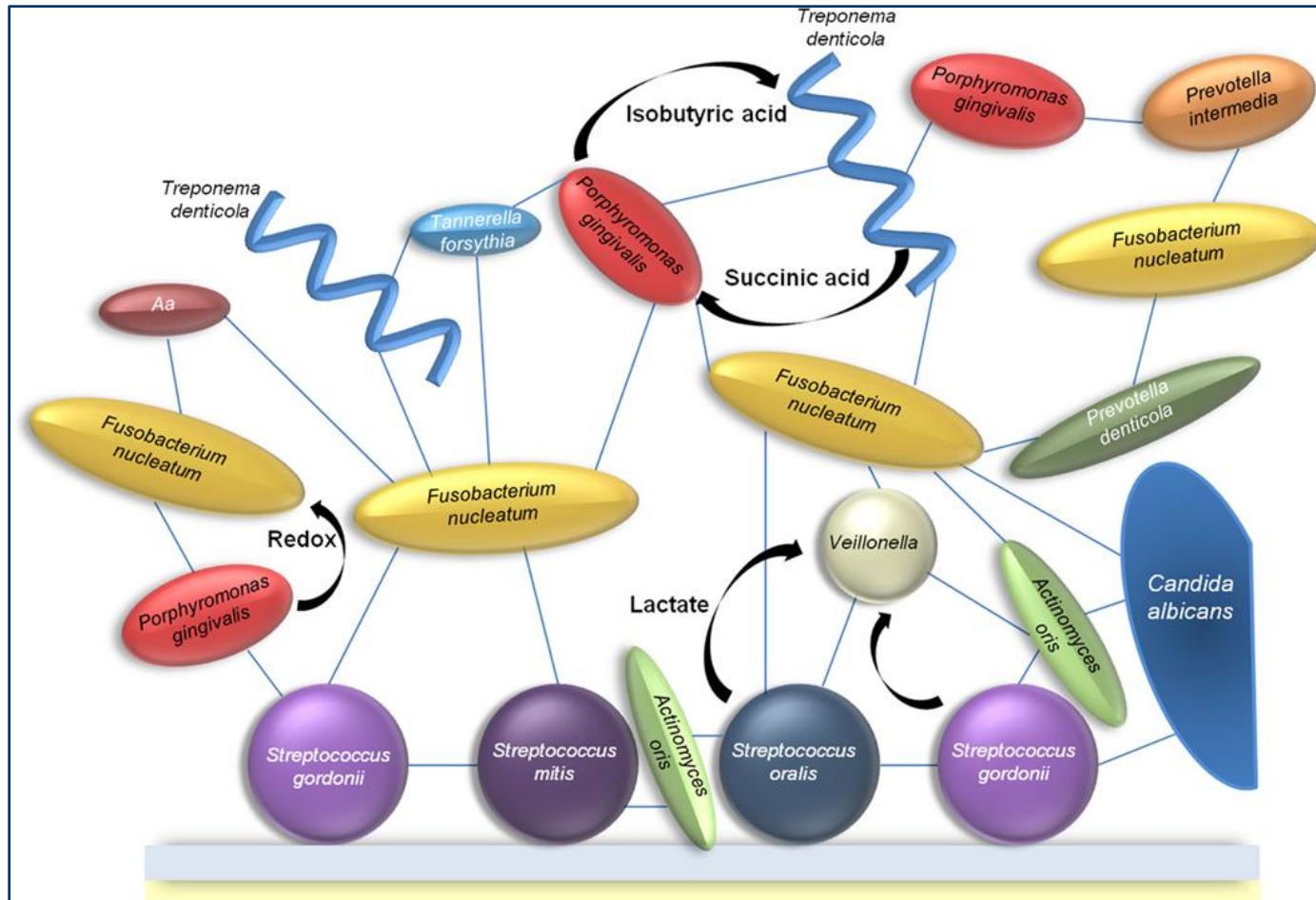
Expressão de um conjunto de genes que resulta em **fenótipos distintos** de seus pares planctônicos



⑤ Metabolismo mais eficiente

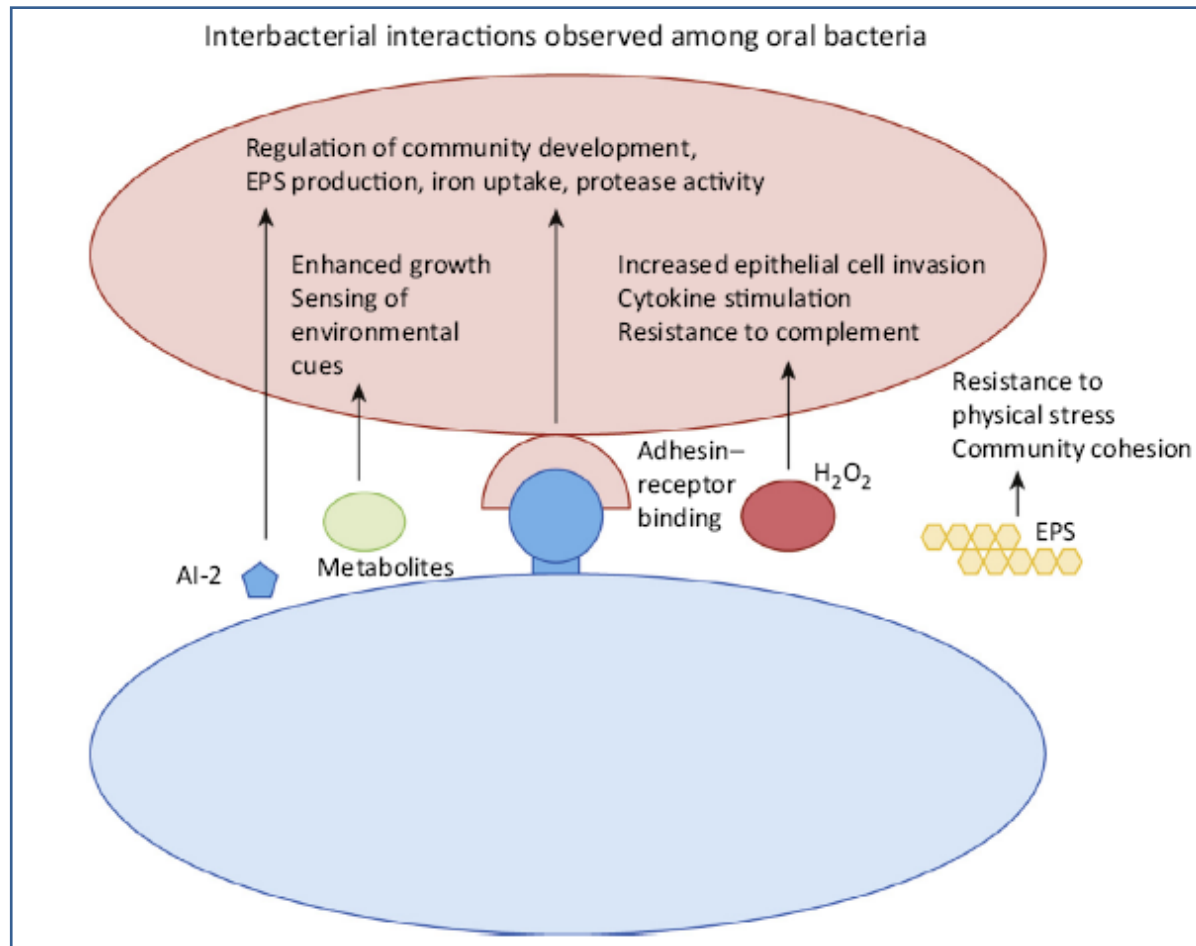
- Maior disponibilidade de nutrientes
- Compartilhamento ou complementação enzimática

Relações metabólicas entre bactérias orais do biofilme dental



⑥ Sinalização célula-célula:

Microrganismos comunicam-se entre si, através de sinais químicos que desencadeiam mecanismos de produção de novas proteínas e enzimas



TRENDS in Molecular Medicine

Rede complexa de moléculas sinalizadoras produzidas por bactérias orais: moléculas pequenas, difusíveis e efetoras

Peptídeos estimuladores de competência (CSP)

- Pequenos peptídeos (17 a 21 aa)
- Produzidos por bactérias Gram +
- Produção influenciada pelo pH



Competência

Formação de biofilme
Liberação de DNA (eDNA)
Produção de bacteriocinas
Resistência ao stress
S. mutans; *S. gordonii*

AI-2 (Quorum Sensing)

- Mediada por moléculas auto-indutoras (AI)
- Produzidos por Gram + e Gram -
 - Sinalização intra específica
 - Sinalização interespecífica



Mutualismo

Formação de biofilme
Porphyromonas gingivalis
Prevotella intermedia
Fusobacterium nucleatum

A sinalização célula-célula capacita os micro-organismos a sentir e adaptar-se a várias situações de stress ambiental e, conseqüentemente, regular a expressão de genes que influenciam a capacidade de patógenos de causarem doenças

Quorum sensing

- A formação de biofilmes requer a expressão coordenada de genes de células individuais regulados por *quorum sensing*
- Células bacterianas individuais produzem um ou mais compostos de baixo peso molecular que são transportados para fora da célula; se várias células produzem o mesmo composto (AI), sua concentração torna-se significativa;
- Quando a concentração atinge certo nível, uma cascata de sinalização celular é iniciada, levando à indução de vários genes;
- Algumas moléculas auto-indutoras funcionam como comunicação entre diferentes espécies e são importantes na formação de biofilmes;
- A comunicação entre células é essencial para a formação de biofilme, e a interferência nesse processo pode ser importante no controle dos biofilmes.

Película adquirida do esmalte (PA)

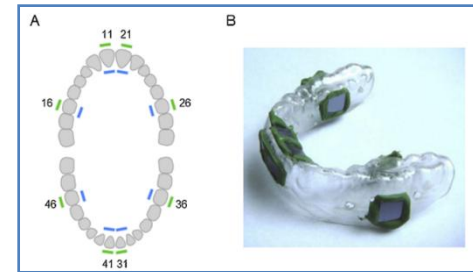
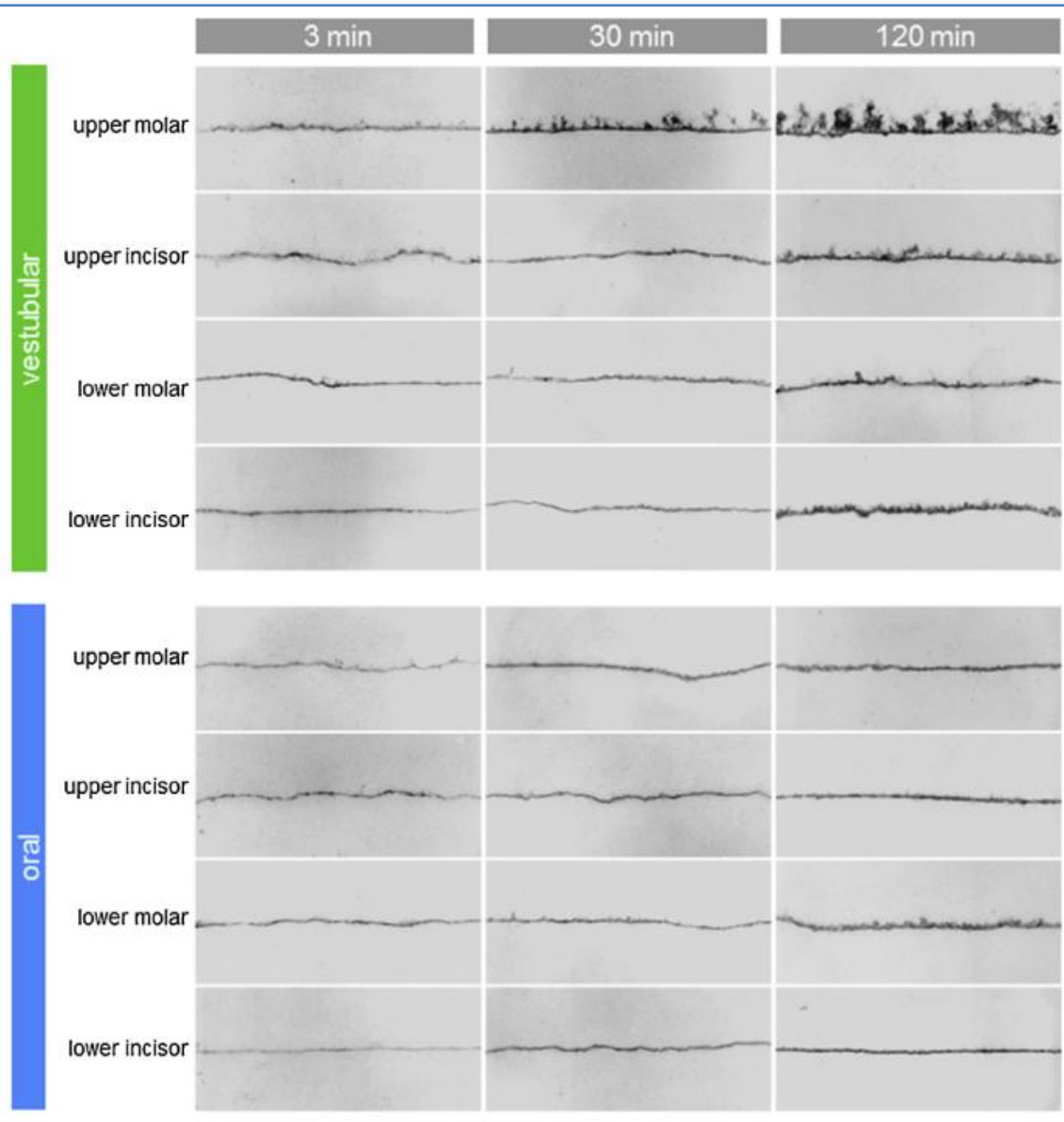
Camada acelular de proteínas que se ligam avida e rapidamente à hidroxiapatita quando exposta à cavidade oral (0,1-1,0 μm)

Base para o subsequente desenvolvimento da placa dental

Composição química e receptores

1. **Glicoproteínas** (mucinas e aglutininas; ex gp340)
2. Proteínas ricas em prolina (PRPs); estaterina
3. Amilase, lisozima, IgA-S, lactoferrina
4. **Glicosiltransferases (Gtfs), glucanos**

Película adquirida do esmalte (PA)



Güth-Thiel et al. 2019

Espessura (nm) varia de acordo com :

- indivíduo
- região
- tempo

Funções biológicas

1. Lubrificação da superfície do esmalte
(mucinas, proteínas ricas em prolina)
2. Regulação da homeostase mineral
(retarda a desmineralização)
3. Atividade antimicrobiana
(lisozima, lactoferrina, lactoperoxidase, IgA-S)
4. Determina a colonização bacteriana
(reconhecimento de receptores)

Placa dental:

Biofilme complexo que se desenvolve na superfície dos dentes e é um precursor de cárie e de doenças periodontais



Cálculo dental

Etapas e formação do biofilme dental

A. Fase de colonização inicial

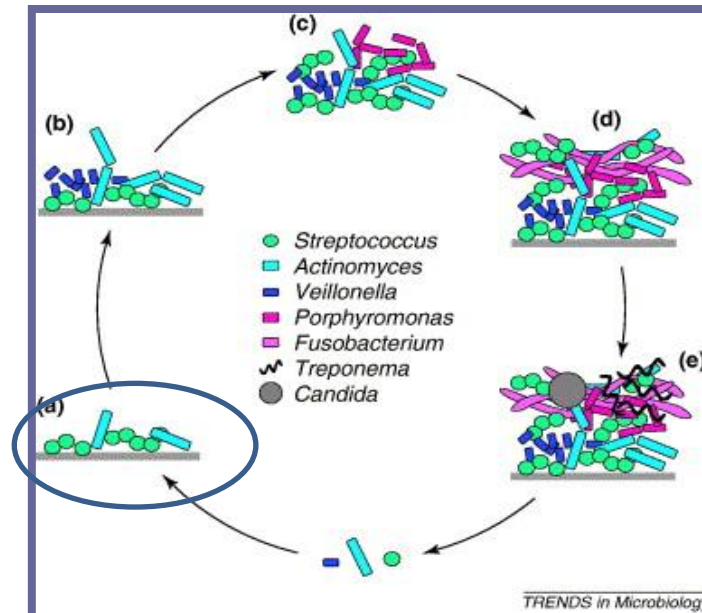
Adesão de micro-organismos à superfície da PA

B. Fase de acumulação e maturação do biofilme

Crescimento bacteriano em microcolônias sésseis e sucessão microbiana

C. Fase de dispersão

Bactérias são liberadas e podem colonizar outras superfícies



Jenkinson & Lamont.
Trends in Microbiology, 2005.

Etapas e formação do biofilme dental

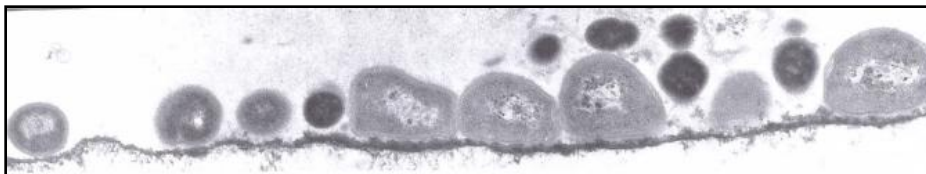
A. Fase de colonização inicial - predominam ligações de bactérias à PA

1. Células planctônicas ligam-se à superfície dental por ligações de **baixa afinidade e baixa eficiência** (forças de Van der Waals e hidrofóbicas)

∴ Reversível

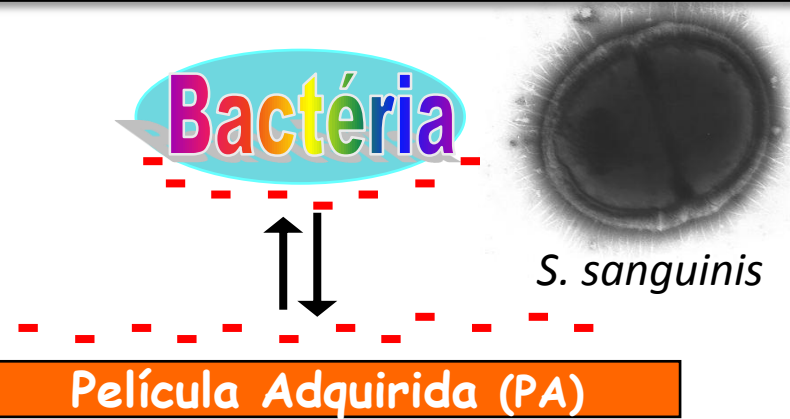
2. Células adsorvidas ligam-se à superfície da PA através de interações de **maior afinidade e eficiência**, usando **adesinas** específicas e seus **respectivos** receptores

∴ Irreversível

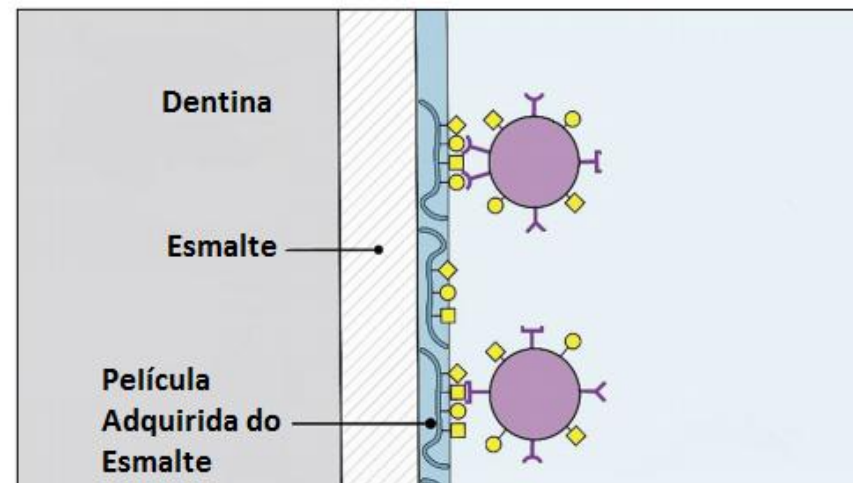


HD Schroeder, University of Zurich

In Lamont et al. Oral Microbiology and Immunology 2006



Ligações entre adesinas e receptores na PA



Modificado de Cross e Ruhl. Cell Immunol 2018

18

A. Fase de colonização inicial

COLONIZADORES INICIAIS

Streptococcus spp (> 60%)

S. gordonii

S. sanguinis

S. oralis

S. mitis

S. cristatus

S. mutans

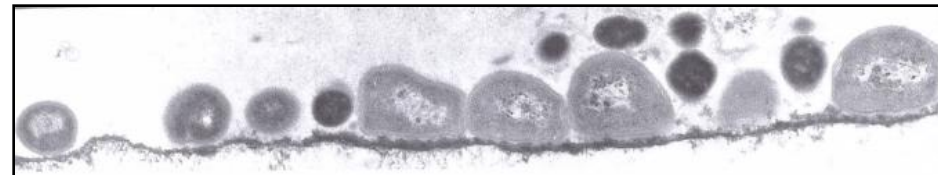
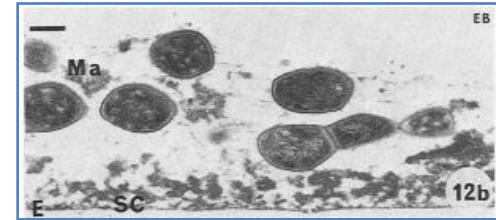
Actinomyces spp

Veillonella spp

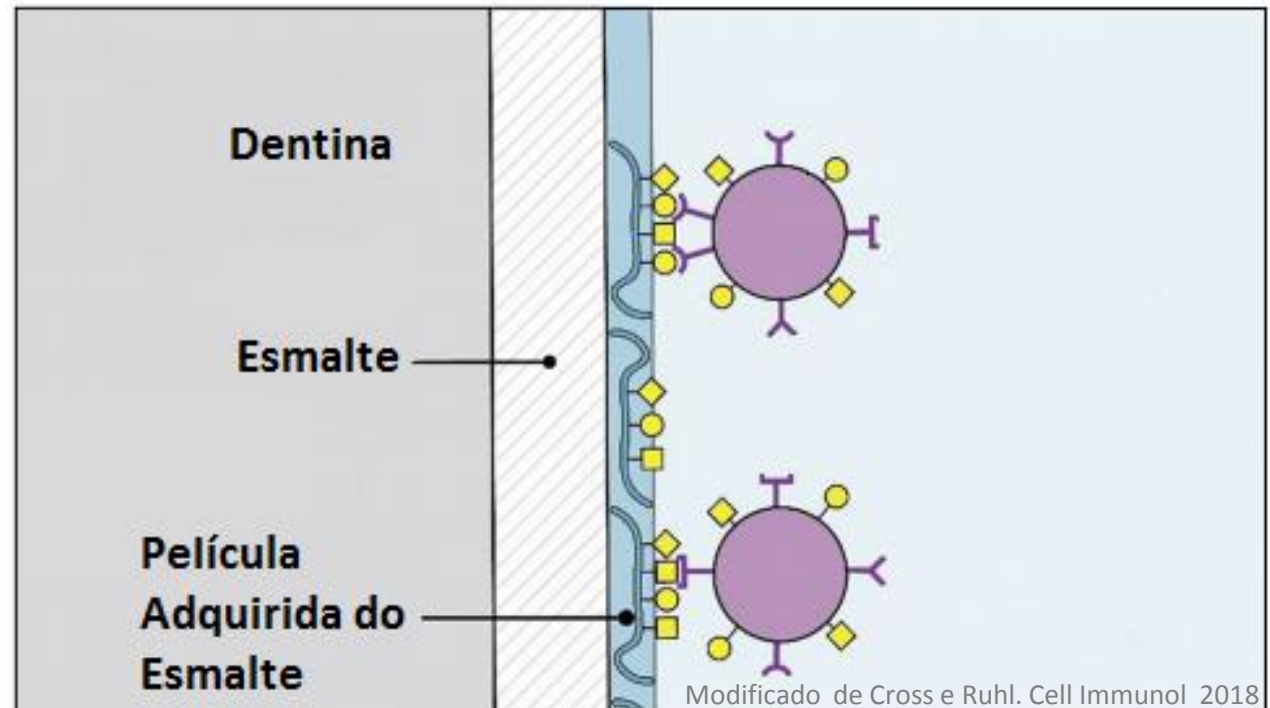
Gemella spp

Granulicatella spp

Kingella spp



HD Schroeder, University of Zurich
In Lamont et al. Oral Microbiology and Immunology 2006



Mecanismos de adesão inicial

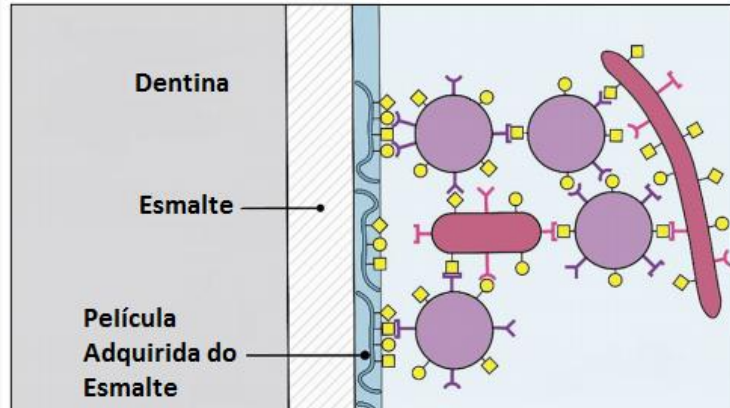
Adesinas	Receptores
Lectinas	Oligossacarídeos
Proteína	Proteína
Interações iônicas ou hidrofóbicas	

Locais preferenciais de colonização

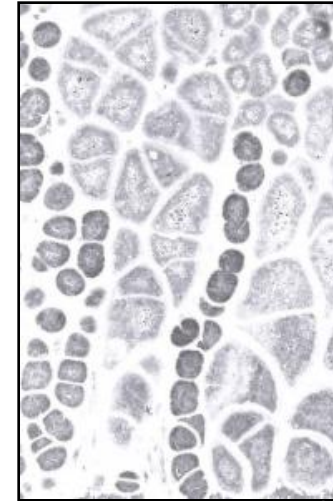
Espécies	Locais de colonização
<i>S. sanguinis</i>	Superfícies lisas (V ou L/P)
<i>Actinomyces spp</i>	Margem gengival
<i>S. mutans</i>	Superfícies lisas IP

B. Fase de acumulação e maturação do biofilme

DESENVOLVIMENTO DE MICROCOLÔNIAS



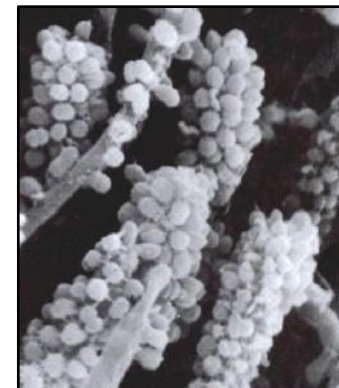
Modificado de Cross e Ruhl. Cell Immunol 2018



HD Schroeder, University of Zurich

In Lamont et al. Oral Microbiology and Immunology 2006

1. Divisão celular
2. Aderência interbacteriana (co-adesão de novas bactérias)
3. Crescimento rápido
4. Aumento da diversidade (sucessão)
5. Maturação → comunidade em equilíbrio



Mecanismos de co-adesão

① Através de Polissacarídeos Extracelulares (PEC)

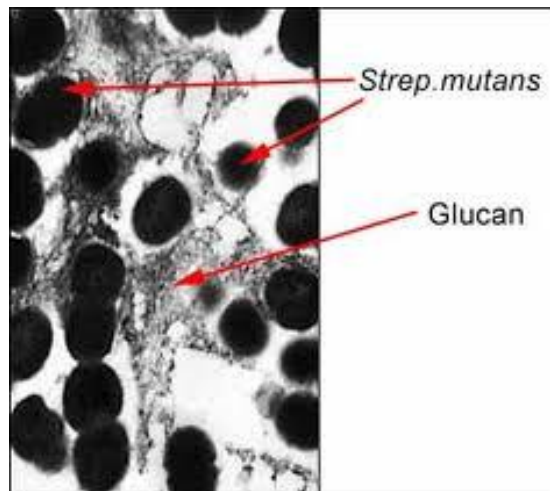
S. mutans + S. mutans

Actinomyces + Actinomyces



Mesma espécie

(Co-adesão intra-específica)



② Através de componentes de saliva e do fluido gengival

S. sanguinis + *S. sanguinis*

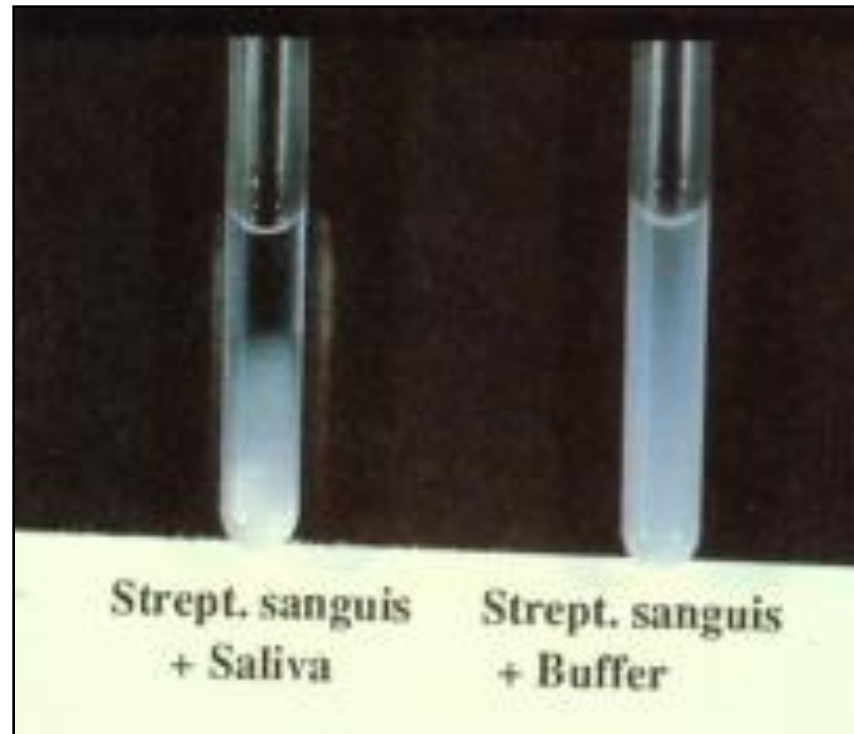
S. gordonii + *S. gordonii*

S. oralis + *S. oralis*

Actinomyces spp + *Actinomyces spp*

Mesma espécie

(Co-adesão intra-específica)



③ Através de constituintes de superfície de bactérias de diferentes espécies associados a fímbrias ou a fibrilas

S. gordonii + *P. gingivalis*

Fusobacterium nucleatum + *S. sanguinis*

Espécies ou gêneros diferentes

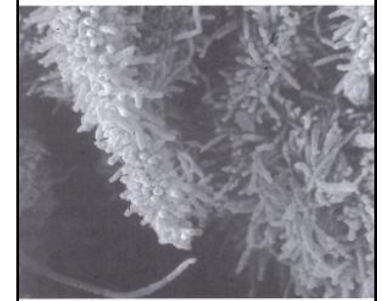
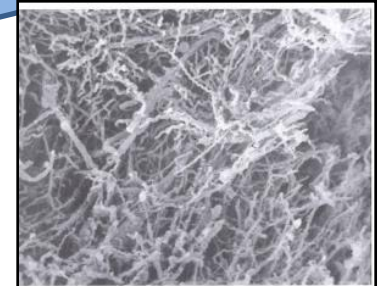


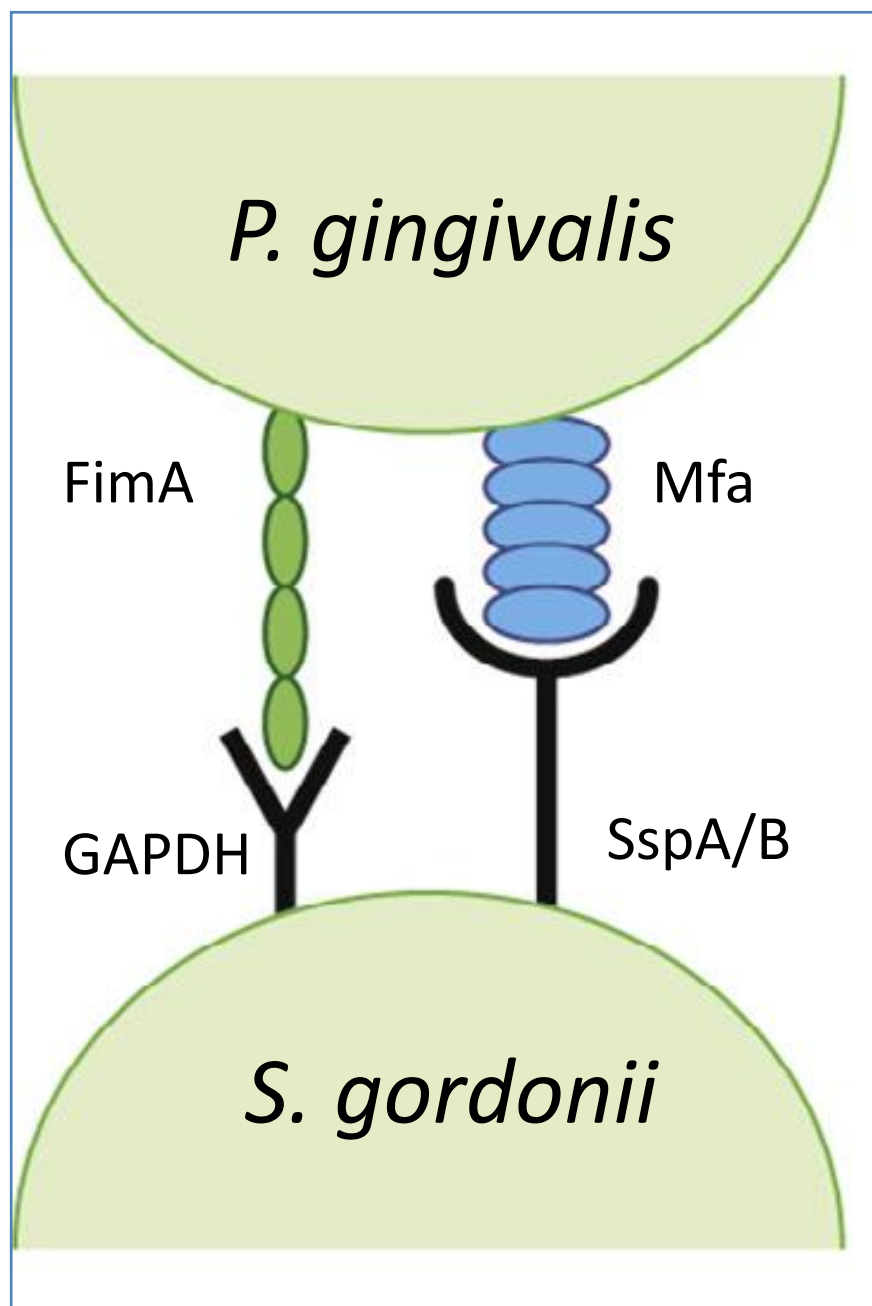
(Co-adesão inter-específica e inter-genérica)



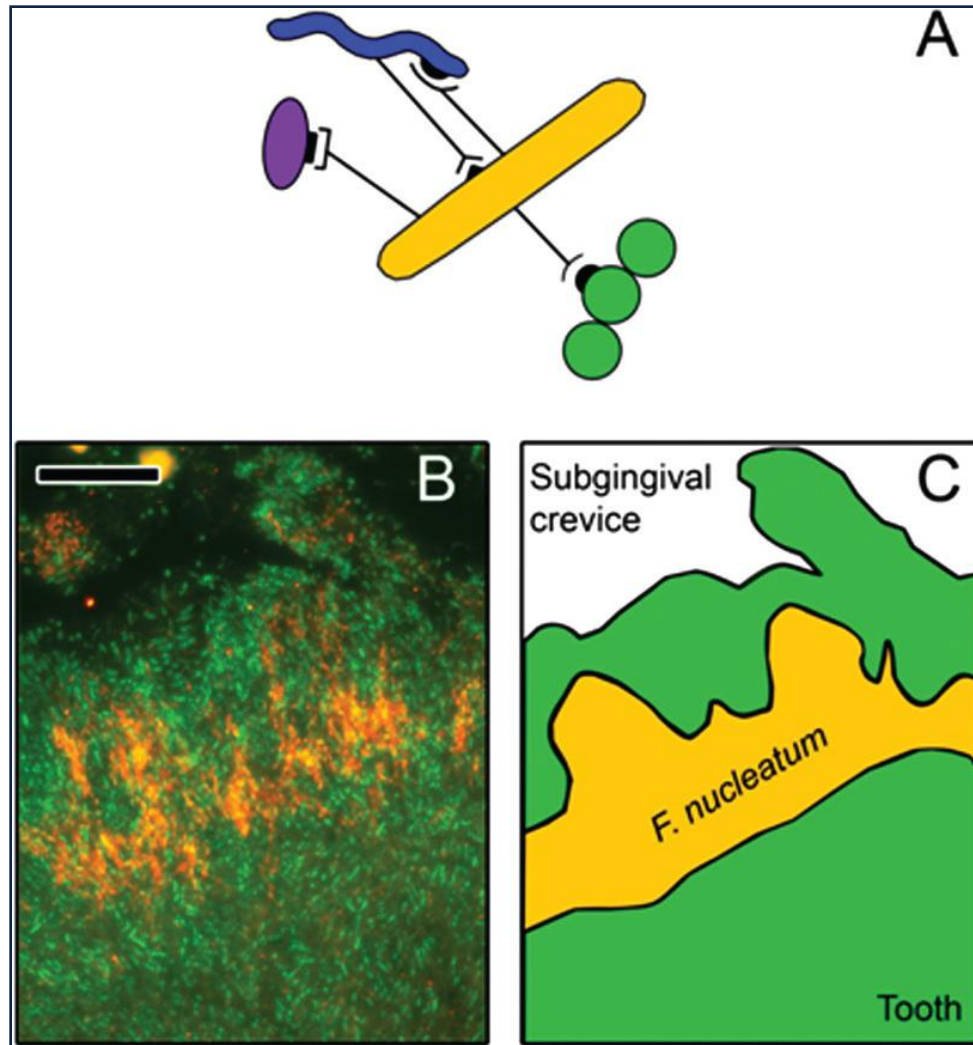
Aumento da diversidade

Espigas de milho, rosetas, cepilhos





Fusobacterium nucleatum como ponte entre colonizadores iniciais e tardios

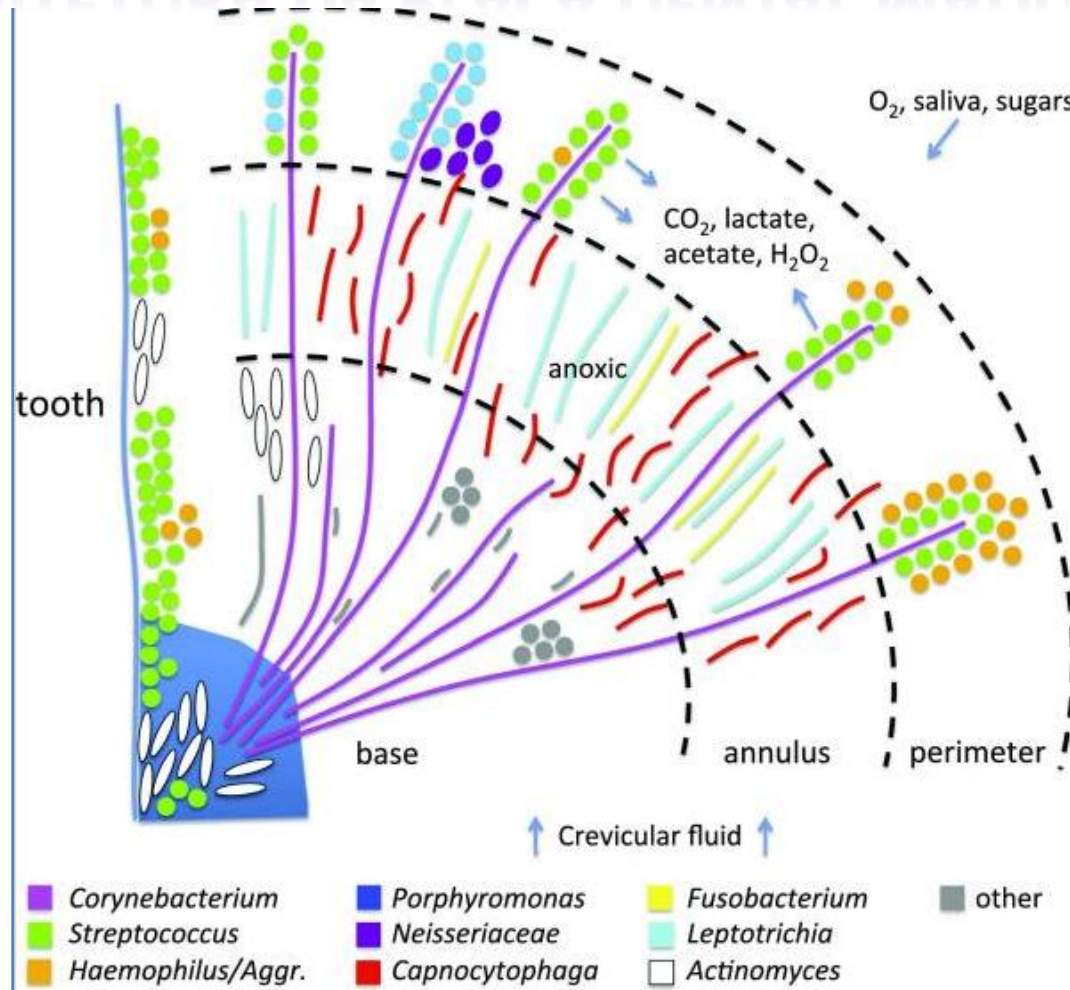


MATURAÇÃO DO BIOFILME

Sucessão ecológica → Formação da placa dental madura

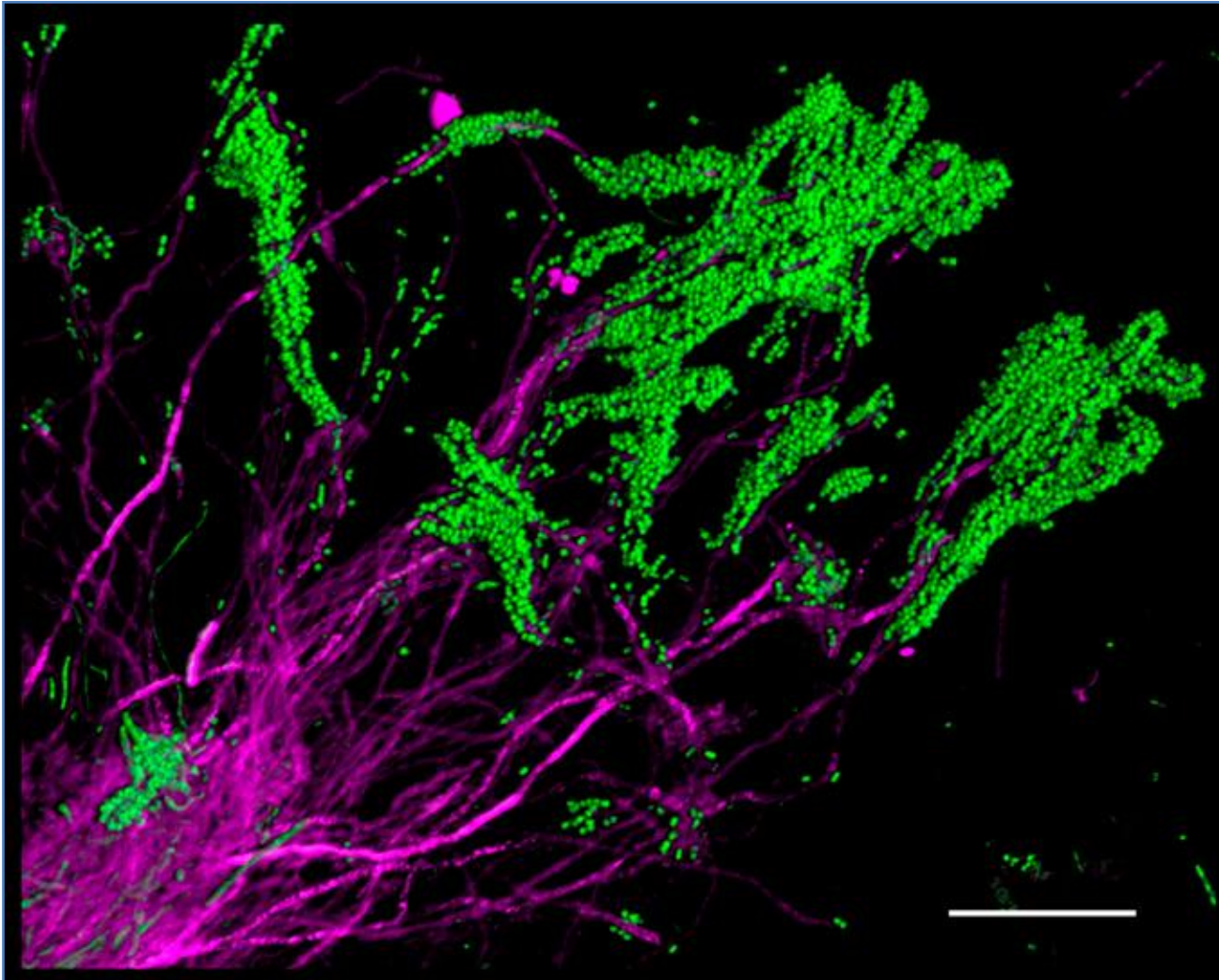
ARQUITETURA DA PLACA DENTAL MADURA

Corynebacterium matruchotii
na estrutura da placa dental madura
(espigas de milho e ouriços)

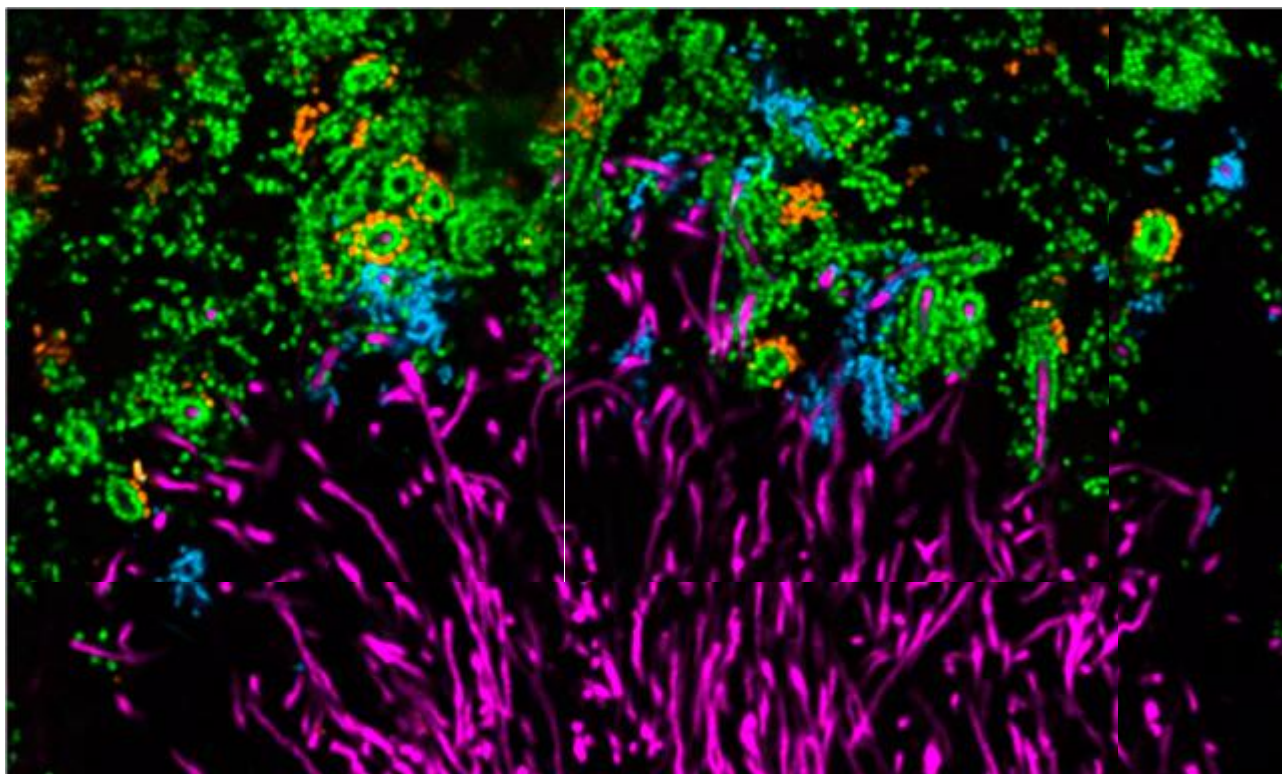










PLACA DENTAL SUPRAGENGIVAL

Estruturas de espiga de milho formadas por *Corynebacterium matruchotii* (magenta) e cocos (verde) na placa

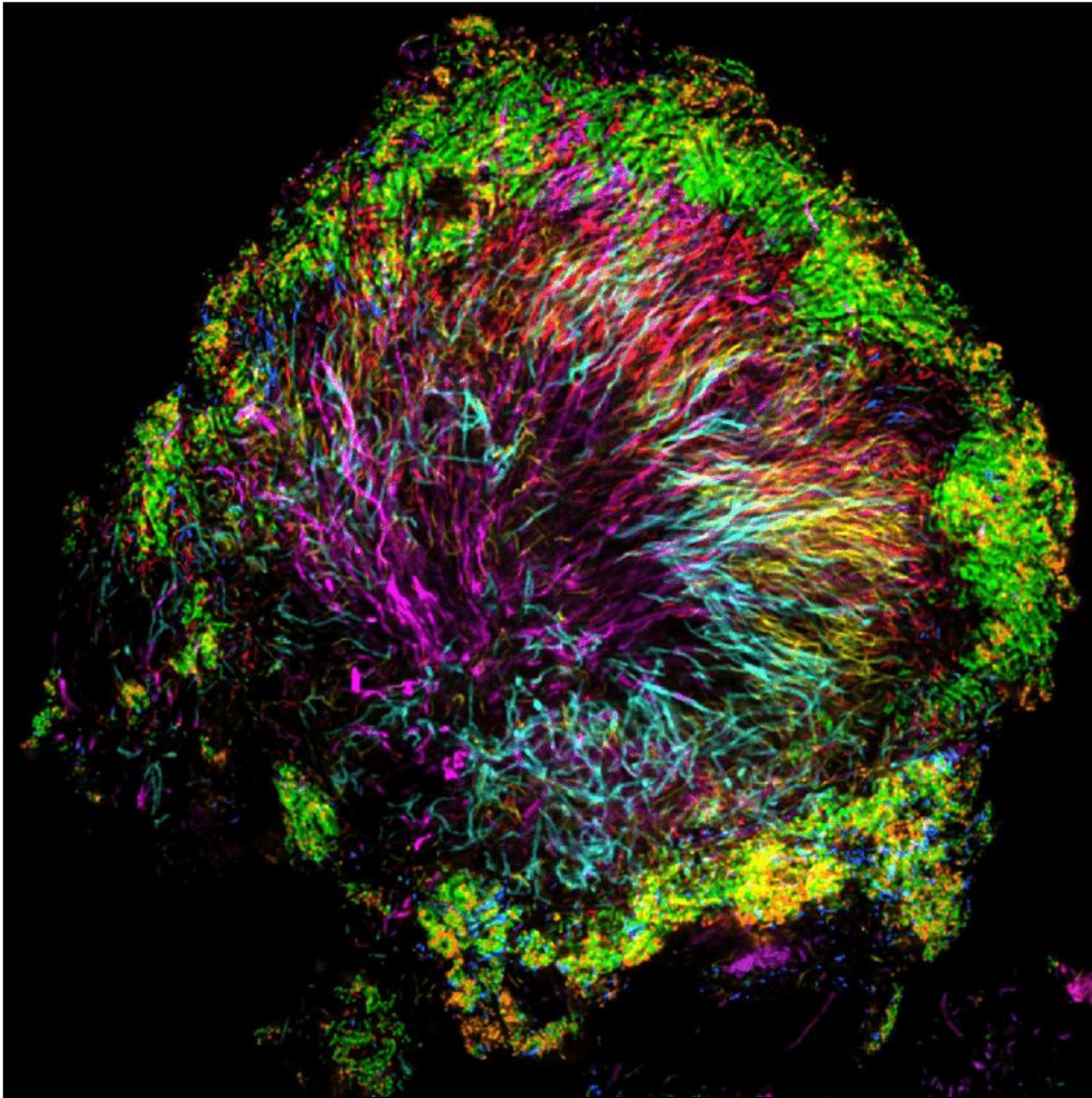


PLACA DENTAL SUPRAGENGIVAL



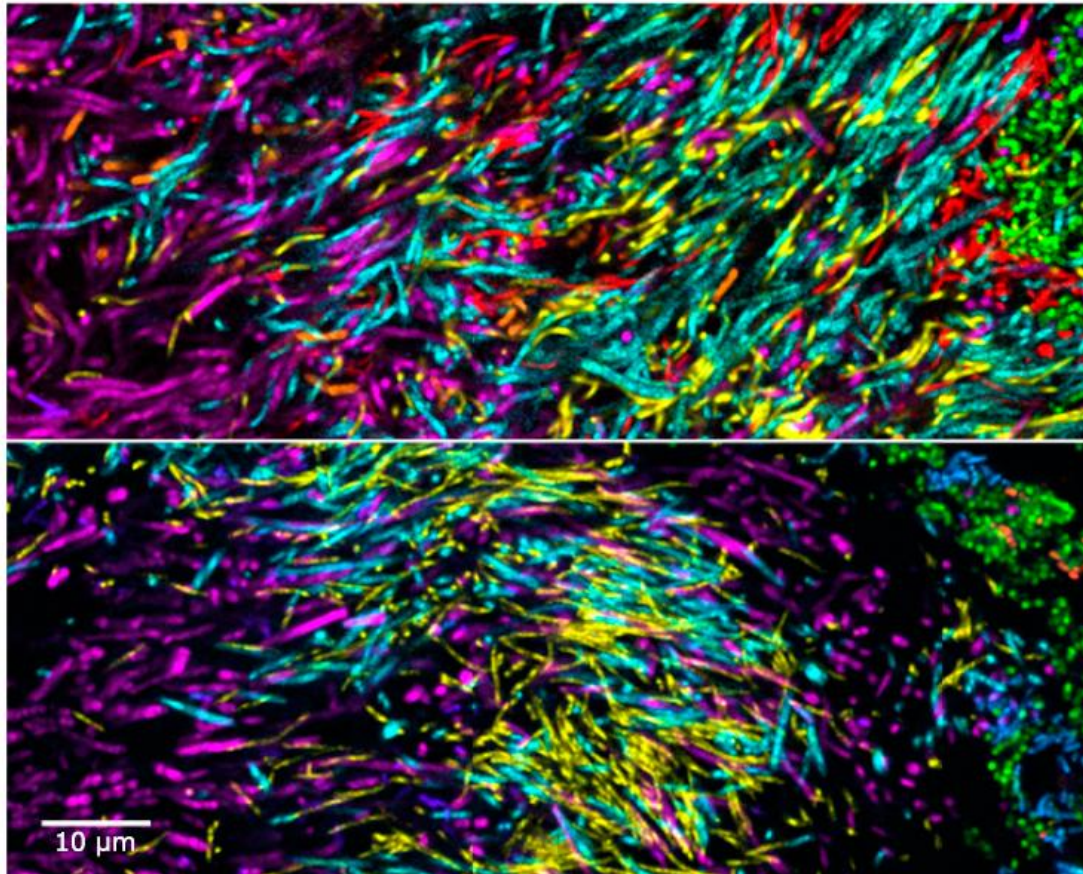
- | | |
|--|---|
|  <i>Corynebacterium</i> |  <i>Fusobacterium</i> |
|  <i>Streptococcus</i> |  <i>Leptotrichia</i> |
|  <i>Porphyromonas</i> |  <i>Capnocytophaga</i> |
|  <i>Haemophilus/Aggregatibacter</i> |  <i>Neisseriaceae</i> |





Hibridização do DNA com sondas específicas marcados cpm
corantes fluorescentes - FISH



PLACA DENTAL SUPRAGENGIVAL

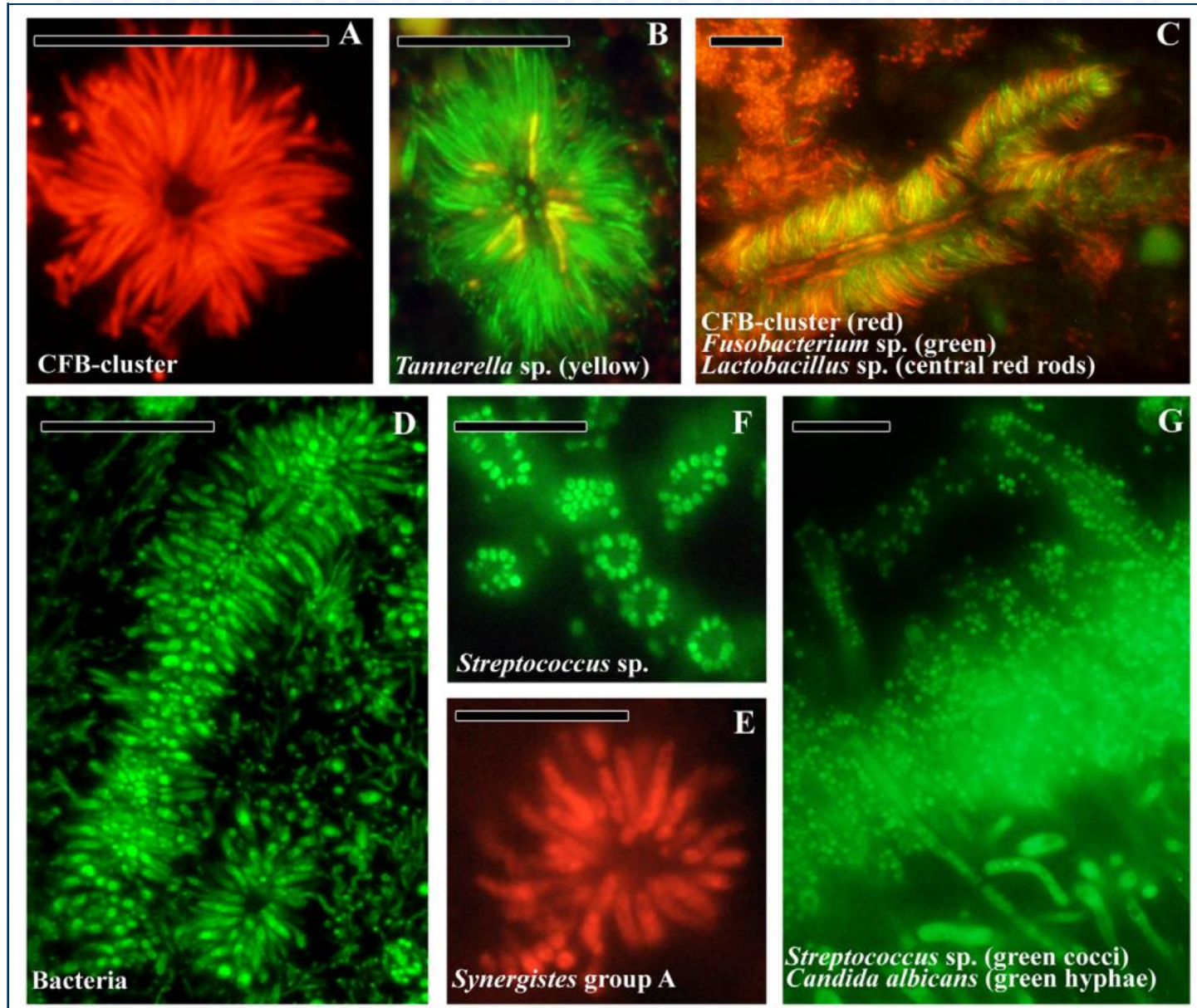
Filamentos e bacilos de vários gêneros formando estrutura na forma de ouriço



 <i>Corynebacterium</i>	 <i>Fusobacterium</i>
 <i>Streptococcus</i>	 <i>Leptotrichia</i>
 <i>Porphyromonas</i>	 <i>Capnocytophaga</i>
 <i>Haemophilus/Aggregatibacter</i>	 <i>Neisseriaceae</i>

Welch et al. 2016 PNAS

ARQUITETURA DA PLACA DENTAL MADURA

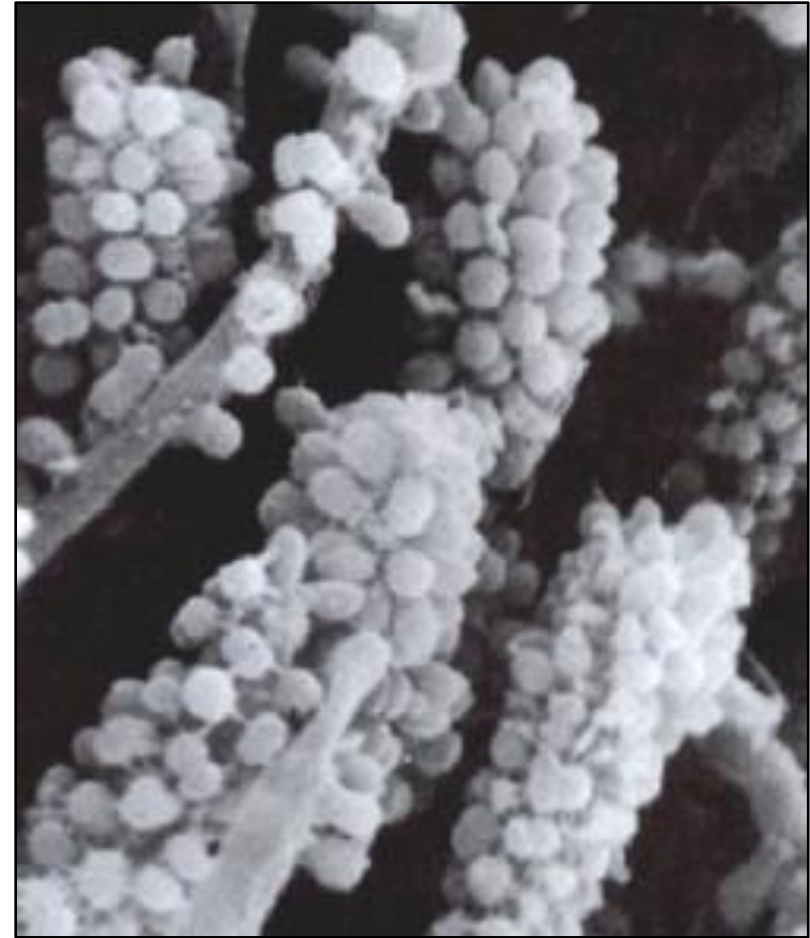


PLACA DENTAL SUPRAGENGIVAL

Espigas de milho



Jones SJ. Dent Practit. 1972



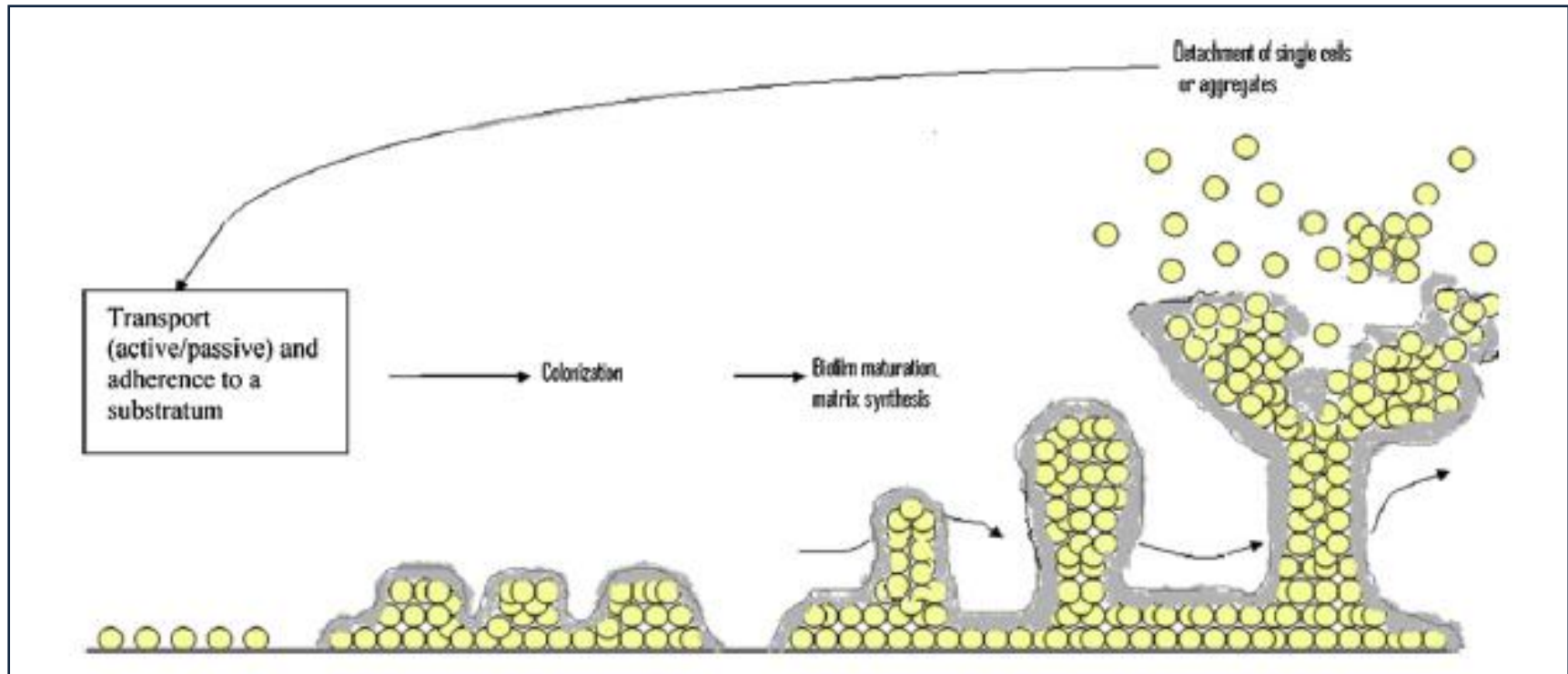
Jakubovics e Kolenbrander, 2010

C. Fase de dispersão

Bactérias são liberadas e podem colonizar outras superfícies

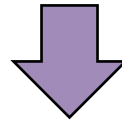
Liberação de células bacterianas

Bactérias associadas ao biofilme retornam à existência planctônica

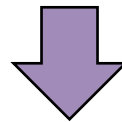


S. mutans: Proteína P1 é proteína formadora de amilóides

Incorporação de D- Aminoácidos na parede celular
(D-tirosina; D-leucina; D-triptofano; D-metionina)

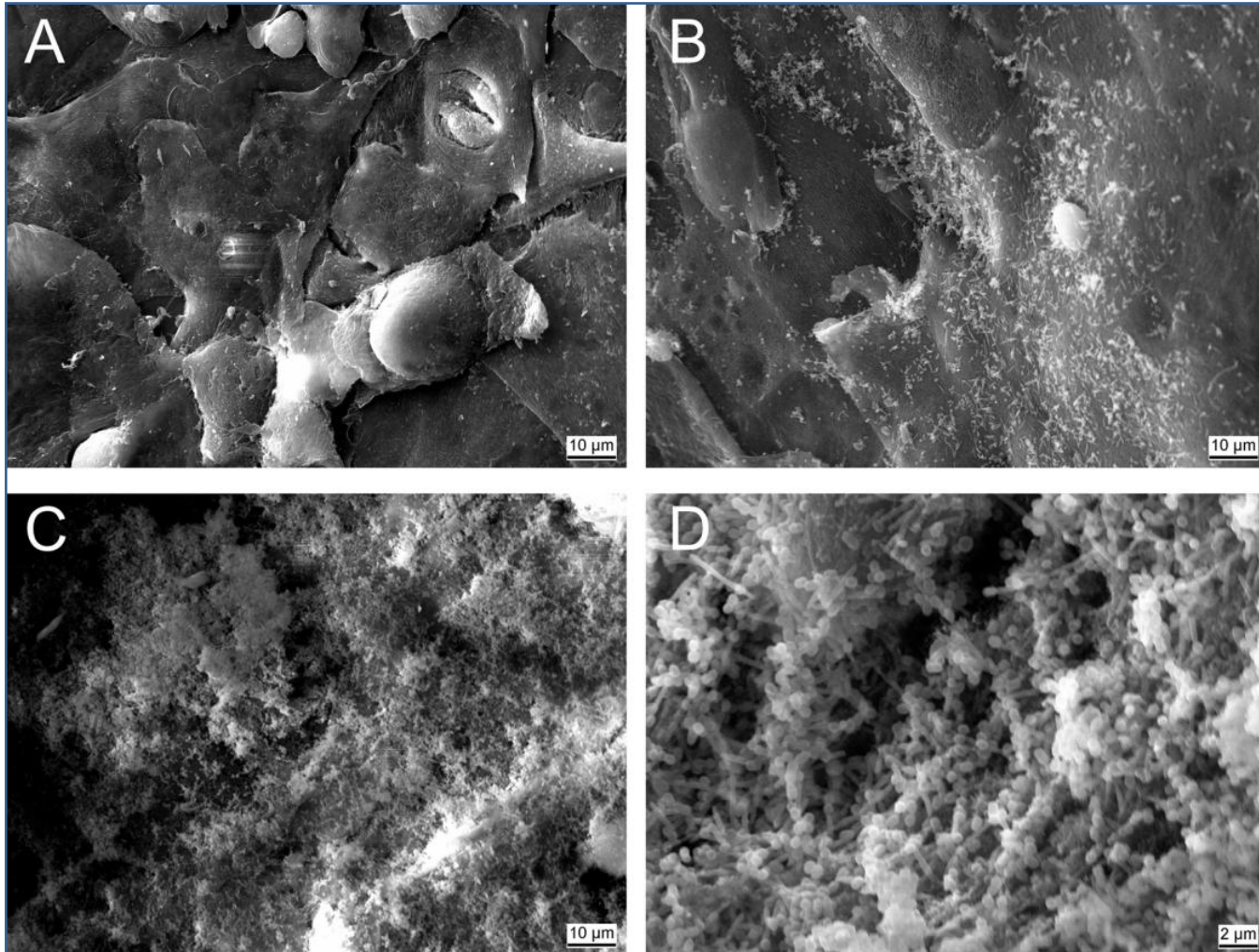


Liberação de fibras amilóides bacterianas
ancoradas pela matriz extracelular



Dispersão do biofilme de *S. mutans*

Biofilme sobre epitélio gengival



Biofilme sobre epitélio gengival

Legend:

