

Série Ensino, Aprendizagem e Tecnologias

# Tópicos em Bioquímica e Microbiologia Bucais

Sandra Liana Henz  
Lina Naomi Hashizume  
Rodrigo Alex Arthur

2ª edição



Série Ensino, Aprendizagem e Tecnologias

# Tópicos em Bioquímica e Microbiologia Bucais

Sandra Liana Henz  
Lina Naomi Hashizume  
Rodrigo Alex Arthur

2ª edição



© dos autores  
1.ª edição: 1995

Direitos reservados desta edição:  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Coordenação da Série:  
Cíntia Kulpa, Tanara Forte Furtado e Marcello Ferreira

Coordenação da Editoração: Cíntia Kulpa e Ely Petry  
Revisão: Equipe de Revisão da SEAD  
Capa: Bruno Assis, Jéssica dos Santos e Tábata Costa  
Editoração eletrônica: Jéssica dos Santos e Tábata Costa

A grafia desta obra foi atualizada conforme o Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, de 1990, que entrou em vigor no Brasil em 1º de janeiro de 2009.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.



---

H528t Henz, Sandra Liana

Tópicos em bioquímica e microbiologia bucais [recurso eletrônico]  
/ Sandra Liana Henz, Lina Naomi Hashizume [e] Rodrigo Alex Arthur ;  
coordenado pela SEAD/UFRGS. – 2. ed. – Porto Alegre: Editora da UFRGS,  
2021.

321 p. : pdf

(Série Ensino, Aprendizagem e Tecnologias)

1. Odontologia. 2. Bioquímica bucal. 3. Microbiologia bucal. 4. Ecologia bucal. 5. Biofilme dental. 6. Cárie. 7. Erosão dentária. 8. Saliva. 9. Flúor. 10. Infecções odontogênicas. I. Hashizume, Lina Naomi. II. Arthur, Rodrigo Alex. III. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Secretaria de Educação a Distância. IV. Título. V. Série

CDU 579.61:616.314-002

---

CIP-Brasil. Dados Internacionais de Catalogação na Publicação.  
(Jaqueline Trombin – Bibliotecária responsável CRB10/979)

ISBN 978-65-5725-038-9

# 5

## Biofilme Dental

Rodrigo Alex Arthur

Sandra Liana Henz

Lina Naomi Hashizume

A cárie dental tem sido definida como uma doença multifatorial, biofilme-açúcar dependente. Nesse contexto, considera-se que o fator etiológico necessário para o seu desenvolvimento seja o acúmulo de biofilme sobre os dentes. Na forma de biofilmes, os micro-organismos apresentam-se mais virulentos, aumentando o potencial patogênico desses biofilmes. Dessa forma, o conhecimento sobre a formação do biofilme e sobre a íntima relação entre ele e o desenvolvimento da cárie dental é de extrema importância no que se refere ao entendimento sobre a etiologia da cárie e também como forma de adoção de medidas preventivas eficientes.

O termo biofilme dental ou placa dental se refere à complexa comunidade microbiana encontrada na superfície dos dentes, embebidos numa matriz de polímeros extracelulares derivados do metabolismo bacteriano e do meio ambiente, nesse caso, a saliva.

O biofilme dental é naturalmente formado nas superfícies dentais a partir da microbiota residente. Um dos benefícios da microbiota residente é atuar como uma barreira para a colonização permanente por micro-organismos transitórios, com potencial patogênico. Os mecanismos envolvidos nessa resistência à colonização incluem: 1) saturação, pela microbiota residente, dos sítios disponíveis para a adesão; 2) competição mais efetiva por nutrientes essenciais; 3) criação de microambientes desfavoráveis ao crescimento de espécies invasoras e 4) produção de fatores inibidores pela microbiota normal.

## AQUISIÇÃO DA MICROBIOTA ORAL RESIDENTE

Essa microbiota residente é adquirida logo após o nascimento e a sucessão de bactérias dentro da boca continua por toda a vida. A boca do recém-nascido é comumente estéril, e a aquisição de micro-organismos depende da transmissão de micro-organismos dos locais de potencial colonização, como a saliva, por exemplo. Nesse sentido, alguns estudos têm sugerido que a mãe é a fonte principal de micro-organismos (transmissão vertical) (LI & CAUFIELD, 1995).

Os primeiros micro-organismos que podem ser isolados da boca durante as primeiras semanas após o nascimento, são os *Streptococcus*, incluindo o *S. mitis*, o *S. oralis* e o *S. salivarius*. Outros micro-organismos aparecem como transitórios (lactobacilos e estreptococos do grupo *mutans*), pois não podem competir com as bactérias estabelecidas. A fonte imediata dessas bactérias é particularmente a mãe, o que também já foi verificado por estudos de Caufield *et al.* (2007); Alves *et al.* (2009). Nos primeiros meses de vida, a microbiota torna-se mais complexa, com bactérias anaeróbicas como *Veillonella* e *Prevotella* estando incluídas na comunidade.

A erupção dos dentes fornece novos tipos de superfícies e de microambientes, alterando a composição da microbiota oral. Com isso, há colonização da cavidade oral por espécies que se aderem na superfície dental e aí se multiplicam, como *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. sanguis*, *Actinomyces* e um aumento de tipos de bactérias anaeróbicas. A microbiota da cavidade bucal torna-se mais complexa, e atinge uma relativa estabilidade em termos de gêneros e espécies. A perda dos dentes, por sua vez, resulta em perda de microambientes na boca e na redução da com-

plexidade da microbiota. A superfície das próteses e de implantes pode ser uma alternativa às superfícies dentais para a colonização dos demais micro-organismos da cavidade bucal.

A microbiota oral continua a aumentar em diversidade até ser alcançada uma situação estável, denominada de comunidade clímax. Essa estabilidade, representada pelo equilíbrio dinâmico entre a microbiota residente e as condições ambientais locais, é denominada de “homeostasia microbiana”. Quaisquer fatores responsáveis pela alteração dessa homeostasia podem levar a um desequilíbrio, havendo aumento na predisposição à doença.

Raramente, ou praticamente nunca, um habitat é ocupado por uma única espécie ou por um único filo de micro-organismos. Em geral, há uma mistura de bactérias que são capazes de sobreviver no ambiente. Uma característica importante de muitos habitats é a presença de um ou mais tipos de superfícies, fornecendo áreas ricas em nutrientes, bem como locais estáveis onde os micro-organismos podem se aderir e evitar serem removidos de seu habitat.

A boca não é um ambiente homogêneo para a colonização microbiana. Existem microambientes distintos, tais como as superfícies mucosas (palato, bochecha, língua), as superfícies dentárias e o sulco gengival.

## **FATORES QUE INFLUENCIAM O CRESCIMENTO E O METABOLISMO MICROBIANO NA CAVIDADE ORAL**

A boca é, ao mesmo tempo, um ambiente amigável e hostil para o crescimento bacteriano. Na maior parte de tempo, há escassez de nutrientes, mas pode haver também períodos repentinos e irregulares de excesso de alimentos. Além disso, a cavidade bucal apresenta condições de aerobiose. Porém, bactérias anaeróbias estritas e facultativas são capazes de crescer nesse ambiente.

A saliva desempenha um importante papel na regulação do crescimento e atividade metabólica da microbiota oral. Ela ajuda a manter a temperatura e o pH em níveis ideais para o crescimento da maioria dos micro-organismos, pode atuar como fonte primária de carboidratos para a microbiota, por meio de glicoproteínas, peptídeos e aminoácidos, e possui uma gama de fatores inatos e específicos de defesa.

A seguir, uma breve descrição dos fatores que podem interferir com o metabolismo microbiano:

### **Temperatura**

A boca é mantida a uma temperatura relativamente constante (35-36°C), o que proporciona condições adequadas para o crescimento de uma ampla gama de micro-organismos.

## Potencial redox/anaerobiose

A cavidade bucal possui uma concentração de oxigênio de aproximadamente 20%. Porém, apenas uma pequena parcela da microbiota bucal compreende espécies aeróbias. A maioria dos micro-organismos da cavidade bucal é anaeróbia facultativa (crescem na presença ou ausência de oxigênio) ou anaeróbias estritas (requerem condições reduzidas, e o oxigênio pode ser até tóxico). Há ainda os microaerófilos (que requerem baixas concentrações de oxigênio) e os capnofílicos (que necessitam de  $\text{CO}_2$ ).

O que determina a colonização bucal e sobrevivência dos os microorganismos em uma determinada região é o potencial de óxido-redução (potencial redox) dessa região. Oxigênio resulta em oxidação da região, o que inibe o crescimento de anaeróbios, que necessitam de regiões com tensões de oxigênio reduzidas. Entretanto, anaeróbios estritos podem sobreviver em ambientes aeróbios devido a parcerias com espécies que consomem o oxigênio, criando um potencial redox adequado para o seu crescimento. Durante a formação da placa dental, o potencial redox das superfícies dentais se altera, de inicialmente alto (altamente oxidado) para baixo (altamente reduzido), sugerindo que há uma sucessão de micro-organismos na placa dental, que inicialmente usam o  $\text{O}_2$ , criando um ambiente adequado para a colonização de micro-organismos anaeróbicos.

## pH

Muitos micro-organismos requerem pH em torno da neutralidade para crescerem, e são sensíveis aos extremos de pH ácido ou alcalino. O pH da maioria das superfícies da boca é regulado pela saliva (6,75 a 7,25),

de modo que, em geral, os valores de pH ótimo para o crescimento microbiano são proporcionados nas áreas banhadas por este fluido. Porém, flutuações no pH do ambiente podem acarretar em mudanças da população bacteriana da placa dental. Esse fenômeno ocorre após ingestão de carboidratos fermentáveis, onde há produção de ácidos devido ao metabolismo bacteriano. Lentamente, o pH se recupera, atingindo valores iniciais. Dependendo da frequência da ingestão de açúcar, as quedas de pH são mais frequentes, inibindo o crescimento de bactérias ácido-sensíveis, e viabilizando o crescimento de bactérias ácido-tolerantes, como os *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus*, predispondo a superfície dental à ocorrência de cárie.

## Nutrientes

A persistência e a diversidade de microflora oral residente devem-se principalmente ao metabolismo de nutrientes endógenos, ao invés de nutrientes exógenos fornecidos pela dieta. A principal fonte de nutrientes endógenos é a saliva, que contém aminoácidos, glicoproteínas, peptídeos, proteínas, vitamina e gases. O sulco gengival, suprido pelo fluido gengival, contém albumina, glicoproteínas e moléculas contendo sangue. A diferença na fonte de nutrientes endógenos é uma das razões para a variação na microflora do sulco gengival comparada ao dente, por exemplo.

Além disso, alimentos periodicamente ingeridos na dieta também se constituem em fonte de energia para os micro-organismos e podem interferir com a ecologia bucal. No caso de frequente ingestão de carboidratos fermentáveis, como, por exemplo, a sacarose, há produção

de glucanos e frutanos decorrentes da fermentação desse carboidrato pelas enzimas glicosiltransferases e frutossiltransferases dos *S. mutans*. Os frutanos podem atuar como reservatório energético extracelular, ao passo que os glucanos possuem função estrutural e de manutenção da arquitetura do biofilme. As frequentes quedas de pH decorrentes desse consumo regular aumentam a proporção de *S. mutans* e lactobacilos, e reduzem a proporção de *S. sanguis* e *S. gordonii* na placa dental. Substitutos de açúcar, como o xilitol, podem ser utilizados, pois não são metabolizados pelas bactérias orais.

### **Aderência e aglutinação**

A mastigação e o fluxo salivar provocam o deslocamento de micro-organismos não firmemente aderidos a uma superfície oral. Esses micro-organismos são principalmente derivados dos dentes (placa dental) e da mucosa (língua). Alguns componentes salivares, como as glicoproteínas do tipo mucinas, podem agregar esses micro-organismos, facilitando sua remoção da boca pela deglutição. Como superfícies mucosas se descamam frequentemente, a carga bacteriana nessas superfícies é mais leve. Entretanto, a superfície dental pode acumular maior carga bacteriana (placa dental), principalmente em áreas de estagnação, como sulcos e fissuras e região interproximal.

## Agentes antimicrobianos

A microbiota oral é constantemente desafiada por agentes antiplaca ou antimicrobianos. Os agentes antiplaca removem células já aderidas, ou evitam a adesão de novas células à superfície do dente, ao passo que os antimicrobianos podem matar ou inibir o crescimento das bactérias. Ambos os tipos podem ser distribuídos por dentifrícios ou enxaguatórios.

## Defesas do hospedeiro

### Fatores não específicos

\*Lisozimas: unem e agregam bactérias orais. Hidrolizam peptidoglicanos que conferem rigidez às paredes celulares bacterianas. Os membros da microbiota residente são insensíveis à ação da lisozima, de forma que seu papel pode ser mais dirigido para a inibição do crescimento de bactérias exógenas.

\*Lactoferrina: glicoproteína que possui afinidade com o ferro. Sequestra o ferro, que é necessário para o metabolismo bacteriano.

\*Peroxidase salivar (sialoperoxidase): produz hipotiocianato em pH neutro ou ácido hipotiocianoso em pH baixo (na presença de  $H_2O_2$ ), que podem inibir o metabolismo bacteriano.

\*Histidinas e cistatinas: histidinas possuem ação antifúngica, ao passo que cistatinas são inibidores de proteases.

## Fatores específicos

\*IgAs: pode aglutinar bactérias orais, modular a atividade enzimática e inibir a aderência de bactérias à superfície dental. É considerada a primeira linha de defesa do hospedeiro.

\*IgA, IgG e IgM: impedem a adesão microbiana; opsonização.

## Placa bacteriana: desenvolvimento, estrutura, composição e propriedades

O desenvolvimento da placa bacteriana pode ser dividido em vários estágios arbitrários:

- Formação de película;
- Adesão de células bacterianas simples (0 a 4 horas);
- Crescimento de bactérias aderidas, levando a formação de microcolônias distintas (4-24 horas);
- Sucessão e coagregação microbianas, levando a um aumento na diversidade microbiana (1-14 dias);
- Multiplicação dos micro-organismos e síntese de polímeros extracelulares;
- Comunidade clímax ou placa madura (2 semanas ou mais);
- Descolamento de células do biofilme para fase planctônica (saliva) facilitando a colonização de novos sítios.

Obs: a formação da placa dental é dinâmica. Adesão, crescimento, remoção e readesão (re-colonização) ocorrem ao mesmo tempo.

## Formação da película salivar

Os micro-organismos não colonizam diretamente a superfície mineralizada do dente. Os dentes são sempre cobertos por uma camada proteica acelular denominada película, que se forma logo após a superfície dental ser limpa. Essa película é composta por glicoproteínas salivares, fosfoproteínas, lipídeos e proteínas. Remanescentes da parede celular bacteriana e outros produtos também têm sido encontrados na película.

## Colonização microbiana

Os colonizadores iniciais constituem uma parte altamente seletiva da microbiota oral, principalmente o *S. sanguis*, o *S. oralis* e o *S. mitis*. Essas espécies representam 95% dos estreptococos e 56% da microbiota inicial. Essa microbiota inicial compreende *Actinomyces* e bactérias Gram-negativas, como *Neisseria*. Independente da exposição à sacarose, os estreptococos *mutans* representam apenas 2% ou menos dos estreptococos iniciais.

Essa adesão microbiana é seletiva (teoria de Kolenbrander; KOLENBRANDER *et al.*, 2006). As bactérias possuem componentes específicos de superfície, chamados de adesinas, que se aderem a moléculas complementares (receptores) na película. Pequenas séries de forças são responsáveis pela interação entre adesinas e receptores. Essas interações

contribuem para o tropismo de um micro-organismo com uma superfície particular ou habitat. Alguns micro-organismos se ligam à alfa-amilase, outros à estaterina, ou às proteínas ricas em prolina presentes na película salivar. Além disso, alguns mecanismos de adesão envolvem proteínas bacterianas semelhantes às lectinas, que interagem com os oligossacarídeos, carboidratos e glicoproteínas adsorvidas na superfície do dente (por exemplo, *S. sanguis*). Outros micro-organismos, como o *Actinomyces*, possuem fímbrias, que permeiam a aderência bacteriana às proteínas ricas em prolina e estaterina presentes na película. Algumas proteínas localizadas na superfície das bactérias também podem atuar como adesinas para a ligação em receptores de outras células.

Ainda, é preciso ressaltar que os receptores do hospedeiro não estão apenas adsorvidos à superfície do dente, mas estão livremente acessíveis em solução na saliva, podendo agregar as bactérias, facilitando sua remoção da boca por deglutição. Por isso, para que haja formação de placa, as bactérias não podem se aderir a tais receptores livres na saliva. Especificamente, *A. naeslundii* não se aderem a receptores de Proteínas ricas em prolina (PRP) livres, mas apenas quando essas proteínas estão adsorvidas na superfície dental. Provavelmente, há segmentos ocultos dessas PRPs que somente tornam-se expostos quando adsorvidos à superfície do dente, provavelmente, devido a mudanças conformacionais. Esses receptores ocultos são chamados de “criptítomos”, impedindo com que haja a ligação das bactérias a receptores livres na saliva. As adesinas que podem reconhecer criptítomos em moléculas associadas a superfícies, podem prover uma forte vantagem seletiva para qualquer micro-organismo. Além disso, o fato de que a atividade enzimática bacteriana

pode modificar constituintes da película, destruir receptores de algumas espécies e criar novos receptores para outras espécies é, provavelmente, um importante fator na regulação da colonização.

## **Coagregação**

A coagregação é o reconhecimento célula a célula. Frequentemente, envolve interações do tipo lectinas, que são proteínas que interagem com receptores complementares contendo carboidratos em outra célula. Observa-se que as fusobactérias se coagregam com a maior parte dos gêneros de bactérias. Foi proposto que essas fusobactérias agem como uma ponte entre os colonizadores iniciais e as colonizadoras tardias. Essa coagregação mediada por lectinas pode ser um importante mecanismo envolvido com a organização das comunidades microbianas da placa dental. Além disso, moléculas salivares continuarão a ser adsorvidas em bactérias já ligadas à superfície do dente, e os mecanismos de adesão descritos anteriormente continuarão funcionando. A diversidade de mecanismos potenciais para a aderência, juntamente com a heterogeneidade molecular das superfícies das bactérias, significa que a formação do biofilme envolve múltiplas interações.

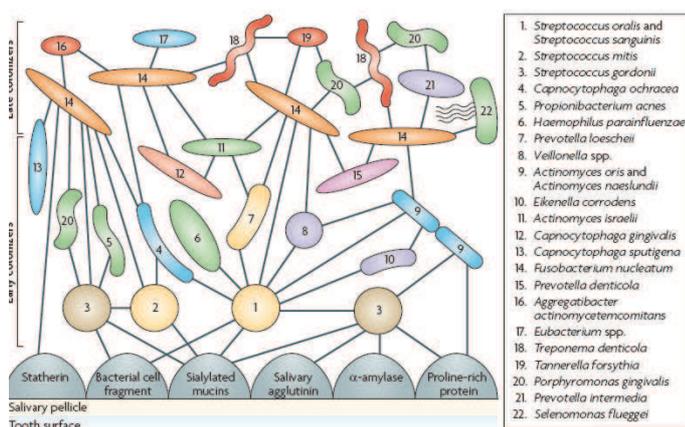
## **Multiplicação, síntese de polímeros e formação de biofilme**

Uma vez estabelecidas na superfície dental, as bactérias começam a se multiplicar. Porém, essa taxa de crescimento muda à medida que o biofilme amadurece.

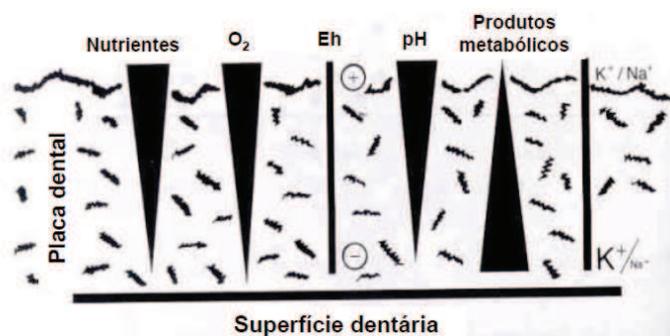
Durante o desenvolvimento do biofilme, há síntese de polímeros extracelulares pelas bactérias. Particularmente no caso de *S. mutans*, a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis (ou mutanos) é responsável pela integridade estrutural da placa, mas também pelo aumento na porosidade da placa. Esses polissacarídeos são sintetizados por enzimas glicosiltransferases, que podem estar adsorvidas na superfície bacteriana ou mesmo na superfície dental, formando parte da película adquirida. Os polissacarídeos extracelulares insolúveis podem atuar como colas biológicas entre as gtf's na superfície bacteriana e aquelas na superfície dental, viabilizando a aderência desses micro-organismos à placa, como no caso dos *S. mutans* (RÖLLA, 1985, 1989). Além disso, os polissacarídeos extracelulares insolúveis também viabilizam a adesão entre os micro-organismos. Os polissacarídeos extracelulares solúveis são sintetizados pelas frutossiltransferases, e atuam, principalmente, como fonte de energia para bactérias da placa.

Nesse processo de multiplicação, o biofilme torna-se mais espesso. O metabolismo das espécies pioneiras cria condições apropriadas para a colonização por bactérias com maior nível de exigências atmosféricas. O oxigênio é consumido pelas espécies aeróbicas e anaeróbicas facultativas, e, gradualmente, o potencial redox é diminuído, favorecendo o crescimento de bactérias anaeróbicas obrigatórias. Nutrientes adicionais também se tornam viáveis em razão do metabolismo das espécies pioneiras, e a diversidade da microflora aumenta em termos de tipos morfológicos e de número de espécies. Nesse caso, o estabelecimento de micro-organismos primários é um antecedente primário para a sub-

sequente proliferação de outros micro-organismos, num processo de sucessão microbiana. Após algumas semanas de crescimento não perturbado, a microbiota se desenvolve numa comunidade clímax.



(KOLENBRANDER *et al.*, 2010). Esquema ilustrativo da formação do biofilme na superfície dental e espécies envolvidas.



(MARSH & MARTIN, 2005) Ilustração das variantes ambientais presentes durante o crescimento dos biofilmes.

Como exemplo desse processo de formação de biofilme, abaixo está descrita a sequência de colonização microbiana inicial da superfície do dente:

Após uma superfície ter sido limpa e exposta a aproximadamente 4 horas ao ambiente oral, poucas bactérias são encontradas. O esmalte está coberto por um depósito granular denominado película, que é irregularmente distribuída sobre a superfície dos dentes. Essa película forma-se primeiramente em depressões do esmalte. Bactérias encontradas nos estágios iniciais de formação de placa são cocos ou bacilos. Existe uma fase adaptativa (sem multiplicação celular) antes que a colonização pelas bactérias prossiga. Um rápido aumento só é observado depois de 8 a 12 horas e as bactérias se espalham pela superfície em uma única camada. Em algumas regiões, os micro-organismos formam multicamadas, nas quais esses micro-organismos são embebidos numa matriz intermicrobiana. Porém, os depósitos microbianos sobre os dentes não são uniformes em espessura. Após 1 dia, a placa é constituída por cocos e filamentos. Após o segundo dia há múltiplos organismos filamentosos com orientação perpendicular à superfície. Em relação à placa formada sobre dentina radicular, a taxa de formação é mais rápida e também a espessura da placa é mais homogênea.

A adsorção contínua de micro-organismos simples, provenientes da saliva, também contribui para a expansão dos depósitos bacterianos. Na camada superficial, alguns se coagregam com outras espécies para formar estruturas semelhantes a espigas de milho (filamento central coberto por micro-organismos esféricos). Com o envelhecimento da placa (duas semanas ou mais), ocorrem alterações estruturais desde as camadas mais profundas até a superfície. Há formação de uma camada interna de bactérias pleomórficas Gram-positivas, que é ultra estruturalmente semelhante à espécie de *Actinomyces*. A parte mais externa desses depósitos microbianos maduros é em geral mais fracamente estruturada e varia em composição.

## PLACA COMO UMA COMUNIDADE BACTERIANA

Em um biofilme complexo, como o biofilme dental, populações de bactérias estão próximas umas das outras, e, em consequência disso, interagem. Essas interações podem ser benéficas para uma ou mais populações de micro-organismos, ou antagonista para outras populações. O metabolismo da placa irá produzir gradientes de fatores na placa, tais como nutrientes, pH, oxigênio, produtos tóxicos. Esses gradientes levam ao desenvolvimento de estratificações verticais e horizontais no biofilme, permitindo o crescimento de micro-organismos com necessidades amplamente diversas, permitindo que espécies incompatíveis coexistam no mesmo ambiente.

### Interações sinérgicas

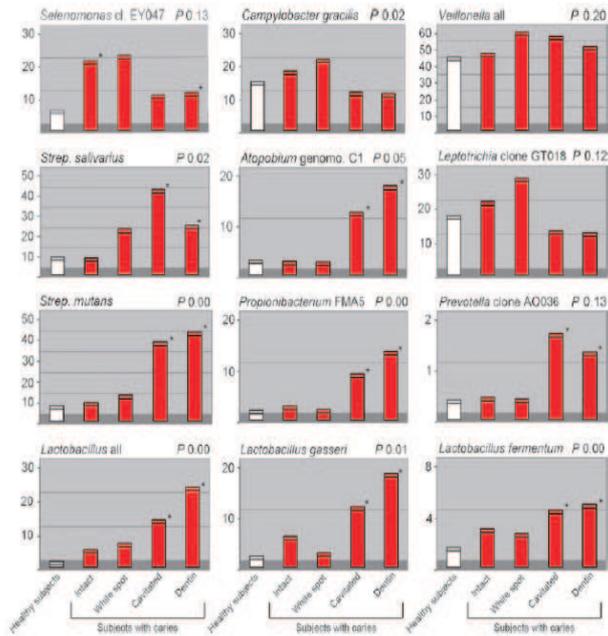
Durante o metabolismo bacteriano, os produtos obtidos pelo metabolismo de uma determinada população podem ser utilizados como nutriente para outros micro-organismos. Exemplo é o caso dos *S. mutans*, que produzem ácido láctico que é usado como nutriente por *Veillonella*. O acetato produzido por *Veillonella* é usado como nutriente por *Eubacterium*. Além disso, existe uma complementação enzimática entre populações. Esse sinergismo contribui para que espécies diferentes evitem competição direta por nutrientes, e, conseqüentemente, sejam capazes de coexistir. Forma-se uma cadeia de interações nutricionais e de redes alimentares, criando interdependência entre os micro-organismos. A coagregação também é uma interação sinérgica, já que pode auxiliar na colonização de micro-organismos metabolicamente dependentes.

## Interações antagonísticas

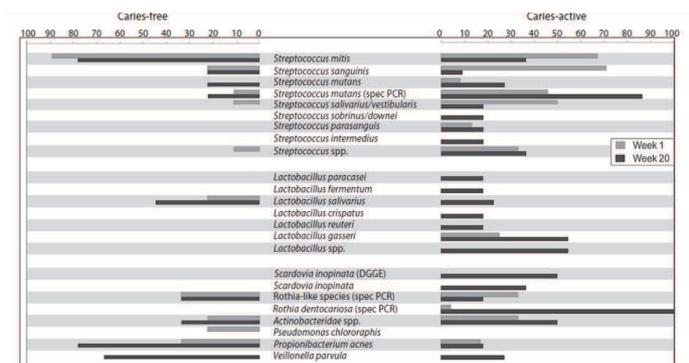
A produção de compostos antagônicos, como bacteriocinas, por exemplo, podem inibir o crescimento de alguns micro-organismos, conferindo vantagem competitiva a outros. Essas bacteriocinas são produzidas pela maioria dos estreptococos orais. Além disso, produtos metabólicos como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e enzimas também podem interferir com o crescimento da microbiota da placa dental. O baixo pH é particularmente inibitório para micro-organismos Gram-negativos.

Essas interações sinérgicas e antogonísticas permitem que os micro-organismos do biofilme dental convivam na forma de uma comunidade. Em adição, as estreitas interações físicas e metabólicas deixam poucos nichos incompletos, reduzindo, desse modo, a probabilidade de colonização por micro-organismos exógenos, e contribuindo para a estabilidade microbiana natural da flora da placa (*homeostasia microbiana*). O equilíbrio da microflora permanece estável a menos que severamente perturbado por um estresse no meio ambiente. Essa estabilidade é mantida apesar das defesas do hospedeiro e de uma variedade de estresses do meio ambiente (dieta, distúrbios físicos, antibióticos), e resulta principalmente de um equilíbrio entre sinergismo e antagonismo. Quando esse equilíbrio é perturbado, mecanismos autorreguladores forçam a restauração do equilíbrio original. Quando essa homeostase não puder ser recuperada, há o desenvolvimento de doenças bucais, como por exemplo a cárie dental.

Classicamente, o desenvolvimento de cárie dental tem sido associado à presença de *S. mutans* no biofilme dental. (HAMADA & SLADE, 1980; LÖESCHE, 1986). Entretanto, o emprego de técnicas avançadas de biologia molecular para identificação de micro-organismos em estudos recentes têm demonstrado que o biofilme dental coletado de superfícies dentais cariadas (lesão em esmalte ou dentina) ou mesmo de indivíduos cárie-ativos e de indivíduos livres de cárie (cárie inativos) apresentam uma composição microbiana diversa. Observa-se que os indivíduos cárie-inativos apresentam altos níveis de *Veilonella parvula* e de *Streptococcus mitis* no biofilme, ao passo que indivíduos cárie-ativos, além de elevadas contagens de *S. mutans*, possuem elevados níveis de *Rothia dentocariosa*, *Scardovia inopinata* e *Propioniumbacterium ssp*, sugerindo que possivelmente outras bactérias, além do *S. mutans*, também contribuem para a cariogenicidade do biofilme dental (AAS *et al.*, 2006; THOMAS *et al.*, 2012). Porém, pouco se sabe sobre a função dessas novas espécies no biofilme. Hipotetiza-se que são as interações metabólicas entre todos os micro-organismos presentes no biofilme que criam condições favoráveis para o desenvolvimento da lesão de cárie. Estudos têm sido conduzidos para se avaliar individualmente o metabolismo e características fenotípicas dessas novas espécies bacterianas no intuito de melhor explicar o seu papel no biofilme cariogênico.



(AAS *et al.* 2008). Distribuição de espécies microbianas em biofilmes coletados de superfícies dentais de indivíduos cárie-inativos (primeira coluna), de superfície hígida de indivíduos cárie ativos (segunda coluna), de superfície com lesão não cavitada ativa em esmalte de indivíduos cárie-ativos (terceira coluna), de superfície de lesão cavitada ativa em esmalte de indivíduos cárie-ativos (quarta coluna) e de superfícies com cavidade de cárie em dentina (indivíduos cárie-ativos). O asterisco significa proporções estatisticamente maiores.



(THOMAS *et al.*, 2012) Proporção de micro-organismos isolados de biofilme dental de indivíduos livres de cárie e de indivíduos cárie-ativos após 1 ou 20 semanas de formação do biofilme.

Uma vez estabelecida na cavidade bucal, a relação entre microbiota e hospedeiro pode culminar com 2 situações distintas: Saúde e Doença, na dependência de fatores diretamente relacionados ao hospedeiro, externos ao hospedeiro ou relacionados à própria comunidade microbiana.

## **MANUTENÇÃO DE UM EQUILÍBRIO SAUDÁVEL ENTRE MICROBIOTA ORAL E O HOSPEDEIRO (SAÚDE)**

A manutenção de um equilíbrio saudável entre microbiota oral e o hospedeiro, correspondente a sua situação de saúde, está na dependência de alguns fatores:

### **Fatores do hospedeiro**

#### **\*Saliva:**

Desempenha uma função muito importante na manutenção de um equilíbrio apropriado entre microbiota oral e hospedeiro, aumentando a capacidade de sobrevivência de algumas bactérias, e reduzindo a competitividade de outras.

- A saliva é responsável pela formação de **película salivar adquirida**, fornecendo receptores para a adesão de bactérias específicas. Nesse ponto, a saliva pode atuar “modulando” o primeiro estágio da colonização dental, que é a aderência.

- Fonte de nutrientes (glicoproteínas salivares, aminoácidos, carboidratos, vitaminas e sais inorgânicos). Muitas bactérias podem sobreviver tendo a saliva como fonte principal de nutrientes, mas outras bactérias não são bem sucedidas sob certa restrição de nutrientes.
- Capacidade tampão da saliva controla o pH da placa dental, mantendo o nível de pH próximo da neutralidade, eliminando a vantagem dada às bactérias cariogênicas acidúricas.

Além disso, a atuação das lisozimas, lactoferrinas, peroxidases, histatitas e cistatinas bem como de imunoglobulinas salivares também podem modular as interações entre os micro-organismos da placa dental de forma a possibilitar o crescimento de um biofilme que seja compatível com saúde bucal.

## **Fatores externos ao hospedeiro**

### **\*Dieta:**

A composição química, a consistência e a frequência de ingestão dos alimentos podem influenciar a composição da microbiota da placa dental. Alimentos com alto peso molecular não são degradados ou podem ser degradados lentamente, não fornecendo nutrientes para a placa dental. Alimentos fibrosos podem ter um efeito de limpeza física. Carboidratos de baixo peso molecular (glicose, frutose, sacarose) se difundem facilmente pela placa dental e são metabolizados, atuando como nutrientes para a placa dental. Alimentos líquidos ficam menos

disponíveis para as bactérias, ao passo que os pastosos permanecem mais tempo na cavidade bucal. As melhores dietas alimentares para a saúde em termos de cárie são as que fornecem quantidades menores e menos frequentes de carboidratos rapidamente fermentáveis.

### **Fatores associados à placa dental**

Alguns fatores associados à placa dental podem promover a estabilidade da composição bacteriana e do metabolismo da placa dental:

\*Metabolismo de lactato por *Veillonella*, *Neisseria* e *Eubacterium*: levam o pH ambiental e a composição ácida da placa para níveis de estado de repouso.

\*Geração de bases a partir da utilização de nitrogênio e ureia pelas bactérias orais. Esses compostos alcalinos podem explicar o porquê do pH da placa em repouso ser maior do que o da saliva. Proteínas da saliva e da dieta podem ser fontes de nitrogênio.

A manutenção de um pH próximo do repouso anula a vantagem das bactérias acidúricas e acidogênicas.

## A HIPÓTESE DA PLACA DENTAL ECOLÓGICA

### Hipótese da placa ecológica (MARSH, 2003)

Esse é um modelo dinâmico para explicar as mudanças na ecologia da placa que levam ao desenvolvimento da lesão de cárie. Bactérias potencialmente patogênicas podem ser naturalmente encontradas na placa dental. Porém, em pH neutro, esses micro-organismos são fracamente competitivos e estão presentes apenas em uma pequena proporção na microbiota da placa, em níveis baixos para serem considerados clinicamente relevantes. Nessa situação, os processos de des- e remineralização estão em equilíbrio. Se a frequência de ingestão de carboidratos aumenta, a placa permanece mais tempo com pH abaixo do pH crítico para desmineralização do esmalte. Essa condição de baixo pH favorece a proliferação de bactérias acidogênicas e acidúricas (especialmente *S. mutans* e lactobacilos, mas não exclusivamente) (VAN HOUTE, 1994) e também desloca o equilíbrio dinâmico entre esmalte e saliva para a condição de desmineralização. O aumento de *mutans* e lactobacilos na placa resultaria em maior produção de ácidos, aumentando ainda mais a desmineralização. Outras bactérias podem também produzir ácidos nessas condições. Porém, numa taxa mais lenta e poderiam estar associadas aos estágios iniciais da desmineralização. Se espécies acidúricas não estiverem presentes inicialmente, então as repetidas condições de pH baixo junto com a inibição da competição dos organismos podem aumentar a possibilidade de colonização por *mutans* e lactobacilos. Essa sequência contribui para a falta de especificidade total na ecologia da microbiota da cárie dental e explica o padrão de sucessão microbiana observado.

Nessa hipótese, a cárie é uma consequência de mudanças no equilíbrio da microbiota residente da placa provocada por fatores locais (altas frequências de ingestão de açúcar e queda no pH na placa). Essa hipótese também reconhece a relação dinâmica entre microbiota e hospedeiro. Nesse caso, para a prevenção de cárie, a doença pode ser controlada não somente pelo ataque direto aos patógenos, mas também pela interferência nos fatores que interferem com o equilíbrio da microbiota. A identificação de tais pontos críticos pode levar à seleção de estratégias apropriadas na prevenção de cárie dental, sob medida para as necessidades individuais.

### **Características comuns aos micro-organismos cariogênicos**

\*Rápido transporte de açúcares fermentáveis e conversão em ácidos (acidogenicidade).

Estreptococos do grupo mutans possuem um eficiente sistema de transporte de açúcar (fosfoenol piruvato/fosfotransferase), que são capazes de transportar carboidratos para o meio intracelular mesmo quando esses estão presentes em baixas concentrações.

\*Produção de polissacarídeos extracelulares (glucanos e frutanos, que possuem função estrutural ou energético) e de polissacarídeo intracelular (reserva energética), usado quando açúcar livre não está disponível.

\*Capacidade de manter o metabolismo do açúcar sob condições ambientais extremas, como em baixo pH (aciduricidade). Os *S. mutans* e lactocófilos não só permanecem viáveis em pH baixo, como também crescem e metabolizam produtos, isto é, são acidogênicos e acidúricos. Essa capacidade depende da habilidade de manter um ambiente in-

tracelular favorável e bombear prótons mesmo sob condições ácidas, presença de enzimas com pH ótimo ácido e produção de proteínas de resposta ao estresse ácido.

Deve-se enfatizar que essas propriedades não são específicas apenas para estreptococos *mutans*. Porém, esses são os micro-organismos com a combinação ideal dessas propriedades cariogênicas descritas acima. Portanto, não é surpreendente que os estreptococos são comumente encontrados em altas proporções em locais cariados, que outras bactérias podem estar envolvidas e que a etiologia não é monoespecífica em termos de bactérias envolvidas, embora a doença possa ser considerada específica do ponto de vista funcional, isto é, em termos acidúricos e acidogênicos.

## Considerações sobre biofilmes x células planctônicas

Estudos recentes têm ressaltado o fato de que propriedades de bactérias crescidas sobre uma superfície (na forma de biofilmes) são distintas dos fenótipos expressos pelos mesmos organismos em uma cultura líquida convencional.

Propriedades gerais de um biofilme (MARSH, 2005):

- \*Proteção contra a defesa do hospedeiro e predadores;
- \*Proteção contra o ressecamento;
- \*Alta resistência ou tolerância a agentes antimicrobianos, devido a:
  - Novo fenótipo associado à superfície (devido expressão diferencial de genes):

- Biofilmes formados com *S. sobrinus* necessitaram de uma concentração de amina fluoretada cerca de 100x maior do que em célula planctônica para matar a mesma quantidade de células (SHANI *et al.*, 2000). Em outro experimento, a concentração inibitória mínima para *P. gingivalis* foi 160x maior que em célula planctônia (LARSEN, 2002).

- Pobre penetração no biofilme: a matriz do biofilme pode atuar como uma barreira física à difusão dos antimicrobianos. Componentes da matriz podem aprisionar os antimicrobianos. Experimentalmente, Thurnheer *et al* (2003) mostrou que macromoléculas com diferentes pesos moleculares apresentam diferentes capacidades de penetrarem num biofilme multi-espécie formado *in vitro*. Moléculas maiores penetraram no biofilme numa menor extensão quando comparada às moléculas mais leves, razão do tamanho dos poros da matriz e de sua organização na forma de rede, que aprisiona essas macromoléculas.

- Taxa de crescimento lenta

Limitação de nutrientes promove menor crescimento do biofilme, podendo aumentar sua resistência aos antimicrobianos.

- Inativação por enzimas

\*Alteração na expressão gênica, proteica e fenotípica:

O meio ambiente de crescimento dentro do biofilme pode diferir significativamente de cultura planctônica no que diz respeito aos fatores chave, resultando na expressão alterada de genes e fenótipos alterados.

*S. mutans* cultivados na forma de biofilmes apresentam uma expressão proteica diferente quando comparada à expressão em células planctônicas. Em biofilmes, há superexpressão de algumas proteínas

que, ou não são expressas em cultura planctônica, ou são subexpressas, sugerindo que o crescimento bacteriano na forma de biofilmes altera o fenótipo do micro-organismo (SVENSÄTER *et al.*, 2001).

*S. mutans* cultivados na forma de biofilme foram mais acidúricos em relação às células planctônicas (WELIN-NEILANDS & SVENSÄTER, 2007).

\*Heterogeneidade espacial e ambiental criando um mosaico de microambientes (gradiente de pH, oxigênio, nutrientes), contribuindo para o aumento na diversidade microbiana.

\*Interações metabólicas

\*Comunicação intercelular

Bactérias podem responder às alterações do ambiente externo e também à presença de outras bactérias. Esse mecanismo de comunicação permite adaptação a fatores estressores e regula expressão de genes envolvidos com patogenia. Além disso, pode induzir competência genética e aumenta a frequência de transformação dos micro-organismos, habilitando-os na aquisição de material genético exógeno e de plasmídeos, que eventualmente carregam genes de resistência a antimicrobianos.

Para *S. mutans*, esse *quorum sensing* é mediado por moléculas de baixo peso molecular, denominados de peptídeos de competência (LI *et al.*, 2002). Alguns trabalhos sugerem que esse mecanismo é essencial para adaptação de *S. mutans* em ambientes ácidos. Quando os genes envolvidos na codificação dos peptídeos de competência são nocauteados, os *S. mutans* tornam-se menos tolerantes à acidificação (LI *et al.* 2002).

\*Troca de material genético: Também chamada de transferência horizontal, é viabilizada pelos peptídeos de competência.

## Comunidade residente da placa dental em locais diferentes

As condições ambientais em um dente não são uniformes: superfícies diferentes variam no seu grau de proteção das forças de remoção orais e da fonte de nutrientes. Essas diferenças terão reflexo na composição da comunidade microbiana.

### Placa de fissura

A microbiota é formada principalmente por Gram-positivos e é dominada por estreptococos, especialmente aqueles produtores de polissacarídeos extracelulares. Há também *Actinomyces*. Anaeróbios estritos como *Veillonella* e *Propionibacterium* também são detectados, porém em baixos números. A comunidade mais simples encontrada em fissuras comparadas a outras superfícies do esmalte provavelmente reflete um meio ambiente mais severo, talvez com uma faixa relativamente limitada de nutrientes. A principal fonte de nutrientes é a saliva e a dieta. Na entrada das fissuras, cocos e bastonetes estão arranjados em paliçada, perpendiculares à superfície do esmalte, mesclados com micro-organismos filamentosos. Na fissura propriamente dita, filamentos são muito menos presentes e a microbiota consiste principalmente de cocos e bastonetes. De forma geral, os micro-organismos presentes no fundo (na parte mais interna da fissura) são micro-organismos mortos e metabolicamente inativos.

## Placa interproximal

A microbiota é dominada por bacilos Gram-positivos, principalmente *Actinomyces*, mas estreptococos e *Veillonella* estão presentes em altos níveis. Semelhante ao descrito para placa de fissura, cada local apresenta um ecossistema diferente. Tais variações locais na composição da microbiota podem explicar porque alguns locais experimentam alta atividade de cárie com possível formação de cavitação, enquanto um local adjacente, na mesma boca, permanece sem lesões de cárie clinicamente detectáveis. A principal fonte de nutrientes são saliva, dieta e fluido gengival.

## CONCLUSÃO

A placa dental possui uma grande diversidade de micro-organismos pertencentes à microbiota oral residente. Esses micro-organismos interagem constantemente uns com os outros por meio de interações sinérgicas e antagônicas. O equilíbrio entre essas interações é responsável pelo equilíbrio microbiológico presente no biofilme dental, compatível com uma condição de homeostase microbiana. Essa condição é compatível com saúde bucal. Entretanto, determinados fatores podem alterar esse equilíbrio entre microbiota e hospedeiro e permitir o desenvolvimento de doenças. Frequente ingestão de carboidratos fermentáveis, aliada a reduzido fluxo salivar do hospedeiro, promove uma ruptura na homeostasia microbiana permitindo o desenvolvimento de cárie dental.

## REFERÊNCIAS

### Livros e capítulos de livro

CARLSSON, J.; HAMILTON I. Atividades metabólicas das bactérias orais. *In: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. Cariologia Clínica*. 3. ed. São Paulo: Editora Santos, 2001. Cap. 4. p. 71-88.

MARSH, P. D.; MARTIN, M. V. Placa dentária. *In: Microbiologia oral*. 4. ed. São Paulo: Livraria Santos, 2005. Cap. 5. p. 58-81.

MARSH, P. D.; NYVAD, B. The oral microflora and biofilms on teeth. *In: FEJERSKOV, O.; KIDD E. Dental Caries: The disease and its clinical management*. Second edition. Blackswell-Munksgaard, 2008. Cap. 10. p. 163-188.

NYVAD, B.; FEJERSKOV, O. Desenvolvimento, estrutura e pH da placa dental. *In: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. Cariologia Clínica*. 3. ed. São Paulo: Editora Santos, 2001. Cap. 5. p. 89-110.

### Artigos científicos

AAS, J. A.; GRIFFEN, A. L.; DARDIS, S. R.; LEE, A. M.; OLSEN, I.; DEWHIRST, S. E.; LEYS, E. J.; PASTER, B. J. Bacterial of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol*, 46, p. 1407-1417, 2008.

ALVES, A. C.; NOGUEIRA, R. D.; STIPP, R. N.; PAMPOLINI, F.; MORAES, A. B.; GONÇALVES, R. B.; HOFLING, J. F.; LI, Y.; MATTOS-GRANER, R. O. Prospective study of potential sources of *Streptococcus mutans* transmission in nursery school children. *J Med Microbiol*, 58, p. 476-481, 2009.

CAUFIELD, P. W.; SAXENA, D.; FITCH, D.; LI Y. Population structure of plasmid-containing strains of *Streptococcus mutans* a member of the human indigenous biota. *J Bacteriol*, 4, p. 1238-1243, 2007.

KOLENBRANDER, P. E.; PALMER, R. J.; RICKARD, A. H.; JAKUBOVICS, N.S.; CHALMERS, N. I.; DIAS, P. I. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontology* 2000, 42, p. 47-79, 2006.

HAMADA, S.; SLADE D. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev*, 44, p. 331-384, 1980.

LARSEN, T. Susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* in biofilms to amoxicillin, doxycycline and metronidazole. **Oral Microbiol Immunol**, 17, p. 267-271, 2002.

LI, Y. H.; TANG, N.; ASPIRAS, M. B.; LAU, P. C.; LEE, J. H.; ELLEN, R. P.; CVITKOVITCH, D. G. A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. **J Bacteriol**, 184, p. 2699-2678, 2002.

LI, Y.; CAUFIELD, P. W. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. **J Dent Res**, 74, p. 681-685, 1995.

LÖESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol ver**, 50, p. 353-380, 1986,

MARSH, P. D. Dental plaque: Biological significance of a biofilm and community life-style. **J Clin Periodontol**, 32, p. 7-15, 2005.

MARSH, P. D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology**, 149, p. 279-294, 2003.

RÖLLA, G.; SCHEIE, A. A.; CIARDI, J. E. Role of sucrose in plaque formation. **Scand J Dent Res**, 93, p. 105-111, 1985.

RÖLLA, G. Why is sucrose so cariogenic? The role of glucosyltransferase and polysaccharides. **Scand J Dent Res**, 97, p. 115-119, 1989.

SHANI, S.; FRIEDMAN, M.; STEINBERG, D. The anticariogenic effect of amine fluorides on *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase in biofilms. **Caries Res**, 34, p. 260-267, 2000.

SVENSATER, G.; WELIN, J.; WILKINS, J. C.; BEIGHTON, D.; HAMILTON, I. Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiology Letters**, 205, p. 139-146, 2001.

THOMAS, R. Z.; ZIJNGE, V.; CIÇEK, A.; DE SOET, J. J.; HARMSSEN, H. J. M.; HUYSMANS, M. C. D. N. J. M. Shifts in the microbial population in relation to in situ caries progression. **Caries Res**, 46, p. 427-431, 2012.

THURNHEER, T.; GMUR, R.; SHAPIRO, S.; GUGGENHEIM, B. Mass transport of macromolecules within an in vitro model of supragingival plaque. **Applied Environ Microbiol**, 69, p. 1702-1709, 2003.

VAN HOUTE, J.; LOPMAN, J.; KENT R. The predominant cultivable flora of sound and carious human root surface. **J Dent Res**, 73, p. 1727-1734, 1994.

WELIN-NEILANDS, J.; SVENSATER, G. Acid tolerance of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. **Applied Environ Microbiol**, 73, p. 5633-5638, 2007.