

Biofilmes Oraís

Objetivos gerais da aula:

- Arquitetura dos biofilmes
- Mecanismos de formação
- Potencial patogênico dos biofilmes orais

- **Profa. Dra. Maria Regina Simionato**
- **Depto. de Microbiologia ICB/USP**



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

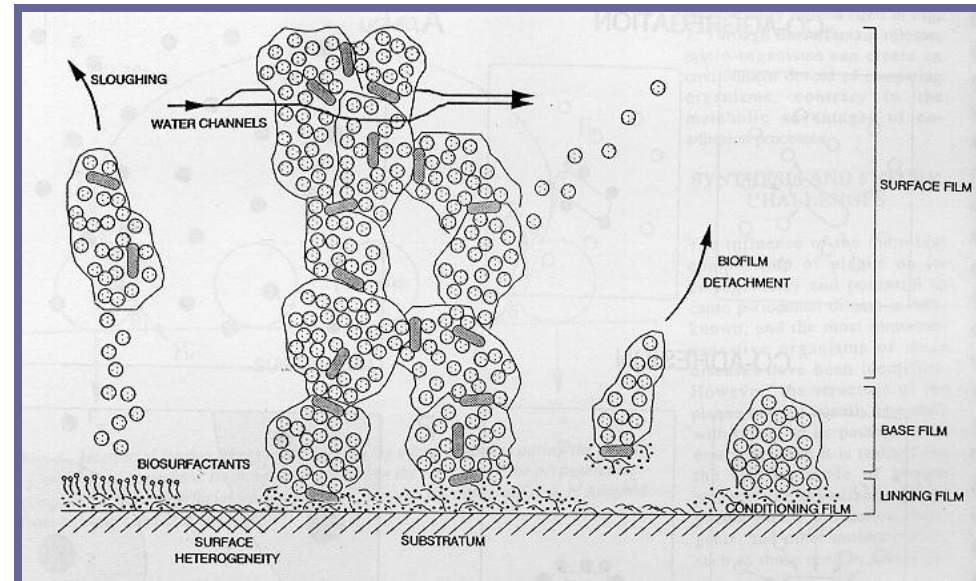


Biofilme na superfície dental
=
Placa dental

Arquitetura do biofilme dental

① **Microcolônias** com aspecto de pilares

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

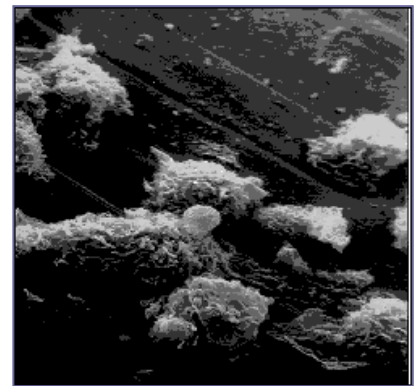
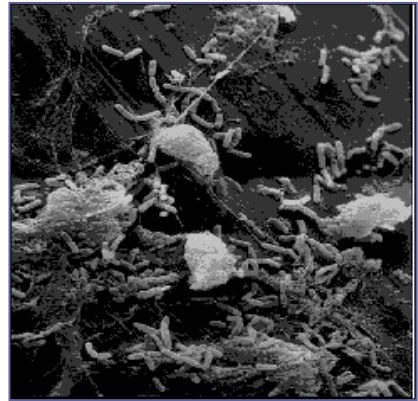
Vantagens para os microrganismos que vivem em biofilmes orais

① Persistência em ecossistemas com fluxo

② Heterogeneidade espacial e ambiental

- Diversidade de superfícies para adesão
- Diversidade nutricional
- Diversidade de Eh (concentração de oxigênio)
- Diversidade de pH

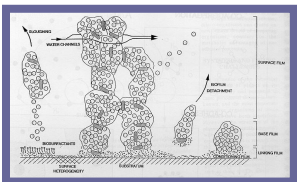
③ Maior **tolerância** (fenotípico) e **resistência** (genotípico) bacteriana a agentes com atividade antimicrobiana



- Penetração reduzida dos agentes antimicrobianos
 - dissolução do agente na parte superficial do biofilme
 - a matriz do biofilme funciona como uma barreira
 - ligação do agente à matriz do biofilme
- Menor taxa de crescimento das bactérias
- Presença de células persistentes ou dormentes
- Presença de eDNA (quelante de cátions)
- Transferência horizontal de genes

Tolerância

Resistência

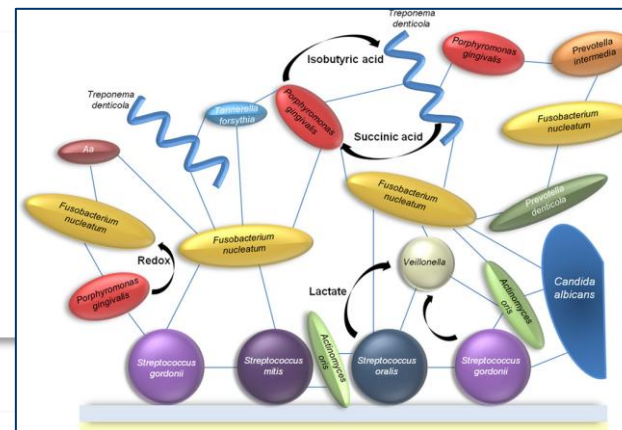


Proximidade das bactérias e a arquitetura e disposição espacial do biofilme possibilitam:

④ **Expressão** de um conjunto de genes que resulta em **fenótipos distintos** de seus **pares planctônicos**

⑤ **Metabolismo mais eficiente**

- Compartilhamento ou complementação enzimática
- Maior disponibilidade de nutrientes (ex. cadeia alimentar)



Marsh et al. 2011

⑥ **Sinalização célula-célula:**

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

A sinalização célula-célula capacita os micro-organismos a sentir e adaptar-se a várias condições ambientais e, conseqüentemente, regular a expressão de genes que permitem: formar biofilmes, resistir a situações de stress ambiental e influenciar a capacidade de patógenos de causarem doenças e de sobreviverem em células do hospedeiro.

Película adquirida do esmalte (PA)

Camada acelular de proteínas que se ligam ávida 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)
2. Proteínas ricas em prolina (PRPs); estaterina
3. Amilase, lisozima, IgA-S, lactoferrina
4. **Glicosiltransferases (Gtfs), glucanos**

Hospedeiro

Bacteriana

Funções biológicas

1. Lubrificação da superfície do esmalte
(mucinas, proteínas ricas em prolina)
2. Regulação da homeostase mineral
(retarda a passagem de substâncias com carga elétrica – ácidos e produtos da desmineralização)
3. Atividade antimicrobiana
(lisozima, lactoferrina, lactoperoxidase, IgA-S)
4. Determina a colonização bacteriana
(adesinas bacterianas reconhecem 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

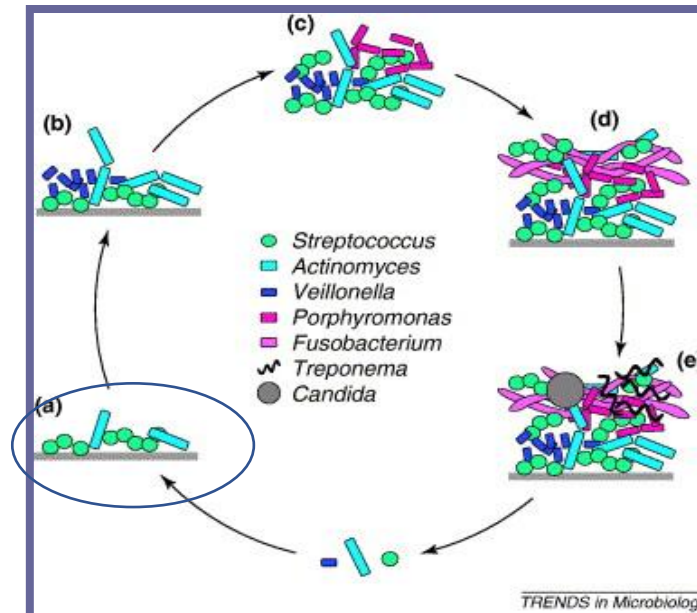
Adesão de microrganismos à superfície da PA

B. Fase de acumulação e de maturação do biofilme

Crescimento bacteriano em microcolônias sésseis e sucessão microbiana

C. Fase de dispersão

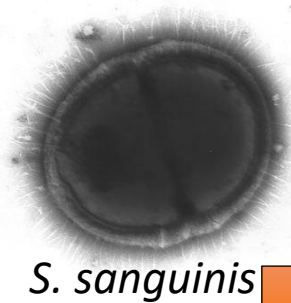
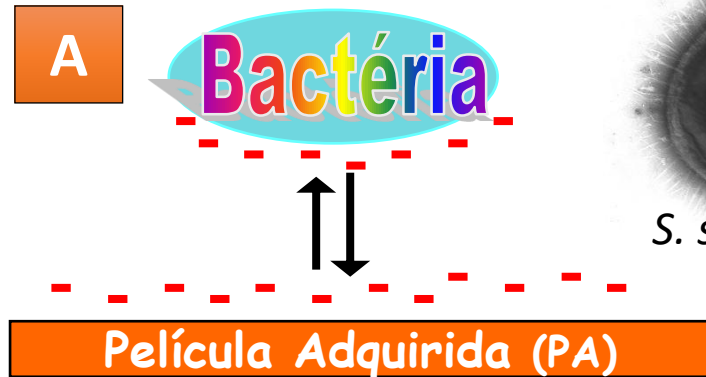
Bactérias são liberadas e podem colonizar outras superfícies



Jenkinson & Lamont .
Trends in Microbiology, 2005.

Etapas e formação do biofilme dental

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



S. sanguinis

1. Repulsão inicial entre a bactéria e a PA (cargas negativas)
2. Bactérias da saliva chocam-se inúmeras vezes com a superfície da PA
3. Quando a bactéria choca-se com a superfície em determinado ângulo e com determinada velocidade \Rightarrow equilíbrio é estabelecido \Rightarrow bactéria permanece próxima à superfície por curto período de tempo (estágio B)

B

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

\therefore Reversível

C

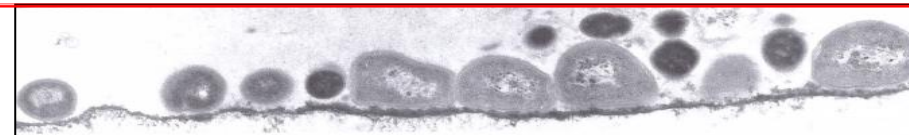
Células adsorvidas ligam-se à superfície da PA através de interações de **maior afinidade e eficiência**, usando **adesinas** específicas e seus **respectivos** receptores

Mecanismos:

- Adesinas (proteínas tipo lectinas) e receptores oligossacarídicos
- Adesinas (proteínas) e receptores protéicos

\therefore Irreversível

COLONIZAÇÃO



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

Nem todas as bactérias ligadas reversivelmente vão definitivamente colonizar a superfície dental

Somente aquela que possuem adesinas específicas a receptores da PA progredem para a colonização (Fase C)

Daí a razão dessa fase ser restrita a tão poucas espécies e gêneros

A. Fase de colonização inicial

COLONIZADORES INICIAIS

Streptococcus spp (> 60%)



- S. gordonii*
- S. sanguinis*
- S. oralis*
- S. mitis*
- S. cristatus*
- S. mutans*

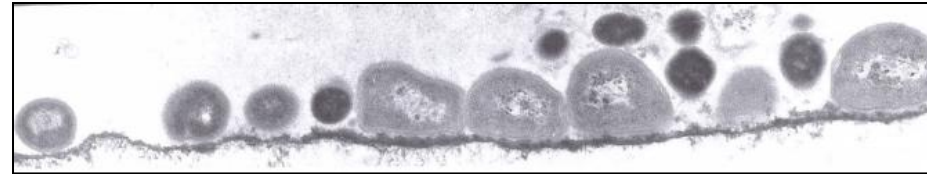
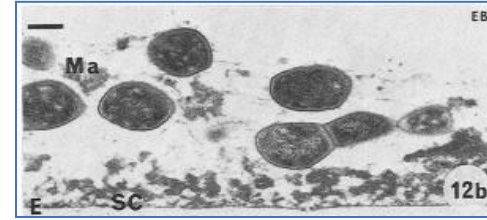
Actinomyces spp

Veillonella spp

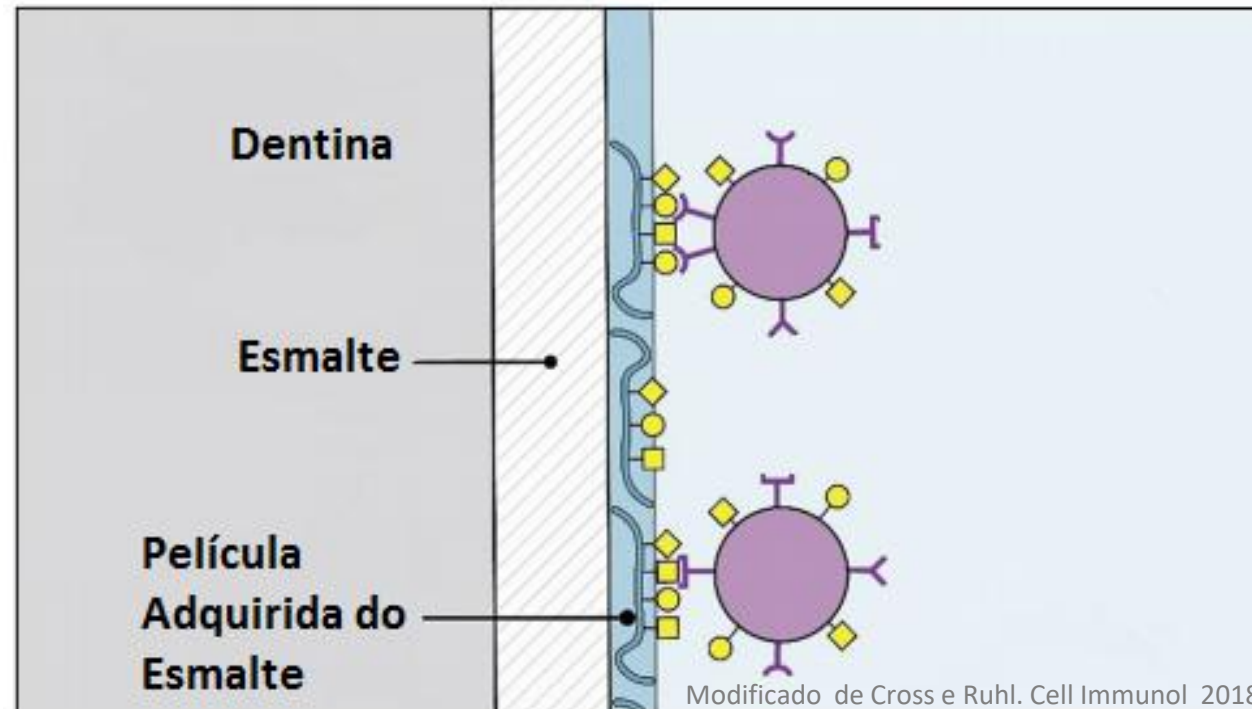
Gemella spp

Granulicatella spp

Kingella spp

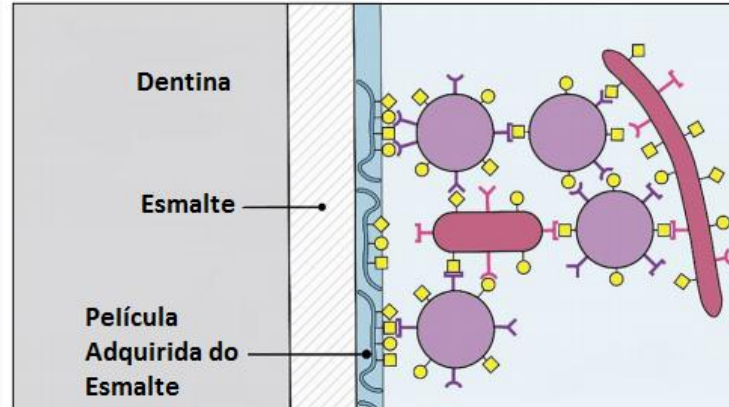


HD Schroeder, University of Zurich
In Lamont et al. Oral Microbiology and Immunology 2006

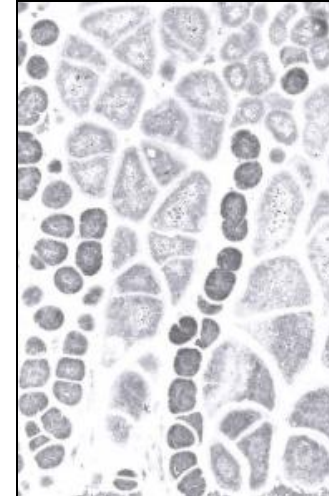


B. Fase de acumulação e maturação do biofilme

DESENVOLVIMENTO DE MICROCOLÔNIAS



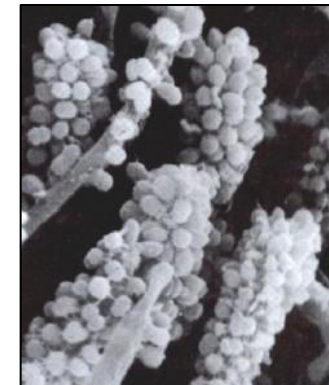
Modificado de Cross e Ruhl. Cell Immunol 2018



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

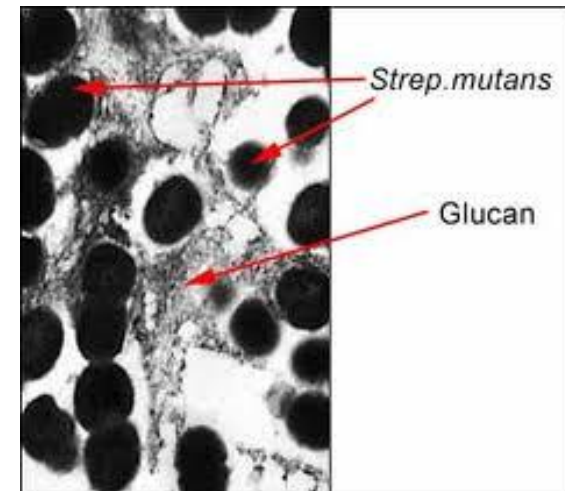
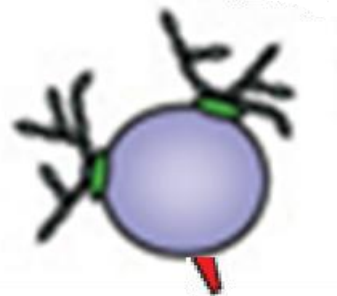
Actinomyces + Actinomyces



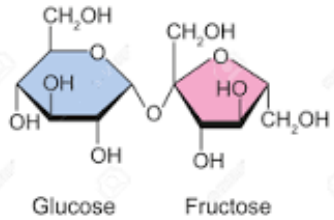
Mesma espécie

(Co-adesão intra-específica)

-  Glicosiltransferase (GTFs)
-  PEC
-  Glucan Binding Protein (GBPs)
-  *S. mutans*

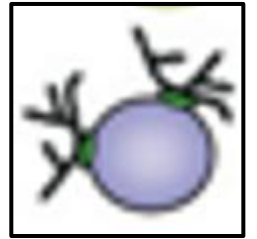


Sucrose Sugar Molecule



Glucanos de *Streptococcus mutans* (SM):

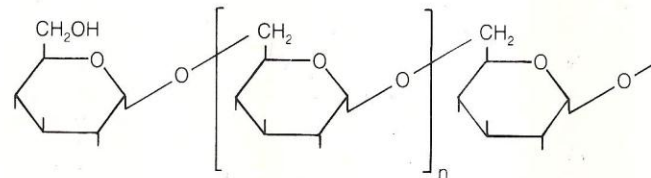
1. São produzidos apenas a partir de sacarose por enzimas **Glicosiltransferases (GTFs) extracelulares** (presentes na superfície de SM)
2. São constituídos por moléculas de glicose polimerizadas
3. Ligam-se a **Glucan Binding Proteins (GBPs)** (presentes na superfície de SM)



Dextrano

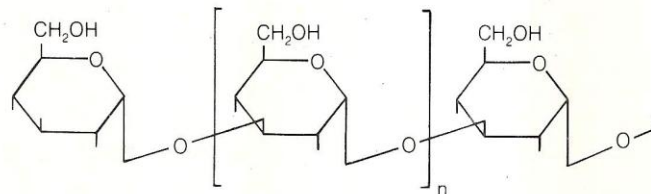
Glucano solúvel

Ligações α -1,6

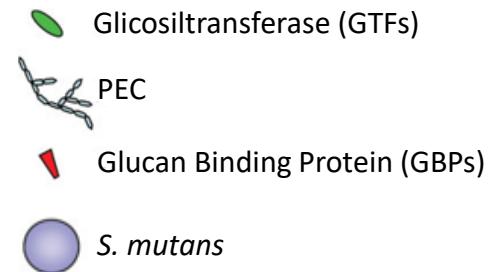


Glucano insolúvel

Ligações α -1,3



Mutano



② Através de componentes de saliva

S. sanguinis + *S. sanguinis*

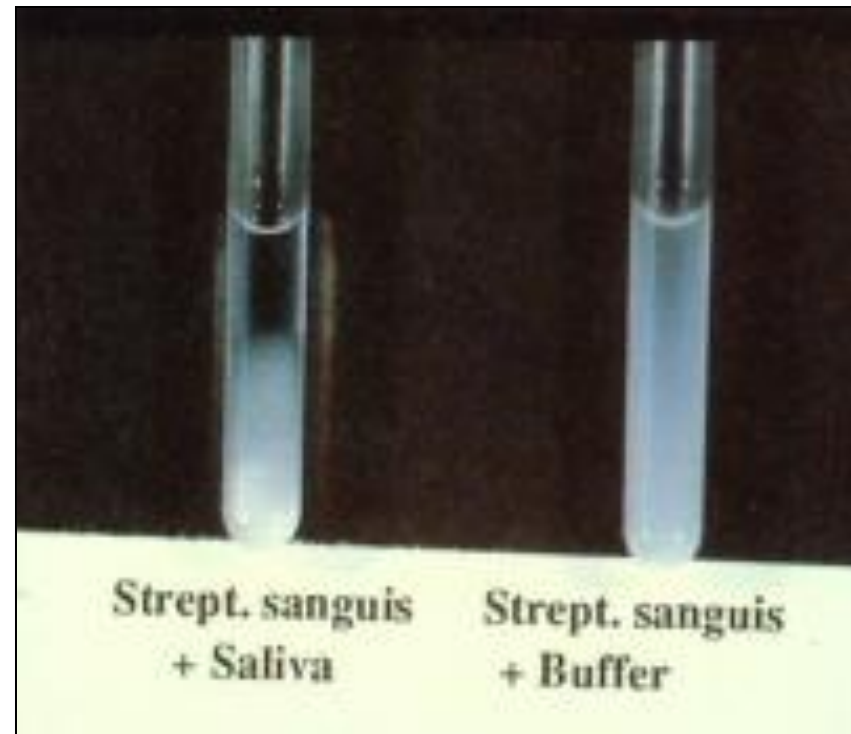
S. gordonii + *S. gordonii*

S. oralis + *S. oralis*

Actinomyces spp + *Actinomyces spp*

Mesma espécie

(Co-adesão intra-específica)



IgA-S

③ Através de constituintes de superfície de bactérias de diferentes espécies associados a fímbrias ou a fibrilas (adesinas e receptores)

S. gordonii + *P. gingivalis*

S. sanguinis + *Fusobacterium nucleatum*

Espécies ou gêneros diferentes

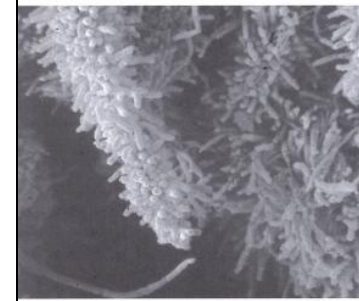
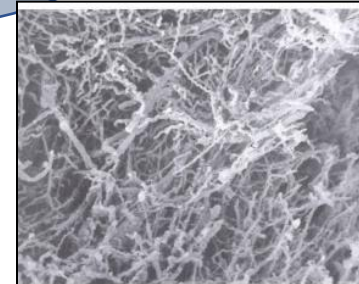
(Co-adesão inter-específica e inter-genérica)

Aumento da diversidade

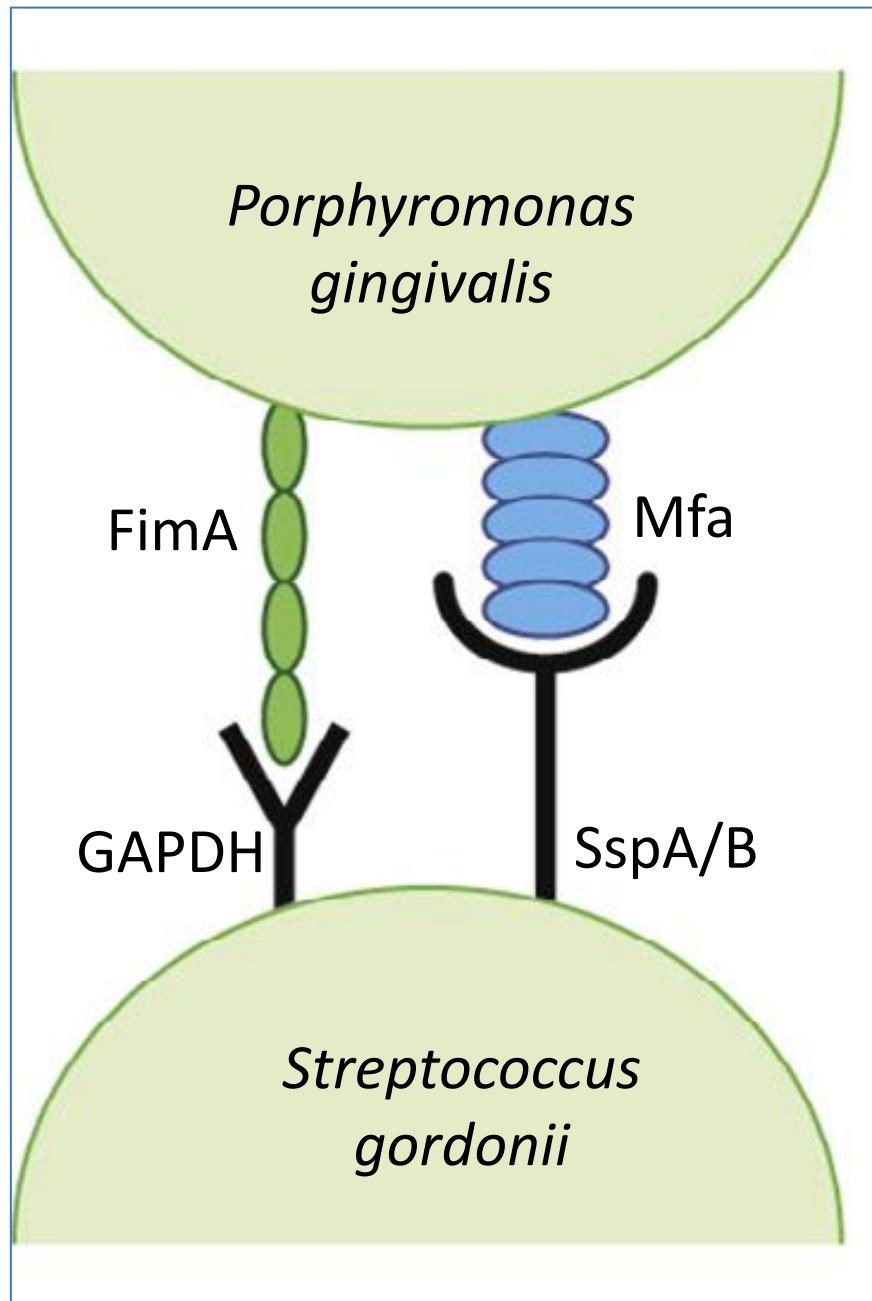
Espigas de milho, rosetas, cepilhos

Mecanismos:

- Adesinas (proteínas tipo lectinas) e receptores oligossacarídicos
- Adesinas (proteínas) e receptores protéicos



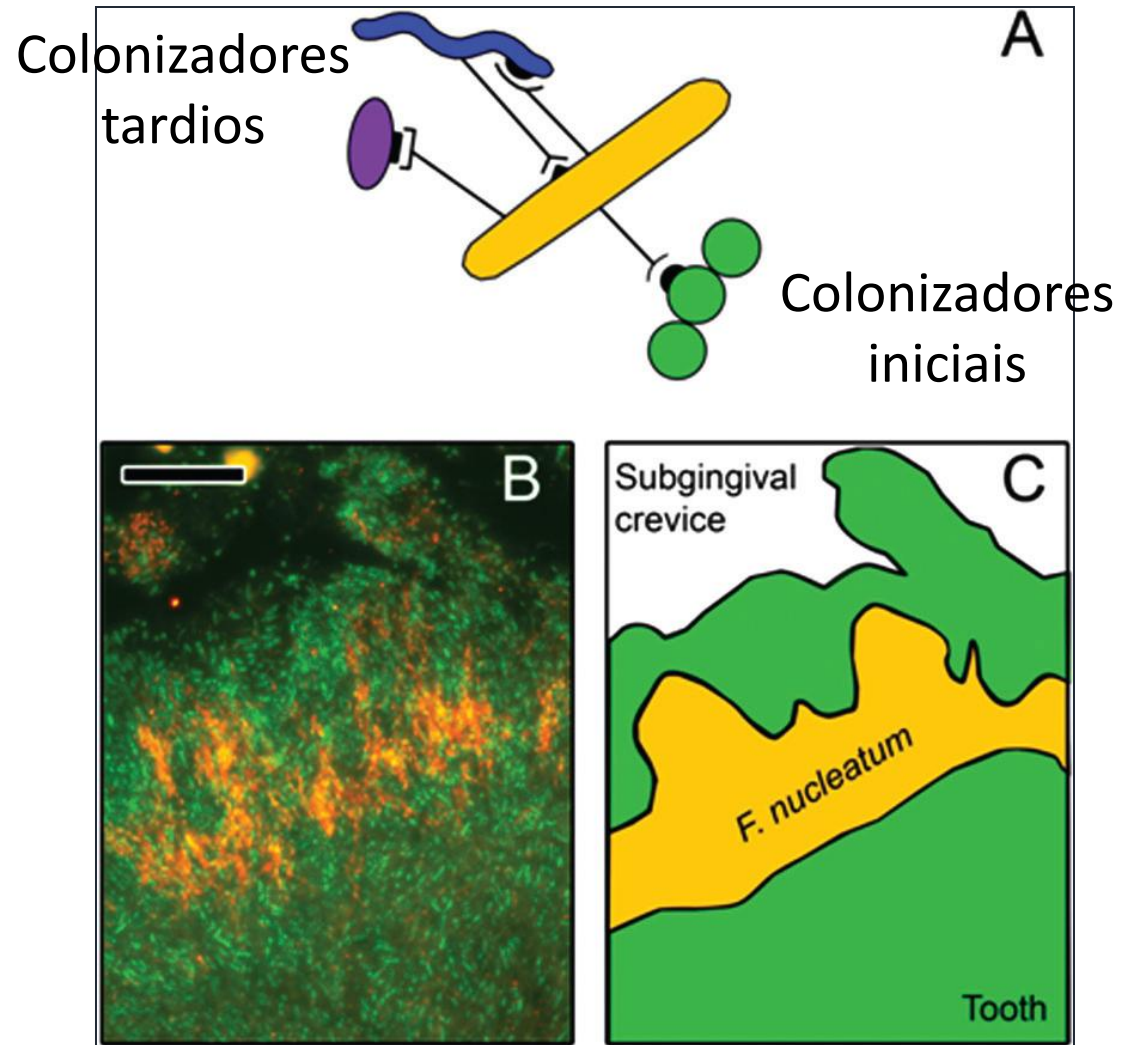
MECANISMOS



**Colonizador Tardio
(importante na periodontite crônica)**

**Colonizador Inicial
(bactéria comensal)?**

Fusobacterium nucleatum como ponte entre colonizadores iniciais e tardios

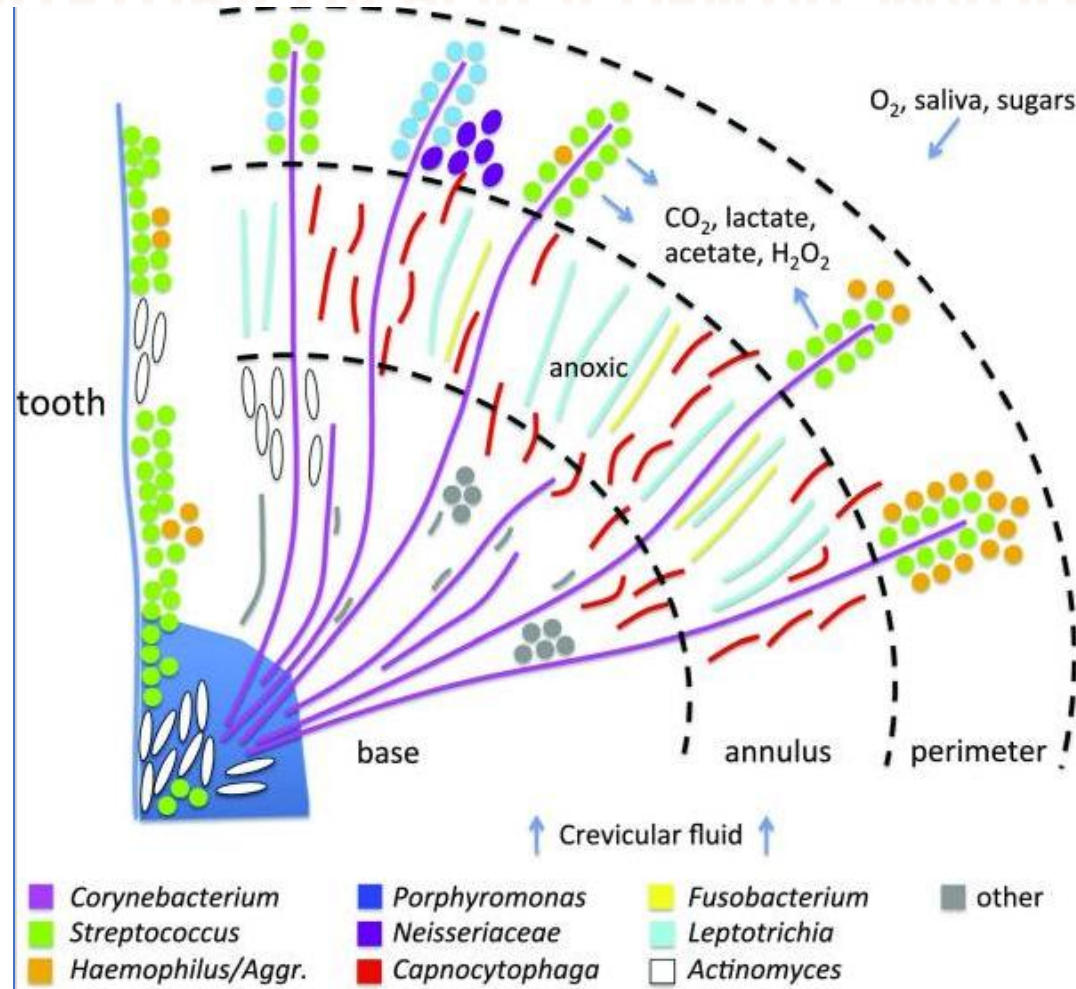


MATURAÇÃO DO BIOFILME

Sucessão ecológica → Formação da placa dental madura

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

ARQUITETURA DA PLACA DENTAL MADURA



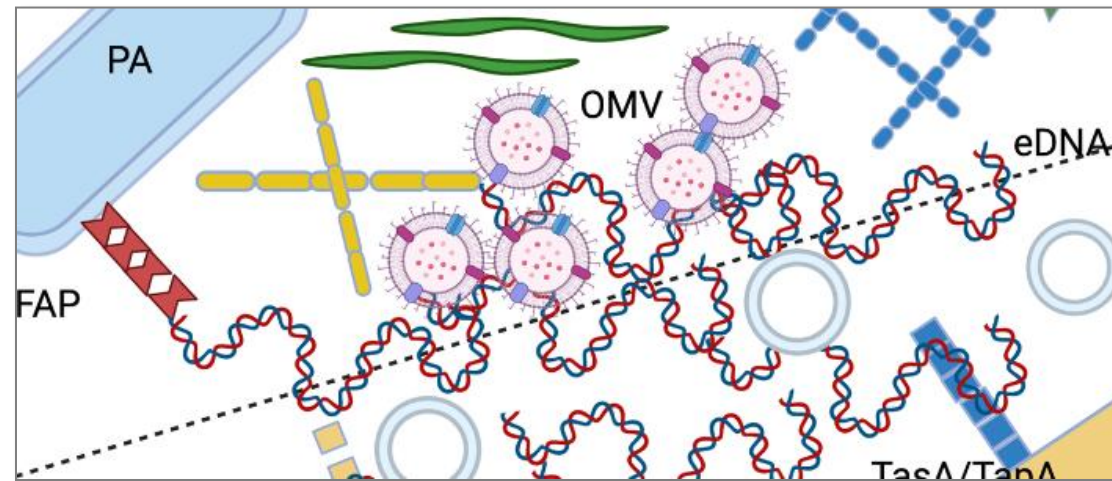
Muitos outros fatores estão envolvidos na formação de biofilmes

Quorum Sensing

eDNA

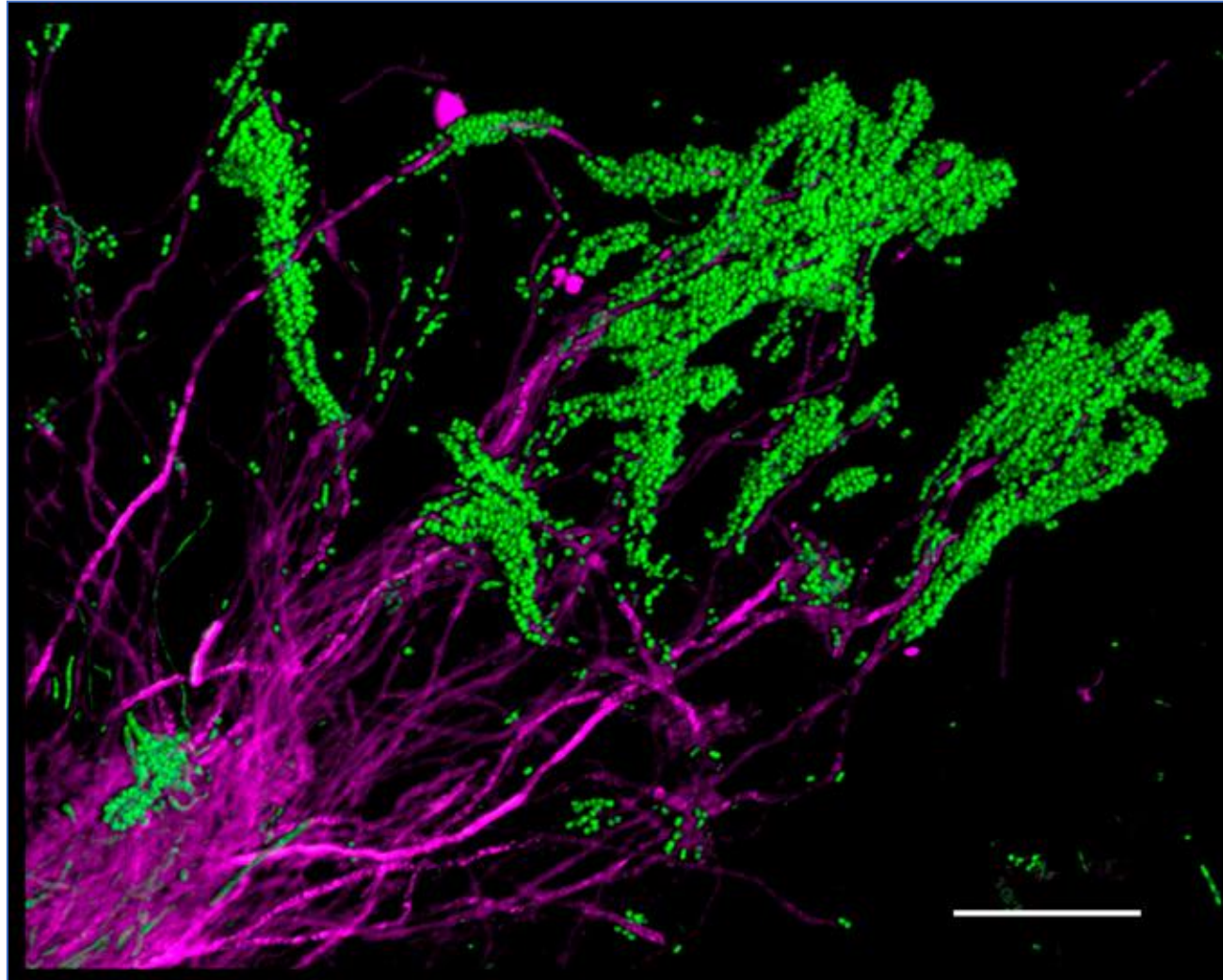
Proteínas tipo amilóides

...

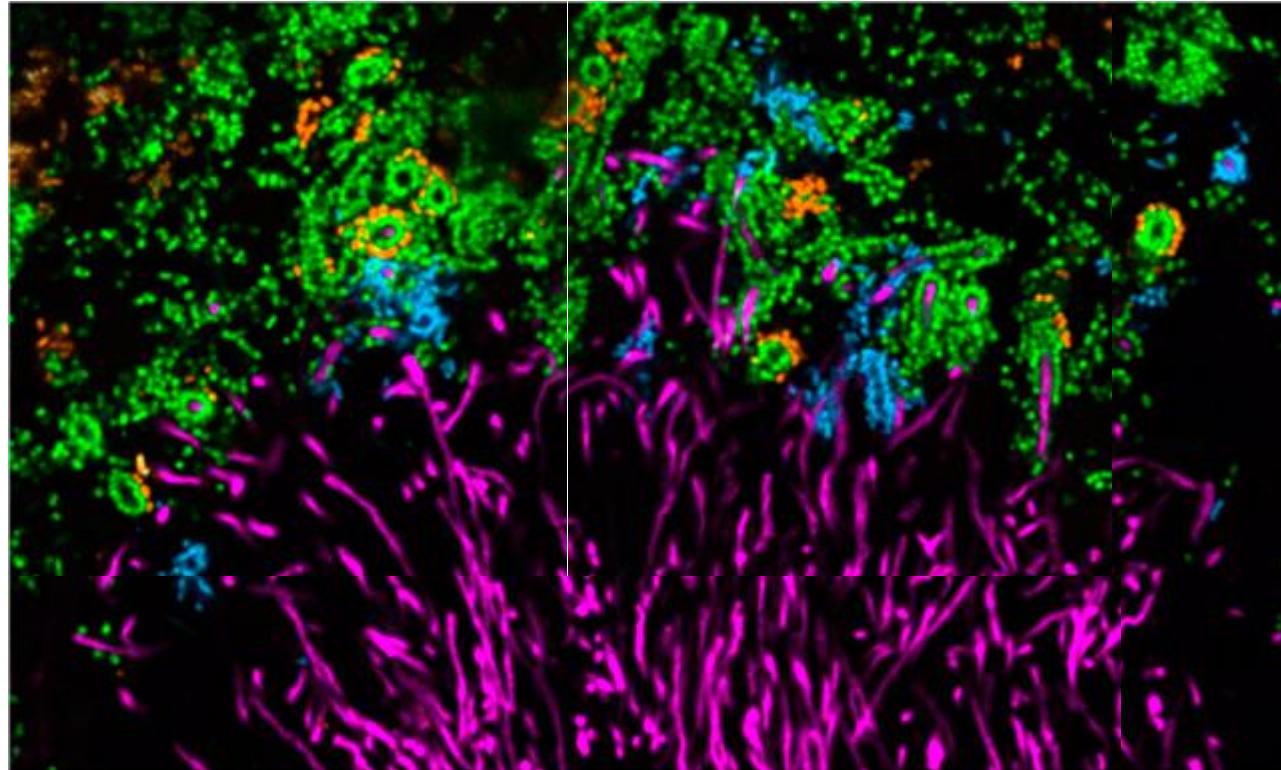










PLACA DENTAL SUPRAGENGIVAL

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



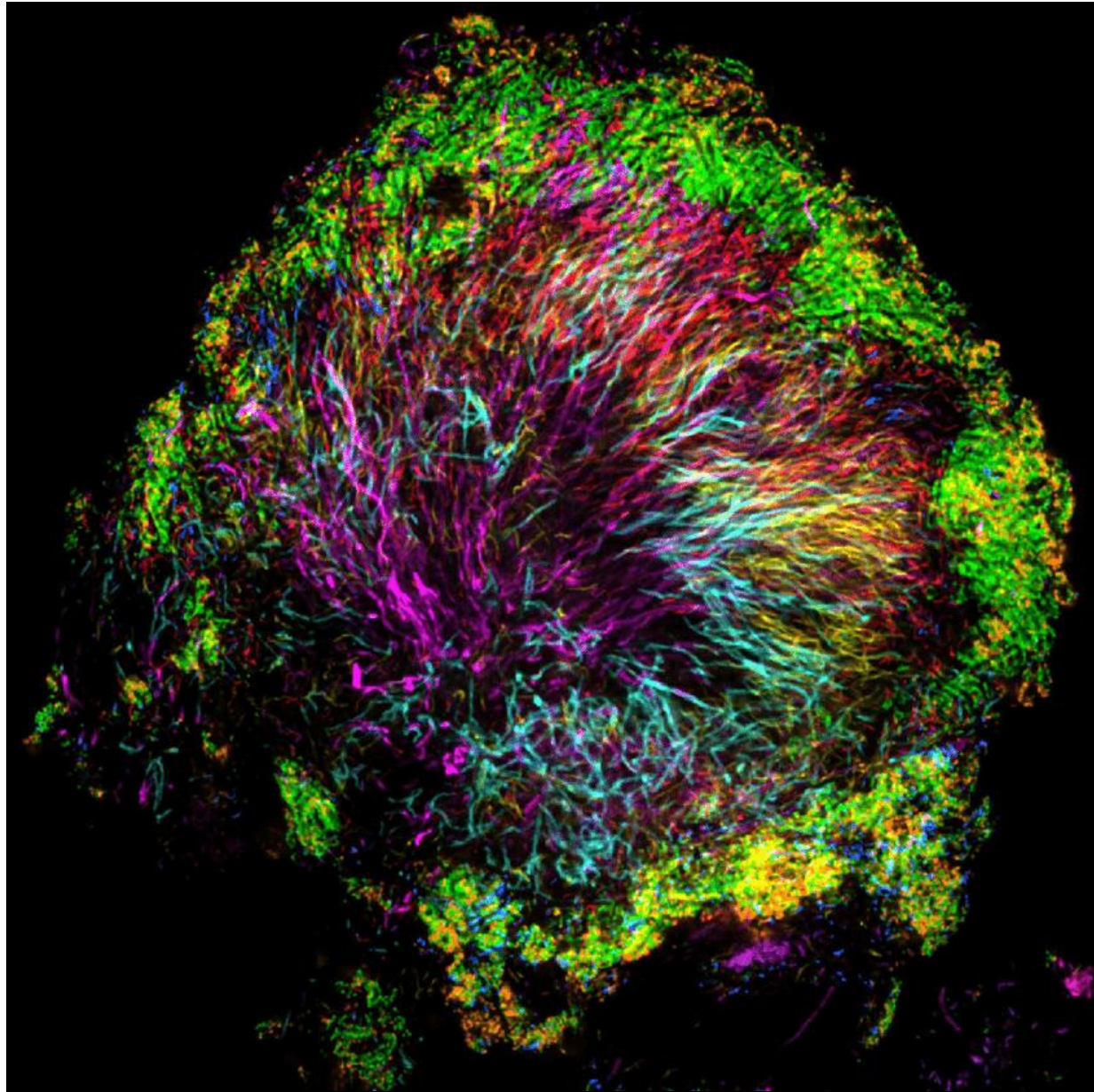
PLACA DENTAL SUPRAGENGIVAL



- | | |
|--|---|
|  <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> |

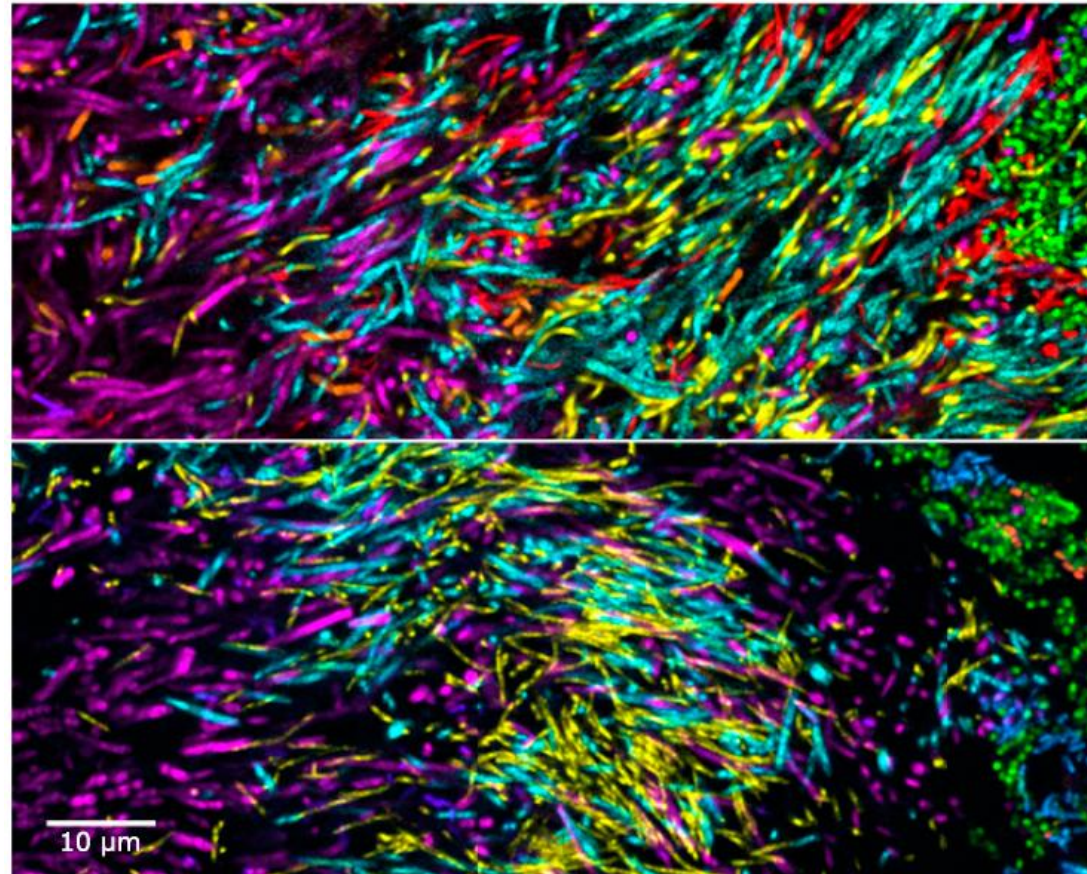
Hibridização do DNA com sondas específicas marcados cpm
corantes fluorescentes - FISH





Welch et al. 2016 PNAS



PLACA DENTAL SUPRAGENGIVAL

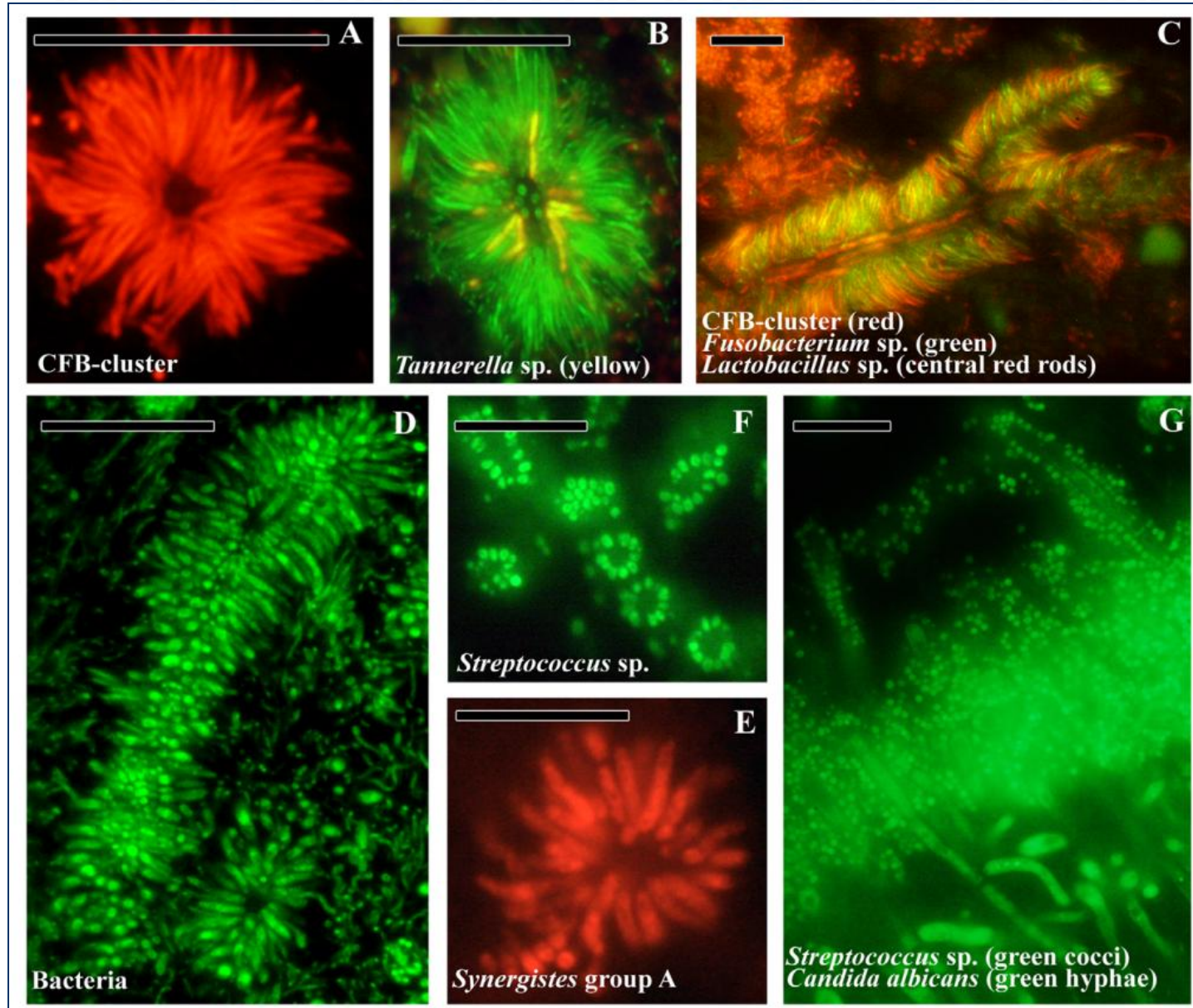
Filamentos e bacilos de vários gêneros formando estrutura na forma de ouriço



 <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

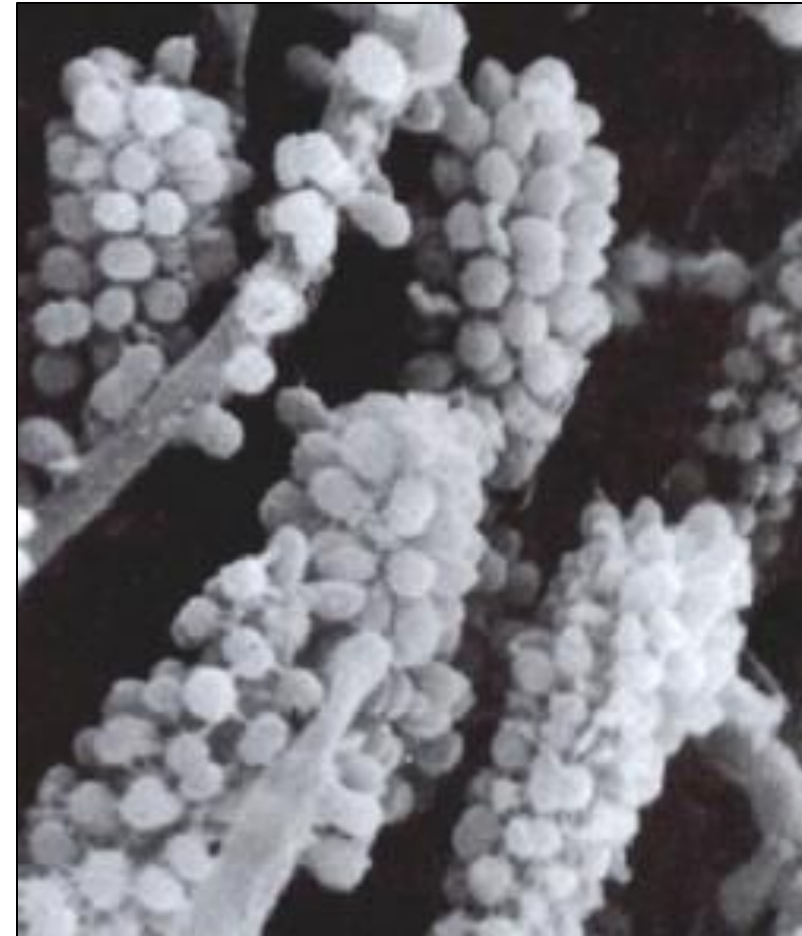


PLACA DENTAL SUPRAGENGIVAL

Espigas de milho



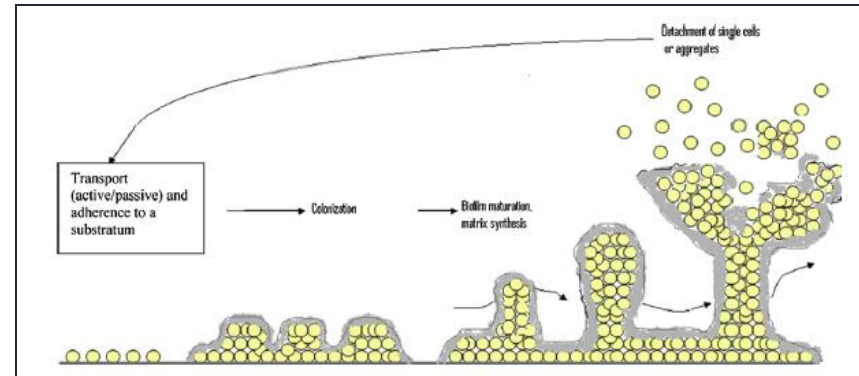
Jones SJ. Dent Practit. 1972



Jakubovics e Kolenbrander, 2010

C. Fase de dispersão

Bactérias associadas ao biofilme são liberadas, retornam à existência planctônica e podem colonizar outras superfícies

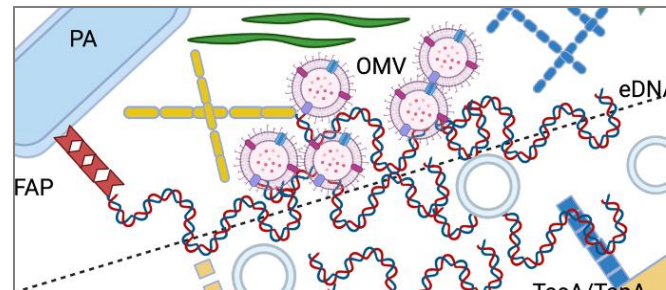


Lazar V. Anaerobe 17: 280-5, 2011

Mecanismos de dispersão dependem dos mecanismos da formação:

Fatores envolvidos na formação de biofilmes

Quorum Sensing
eDNA
Proteínas tipo amilóides
...



Potencial Patogênico dos Biofilmes Orais

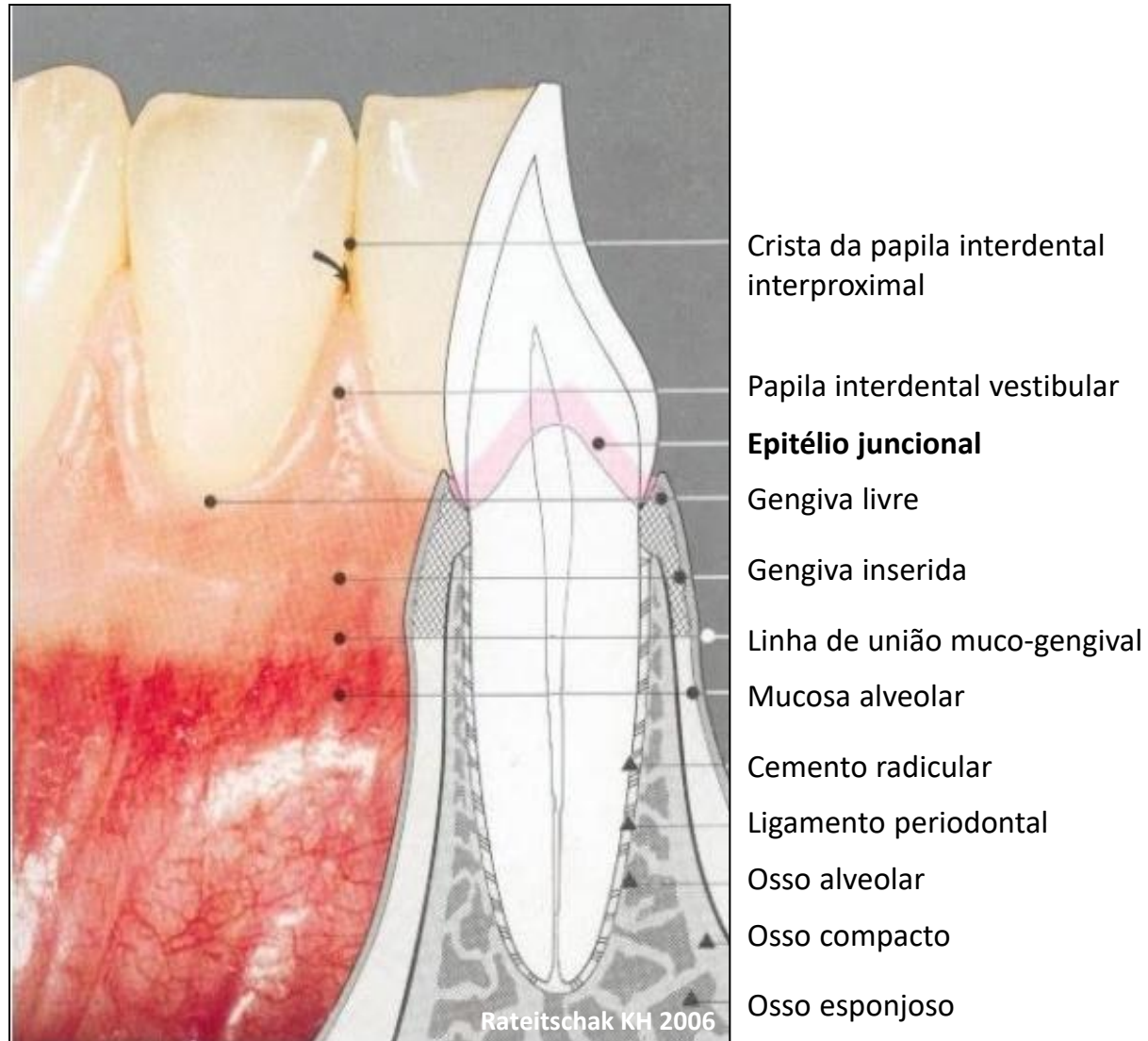
Potencial Patogênico dos Biofilmes Orais

Objetivos gerais da aula:

- Placa dental associada à saúde
- Placa dental cariogênica
- Placa dental associada à gengivite
- Placa dental associada às periodontites

- **Profa. Dra. Maria Regina Simionato**
- **Depto. de Microbiologia ICB?USP**

Estruturas do periodonto de proteção e sustentação



Potencial patogênico da placa dental

Placa dental associada à saúde

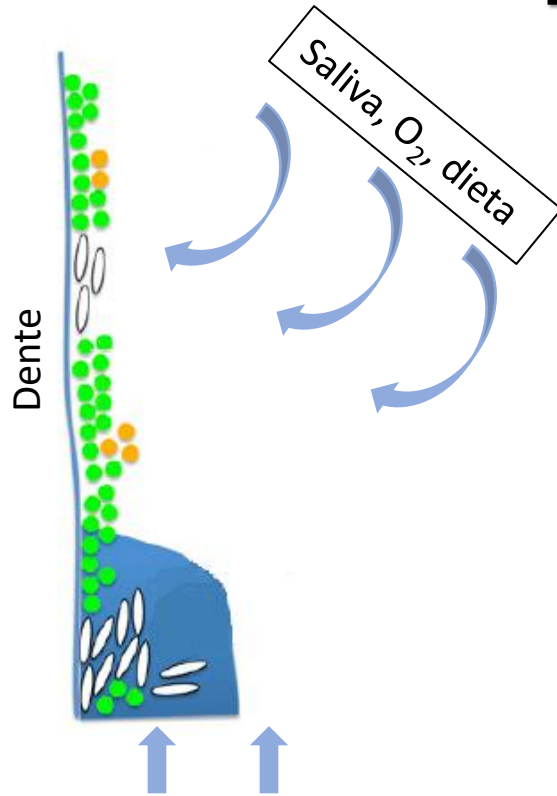
Controle mecânico efetivo da placa dental

Características microbiológicas:

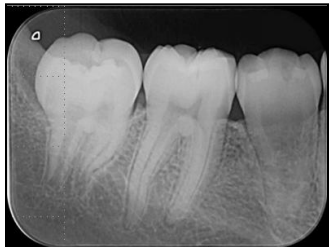
- placa supragengival
- placa esparsa (20 a 40 células de espessura)
- predominam células cocóides Gram + (~85%)
- predominam colonizadores iniciais:
Streptococcus sanguinis, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. gordonii*, *Actinomyces spp*, *Veillonella spp*, *Gemella spp*, *Granulicatella spp*, *Kingella spp*
- predominam anaeróbios facultativos
- rateio Móvel/Imóvel: 1/50

Saúde:

Fatores da resposta imune inata: limpeza mecânica decorrente do fluxo, fatores de defesa solúveis (IgG, IgM, sistema complemento)

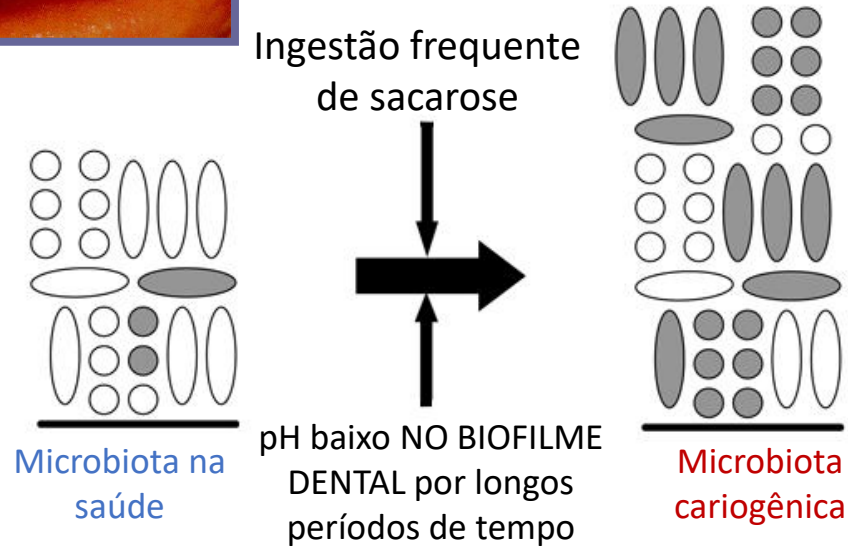
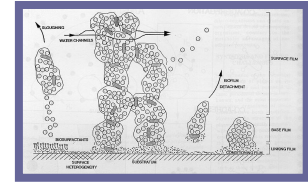


- *Streptococcus*
- *Actinomyces*
- *Haemophilus/Aggr.*



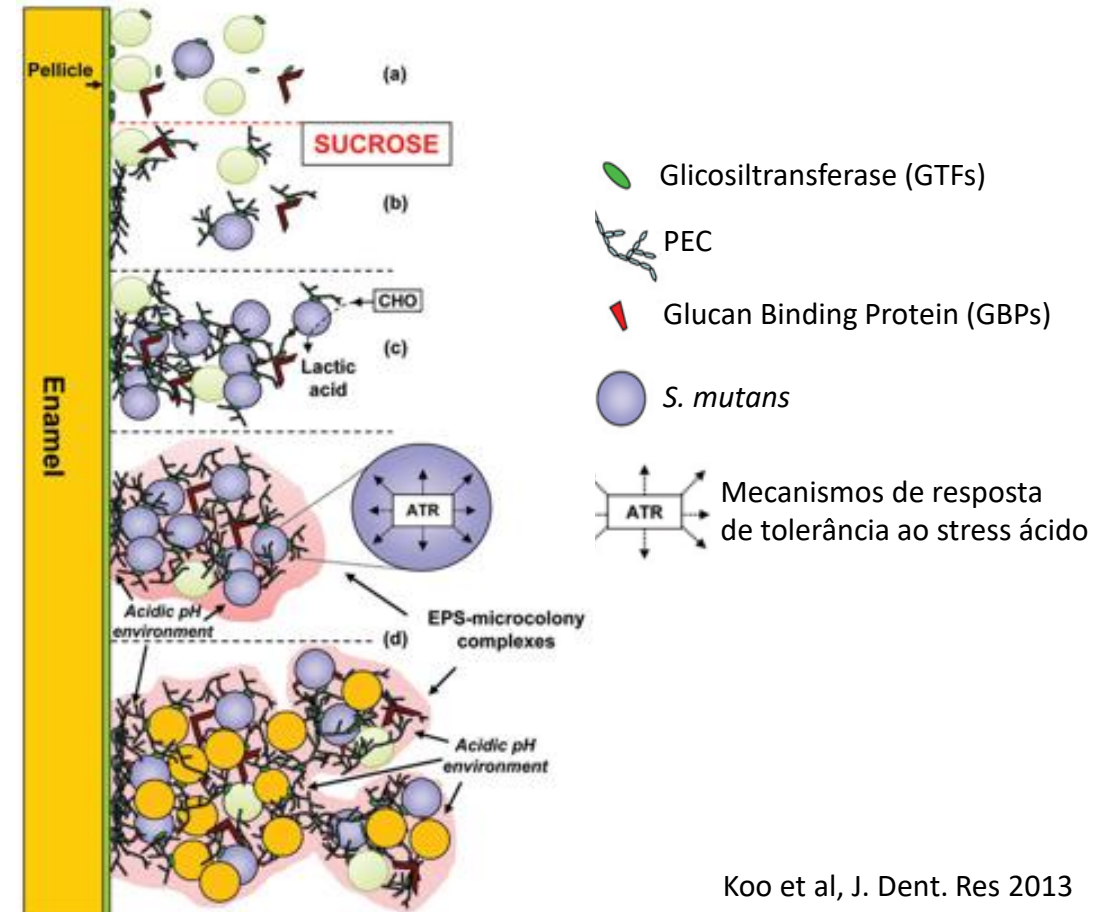


Placa dental cariogênica

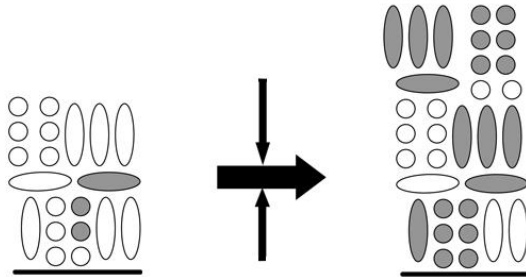


Características microbiológicas:

- placa supragengival
- espessura ou localização suficientes para retardar a ação do tampão salivar
- poucos colonizadores iniciais
- microbiota acidogênica e acidúrica fortemente associada à doença
- matriz rica em polissacarídeo extracelular (glucanos)



Microbiota na saúde e na cárie



Placa associada à saúde
Alta diversidade

e.g. colonizadores iniciais

- Streptococcus sanguinis*
- S. oralis*
- S. mitis*
- S. gordonii*
- Actinomyces spp*
- Veillonella spp*
- Gemella spp*
- Granulicatella spp*
- Kingella spp*

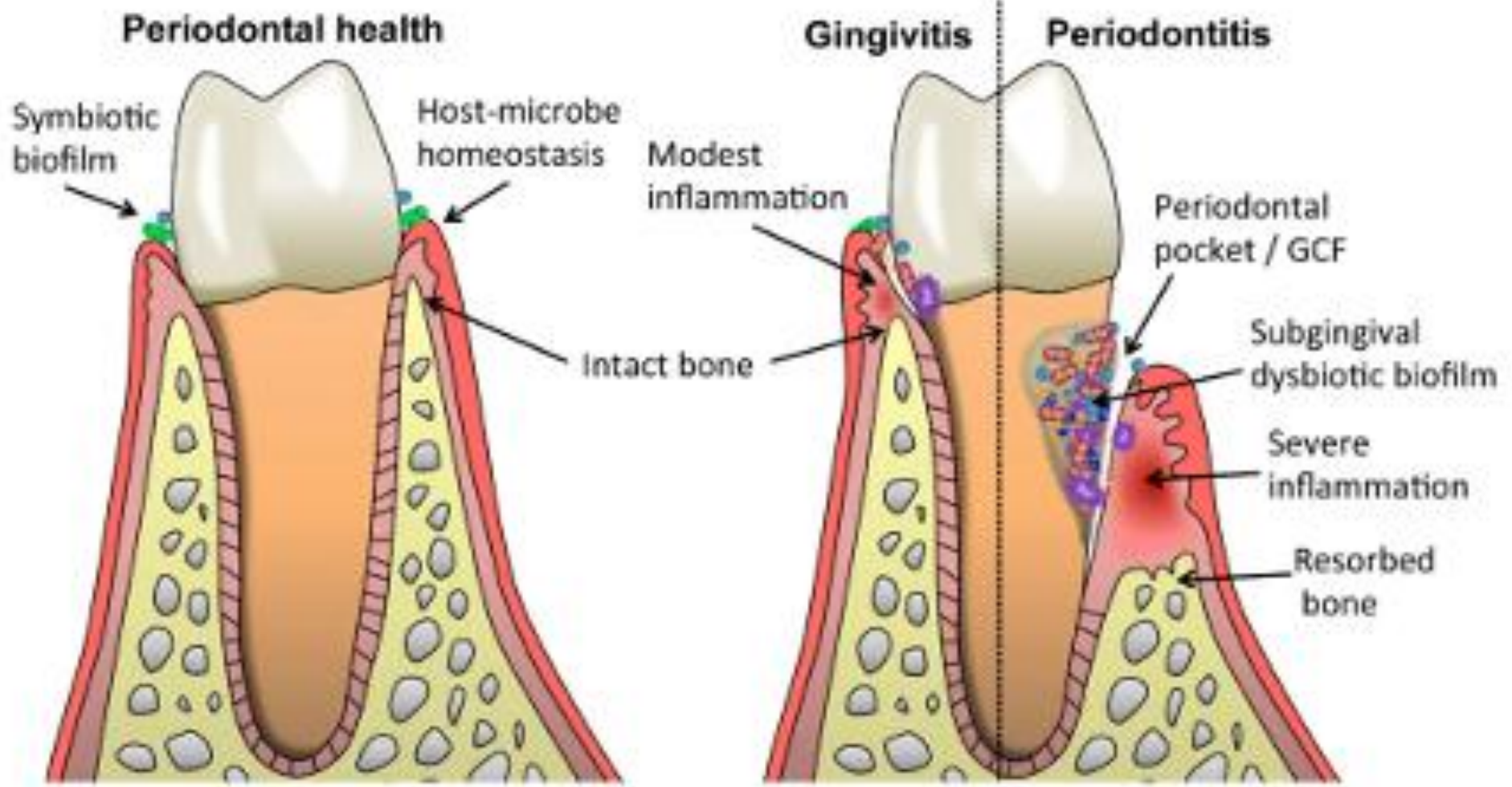
Lesão de cárie de esmalte
Disbiose: redução de diversidade

Microbiota acidogênica e acidúrica fortemente associada à doença

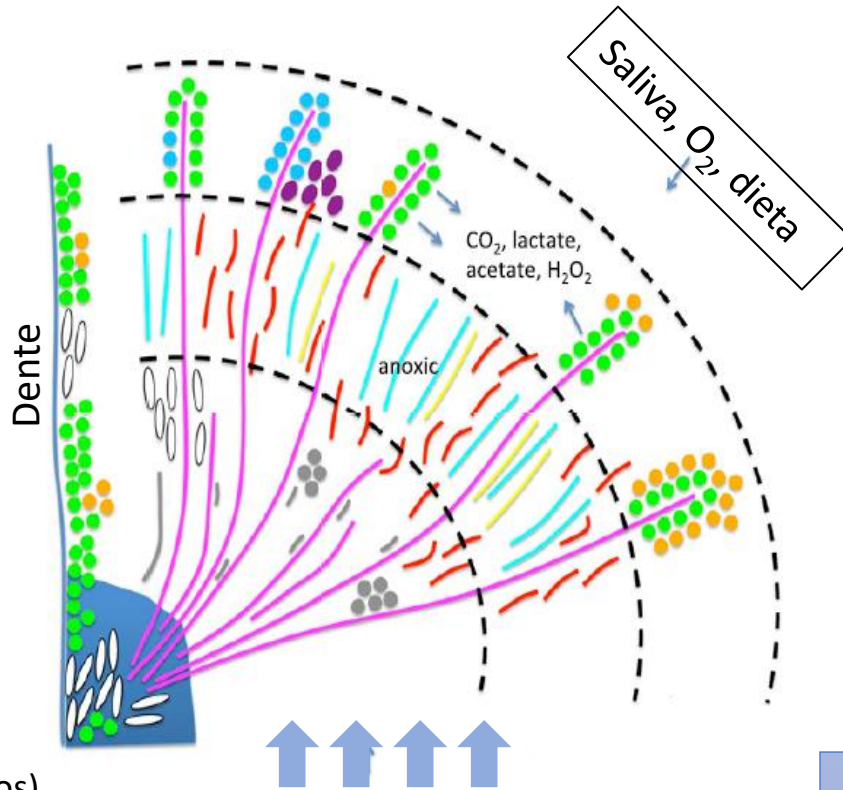
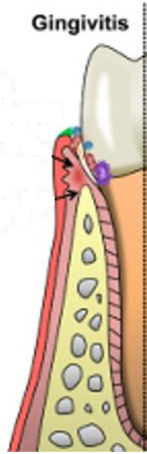
- S. mutans*
- S. sobrinus*
- Bifidobacterium spp*
- Lactobacillus spp*
- Scardovia wiggsiae*
- Atopobium spp*
- Prevotella spp*
- Corynebacterium sp*
- Propionibacterium spp*

Nem todos presentes em todas as lesões

Mira et al. 2017



Gengivite induzida pelo biofilme



<i>Corynebacterium</i>	<i>Porphyromonas</i>	<i>Fusobacterium</i>	other
<i>Streptococcus</i>	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Leptotrichia</i>	
<i>Haemophilus/Aggr.</i>	<i>Capnocytophaga</i>	<i>Actinomyces</i>	

Modificado de Welch et al. 2016

Características microbiológicas:

- aumento da quantidade total de placa
- anaeróbios estritos: 45%
- aumento de *Actinomyces*
- redução de *Streptococcus*
- aumento de Gram-, proteolíticos, assacarolíticos, alcalinófilos:
- *Prevotella*
- *Fusobacterium*
- *Peptococcus*
- *Peptostreptococcus*

Características clínicas:

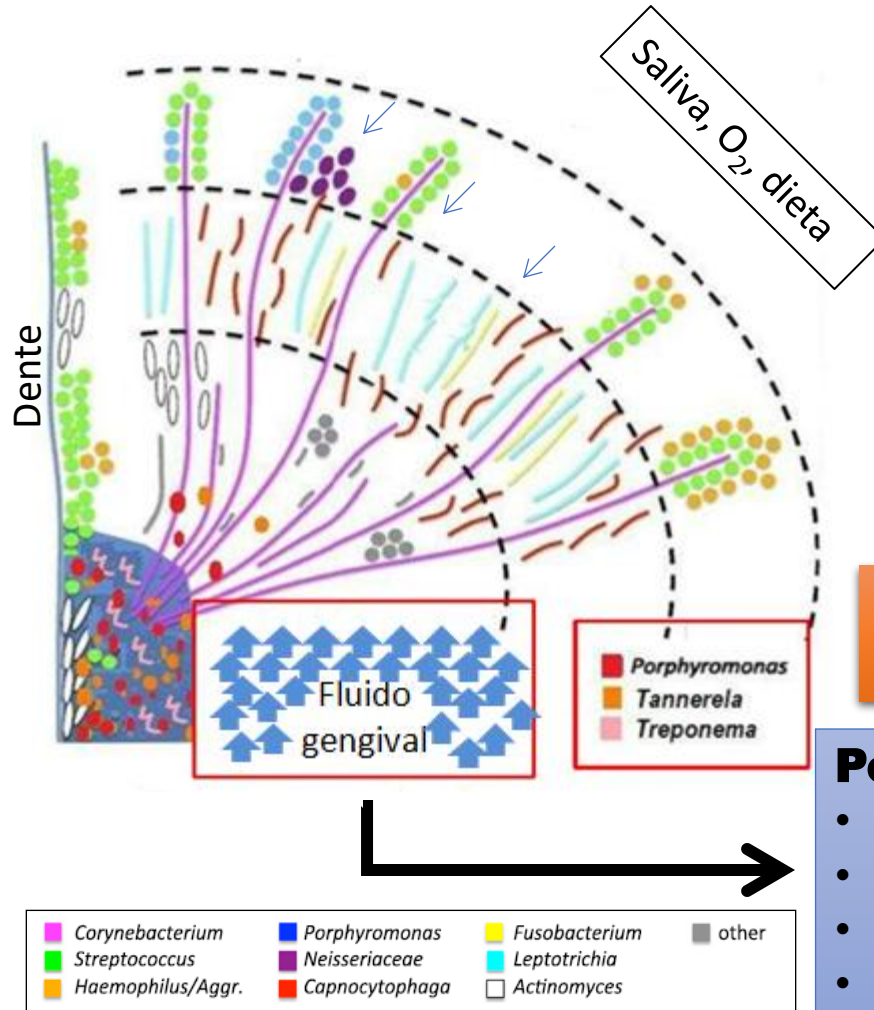
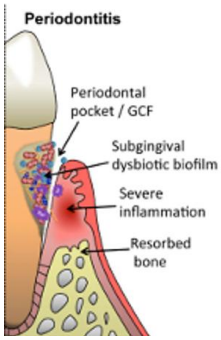
- aumento da quantidade total de placa
- inflamação da gengiva marginal
- evidências da inflamação:
 - edema
 - sangramento (> 10% dos sítios)
- ↳ induzido ou espontâneo
- profundidade de sondagem: ≤ 3 mm
- não há perda de inserção
- não há perda óssea radiográfica
- gengivite é reversível

Gengivite:

- ↑ volume
- ↑ proteínas
- ↑ produtos de degradação dos tecidos
- ↑ fatores de crescimento

(papel importante na **nutrição dos microrganismos**)

Periodontite Estágio III Grau A ou B (Progressão lenta ou moderada) - Periodontite crônica -



Características microbiológicas:

- placa espessa subgengival
- anaeróbios estritos: 90%
- proteolíticos
- rateio Móvel/Imóvel: 1/1
- 20 x mais espiroquetas que na saúde

- *Porphyromonas gingivalis*
- *Tannerella forsythia*
- *Treponema denticola*

É resultado de desequilíbrio da microbiota periodontal (disbiose).

Periodontite:

- ↑ volume
 - ↑ proteínas
 - ↑ produtos de degradação dos tecidos
 - ↑ fatores de crescimento
- (papel importante na nutrição dos microrganismos)

Características clínicas:

- acúmulo > de placa dental
- acúmulo de cálculo dental
- sinais clínicos de inflamação
- sangramento à sondagem, supuração
- perda de inserção clínica
- aumento da profundidade de sondagem
- bolsa periodontal
- perda óssea alveolar

Periodontite Estágio III Grau C

Periodontite Agressiva

- Progressão rápida (razão % perda óssea/idade > 1 mm)
- Destruição incompatível com a quantidade de placa
- Estabelecimento precoce
- Agregação familiar

Generalizada

(>30% dos dentes são afetados)

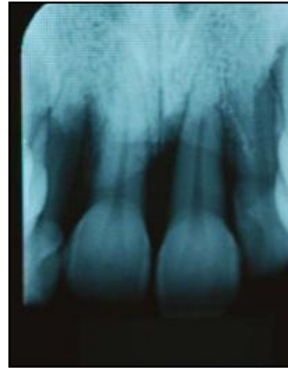
Padrão Molar Incisivo (Localizada)

(<30 % dos dentes são afetados, molares e incisivos)

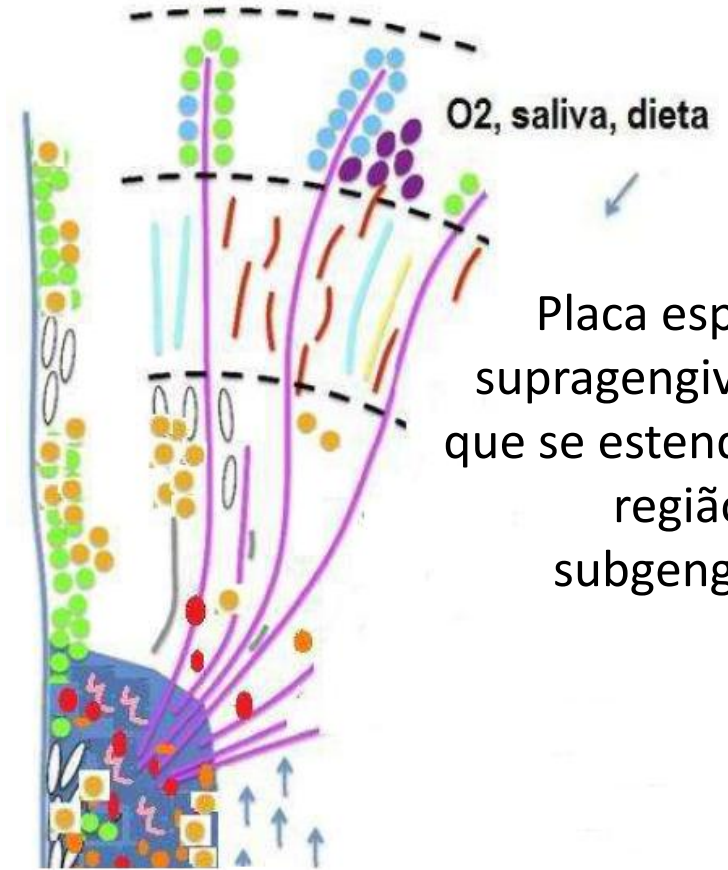
- perda de inserção rápida e precoce (início aos 11 anos)



Placa esparsa
Muita destruição



- Padrão Molar Incisivo -



- | | | | |
|--------------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|
| <i>Corynebacterium</i> | <i>Prevotella</i> | <i>Fusobacterium</i> | <i>Porphyromona</i> |
| <i>Streptococcus</i> | <i>Neisseriaceae</i> | <i>Leptotrichia</i> | <i>Tannerella</i> |
| <i>Haemophilus/Aggr.</i> | <i>Capnocytophaga</i> | <i>Actinomyces</i> | <i>Treponema</i> |

Aggregatibacter actinomycetemcomitans