

## **Apostila 2**

**Disciplina: Pré-Clínica II (DP-201)  
Aspectos microbiológicos da placa dental**

**Área de Microbiologia e Imunologia  
FOP-UNICAMP**

**Profa. Dra. Renata O. Mattos Graner  
Prof. Dr. Reginaldo B. Gonçalves  
Prof. Dr. José Francisco Höfling  
Leandro Moraes Furlan**

**Piracicaba 2005**

## Placa dental bacteriana – aspectos microbiológicos

### 1. Conceito de placa dental bacteriana ou biofilme dental.

#### **Definição de biofilme:**

Genericamente, biofilmes são definidos como comunidades microbianas sésseis aderidas a superfícies rígidas. Os microrganismos que compõem o biofilme formam uma comunidade extremamente organizada, sendo envolvidos por uma matriz extracelular, composta principalmente de polissacarídeos produzidos pelos próprios microrganismos, os quais interagem com componentes do fluido pelo qual são banhados. Os biofilmes são tipicamente banhados por fluidos que carregam microrganismos. O biofilme dentário é banhado pela saliva.

Os microrganismos que colonizam os dentes formam a chamada placa dental bacteriana, de enorme interesse à odontologia e outras áreas de medicina. A placa dental bacteriana é um BIOFILME. Na natureza existem inúmeros biofilmes distintos. Por exemplo, biofilmes microbianos estão implicados na redução da vazão de tubulações das redes de água e esgoto e na contaminação e disseminação de infecções por microrganismos formadores dos biofilmes de catéteres e tubulações de equipamentos médicos e odontológicos (4,12). A placa dental é possivelmente o biofilme mais estudado, sendo importante no desenvolvimento das principais patologias bucais: a cárie dental e as doenças periodontais (3).

A comunidade microbiana de um biofilme dental maduro envolve interações microbianas intra e inter espécies e gêneros, as quais são relativamente estáveis. A matriz extracelular do biofilme apresenta canais por onde atravessam fluidos contendo nutrientes, metabólitos secretados, enzimas, oxigênio, sais e compostos orgânicos.

As bactérias que formam o biofilme apresentam mecanismos de comunicação através de sinais químicos. Estes sinais estimulam as bactérias a produzir proteínas e enzimas importantes para a adaptação fisiológica bacteriana às diferentes condições ambientais, às quais o biofilme está exposto. Assim, os biofilmes se comportam como um tecido organizado, sendo capazes de se adaptar mais facilmente a diferentes condições de estresse ambiental (3).

### 2. Fases de formação de biofilmes dentários.

Embora tenhamos discutido que a composição microbiana varia segundo as diferentes áreas dos dentes, principalmente quando se compara biofilme supragengival e biofilme subgengival, os mecanismos básicos de formação de biofilmes são academicamente divididos em três fases principais do desenvolvimento:

- 1) **Fase de aderência inicial:** envolve mecanismos inespecíficos e específicos de adesão à película adquirida do esmalte e outras superfícies dentárias expostas (Ex. superfícies radiculares). Os microrganismos com maior capacidade de se aderir aos dentes nestas fases iniciais são definidos como **colonizadores primários**.
- 2) **Fase de acúmulo:** envolvem mecanismos de interação bacteriana e a produção de uma matriz extracelular. Muitos microrganismos não se aderem inicialmente aos dentes, mas são capazes de se aderir (co-adesão) a microrganismos primários que se estabelecem na fase inicial. Estes são denominados de **colonizadores secundários**.

- 3) **Fase da comunidade “clímax”**: atinge um estágio de equilíbrio dinâmico, onde os diversos microrganismos que compõem o biofilme estão em constante adaptação às alterações ambientais. Após a adesão e acúmulo, diversas modificações ambientais ocorrem de forma que os diferentes gêneros e espécies microbianas vão variar em proporção até atingir uma fase de equilíbrio. Este equilíbrio é dinâmico, pois envolvem constantes modificações fisiológicas, para que a comunidade sobreviva no nicho colonizado. Variações na composição e proporção das espécies são menores, a não ser que grandes variações ambientais ocorram, como por exemplo, alterações acentuadas da dieta e/ou da saúde geral do hospedeiro. A microbiota clímax apresenta microrganismos colonizadores primários e secundários, e também os microrganismos **colonizadores tardios**, isto é, aqueles que aumentam em proporção como consequência de variações ambientais decorrentes do acúmulo microbiano no biofilme dentário.

Os mecanismos envolvidos nestas fases de formação de biofilmes têm sido intensamente estudados, pois ao compreendermos estes mecanismos, poderemos desenvolver métodos de controle de placa bacteriana e estratégias que atuem apenas sobre aqueles microrganismos patogênicos. Os principais mecanismos envolvidos em todas estas fases de formação do biofilme dentário serão descritos com mais detalhes nos tópicos a seguir.

## 2.1 Fase de aderência inicial.

Esta fase é formada basicamente pela interação dos colonizadores primários com a película adquirida do esmalte, por meio de interações **inespecíficas** ou **específicas**.

Interações inespecíficas ocorrem da seguinte forma: o esmalte dentário possui uma força de atração predominantemente negativa, devido aos grupos fosfatos que formam a hidroxiapatita. Sobre esta superfície, se forma uma camada composta, na sua maioria, por íons cálcio (com carga positiva), denominada **camada de hidratação**. Sobre esta camada, se adsorvem diversos componentes salivares e microbianos através de ligações não covalentes fracas, como as ligações de van der Waals, interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e pontes iônicas (13). Esta camada, formada predominantemente de glicoproteínas e proteínas ricas em aminoácidos prolina é denominada de **película adquirida do esmalte (PA)** (Figura 1A). A adesão dos colonizadores primários ao dente ocorre através de ligações ao componentes da PA. Estas ligações podem ser de dois tipos:

- 1) **ligações inespecíficas**: envolvem interações fracas por carga (por exemplo, interações de van der Waals);
- 2) **ligações específicas**: envolvem interações estáveis de “encaixe” entre proteínas da PA e proteínas de superfície bacteriana, as chamadas **adesinas** (Figura 1B). Existem vários tipos de adesinas nas diversas espécies microbianas. Cada tipo de adesina se liga a um componente específico comumente presente na PA. Vide alguns exemplos na Tabela 1.

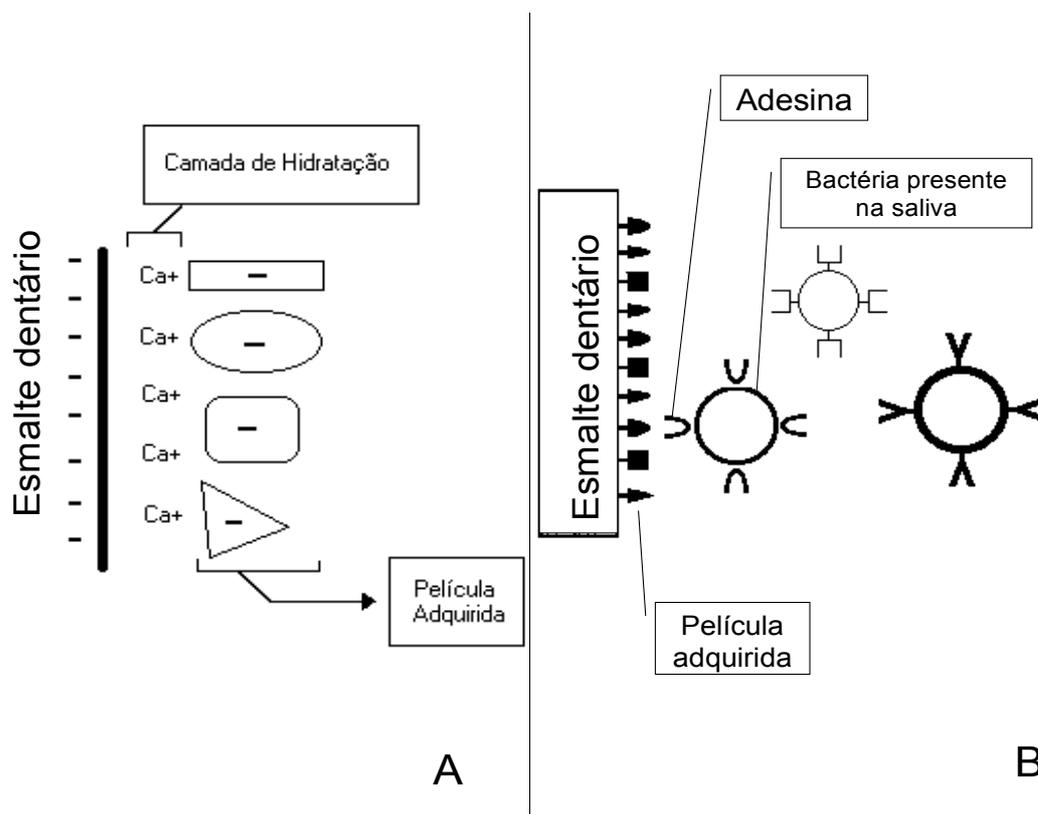


Figura 1. A) Esquema da organização da película adquirida do esmalte. A superfície do esmalte apresenta carga negativa decorrente dos grupos fosfatos que compõem a hidroxiapatita. Íons cálcio ( $\text{Ca}^+$ ) são então atraídos, formando uma camada de hidratação com carga positiva. Componentes salivares com partes eletronegativas se adsorvem a esta camada por interações não covalentes fracas. Estes componentes formam uma camada denominada de película adquirida do esmalte (PA). B) Proteínas de superfície bacteriana (adesinas) se ligam especificamente a componentes da película adquirida, permitindo ligações mais estáveis (“encaixe”). As ligações bacterianas inespecíficas, que ocorrem inicialmente por ligações eletrostáticas e/ou ligações de van der Waals não estão representadas nesta figura. Figura adaptada de B. Nyvad e O. Fejerskov, in: A. Thylstrup, O. Fejerskov. Tratado de Cariologia. Ed. Cultura Médica, RJ, 1ª edição, 1988.

Os colonizadores primários da placa dental têm como característica, a presença de **adesinas com maior afinidade a componentes da PA**, quando comparados com colonizadores secundários. Além disto, estes microrganismos geralmente são produtores de proteases que quebram os anticorpos IgA1S. Estas proteases são portanto, denominadas de **IgA1-proteases** (vide Apostila 1). As IgA1-proteases são importantes, pois permitem que estes microrganismos ocupem sítios da PA bloqueados por anticorpos. Além disto, estes microrganismos são capazes de eliminar os anticorpos que se ligam a suas adesinas de superfície. Dentre as principais espécies classificadas como colonizadores primários dos dentes estão: *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus mitis* (vide as principais características destas espécies bacterianas na Apostila 1).

Tabela 1. Exemplos de adesinas que interagem com componentes da película adquirida, identificadas em espécies de colonizadores primários.

<b>Tipo de adesinas</b>	<b>Espécies microbianas que apresentam</b>	<b>Receptor</b>
Família de Antígenos I/II	<i>S. gordonii</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. sobrinus</i>	Aglutinina da saliva da parótida, proteínas ricas em prolina, colágeno.
Proteínas Ligantes de Amilase	<i>S. gordonii</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. crista</i>	$\alpha$ -amilase salivar.
Lectinas de superfície	<i>S. oralis</i> , <i>S. mitis</i>	Glicoproteínas salivares.
Complexo antigênico G9B	<i>S. gordonii</i>	Proteína de 73 kDa da saliva submandibular.
Proteína de superfície da família Lral	<i>S. parasanguis</i> , <i>S. sanguinis</i>	Diversos componentes da PA.

Fonte: adaptado de Kolenbrander, P. E. and J. London. 1993. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. J.Bacteriol. 175:3247-3252. (7)

## 2.2 Fase de acúmulo.

A fase de acúmulo é a fase onde os microrganismos interagem entre si. Nesta fase, microrganismos **não** capazes de interagir com componentes da PA podem se aderir através da interação com as superfícies de microrganismos colonizadores primários (aderidos à PA). Diversos mecanismos estão envolvidos na fase de acúmulo microbiano no biofilme. Estes mecanismos podem ser divididos em:

- (a) Co-adesão e co-agregação: adesinas de novos microrganismos se ligam a receptores da superfície celular dos microrganismos que formam as primeiras camadas de biofilme (colonizadores primários).
- (b) Acúmulo microbiano através da divisão celular de microrganismos aderidos ao dente.
- (c) Acúmulo através da produção de uma matriz extracelular pegajosa de polissacarídeos extracelulares que “gruda” diversas bactérias em divisão no biofilme.
- (d) Interações metabólicas. Todos os processos de acúmulo ocorrem de forma associada e dinâmica, sofrendo influência de diversas condições ambientais, condições do hospedeiro e bacterianas. As interações bacterianas metabólicas incluem mecanismos de antagonismo<sup>1</sup> e mutualismo<sup>2</sup> entre as diversas espécies e gêneros microbianos.

### 2.2.1 Mecanismos de co-adesão e co-agregação (a).

Estes mecanismos envolvem a interação específica entre **adesinas** da superfície bacteriana e **receptores** presentes nas superfícies de outros microrganismos. Estas interações entre células promovem agregação de bactérias de mesma espécie. O prefixo “co-” é utilizado para indicar interação entre bactérias de gêneros e/ou espécies distintos. Bactérias isoladas ou

<sup>1</sup> Antagonismo: relação entre dois organismos distintos no qual um inibe o outro.

<sup>2</sup> Mutualismo: relação entre dois organismos distintos, na qual ambos são beneficiados.

agregados bacterianos podem se ligar a outras aderidas ao dente. Através destes mecanismos de interação específica há um progressivo aumento da diversidade microbiana. Primeiro surgem os colonizadores secundários e com o aumento sucessivo e ordenado de novas espécies, aparecem os colonizadores tardios. Alguns dos gêneros bacterianos mais freqüentemente identificados como **colonizadores secundários** estão *Actinomyces spp.*, *Veillonella spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Haemophilus spp.* e *Capnocytophaga spp.* (vide características destes microrganismos na Apostila 1). Os **colonizadores tardios** são aqueles que dependem das modificações desencadeadas pelos colonizadores primários e secundários. Estes normalmente incluem bactérias anaeróbicas estritas, como as do gênero *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Actinobacillus* e *Treponema* (7).

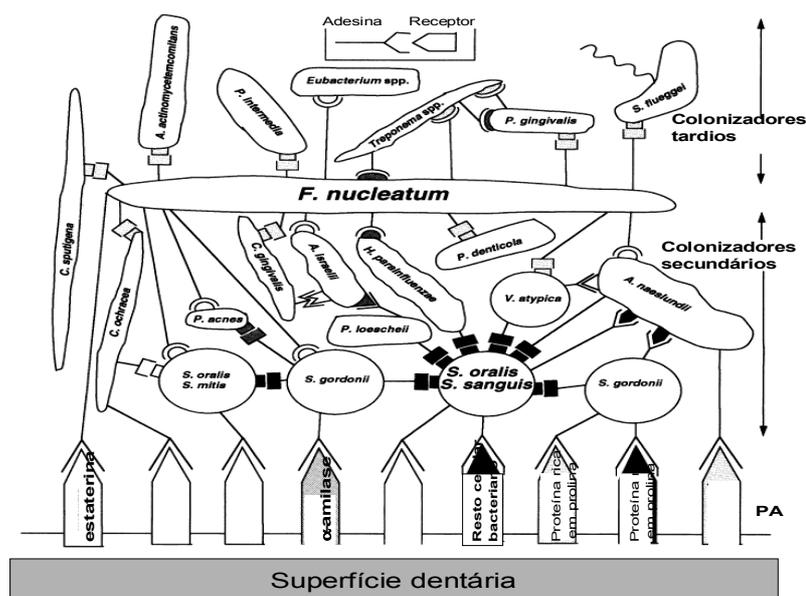
A Figura 2 ilustra um modelo de acúmulo bacteriano envolvendo mecanismos de co-aderência e co-agregação proposto por Kolenbrander e London (1993) (7). Note que os microrganismos da primeira camada bacteriana correspondem aos colonizadores primários, os quais apresentam inúmeros receptores para os colonizadores secundários. Assim, a sucessão microbiana parece não ser aleatória, mas sim determinada pelos tipos de receptores presentes nas superfícies das bactérias que formam as camadas anteriores e as adesinas das bactérias que formam as camadas subseqüentes. Entretanto, como veremos a seguir, este não é o único mecanismo que determina a composição da microbiota do biofilme dentário (vide tópico de *Dinâmica das sucessões microbianas*).

### 2.2.2 Acúmulo microbiano pela divisão celular (b e c)

Outro mecanismo de acúmulo bacteriano no biofilme, consiste no próprio processo de divisão celular das bactérias aderidas. As novas bactérias geradas pela divisão celular passam a formar **microcolônias** que aumentam em tamanho. Durante a formação do biofilme, diversas microcolônias em crescimento se unem umas às outras. Este acúmulo é concomitante e dependente da produção de polissacarídeos extracelulares (polímeros de açúcar como a glicose ou frutose). Estes polissacarídeos formam uma matriz extracelular pegajosa que é muito importante para que as células em divisão se acumulem no biofilme. Esta matriz pode também interagir com outras bactérias trazidas pela saliva individualmente ou como agregados e co-agregados. A Figura 3 ilustra estes processos.

A matriz de polissacarídeos extracelulares (PEC) é produzida por enzimas secretadas pelas próprias bactérias colonizadoras. Estas enzimas catalisam a produção de polímeros de glicose (dextranos) ou de frutose (frutanos) a partir da sacarose presente na dieta. Como vimos na Apostila 1 (vide Tabela 3), diversas espécies bacterianas, principalmente *Streptococcus*, são capazes de produzir polissacarídeos extracelulares a partir da sacarose. Entretanto, estes polissacarídeos variam muito quanto a suas propriedades (por exemplo, solubilidade em água), dependendo do tipo das ligações glicosídicas e do tamanho das cadeias de açúcar formadas. Algumas espécies não patogênicas produzem PEC mais solúveis em água e mais facilmente “quebrados” (por exemplo, *S. sanguinis*), enquanto outras espécies produzem PEC altamente ramificados e insolúveis em água (por exemplo, *S. mutans*). Estes PEC insolúveis são mais estáveis e são considerados como essenciais na patogenia da cárie dentária, como veremos mais adiante. Indivíduos que ingerem açúcar com freqüência, têm maior acúmulo de placa dental nos seus dentes. A produção de PEC aumenta a rapidez de acúmulo e o volume de placa formada sobre os dentes. Assim, a composição microbiana (proporção de microrganismos produtores de PEC), dieta (disponibilidade de sacarose) e hábitos de higiene bucal determinam a “velocidade de formação de placa dental”. Assim, após a completa remoção de placa através da escovação e uso de fio dental, ou através da remoção de placa profissional, alguns indivíduos apresentam um rápido re-acúmulo de placa, enquanto que em outros indivíduos, o acúmulo de placa dental é muito lento. Por isto, “a velocidade com que a placa dental” foi

utilizada por um pesquisador sueco, Dr. Per Axelsson, como um indicador dos riscos dos indivíduos desenvolverem doenças bucais como a cárie, uma vez que esta patologia está associada a microrganismos altamente formadores de PEC e ao consumo freqüente de sacarose (10).



Adaptado de PE Kolenbrander e J London. J Bacteriol 175:3247-3252, 1993

Figura 2. Diagrama de aderência bacteriana à superfície dentária. Os colonizadores primários consistem naqueles com adesinas de maior afinidade a componentes de película adquirida da esmalte. Após aderidos, estes microrganismos oferecem novos sítios de interação, visto que colonizadores secundários apresentam adesinas que se ligam a proteínas de superfície de alguns colonizadores primários, podendo co-aderir e co-agregar. Camadas sucessivas são formadas a partir destes processos de co-aderência/agregação, ocorrendo um aumento da diversidade microbiana da placa dental. Observe que a espécie *Fusobacterium nucleatum* corresponde a uma das espécies fusiformes que funcionam como uma ponte entre as diferentes camadas de bactérias.

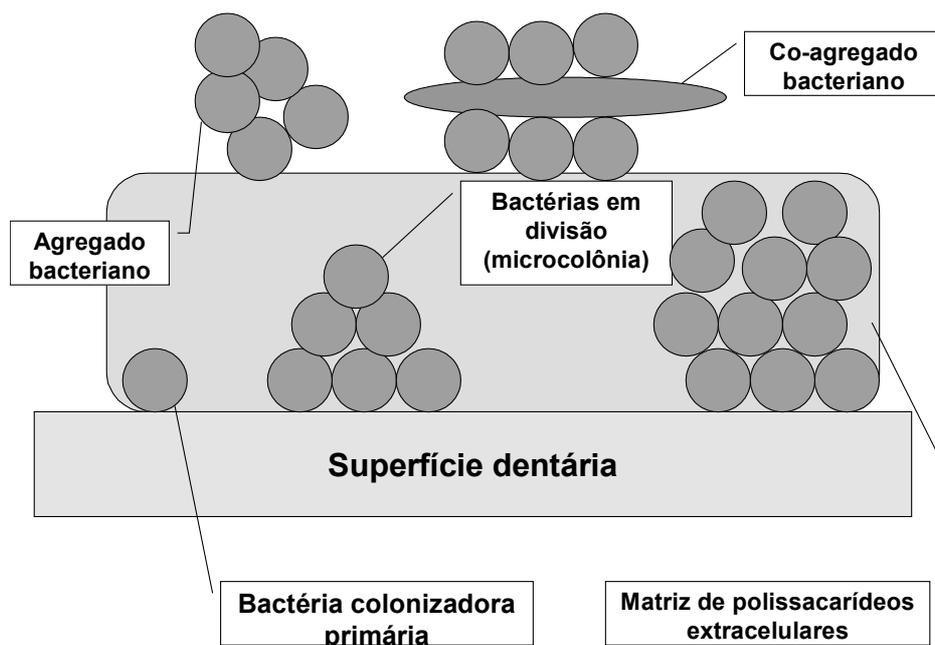


Figura 3. Diagrama simplificado do acúmulo bacteriano durante a formação da placa dentária. Bactérias inicialmente aderidas aos dentes passam a se dividir, formando microcolônias, as quais vão crescer em tamanho e se unem a outras microcolônias. Algumas das bactérias em divisão produzem também uma matriz de PEC, a qual favorece o acúmulo, agregação e co-agregação de outros microrganismos na placa.

### 2.2.3 Dinâmica das sucessões microbianas (d).

Conforme o biofilme vai se formando, diversas mudanças locais ocorrem. Com o aumento da quantidade de matriz extracelular, as camadas mais internas (mais próximas do esmalte) apresentam menor disponibilidade de alguns nutrientes e de oxigênio. Estas áreas mais internas passam a ser favoráveis aos microrganismos anaeróbios, os quais iniciam sua proliferação. Além disto, algumas espécies presentes na placa utilizam  $O_2$ , para a produção de  $H_2O_2$ , também favorecendo microrganismos anaeróbios estritos.

Outras modificações ocorrem devido a variações no pH local. Como grande parte dos colonizadores primários e secundários são bactérias sacarolíticas fermentativas, há a produção de ácido lático e conseqüente queda do pH local. Embora existam diversos mecanismos de tolerância bacteriana a meios ácidos, a maior parte dos colonizadores comensais (*S. sanguinis*, *S. gordonii*, *S. oralis*) não são capazes de resistir a quedas muito drásticas e duradouras do pH. Em algumas placas dentárias, o pH pode cair rapidamente para valores por volta de 4,0! Algumas espécies bucais se desenvolvem bem em meios ácidos, como *Lactobacillus spp.*, *Veillonella spp.* e estreptococos do grupo mutans, sendo favorecidas nos ambientes altamente acidogênicos. Por outro lado, nas placas subgingivais, o pH torna-se alcalino em decorrência da resposta inflamatória, onde há degradação de proteínas, liberação de aminas e produção de amônia. Nestes casos, o pH local varia de 7,2 a 7,4, o que favorece o crescimento de algumas espécies patogênicas como a *Porphyromonas gingivalis*, cujo pH ótimo de crescimento está por volta de 7,5 (8,9).

Com a maior competição por nutrientes, aqueles microrganismos com capacidade de transportar e metabolizar maior diversidade de açúcares ou de nutrientes disponíveis tenderão a aumentar em proporção na placa dental. A saliva funciona como uma fonte importante de

nutrientes, pois contém carboidratos, glicoproteínas, proteínas e diversos íons importantes para o metabolismo microbiano. A saliva pode sustentar o crescimento de muitos microrganismos durante os períodos entre as refeições, quando há ausência de nutrientes da dieta (exógenos). Entretanto, é possível que a maior fonte de nutrientes nos períodos entre as refeições seja proveniente de reservas de açúcares presentes na forma de polissacarídeos da própria matriz extracelular e de polissacarídeos intracelulares (glicogênio) (2). Os componentes da dieta têm grande influência na composição da microbiota bucal. Os carboidratos da dieta, principalmente a sacarose, e seu efeito na composição da microbiota bucal são os de maior interesse, pois podem favorecer microrganismos patogênicos, como *S. mutans*, como veremos em mais detalhes na Apostila 3. Por outro lado, enquanto microrganismos da placa supragengival utilizam os nutrientes da dieta e saliva, os microrganismos da placa subgengival, menos expostos a nutrientes exógenos, utilizam principalmente os nutrientes do fluido crevicular. O fluido crevicular contém diversos nutrientes protéicos e glicoproteínas, além de fatores de crescimento essenciais para diversos microrganismos anaeróbicos, como a hemina e vitamina K.

Com o aumento do número e diversidade microbiana, uma série de produtos do metabolismo microbiano se acumula no biofilme. Há um aumento da pressão osmótica, o que poderá promover perda de água pelas células microbianas. Assim, quando há alta concentrações de soluto no meio extracelular, os microrganismos somente podem captar água do ambiente, através do bombeamento de íons inorgânicos para o interior da célula. Assim, a proporção de íons de sódio ( $\text{Na}^+$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ) extracelular é alterada. Os íons sódio e potássio são osmorreguladores que participam do transporte ativo de componentes através da membrana celular (13). Para lidar com o estresse osmótico, as bactérias também sofrem alterações na sua membrana e parede celular, para tornarem-se mais impermeáveis.

Outro desafio ambiental consiste no acúmulo de radicais livres e variações no potencial de oxido-redução (Eh). Diversas reações enzimáticas envolvem reações de oxidação-redução, nas quais um componente é oxidado (perde elétrons) e outro é reduzido (recebe elétrons). A tendência de transferir elétrons de um composto para o outro é definida como o potencial de oxidação-redução ou potencial redox (Eh). O Eh de um composto pode ser determinado experimentalmente, sendo definido como a diferença de voltagem ocorrida quando elétrons de um componente em solução com baixa afinidade a elétrons migram para a solução de outro componente com alta afinidade a elétrons. A diferença de energia ocorrida pela migração de elétrons é medida através de um voltímetro, sendo o valor de Eh expresso em miliVolts (mV). Assim, o Eh é uma medida da afinidade por elétrons (1). A baixa afinidade a elétrons de um composto em relação ao outro gera um valor de Eh negativo, enquanto a alta afinidade a elétrons tende a gerar Ehs positivos. O Eh é altamente influenciado pela disponibilidade de  $\text{O}_2$ , uma vez que o oxigênio é o receptor de elétrons mais comum no ambiente. A cavidade bucal é caracterizada por grandes variações nos valores Eh. Na saliva, Ehs variam de +158 a +542mV, mas chegam a valores de -300mV no sulco gengival. O Eh também varia muito na extensão da placa dental, principalmente em placas dentais espessas. Nas porções externas, o Eh tende a ser positivo com a maior exposição ao oxigênio, mas nas porções internas tende a ser negativo (6). Bactérias anaeróbicas precisam de ambientes com valores de Eh negativos, enquanto a bactérias aeróbicas precisam de condições oxidantes (valores de Eh positivos) (6). Na placa supragengival, apesar da maior exposição ao  $\text{O}_2$ , o Eh apresenta valores negativos (por volta de -141mV), o que está associada à presença de grande proporção de anaeróbios facultativos (por exemplo, *Streptococcus spp.*). Por outro lado, estudos mais recentes têm demonstrado que até mesmo diversos microrganismos associados à doença periodontal e classificados como anaeróbios estritos apresentam certa tolerância ao oxigênio. Isto porque estes microrganismos apresentam mecanismos para controle do estresse oxidativo. Por estas características, alguns

pesquisadores consideram questionável a classificação de espécies bucais dos gêneros *Porphyromonas*, *Prevotella* e *Treponemas*, como anaeróbios estritos (2).

O estresse oxidativo é decorrente dos vários produtos tóxicos oxidantes derivados do  $O_2$ , os quais são altamente reativos. A reatividade do  $O_2$  aumenta com a aquisição de elétrons. Entre os produtos tóxicos gerados a partir do  $O_2$ , temos o radical livre superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxila (OH.) formado pela adição de um a três elétrons. Os produtos  $O_2^-$  ou  $H_2O_2$  podem ainda reagir com íons de ferro ( $Fe_3^+$ ) ou cobre ( $Cu_2^+$ ), gerando produtos também tóxicos às bactérias. A sobrevivência ao estresse oxidativo é dependente da capacidade de metabolizar  $O_2$  sem gerar produtos tóxicos ou de remover/modificar os agentes tóxicos produzidos em produtos finais não tóxicos. Enquanto os microrganismos aeróbicos utilizam inúmeros sistemas enzimáticos que eliminam os agentes redutores originados do  $O_2$ , as bactérias anaeróbicas estritas não produzem estas enzimas, sendo altamente sensíveis ao estresse oxidativo. Os anaeróbios facultativos também apresentam diversos sistemas para converter produtos tóxicos, embora não utilizem o  $O_2$  para obter energia, como os aeróbicos. As bactérias bucais se utilizam de pelo menos 6 reações enzimáticas distintas para metabolizar o oxigênio e/ou seus produtos (2). Cada uma destas reações envolvem diferentes enzimas, cujas reações catalisadas estão a seguir:

- 1) Superóxido dismutase :  $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
- 2) Catalase :  $2 H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
- 3) Peróxido de hidrogênio NADH oxidase :  $NADH + H^+ + O_2 \rightarrow 2NAD^+ + H_2O_2$
- 4) Água-NADH oxidase:  $2NADH + 2H^+ + 2O_2 \rightarrow 2NAD^+ + 2H_2O$
- 5) NADH peroxidase:  $NADH + H^+ + H_2O_2 \rightarrow NAD^+ + H_2O$
- 6) Piruvato oxidase:  $\text{Piruvato} + \text{Pi} + O_2 \rightarrow \text{Acetyl-P} + H_2O_2$

*Streptococcus spp.* (anaeróbios facultativos) apresentam NADH oxidases, NADH peroxidases, superóxido-dismutases, mas não catalases. Enzimas NADH oxidase e superóxido dismutase também foram detectadas em espécies de anaeróbios “estritos”, como *Treponema denticola*, *Porphyromonas spp.* e *Prevotella spp.*

A Figura 4 ilustra as principais modificações ambientais ocorridas em diferentes áreas de placa dental bacteriana, da mais externa à mais interna. Variações nos mesmos fatores ambientais também existem quando se comparam as microbiotas da placa supragengival e subgengival (não representado na Figura 4).

O conjunto de mecanismos de adaptação ao estresse ambiental é também influenciado pela composição microbiana de placa dental. Diversas interações entre microrganismos favorecem o estabelecimento de uma condição de equilíbrio. Um biofilme dentário maduro formado por uma comunidade complexa em equilíbrio dinâmico pode ser referido como uma **comunidade clímax**. As comunidades clímax podem existir apenas temporariamente, uma vez que alterações ambientais podem constantemente interferir neste equilíbrio ecológico. Portanto, é improvável que as comunidades clímax existam por muito tempo na cavidade bucal, exceto em áreas mais protegidas.

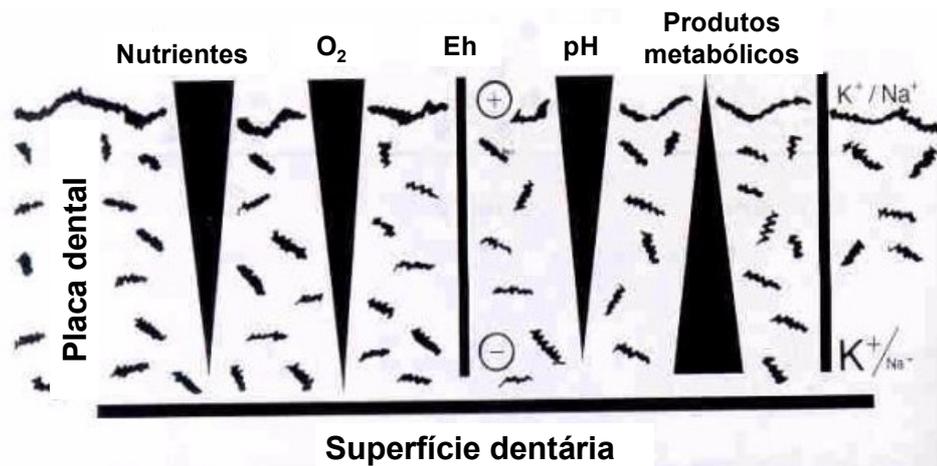


Figura 4. Diagrama representativo das variações em diferentes condições ambientais que influenciam na composição microbiana das diversas camadas da placa dental (das porções externas às internas). As setas em preto voltadas para baixo indicam redução nas concentrações de nutrientes, tensão de oxigênio e pH nas regiões mais internas da placa dentária. A seta em preto voltada para cima indica maiores concentrações de produtos metabólicos nas áreas internas da placa. Observe que o Eh tende a ser negativo nas regiões de menor tensão de oxigênio. As barras pretas indicam variações nos valores de Eh e concentrações de íons potássio e sódio. Figura adaptada P.D. Marsh, Microbiologia Oral, 2005 (6).

### 3. Interações metabólicas entre gêneros e/ou espécies da placa dental

A sucessão microbiana não é casual, mas sim envolve inúmeros processos que ordenam a colonização e composição da microbiota bucal. Além dos mecanismos de interação mediados por adesinas, PEC e adaptação a condições de estresse ambiental, há também o efeito de **interações metabólicas** entre microrganismos distintos da comunidade da placa dental. Estas interações envolvem diversos mecanismos específicos de **antagonismo** (uma espécie/gênero inibe outra espécie ou gênero distinto) e de **mutualismo/agonismo** (uma espécie ou gênero favorece a outra espécie ou gênero distinto). Estes processos contribuem para o estabelecimento de uma comunidade microbiana em equilíbrio. Além disto, dentro de uma mesma espécie microbiana, cepas distintas competem entre si para se estabelecer dentro de uma comunidade específica. Vamos compreender isto melhor. Considere que os alunos do curso de graduação da FOP-UNICAMP pertencem à espécie *Homo sapiens*. Embora sendo da mesma espécie, muitos destes alunos poderão interagir de forma competitiva, ou para vencer um torneio esportivo, ou para obter as melhores notas, ou para adquirir o aproveitamento mais completo e/ou especializado do curso e com isto tornar-se mais competitivo em áreas específicas do mercado de trabalho. Cada indivíduo desta espécie apresenta, no entanto, habilidades distintas que os tornam mais ou menos competitivos, dentro da situação ou condição específica. Muitas destas habilidades são determinadas geneticamente. Entre as bactérias de uma mesma espécie, algo semelhante ocorre. Assim, por exemplo, cada indivíduo da espécie *Streptococcus gordonii*, embora semelhante em muitas características fundamentais, pode diferir bastante em características específicas. Cada indivíduo dentro de uma mesma espécie bacteriana é denominado de cepa. Cepas distintas de uma mesma espécie variam geneticamente, o que influencia na sua capacidade competitiva.

A seguir, vamos explicar alguns exemplos de interações metabólicas entre microrganismos da placa dental e mecanismos competitivos dentro ou fora de um mesmo gênero e/ou espécie microbiana.

**(Exemplo 1) Antagonismo: bactérias produtoras de ácido láctico versus microrganismos aeróbios e outros competidores**

Como explicado no tópico do gênero *Streptococcus*, as bactérias produtoras de ácido láctico são anaeróbias facultativas, isto é, não requerem O<sub>2</sub> para obter energia (ATP), embora não sejam sensíveis ao oxigênio. Entretanto, as bactérias produtoras de ácido láctico captam O<sub>2</sub> em proporções similares aos microrganismos aeróbicos. Parte deste é reduzido ao radical livre superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou H<sub>2</sub>O. O superóxido produzido é altamente tóxico e deve ser convertido em O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pela enzima superóxido-dismutase. O O<sub>2</sub> captado não é utilizado para obtenção de energia, mas tem uma função ecológica importante. Ao utilizar O<sub>2</sub> do meio, estas bactérias criam um ambiente anaeróbico, inibindo a proliferação de microrganismos aeróbicos. Além disto, a própria H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzida ou substâncias geradas a partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são capazes de inibir o metabolismo e crescimento de outros microrganismos competidores.

**(Exemplo 2) Mutualismo: bactérias produtoras de ácido láctico versus *Veillonella spp.***

O ácido láctico, produto final do metabolismo de *Streptococcus* e outros gêneros de bactérias produtoras de ácido láctico, consiste na fonte de carbono ideal de *Veillonella spp.* Espécies de veilonela não são capazes de fermentar açúcares, mas obtêm energia a partir de ácido láctico. *Veillonella* metaboliza ácido láctico produzindo CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>. Desta forma, há boa disponibilidade de ácido láctico em comunidades onde predominam *Streptococcus* e *Lactobacillus*, o que favorece o crescimento e aumento da proporção de veilonelas. Por outro lado, muitas espécies de estreptococos comensais da placa dental (por exemplo, *S. sanguinis*) não são capazes de tolerar pH muito baixos, que ocorre em decorrência do acúmulo de metabólitos, como o ácido láctico. Assim, as veilonelas presentes auxiliam no controle do pH local impedindo que este atinja limites tóxicos aos próprios estreptococos produtores de ácidos.

**(Exemplo 3) Antagonismo: bacteriocinas**

A produção de bacteriocinas é um exemplo de competição entre cepas de uma mesma espécie microbiana. Cepas distintas de diversas espécies bacterianas produzem substâncias que inibem o crescimento de cepas da mesma espécie ou de espécies semelhantes. Estas substâncias são denominadas de bacteriocinas. Diferente dos antibióticos, substâncias inibitórias de amplo espectro de ação produzidas por diversos microrganismos, as bacteriocinas têm pequeno espectro de ação e atuam normalmente sobre cepas da mesma espécie ou sobre cepas de espécies semelhantes à espécie produtora. Assim, *Streptococcus mutans* produzem bacteriocinas que inibem outras espécies de *Streptococcus* competidoras, como *S. gordonii*, *S. sanguinis* e *S. mitis*, além de inibirem cepas distintas, também da espécie *S. mutans*. Nem todas as cepas de *S. mutans* produzem bacteriocinas, e cepas distintas podem produzir tipos distintos de bacteriocinas. Existem bacteriocinas que inibem cepas distintas dentro de uma mesma espécie, enquanto outras têm maior espectro de ação. Através da produção de um grupo particular de bacteriocinas, uma cepa pode ser mais hábil do que a outra em se estabelecer em um determinado nicho ecológico. Existem estudos que sugerem que cepas de *S. mutans* que produzem maior número de bacteriocinas distintas contra um maior espectro de cepas de *S. mutans* e de outras espécies de estreptococos bucais, são mais facilmente transmitidas de mães para seus filhos (as) (5).

**(Exemplo 4) Comunicação: através de interações químicas entre bactérias de mesma espécie ou entre espécies distintas**

Como abordado superficialmente na Apostila 1, as bactérias que colonizam o mesmo ambiente são capazes de se comunicar através de sistemas de sinalização. Alguns destes sistemas são denominados de “*quorum-sensing*” (do Latim, *quorum*: número mínimo de indivíduos presentes exigidos para que um órgão coletivo funcione), através dos quais as bactérias “sentem” o aumento de sua densidade populacional. Isto ocorre porque as bactérias secretam pequenos peptídeos (também chamados de ferormônios), para o meio extracelular. Quando há um aumento na concentração destes ferormônios em decorrência do aumento do número de bactérias no local, estes se ligam a receptores das bactérias locais, ativando a transcrição de genes importantes para uma série de modificações fisiológicas (11,14). Estas modificações fisiológicas tornam as bactérias mais hábeis a se adaptar a condições de estresse decorrentes da “super-população”, como carência de nutrientes, estresse osmótico, quedas do pH e variações de Eh. Existem ferormônios que ativam apenas as cepas da mesma espécie à da cepa produtora (sinalização intra-espécie), enquanto outros ferormônios ativam bactérias de espécies distintas (sinalização inter-espécie) (11,11).

#### **4. Placa dental associada às doenças bucais**

A placa dental pode apresentar uma composição microbiana compatível com a saúde, quando há o bom funcionamento dos mecanismos de defesa do hospedeiro inatos e adaptativos, um controle físico-mecânico de placa periódico (através de escovação e fio dental) e uma dieta balanceada (rica em fibras e com baixa concentração e frequência de consumo de sacarose). Nestas situações, podemos dizer que a placa dental encontra-se em condição **homeostase (equilíbrio)** com o hospedeiro. Entretanto, fatores que interfiram no sistema imune, no acúmulo de placa dental e ou que promovam uma dieta inadequada (pobre em fibras, com alta frequência de consumo de açúcares fermentáveis), podem promover o desequilíbrio microbiano da placa dental e redução da proporção de microrganismos comensais. Esta condição de desequilíbrio está associada ao aumento em proporção dos microrganismos patogênicos oportunistas envolvidos na patogenia da cárie dental ou em doenças periodontais. Assim condições que favoreçam microrganismos capazes de proliferar em baixos pHs (por exemplo: estreptococcus do grupo mutans e lactobacilos) estão associados à desmineralização progressiva dos dentes, e conseqüente desenvolvimento de lesões de cárie. Por outro lado, o acúmulo prolongado de placa nas margens gengivais causam inflamação gengival pela ação mais exacerbada do sistema imune local e favorece o crescimento de microrganismos anaeróbios estritos, incluindo bactérias proteolíticas (por exemplo: *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*, *Treponema spp.*) que promovem destruição dos tecidos periodontais e ativam mecanismos imunológicos que agridem o próprio tecido periodontal. Além das proteases produzidas por estes microrganismos, os produtos da própria reação inflamatória são responsáveis pelo dano do periodonto. Durante a inflamação, o pH da placa subgengival varia de neutro a pHs mais básicos, por volta de 7,5 (8). Estes pHs alcalinos favorecem o crescimento de bactérias periodontopatogênicas anaeróbias, Gram-negativas, como *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis*. Além disto, o fluido crevicular aumenta em volume em decorrência do processo inflamatório. Por ser rico em proteínas, este fluido passa ser uma fonte rica em nutrientes para as bactérias proteolíticas, favorecendo o crescimento das espécies periodontopatogênicas, os quais aumentam em proporção na placa dental bacteriana (9). A Figura 5 ilustra a evolução de uma placa dental associada à saúde para uma placa dental patogênica. Na próxima apostila, vamos estudar em detalhes os fatores associados ao estabelecimento de uma placa dental associada à cárie dentária.

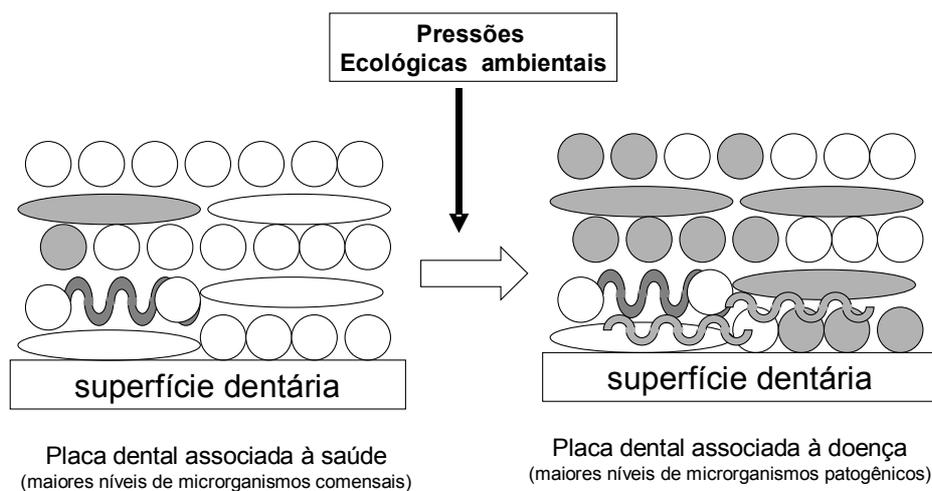


Figura 5. Relação entre os níveis de patógenos da placa dental associada à saúde e à doença periodontal. Bactérias em cinza representam as espécies patogênicas. As bactérias comensais são representadas em branco. Observe que os níveis de microrganismos comensais é maior nas placas dentárias compatíveis com a saúde, embora microrganismos patogênicos possam existir em baixos níveis. Pressões ecológicas podem favorecer a proliferação de microrganismos patogênicos, o que promove o desenvolvimento de uma placa dental patogênica. Figura adaptada de P.D. Marsh. *Microbiology* 149: 279-294, 2003 (9).

## Agradecimentos

A elaboração desta apostila contou com a colaboração do aluno do Curso de Graduação em Odontologia da FOP-UNICAMP, **Leandro Moraes Furlan** (RA 24277).

## Referências Bibliográficas

1. **Alberts, B, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter.** 2002. IV. Internal Organization of the Cell -> 14. Energy Conversion: Mitochondria and Chloroplasts -> Electron-Transport Chains and Their Proton Pumps, *In* Alberts, B, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter (eds.), Garland Publishing, New York.
2. **Bowden, G. H. and I. R. Hamilton.** 1998. Survival of oral bacteria. *Crit Rev.Oral Biol.Med.* **9**:54-85.
3. **Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg.** 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**:1318-1322.
4. **DuPont, G. A.** 1997. Understanding dental plaque; biofilm dynamics. *J.Vet.Dent.* **14**:91-94.
5. **Gronroos, L., M. Saarela, J. Matto, U. Tanner-Salo, A. Vuorela, and S. Alaluusua.** 1998. Mutacin production by *Streptococcus mutans* may promote transmission of bacteria from mother to child. *Infect.Immun.* **66**:2595-2600.
6. **Kenney, E. B. and M. M. Ash, Jr.** 1969. Oxidation reduction potential of developing plaque, periodontal pockets and gingival sulci. *J.Periodontol.* **40**:630-633.
7. **Kolenbrander, P. E. and J. London.** 1993. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J.Bacteriol.* **175**:3247-3252.
8. **Marcotte, H. and M. C. Lavoie.** 1998. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**:71-109.
9. **Marsh, P. D.** 2003. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* **149**:279-294.
10. **per Axelsson, A.** 1991. A four-point scale for selection of caries risk patients, based on salivary *S. mutans* levels and plaque formation rate index., p. 159-171. *In* N. W. Johnson (ed.), Risk marker for oral disease. Cambridge University, New York.
11. **Podbielski, A. and B. Kreikemeyer.** 2004. Cell density--dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci. *Int.J.Infect.Dis.* **8**:81-95.
12. **Shearer, B. G.** 1996. Biofilm and the dental office. *J.Am.Dent.Assoc.* **127**:181-189.
13. **Thylstrup, A. and O. Fejerskov.** 1995. *Cariologia clínica.* Editora Santos, São Paulo.
14. **Vendeville, A., K. Winzer, K. Heurlier, C. M. Tang, and K. R. Hardie.** 2005. Making 'sense' of metabolism: autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria. *Nat.Rev.Microbiol.* **3**:383-396.

### *Glossário*

**Heme:** subunidade da molécula de hemoglobina que consiste de uma parte orgânica e um átomo de ferro. A parte orgânica é formada por 4 anéis, os quais se ligam formando um tetra-estrutura. O átomo de ferro fica no centro da estrutura tetra e se liga ao oxigênio.

**Hemina:** forma química de heme, na qual o átomo de ferro se torna férrico (reativo com cloro. Também chamado de cloreto de hemina, cloreto de hematina, cloro-hemina, fator X de *Haemophilus*.

**Mutualismo:** Relação entre dois organismos distintos, na qual ambos são beneficiados.