

## Contribuição do estudo do biofilme dentário para o tratamento das doenças periodontais

### *Contribution of dental biofilm study to the treatment of periodontal diseases*

Maria Cristina Pereira Nunes\*  
Márcio Zaffalon Casati\*\*  
Karina Teixeira Villalpando\*\*\*  
Fabiano Ribeiro Cirano\*\*\*\*

#### Resumo

Microorganismos têm uma tendência bastante forte de se associar a superfícies, sejam estas inertes ou móveis. Uma vez ligados a uma superfície, denominada substrato, é desencadeado um processo elaborado de formação de microcolônias que se estruturam em comunidades organizadas e funcionais. Cada bactéria destas comunidades vive em um cooperativismo metabólico. Este complexo é chamado de biofilme e está presente na maioria das superfícies molhadas da natureza (tecidos humanos, próteses médicas, tubulação de água), podendo causar vários problemas ao meio onde se desenvolve. A placa dentária é um biofilme denominado supragengival quando se acumula na superfície dentária coronariamente à margem gengival e subgengival quando se associa à superfície dentária e a tecidos moles apicalmente à margem gengival. Estas comunidades extremamente estruturadas onde cada elemento desempenha um papel em prol do bem comum são responsáveis por doenças nos seres humanos. Os biofilmes que colonizam as superfícies dentárias e os tecidos orais podem provocar cáries, gengivites e periodontites, que estão entre as infecções mais comuns que afligem os homens. Os microorganismos pertencentes a estas estruturas demonstram certa resistência a agentes antimicrobianos e mecanismos de defesa do hospedeiro, o que torna estas infecções difíceis de serem tratadas de forma eficaz. Entender o biofilme, sua composição, estrutura, organização, atividade e como se relaciona com agentes químicos pode ser um meio para melhorar o combate das patologias originadas por ele.

Palavras-chave: Biofilmes; Matriz extracelular; Doenças periodontais

#### Abstract

*Microorganisms have a strong tendency to become associated with inert or living surfaces. Once microorganisms are attached to a substratum surface, a multistep process starts leading to the formation of microcolonies which are structured in organized and functional communities. Each bacterium from these communities lives in a metabolic cooperativity. This complex is termed biofilm and exists on most of the wet surfaces in nature (living tissues, medical devices, and water piping systems), bringing problems to its environment. Dental plaque is a biofilm named supragingival biofilm when it accumulates on the tooth surface above the gingival margin and subgingival biofilm when it is associated to the tooth and tissues below the gingival margin. These remarkably structured communities where each member plays a role to benefit them as a whole are responsible for a number of diseases of human beings. The biofilms which colonize the tooth surface and oral tissues can cause caries, gingivitis and periodontitis which are among the most common infections of man. The microorganisms that belong to these structures show certain resistance to antimicrobial agents and host defense systems which make these infections difficult to be treated effectively. Understanding the biofilm, its composition, structure, organization, and activities as well as how it deals with these antimicrobial agents may be a way to improve the fight against the diseases it causes.*

Key words: Biofilms; Extracellular matrix; Periodontal diseases

\* Especialista em Periodontia pela Universidade Paulista (UNIP). E-mail: mcristinapn@ig.com.br

\*\* Professor Titular da Disciplina de Periodontia da UNIP.

\*\*\* Professora do Curso de Especialização de Periodontia da UNIP.

\*\*\*\* Professor Adjunto da Disciplina de Periodontia da UNIP.

## Introdução

A placa dentária é um biofilme complexo que se acumula na superfície dentária coronariamente ou apicalmente à margem gengival ou sobre os tecidos da cavidade oral provocando cáries, gengivites e periodontites. A película adquirida é formada a partir da adsorção de macromoléculas da saliva nas superfícies do dente. Esta estrutura fornece receptores para os primeiros colonizadores bacterianos. A colonização bacteriana segue um padrão que começa com a adesão a esta película por microrganismos planctônicos, chamados assim porque se encontram em suspensão em meio líquido. Estes podem se co-agregar antes de aderir à superfície. A adesão da bactéria a uma superfície faz com que sofra uma alteração fenotípica, tornando-se sésil. Estes microrganismos passam por co-adesão, sintetizam matriz extracelular e se comunicam via *quorum sensing* até se encontrarem bem adaptados às mudanças do meio e em perfeito equilíbrio com seus vizinhos da mesma espécie ou de diferentes espécies. Estes agregados celulares podem formar microcolônias que farão parte de comunidades permeadas por canais com a função de trazerem nutrientes e levar catabólitos. Toda esta elaborada estrutura fará com que as bactérias no interior do biofilme estejam protegidas contra agentes químicos e mecanismos de defesa do hospedeiro e estejam prontas para se destacarem e colonizarem outros sítios.

Esta revisão da literatura tem por objetivo analisar formação, composição, estrutura, comportamento e atividade do agente etiológico das doenças periodontais, ou seja, o biofilme dentário. Além disso, verificaremos os benefícios que esta organização promove às espécies colonizadoras e o quanto dificulta o tratamento das patologias promovidas pelas mesmas.

## Revisão da literatura

### Formação, composição, estrutura e comportamento do biofilme dentário

#### Película adquirida

A formação da película adquirida se dá por forças físicas entre as superfícies orais e os componentes orgânicos e inorgânicos dos fluidos circundantes.

De acordo com Scannapieco e Levine<sup>24</sup> (1999), a saliva se compõe de:

1 – Eletrólitos: potássio (K<sup>+</sup>), sódio (Na<sup>+</sup>), cloreto (Cl<sup>-</sup>), bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), cálcio (Ca<sup>2+</sup>), magnésio (Mg<sup>2+</sup>) e fósforo (HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>).

2 – Parte orgânica: proteínas, lipídios, carboidratos e sulfatos que são as mucinas, proteínas ricas em prolina e glicoproteínas, histatinas, estaterina, alfa-amilases, peroxidases, lactoferrina, lisozina, IgA secretora e fibronectina.

#### Adesão

Bactérias são atraídas por nutrientes orgânicos que se concentram nas superfícies molhadas<sup>7</sup>.

Muitas espécies bacterianas possuem certas estruturas protéicas na sua superfície, tais como fimbrias que ajudam na sua adesão a superfícies diferentes (Duguid *et al.*<sup>11</sup>, 1991). Estes apêndices foram encontrados em várias espécies bacterianas: *Actinomyces naeslundii*, *Porphyromonas gingivalis*, alguns grupos de estreptococos, tais como *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus parasanguis*, *Streptococcus mutans*, membros do grupo do *Streptococcus mitis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens*<sup>15</sup>. Fimbrias estão associadas à adesão bacteriana à proteína salivar rica em prolina, lactoferrina, fibronectina, ao fibrinogênio e à estaterina depositados na película adquirida, a receptores glicosídicos de células epiteliais, leucócitos polimorfonucleares e estreptococos da cavidade oral além de outras bactérias<sup>25</sup>.

#### Co-agregação

Acredita-se que a co-agregação (interação entre organismos em suspensão, os planctônicos) entre pares microbianos orais seja um fato importante na formação do biofilme dentário<sup>1</sup>.

Foram reconhecidos seis grupos de espécies bacterianas associadas intimamente: grupo azul do *Actinomyces*; grupo amarelo formado por *Streptococcus*: *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *Streptococcus sp.*, *S. gordonii*, *S. intermedius*; um complexo verde formado por *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga gingivalis*, *C. sputigena*, *C. ochracea*, *C. concisus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* sorotipo A; um grupo roxo formado por *Veillonella parvula* e *Actinomyces odontolyticus*. Estes grupos são considerados os primeiros colonizadores da superfície dentária e seu crescimento geralmente precede a multiplicação do complexo predominantemente Gram-negativo: o grupo laranja, formado por *C. gracilis*, *C. rectus*, *C. showae*, *E. nodatum*, *F. nuc. nucleatum*, *F. nuc. polymorphum*, *P. intermedia*, *P. micros*, *P. nigrescens*, *S. constellatus*, e o grupo vermelho formado por *P. gingivalis*, *B. forsythus* e *T. denticola*<sup>25</sup>. Estudos demonstraram que o reconhecimento de uma célula por outra não acontece a esmo, mas que cada grupo tem um outro definido para se co-agregar<sup>18</sup>.

#### Co-adesão

Organismos planctônicos podem colidir e co-agregar uns com os outros ou, ainda, colidir com os sésseis resultando em co-adesão<sup>1</sup>. Foi observado que a co-adesão entre *actinomycetes* e estreptococos não era rompida pela passagem de uma interface líquido-ar durante o ato de beber, comer e engolir e que *actinomycetes*, portanto, pode ser considerado elemento desencadeador da adesão de outros microrganismos ou base para esta adesão no desenvolvimento do biofilme dentário<sup>2</sup>.

#### Matriz extracelular

A adesão bacteriana a uma superfície altera seu fenótipo, portanto, todas as seguintes atividades são afetadas

assim que uma célula planctônica se torna séssil: consumo de oxigênio e nutrientes, transporte de elétrons, taxa de crescimento, taxa de quebra de substrato, produção de calor e síntese de matriz ou polímeros extracelulares<sup>31</sup>.

A matriz representa a maior parte do biofilme (75 a 80% do seu volume). É composta predominantemente de água e solutos aquosos. A parte seca corresponde a uma mistura de polissacarídeos extracelulares, proteínas, sais e material celular<sup>25</sup>. Os polissacarídeos da matriz são principalmente frutanas e glicanas sintetizadas pelos microrganismos a partir da sacarose da dieta do hospedeiro<sup>29</sup>. Uma característica peculiar do biofilme oral é que muitos dos microrganismos podem sintetizar e degradar polissacarídeos extracelulares<sup>25</sup>.

### Canais

Vários estudos confirmam que biofilmes são altamente hidratados, com 50-90% da área total de cortes verticais constituída de polissacarídeo extracelular e/ou canais de água<sup>7</sup>.

A disposição regular dos canais e agregados celulares fornece uma rota alternativa para o transporte de nutrientes e oxigênio para a base do biofilme, sem que estes tenham que se difundir por toda a extensão vertical do biofilme<sup>7</sup>.

O fluxo de água que ocorre nestes canais permite a difusão de nutrientes e oxigênio, além da remoção de detritos<sup>20</sup>. Estudos demonstraram que a tensão de oxigênio era maior dentro dos canais, enquanto o meio no interior dos agregados celulares era essencialmente anaeróbio<sup>33</sup>.

### Destacamento

O biofilme maduro é uma área densa e estabilizada, onde o crescimento populacional zero parece ser o padrão, já que os limites espaciais são tantos que a divisão celular seria impedida pelo polímero extracelular circundante. Embora não se dividam, são viáveis e podem ser cultivadas se forem liberadas do invólucro. Como a divisão celular não é freqüente no biofilme maduro, o excedente de energia é usado para produzir polissacarídeos extracelulares, que podem ser degradados e utilizados em tempos de escassez de nutrientes. Com a produção da enzima polissacaridase, há a degradação do polissacarídeo para consumo e a liberação de células da estrutura para procurar meios mais favoráveis<sup>30</sup>.

Três são os processos principais de destacamento: erosão ou separação/cisalhamento (remoção contínua de pequenas porções do biofilme), descamação (remoção rápida e em massa) e abrasão (destacamento devido à colisão de partículas do fluxo principal contra o biofilme)<sup>4</sup>.

A forma do destacamento aparentemente afeta as características fenotípicas dos microrganismos. Agregados que se separaram do biofilme tendem a manter certas características do biofilme, tais como a resistência a agentes antimicrobianos, enquanto células que se separaram como resultado de multiplicação celular podem voltar rapidamente ao fenótipo de planctônicas<sup>10</sup>.

### Quorum sensing

As bactérias podem se comunicar através de produtos bacterianos capazes de se difundir de uma célula para outra. Este método de sinalização intercelular parece apropriado para um meio limitado para difusão como o do biofilme. A produção de moléculas *quorum sensing* conhecidas como *acyl-homoserine lactones* (*acyl-HSLs*) tem sido encontrada em biofilmes cultivados e naturais<sup>9</sup>. Definimos como sendo sinais quaisquer produtos bacterianos transportados ativamente ou passivamente que venham alterar o estado de microrganismos vizinhos. Podem ser: metabólitos bacterianos, *acyl-HSLs*, proteínas secretadas, material genético como DNA ou RNA e produtos ainda não estudados. Estes sinais podem alterar a distribuição de espécies bacterianas específicas no biofilme, a expressão de proteínas e introduzir novas características genéticas em células vizinhas ou ainda atraí-las para o biofilme e incorporá-las para posterior consumo<sup>30</sup>.

*Quorum sensing* pode dar propriedades distintas ao biofilme. Possui potencial para influenciar a estrutura da comunidade, encorajando o crescimento de espécies benéficas (ao biofilme) e desencorajando o crescimento de competidoras<sup>25</sup>.

Uma transferência genética pode transformar um microrganismo não virulento em um patógeno altamente virulento. As bactérias expressam novos fenótipos e algumas vezes mais virulentos quando se desenvolvem no interior do biofilme<sup>16</sup>.

### Fatores que afetam o desenvolvimento e comportamento do biofilme

Qualquer alteração em um dos seguintes fatores tem consequências diretas na estrutura do biofilme: hidrodinâmica<sup>28</sup>, disponibilidade de nutrientes<sup>25</sup>, aspereza da superfície<sup>10,21</sup>, propriedades físico-químicas da superfície<sup>10,25</sup>, presença ou ausência de oxigênio<sup>17,25</sup>, temperatura<sup>2</sup>, pH<sup>3</sup> e coeficiente de difusão<sup>7</sup>.

### Processo inflamatório e resposta do hospedeiro

O fator de risco básico para uma doença infecciosa é o agente etiológico. Sem este agente não há doença, não importa quais outros fatores de risco o indivíduo venha possuir. A maioria dos sítios na maioria dos indivíduos não exhibe destruição óssea mesmo que um grande número de microrganismos, incluindo periodontopatógenos, esteja presente coronariamente ou apicalmente à margem gengival. Como outras doenças infecciosas, pode acontecer de o organismo ganhar o hospedeiro e, ainda assim, este hospedeiro não manifestar características clínicas daquela doença por um período de tempo que pode variar de semanas a décadas ou para sempre. Saúde implica ausência de patógenos ou presença destes sem a doença. Doença implica presença de patógenos<sup>14</sup>.

Aparentemente, a evolução da doença periodontal depende da ocorrência simultânea de um grande número

de fatores. O hospedeiro deve estar suscetível em ambas as partes: a sistêmica e a local. O meio local tem que conter espécies bacterianas que propiciem a infecção ou que pelo menos não inibam a atividade do patógeno. O meio deve ainda contribuir para a expressão de fatores de virulência do patógeno. Isto tudo deve convergir para um ponto em que a expressão do fator de virulência do patógeno é desarmada ou o organismo se estressa e manifesta propriedades que levam à lesão dos tecidos. O(s) patógeno(s) deve(m) alcançar número suficiente para iniciar ou causar a progressão da infecção naquele indivíduo em particular e naquele exato sítio<sup>27</sup>.

### Biofilme supragengival

As bactérias associadas à doença periodontal residem dentro do biofilme coronariamente e apicalmente à margem gengival. O biofilme supragengival está aderido à superfície dentária e é composto predominantemente por espécies de *Actinomyces*<sup>26</sup>.

Na fase inicial da formação do biofilme supragengival há predominância de estreptococos alfa-hemolíticos (grupo *viridans*) e pequena porção de bacilos Gram-positivos, principalmente *Actinomyces viscosus* e *Actinomyces naeslundii*. Após o primeiro dia de desenvolvimento sobre a superfície dentária, a proporção de estreptococos cai para 45%, enquanto a de cocos Gram-negativos anaeróbios (*Veillonella*) aumenta aproximadamente para 20%. Após o terceiro dia, verifica-se que espécies anaeróbicas e facultativas de *Actinomyces* passam a predominar, constituindo cerca de 25% da microbiota cultivável, enquanto bacilos Gram-negativos anaeróbios (*Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Prevotella* e *Porphyromonas*) correspondem a 50%. À medida que a placa supragengival se desenvolve e aumenta em espessura, as condições ambientais favorecem a multiplicação de microrganismos anaeróbios, com a proliferação de bacilos Gram-negativos, principalmente nas camadas mais profundas e mais próximas à superfície dentária<sup>29</sup>.

### Biofilme subgengival

A natureza dos biofilmes subgengivais é mais complexa, já que ambos, o biofilme associado ao dente e o outro associado ao tecido, estão separados por linha tênue ou células planctônicas. Como no biofilme supragengival, a espécie predominante é *Actinomyces*, mas em número muito maior, além das espécies que compõem o grupo vermelho e laranja<sup>25</sup>.

O biofilme subgengival se assemelha ao supragengival com relação às bactérias associadas à gengivite sem a formação de bolsas profundas. As bactérias compreendem cocos Gram-positivos e Gram-negativos, bastonetes e organismos filamentosos. Espiroquetas e vários microrganismos flagelados também podem ser encontrados especialmente na porção apical do biofilme. A camada superficial é freqüentemente menos densa e os leucócitos estão regularmente interpostos entre o biofilme e a camada epitelial do sulco gengival. Quando uma bolsa periodontal é formada, a aparência do

depósito bacteriano subgengival torna-se mais complexa. Os microrganismos filamentosos predominam, mas cocos e bastonetes também estão presentes. Nas porções profundas da bolsa periodontal, os microrganismos filamentosos diminuem em número e na porção apical parecem virtualmente ausentes. O denso depósito bacteriano próximo à superfície dentária é dominado por organismos menores sem uma orientação definitiva. Não há uma matriz bacteriana definida aparente. Os microrganismos compreendem grandes quantidades de espiroquetas e bactérias flageladas. Cocos e bastonetes Gram-negativos também estão presentes. Espiroquetas e bactérias flageladas são bactérias móveis e não existe matriz bacteriana entre estas bactérias<sup>19</sup>.

A microbiota do sulco gengival sadio é dominada por bactérias Gram-positivas (85%), principalmente *Streptococcus* e *Actinomyces*. No entanto, com o desenvolvimento da gengivite, verifica-se acentuado aumento no total de microrganismos Gram-negativos (45%), representados principalmente por *Fusobacterium nucleatum*, espécies de *Bacteroides* e *Prevotella intermedia*. Já no quadro de periodontite avançada destacam-se os bacilos Gram-negativos e microrganismos espiralados anaeróbios (cerca de 75%), incluindo *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *F. nucleatum* e *Treponema denticola*<sup>29</sup>.

O biofilme presente no sulco gengival entre o dente e a gengiva, se não for continuamente removido por escovação ou fio dental, eventualmente provoca uma resposta inflamatória do hospedeiro, resultando no aumento da secreção do fluido crevicular. Este fluido protéico pode atuar como fonte de nutrientes para certos organismos (*Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema spp.*) presentes inicialmente em baixas quantidades. A proliferação de tais organismos, conhecidos como periodontopatógenos, provoca mudanças na comunidade do biofilme que passa a ser dominada por anaeróbios Gram-negativos. Esta comunidade induz o hospedeiro a uma superprodução de mediadores inflamatórios (citocinas e prostaglandinas) que resultam na destruição dos tecidos de suporte<sup>32</sup>.

Os prováveis microrganismos envolvidos na etiologia da doença periodontal são *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *B. forsythus*. Todos são Gram-negativos e, portanto, produzem lipopolissacáride, a qual pode modular a resposta inflamatória local de células do hospedeiro que expressam receptores de reconhecimento de bactérias. Todos parecem capazes de invadir a barreira tecidual e se alojar dentro das células epiteliais, esperando por condições melhores para emergir e voltar a crescer, além de produzirem fatores que os capacitam a se livrar de reações do sistema imune através de cápsula antifagocítica, leucotoxinas, outras proteases e indução de apoptose (autodestruição celular)<sup>12</sup>.

### Vírus

Estima-se que haja 200 a 300 espécies de bactérias presentes no biofilme dentário e é impossível cultivar e identificar todas. Também há microrganismos que não são bactérias: leveduras, protozoários e vírus<sup>13</sup>.

Recentemente foi sugerido que o grupo do vírus do herpes pode desempenhar papel na etiologia e/ou progressão da doença periodontal em adultos e na fase inicial de periodontite localizada<sup>9</sup>. Os vírus citomegálico, *Epstein-Barr*, papilloma e herpes simplex parecem ter papel na etiologia da doença periodontal, possivelmente mudando a resposta do hospedeiro à microbiota subgingival local<sup>5,12</sup>.

## Terapia periodontal

### *Remoção mecânica dos microrganismos*

Dada a extraordinária resistência dos organismos dentro do biofilme aos mecanismos de defesa do hospedeiro e aos agentes antimicrobianos, o primeiro passo, pela lógica, no controle destes microrganismos seria a sua remoção física através de procedimentos que vão da higiene oral, pelo próprio indivíduo, à raspagem e ao alisamento radicular ou à cirurgia periodontal. Dados indicam que, na média, a maioria das espécies não muda significativamente após terapia física. No entanto, três espécies do grupo vermelho, *B. forsythus*, *P. gingivalis* e *T. denticola*, decresceram substancialmente após raspagem e alisamento radicular em indivíduos com periodontite. Esta mudança na quantidade de microrganismos foi acompanhada por uma melhora significativa na profundidade de sondagem e no nível de inserção<sup>25</sup>.

Uma diminuição da inflamação e uma melhora na barreira epitelial dentro da bolsa periodontal podem ter diminuído a disponibilidade de nutrientes, controlando os microrganismos, mas não totalmente. Outros procedimentos mecânicos, como cirurgia periodontal, têm efeitos similares ou melhores com relação ao grupo vermelho e também afetam o grupo laranja<sup>22</sup>.

É evidente, em termos de ecologia microbiana, que as espécies colonizadoras afetam o habitat e que o habitat afeta as espécies colonizadoras. Isto fica bastante claro no caso do meio oral, onde espécies têm certa atração por determinados tecidos. Se este meio que envolve a microbiota subgingival for alterado, algumas mudanças em número, proporção e prevalência das espécies podem ocorrer. Os dois principais fatores que afetam o biofilme subgingival são o tecido da bolsa periodontal e o biofilme supragingival. Mudanças em um dos dois podem levar a mudanças na composição do biofilme subgingival. Já é sabido há muito tempo que a remoção meticulosa do biofilme supragingival leva à melhora dos parâmetros associados à inflamação gingival<sup>25</sup>.

### *Agentes antimicrobianos*

A discussão gerada pelo uso de antibióticos contra doenças periodontais gira em torno da crescente resistência de microrganismos em biofilmes assim como da dificuldade de alguns antibióticos de penetrar de forma eficiente no biofilme. Os antibióticos têm sido usados com sucesso quando empregados conjuntamente com procedimentos mecânicos no tratamento da doença<sup>25</sup>.

## Discussão

Pesquisadores são unânimes quanto às vantagens que o biofilme proporciona aos microrganismos no seu interior, considerando-o agente etiológico de doenças como cáries, gengivites e periodontites. Esta estrutura tridimensional contendo uma ou mais espécies bacterianas se forma sobre superfícies com interfaces sólido/líquido, líquido/ar, exibe heterogeneidade espacial devido a gradientes físicos e químicos que se desenvolvem em seu interior, é permeada de canais e os seus organismos sésseis exibem uma suscetibilidade cada vez menor a agentes antimicrobianos e sistemas de defesa do hospedeiro se comparados aos planctônicos. Desta forma, no interior destas comunidades celulares, os organismos exibem funções orgânicas, atividades vitais, como crescimento, nutrição e respiração, diferentes em diferentes regiões, têm uma forma de comunicação intercelular e podem resistir a agentes antimicrobianos e ameaças do meio.

O biofilme oferece uma grande vantagem às espécies colonizadoras: proteção contra microrganismos competidores e fatores do meio, como mecanismos de defesa do hospedeiro e substâncias potencialmente tóxicas (agentes químicos e antibióticos)<sup>25</sup>. A formação do biofilme é considerada causa de muitas infecções já que a matriz extracelular funciona como barreira aos agentes antimicrobianos retardando sua difusão<sup>6</sup>. Células no interior do biofilme são pouco suscetíveis a agentes antimicrobianos e resistentes a ataques do sistema imune<sup>10</sup>. O biofilme dentário é uma sociedade altamente organizada de espécies bacterianas com alto grau de cooperativismo que mantém uma relação duradoura com o hospedeiro<sup>23</sup>.

O sistema de defesa do hospedeiro não consegue neutralizar o biofilme, portanto as infecções tendem a persistir por longos períodos de tempo. A matriz extracelular impede a atuação da primeira linha de defesa, formada por células fagocíticas, e bloqueia a ativação do complemento e, mesmo quando estes anticorpos são produzidos, podem ser neutralizados. O polissacarídeo da matriz inibe a quimiotaxia e degranulação de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos, além da resposta dos monócitos. Os esforços contínuos do sistema de defesa do hospedeiro causam danos aos tecidos de suporte além de não dominar os efeitos causados pelo biofilme. O ataque persistente dos leucócitos polimorfonucleares ao biofilme dentário produz uma resposta inflamatória que resulta na gengivite, podendo chegar à periodontite.

O biofilme tolera altas concentrações de agentes antimicrobianos porque estes se ligam a matriz extracelular, limitando sua penetração. Além disto, o agente antimicrobiano é inativado por enzimas contidas na matriz. A taxa de crescimento reduzida de bactérias no interior do biofilme as torna menos suscetíveis a agentes antimicrobianos e o meio no interior do biofilme sofre alterações com relação à superfície do mesmo (por exemplo: pH, temperatura e oxigênio), o que também pode reduzir a atividade do agente. Alterações genéticas e expressão de novos genes dentro do biofilme podem alterar o fenótipo do microrganismo, diminuindo sua

suscetibilidade ao agente.

Biofilmes podem também facilitar o processo de aproveitamento de nutrientes, alimentação cruzada (uma espécie fornecendo suprimentos à outra), remoção de produtos metabólicos potencialmente prejudiciais (geralmente através da utilização por outra bactéria), assim como o desenvolvimento de um meio físico-químico apropriado, como um potencial redox negativo.

Estudiosos também são unânimes em admitir que ainda há vários fatores desconhecidos a serem estudados. Na fase de adesão na formação do biofilme, existem fatos desconhecidos que promovem a aproximação do microrganismo à superfície<sup>2</sup>. Como a remoção mecânica do biofilme pode alterar a delicada relação tridimensional entre células, matriz, espaço e superfície, há poucas informações sobre a estrutura do biofilme em tecidos humanos *in vivo*, o que compromete o desenvolvimento de terapias efetivas que dependam da arquitetura do biofilme<sup>33</sup>. A gama de organismos na placa dentária é extremamente grande, aproximadamente 700, incluindo espécies não cultiváveis<sup>31</sup>. Sabe-se relativamente pouco sobre as características do biofilme subgingival<sup>3</sup>. Quando as condições dentro do biofilme mudam, interações bacterianas podem determinar quais células sobreviverão, quais deverão perecer e quais se destacarão. Uma compreensão melhor sobre as relações entre espécies do biofilme é essencial<sup>30</sup>. Pesquisas talvez devam se concentrar em descobrir o que faz o fenótipo das células planctônicas tão diferente do das células sésseis<sup>10</sup>.

Talvez um maior esclarecimento sobre um destes fatores possa quebrar a proteção que o biofilme dá aos membros de sua comunidade e trazer o descobrimento de uma terapia mais eficaz.

O biofilme dentário pode ser alterado de formas diferentes que podem ou não ser combinadas. A terapia periodontal pode afetar as bactérias diretamente através da remoção física e/ou agentes químicos. O tratamento

também pode afetar o habitat bacteriano através da remoção meticulosa do biofilme supragengival. A bactéria afeta seu habitat e seu habitat afeta a bactéria, assim a remoção do biofilme supragengival e também do biofilme do interior das bolsas periodontais vai tornar o meio menos favorável ao crescimento de espécies subgingivais, particularmente aquelas associadas à doença. A administração de agentes antimicrobianos conjuntamente ao tratamento mecânico pode melhorar a atuação sobre bactérias que têm a capacidade de invasão tecidual e beneficiar a resposta do hospedeiro. Esta resposta melhorada afeta a microbiota e seu habitat. O importante é que haja uma alteração ou nas bactérias, ou na resposta do hospedeiro, ou no habitat, ou em todos. Qualquer impacto que venha acontecer em um dos três terá efeito nos outros dois, possibilitando um tratamento mais eficaz. Além disto, a definição sobre quais fatores deverão ser influenciados pela terapia periodontal dependerá de uma série de condições como: tipo de doença, características genéticas do paciente, alterações do meio, como aquelas provocadas pelo fumo, e a condição sistêmica do paciente.

## Conclusão

De acordo com os conhecimentos obtidos até agora sobre o biofilme dentário, pode-se concluir que sua formação, composição, estrutura e seu comportamento fornecem proteção aos agentes etiológicos de cáries, gengivites e periodontites contra agentes químicos e resposta do sistema imune do hospedeiro. Estas informações estabelecidas foram fundamentais para melhorar o tratamento periodontal e aumentar sua eficiência. No entanto, dentro das limitações deste trabalho, também pode-se chegar à conclusão de que novos estudos deverão ser realizados para conhecer características ainda não definidas, as quais talvez tenham relevância na terapia destas doenças.

## Referências

1. Bos R, Van Der Mei HC, Busscher HJ. Co-adhesion of oral microbial pairs under flow in the presence of saliva and lactose. *J Dent Res*. 1996;75(2):809-15.
2. Bos R, Van Der Mei HC, Busscher HJ. Physicochemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol Rev*. 1999;23:179-230.
3. Bowden GHW, Li YH. Nutritional influences on biofilm development. *Adv Dent Res*. 1997;11(1):81-9.
4. Brading MG, Jass J, Lappin-Scott HM. Dynamics of bacterial biofilm formation. *In*: Lappin-Scott HM, Costerton JW. *Microbial biofilms*. Cambridge: Cambridge University Press; 1995. p.46-63.
5. Contreras A, Slots J. Herpesviruses in human periodontal disease. *J Periodontol Res*. 2000; 35:17-25.
6. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg E P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284:1318-22.
7. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Ann Rev Microbiol*. 1995;49:711-45.
8. Darby I, Curtis M. Microbiology of periodontal disease in children and young adults. *Periodontol* 2000. 2001;26(1):33-53.

9. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 1998;280:295-8.
10. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. [citado em 26 jul 2003]. Disponível em: <<http://www.medscape.com/viewarticle/441355>>
11. Duguid JP, Smith IW, Dempster G, Edmunds PN. Non-flagella filamentous appendages ("fimbriae") and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. *J Pathol Bacteriol*. 1991;13:28-34.
12. Ezzo PJ, Cutler CW. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2003; 32(1): 24-35.
13. Genco RJ. Placa dental microbiana. *In*: Genco RJ, Goldman HM, Cohen DW. *Periodontia contemporânea*. 3. ed. São Paulo: Santos; 1999. p.126-34.
14. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 1994;5:78-111.
15. Handley PS. Structure, composition and functions of surface structures on oral bacteria. *Biofouling*. 1990;2:239-64.
16. Hausch HG. Targeted research on oral biofilms. [citado em 26 jul 2003]. Disponível em: <<http://www.odphp.osophs.gov/pubs/hp2000/default.htm>>
17. Jorge AOC. Placa bacteriana. *In*: Jorge AOC. *Microbiologia bucal*. 2. ed. São Paulo: Santos; 1998.
18. Kolenbrander PE, Andersen RN, Clemans DL, Whittaker CJ, Klier CM. Potential role of functionally similar coaggregation mediators in bacterial succession. *In*: Newman HN, Wilson M. *Dental plaque revisited*. Cardiff: Bioline; 1999. p.171-86.
19. Lang NP, Mombelli A, Attstrom R. Placa e cálculo dental. *In*: Lindhe J. *Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999, p.66-91.
20. Potera C. Forging a link between biofilms and disease. *Science*. 1999; 283:1837-9.
21. Quirynen M, Bollen CML. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra and subgingival plaque formation in man. *J Clin Periodontol*. 1995;22:14.
22. Ramberg P, Axelsson P, Lindhe J. Plaque formation at healthy and inflamed gingival sites in young individuals. *J Clin Periodontol*. 1995;22:85-8.
23. Roberts FA, Darveau RP. Beneficial bacteria of the periodontium. *Periodontol 2000*. 2002;30:40-50.
24. Scannapieco FA, Levine MJ. Saliva e películas dentais. *In*: Genco RJ, Goldman HM, Cohen DW. *Periodontia contemporânea*. 3ª ed. São Paulo: Santos; 1999. p.177-25.
25. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*. 2002; 28:12-55.
26. Socransky SS, Haffajee AD. Effect of therapy on periodontal infections. *J Periodontol*. 1993;64:754-9.
27. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol*. 1992;63:322-31.
28. Stoodley P, Dodds I, Boyle JD, Lappin-Scott HM. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *J Appl Microbiol*. 1999; 85:19-28.
29. Uzeda M. *Microbiologia oral: etiologia da cárie, doença periodontal e infecções endodônticas*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2002.
30. Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol*. 2000;182(10): 2675-9.
31. Wilson M. Bacterial biofilms and human disease. *Science Progress*. 2001;84(3):235-54.
32. Wilson M, Reddi K, Henderson B. Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. *J Periodont Res*. 1996; 31:393-407.
33. Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, Robinson C. Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *J Dent Res*. 2000; 79(1): 21-7.

Recebido em 28/4/2006

Aceito em 26/6/2006



## Contribution of dental biofilm study to the treatment of periodontal diseases

Maria Cristina Pereira Nunes\*  
Márcio Zaffalon Casati\*\*  
Karina Teixeira Villalpando\*\*\*  
Fabiano Ribeiro Cirano\*\*\*\*

### Abstract

*Microorganisms have a strong tendency to become associated with inert or living surfaces. Once microorganisms are attached to a substratum surface, a multistep process starts leading to the formation of microcolonies which are structured in organized and functional communities. Each bacterium from these communities lives in a metabolic cooperativity. This complex is termed biofilm and exists on most of the wet surfaces in nature (living tissues, medical devices, and water piping systems), bringing problems to its environment. Dental plaque is a biofilm named supragingival biofilm when it accumulates on the tooth surface above the gingival margin and subgingival biofilm when it is associated to the tooth and tissues below the gingival margin. These remarkably structured communities where each member plays a role to benefit them as a whole are responsible for a number of diseases of human beings. The biofilms which colonize the tooth surface and oral tissues can cause caries, gingivitis and periodontitis which are among the most common infections of man. The microorganisms that belong to these structures show certain resistance to antimicrobial agents and host defense systems which make these infections difficult to be treated effectively. Understanding the biofilm, its composition, structure, organization, and activities as well as how it deals with these antimicrobial agents may be a way to improve the fight against the diseases it causes.*

*Key words: Biofilms; Extracellular matrix; Periodontal diseases*

### Introduction

The dental plaque is a complex biofilm that accumulates on tooth surfaces above, below or at the gingival margin or on tissues of the oral cavity causing caries, gingivitis and periodontitis. Human acquired enamel pellicle consists of salivary macro molecules that selectively adsorb onto tooth surfaces. This structure provides receptors for initial bacterial colonizers. The bacterial colonization follows a pattern which starts with the adhesion of planktonic microorganisms (freely suspended in a liquid medium). The planktonic microorganisms may co-aggregate before adhering to a surface. The adhesion of a bacterium to a surface alters its phenotype and it becomes sessile. After the adhesion, they may co-adhere, synthesize extracellular matrix, and communicate via quorum sensing, until they are well adapted to the changes of the environment and also to their neighbors which can be different or of the same species. The cellular aggregates may become microcolonies that will be part of communities permeated by channels, which are a means to bring nutrients and to remove waste products. The biofilm structure provides a defense against antimicrobial agents as well as host protective mechanisms, besides releasing some of its members to colonize other sites.

This review of literature focuses on the analysis not only of formation, composition, structure, behavior and activities of dental biofilm considered cause of periodontal diseases but also of the benefits this organization brings to the colonizers and of how difficult a treatment to the diseases caused by the biofilm may get.

### Literature review

#### Formation, composition, structure and behavior of dental biofilm

#### Acquired pellicle

The acquired pellicle formation happens due to physical forces between the surfaces and organic and inorganic components of the liquid medium in the oral cavity.

According to Scannapieco and Levine<sup>24</sup> (1999), saliva comprises:

1 – Electrolytes: potassium (K<sup>+</sup>), sodium (Na<sup>+</sup>), chloride (Cl<sup>-</sup>), bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), calcium (Ca<sup>2+</sup>), magnesium (Mg<sup>2+</sup>) e phosphorus (HPO<sub>4</sub><sup>3-</sup>).

2 – Organic components: proteins, lipids, carbohydrate and sulfates, mucins, proline-rich proteins and glyco-

\* Specialist in Periodontology, University Paulista – SP. E-mail:mcristinapn@ig.com.br

\*\* Chairman, Professor, Department of Periodontology, University Paulista – SP.

\*\*\* Professor, Postgraduation Course, Department of Periodontology, University Paulista – SP.

\*\*\*\* Adjunct Professor, Department of Periodontology, University Paulista – SP.



proteins, histatins, statherin, alpha-amylase, peroxidase, lactoferrin, lysozyme, immunoglobulin A and fibronectin.

### Adhesion

Bacteria are attracted by organic nutrients which concentrate on wet surfaces<sup>7</sup>.

Many bacterial species possess surface proteinaceous structures such as fimbriae that aid in their attachment to different surfaces<sup>11</sup>. Fimbriae have been detected on a number of oral species including *Actinomyces naeslundii*, *Porphyromonas gingivalis*, some strains of streptococci such as *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus parasanguis*, *Streptococcus mutans*, members of the *Streptococcus mitis* group, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens*<sup>15</sup>. Fimbriae are associated with the bacterial adhesion to salivary acidic proline-rich proteins, lactoferrin, fibronectin, fibrinogen, and statherin, all deposited within the salivary pellicle, as well as to glycosidic receptors on epithelial cells, polymorphonuclear leukocytes, oral streptococci, and other bacteria<sup>25</sup>.

### Co-aggregation

Co-aggregation (interactions between two suspended micro-organisms, the planktonic microorganisms) between oral microbial pairs is believed to be an important factor in dental plaque formation<sup>1</sup>.

Six closely associated groups of bacterial species were recognized: a blue complex consisting of *Actinomyces*; a yellow complex consisting of the genus *Streptococcus*: *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *Streptococcus sp.*, *S. gordonii*, *S. intermedius*; a green complex consisting of *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga gingivalis*, *C. sputigena*, *C. ochracea*, *C. concisus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype a; a purple complex consisting of *Veillonella parvula* and *Actinomyces odontolyticus*. These groups of species are early colonizers of the tooth surface and their growth usually precedes the multiplication of the predominantly gram-negative orange complex, consisting of *C. gracilis*, *C. rectus*, *C. showae*, *E. nodatum*, *F. nuc. nucleatum*, *F. nuc. polymorphum*, *P. intermedia*, *P. micros*, *P. nigrescens*, *S. constellatus*, and the red complex, consisting of *P. gingivalis*, *B. forsythus* e *T. denticola*<sup>25</sup>. Studies have indicated that cell-to-cell recognition is not random but that each strain has a defined set of co-aggregation partners<sup>18</sup>.

### Co-adhesion

Planktonic organisms may collide and co-aggregate with each other, or collide with sessile organisms, leading to co-adhesion<sup>1</sup>. It was noted that the co-adhesive bond between actinomycetes and streptococci was not disrupted by the passage of a liquid-air interface during drinking, eating, and swallowing and that adhering actinomycetes might therefore be considered strongholds for other microorganisms to adhere in the development of dental plaque<sup>2</sup>.

### Extracellular matrix

Adhesion of a bacterium to a surface alters its phenotype. Hence, all of the following activities of bacteria have been shown to be affected once a planktonic cell has become sessile: respiration rate, rate of oxygen intake, electron transport activity, synthesis of extracellular polymers (matrix), substrate uptake rates, rate of substrate breakdown, heat production and growth rate<sup>31</sup>.

The bulk of the biofilm consists of the matrix (75-80% by volume). It is composed predominantly of water and aqueous solutes. The dry material is a mixture of exopolysaccharides, proteins, salts and cell material<sup>25</sup>. The exopolysaccharides are basically fructans and glucans synthesized by microorganisms from sucrose consumed by the host<sup>29</sup>. One distinguishing feature of oral biofilms is that many of the microorganisms can both synthesize and degrade the exopolysaccharides<sup>25</sup>.

### Channels

Studies have repeatedly confirmed that biofilms are highly hydrated, with 50-90% of the total area at each sectioning depth consisting either of polymer and/or void space (liquid)<sup>7</sup>.

The regular array of channels and aggregates would provide an alternate route for the transport of nutrients and oxygen to the biofilm base without having to diffuse through the entire vertical length of the film<sup>7</sup>.

The water inside the channels delivers nutrients and oxygen and removes wastes<sup>20</sup>. Studies demonstrated that oxygen tension was highest in biofilm channels, whereas the environment was essentially anaerobic<sup>33</sup>.

### Detachment

The thick biofilm is like a densely settled area. Thus, zero population growth may be the norm because the spatial constraints are such that cell division is impeded by surrounding exopolysaccharide. Although the bacteria inside the biofilm do not divide, they are viable and culturable once freed from the plastic encasement. As the cell division is infrequent in a mature biofilm, excess energy is used to make exopolysaccharide that the cell can digest and use in time of need. With the production of an exopolysaccharide lyase, the exopolysaccharide is degraded for consumption and cells are freed from the biofilm scaffold to seek more favorable environments<sup>30</sup>.

The three main processes for detachment are: erosion or shearing (continuous removal of small portions of the biofilm), sloughing (rapid and massive removal), and abrasion (detachment due to collision of particles from the bulk fluid with the biofilm)<sup>4</sup>.

The mode of dispersal apparently affects the phenotypic characteristics of the organisms. Eroded or sloughed aggregates from the biofilm are likely to retain certain biofilm characteristics, such as antimicrobial resistance properties, whereas cells that have been shed as a result of growth may revert quickly to the planktonic phenotype<sup>10</sup>.

## Quorum sensing

Bacteria communicate with each other and this intercellular communication is generally carried out by bacterial products that are able to diffuse away from one cell and enter another cell. This method of intercellular signaling seems ideally suited for bacteria in a diffusion-limited environment such as the biofilm. Production of the quorum-sensing molecules known as acyl-homoserine lactones (acyl-HSLs) has been demonstrated in both natural and cultured biofilms<sup>9</sup>. We define these signals broadly as any actively or passively transported bacterial products that alter the state of neighboring microbes. These might include bacterial metabolites, acyl-HSLs, secreted proteins, genetic material such as DNA or RNA, or as yet undiscovered bacterial products. These signals might alter the distribution of specific bacterial species in the biofilm, alter protein expression in neighboring cells, introduce new genetic traits into neighboring cells, or lure and incorporate bacteria into the biofilm for subsequent consumption<sup>9</sup>.

*Quorum sensing* may give biofilms their distinct properties. It has potential to influence community structure by encouraging the growth of beneficial species (to the biofilm) and discouraging the growth of competitors<sup>25</sup>.

Gene transfer can convert a previous avirulent commensal organism into a highly virulent pathogen. Bacteria express new, and sometimes more virulent phenotypes when growing within a biofilm<sup>16</sup>.

## Factors affecting biofilm development and behavior

Any change in one of the following factors causes direct consequences in the biofilm structure: hydrodynamics<sup>28</sup>, changes in nutrient concentration<sup>25</sup>, roughness of the surface<sup>10,21</sup>, physicochemical properties of the surface<sup>10,25</sup>, oxygen content<sup>17,25</sup>, temperature<sup>2</sup>, pH<sup>3</sup>, and diffusion coefficients<sup>7</sup>.

## Inflammatory process and the host response

The ultimate risk factor for an infectious disease is the causative agent of that disease. Without that agent, no disease will take place no matter what other risk factors the subject may possess. Most sites in most subjects do not exhibit net periodontal destruction even though large numbers of organisms, including pathogens, are present at or below the gingival margin. It is common for many infectious diseases that the organism may gain entrance into the host and yet the host may not manifest clinical features of that disease for periods of time varying from weeks to decades or ever. Health means the absence of pathogens or their presence without the disease. Disease means presence of pathogens<sup>14</sup>.

It appears that periodontal disease progression depends on the simultaneous occurrence of a number of factors. The host must be susceptible both systemically and locally. The local environment has to contain bacterial species that enhance the infection or at least do not inhibit the pathogen's activity. The environment also must

be conducive to the expression of virulence factors by the pathogen. This might take the form of affecting the regulation of virulence factor expression or stressing the organism so that its manifested properties lead to tissue damage. The pathogen(s) must achieve sufficient numbers to initiate or cause progression of the infection in that particular individual in the given local environment<sup>27</sup>.

## Supragingival biofilm

The bacteria associated with periodontal diseases reside within the biofilms both above and below the gingival margin. The supragingival biofilm is attached to the tooth surface and is predominated by *Actinomyces* species<sup>26</sup>.

The supragingival biofilm at its formation first stage is predominated by streptococci (*viridans* group) whereas gram-positive bacilli, mainly *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii* account for a small share of the local microbiota. After the first day attached to the tooth surface, the percentage of streptococci comes down to 45% while the percentage of anaerobic gram-negative cocci (*Veillonella*) goes up to approximately 20%. After the third day, it is noted that facultative anaerobic *Actinomyces* predominate, accounting for 25% of the cultivable microbiota, whereas gram-negative anaerobic bacilli (*Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas*) account for 50%. The older and the thicker the supragingival biofilm gets, the more beneficial the environment becomes to the anaerobic organisms, leading to an increase of the number of gram-negative bacilli, mainly deep in the biofilm and closer to the tooth surface<sup>29</sup>.

## Subgingival biofilm

The nature of subgingival biofilms is more complex with both a tooth-associated and tissue-associated biofilm separated by loosely bound or planktonic cells. Similar to supragingival biofilm, the dominant species subgingivally are *Actinomyces*, but significantly higher counts, proportions and prevalence of red and orange complex species were found<sup>25</sup>.

The subgingival biofilm is similar to the supragingival with regard to the bacteria associated to gingivitis without deep pocket formation. It is known that periodontal pockets harbor gram-positive and gram-negative cocci, rods and filaments. Spirochetal as well as flagellated organisms can also be found mainly in deep portions of the biofilm. The outer layer most of the time is less dense and leukocytes are regularly sitting between the biofilm and the sulcular epithelium. When a periodontal pocket is present, the range of microorganisms is wider and more complex. Although there are still cocci and rods, filaments predominate. Deep down in the periodontal pocket, the filaments decrease and the environment is dominated by smaller microorganisms, spirochetes and flagellated bacteria, without the organization noted previously. Spirochetes and flagellated bacteria are motile microorganisms; therefore, the bacteria are no longer enclosed in an extracel-

llular polymeric substance matrix. Cocci and rods are present in low numbers<sup>19</sup>.

The microbiota in a healthy gingival sulcus comprises: gram-positive bacteria (85%), mainly *Streptococcus* and *Actinomyces*; in gingivitis: gram-negative (45%), mainly *Fusobacterium nucleatum*, groups of *Bacteroides* and *Prevotella intermedia*; in periodontitis: gram-negative bacilli and anaerobic spirochetal microorganism (75%), mainly *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *F. nucleatum* e *Treponema denticola*<sup>29</sup>.

The biofilm present at the gap (known as gingival crevice) between the tooth and the gums if not continually removed (by brushing and flossing) eventually stimulates an inflammatory response in the host resulting in the increased secretion of a serum-like exudate (gingival crevicular fluid). This proteinaceous fluid can act as a source of nutrients for certain organisms (*Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema spp.*) initially present in very low numbers. The proliferation of such organisms (known as periodontopathogens) changes the biofilm community to one that is dominated by gram-negative anaerobes. Such a community is able to induce the host to over produce a range of inflammatory mediators (for example: cytokines and prostaglandins) which results in the breakdown of the tooth-supporting tissues<sup>32</sup>.

The microorganisms that are most likely to put a patient at risk of periodontal disease are *A. actinomycescomitans*, *P. gingivalis* e *B. forsythus* because: they are all gram-negative and, therefore, produce lipopolysaccharide, which can modulate the local inflammatory response in host cells that express pattern recognition receptors; they all appear capable of invasion of the mucosal barrier to infection and possibility of being sequestered inside epithelial cells so that they can "wait-out the bad times" and re-emerge when conditions are permissive for their growth; they all produce factors that enable them to evade the antibacterial functions of the innate immune response (anti-phagocytic capsule, leukotoxin, other proteases, induction of apoptosis)<sup>12</sup>.

## Virus

Apparently there are 200 to 300 species of bacteria within the dental biofilm and it is impossible to grow and identify all of them. Besides the bacteria, there are other microorganisms: yeast and virus<sup>13</sup>.

Recently it has been suggested that herpes group viruses may be involved in the causation and/or progression of adult periodontitis and localized early-onset periodontitis<sup>8</sup>. The viruses cytomegalovirus, *Epstein-Barr* virus, papillomavirus and herpes simplex virus have been proposed to play a role in causing periodontal diseases, possibly by changing the host response to the local subgingival microbiota<sup>5,12</sup>.

## Periodontal therapy

### *The physical removal of microorganisms – mechanical debridement*

Given the remarkable resistance of organisms in biofilms to host defence mechanisms and antimicrobial

agents, the logical first step in the control of these organisms would be their removal by physical means such as performed oral hygiene, scaling and root planing or periodontal surgery. Studies indicate that, on average, the majority of species did not change significantly. However, three species of the red complex, *B. forsythus*, *P. gingivalis* e *T. denticola*, were significantly decreased in both counts and percentages of sites colonized after scaling and root planing in subjects with periodontitis. These microbial changes were accompanied by a significant decrease in full-mouth mean pocket depth and attachment level<sup>25</sup>.

A decrease in inflammation and an improvement of the epithelial barrier within the pocket might diminish the nutrient availability to these taxa, slowing, but not completely controlling their return. Other mechanical debridement procedures, such as periodontal surgery, have similar or even greater effects on the red complex and also affect members of the orange complex<sup>22</sup>.

It is axiomatic in microbial ecology that colonizing species affect the habitat and the habitat affects the colonizing organisms. This is clearly the case in the oral environment, where species have specific tissue tropism. If the environment surrounding the subgingival microbiota were altered, then changes in numbers, proportions and prevalence of species would be likely to be affected. The two major environmental factors that affect subgingival plaque are the tissues of the periodontal pocket and the supragingival plaque. Changes in either of these factors are likely to lead to changes in the composition of the subgingival plaque. It has been recognized for a long period of time that meticulous removal of supragingival plaque leads to an improvement in the parameters associated with gingival inflammation<sup>25</sup>.

### *Chemotherapeutic agents*

Given the discussion on increased antibiotic resistance that occurs in organisms growing in biofilms as well as the difficulty of some antibiotics to effectively penetrate a biofilm, one might question the use of these agents in the treatment of periodontal diseases. Antibiotics have been successfully employed as adjuncts in the treatment of these infections<sup>25</sup>.

## Discussion

Researchers come to the same conclusion towards the advantages the biofilm provides for microorganisms enclosed in the extracellular matrix. It has been considered the cause of diseases such as cavities, gingivitis and periodontitis. This three-dimensional structure containing one or more bacterial species forms at interfaces: solid/liquid, liquid/air, and solid/air; exhibits spatial heterogeneity due to physical and chemical gradients which develop within it; is often permeated by water channels; the organisms within it exhibit a marked decrease in susceptibility to antimicrobial agents and host defence systems compared to their planktonic counterparts. Therefore, inside these cellular communities, the

organisms display different physiologies, vital activities such as growth and nutrients and oxygen intake within different regions, have a form of intercellular communication and can resist noxious chemical and other threats from the environment.

Biofilm provides a number of advantages to colonizing species: the protection against competing microorganisms, environmental factors such as host defence mechanisms and potentially toxic substances in the environment such as lethal chemicals and antibiotics<sup>25</sup>. Formation of the biofilm is at the root of many infections. An explanation for that may be that polymeric substances like those that make up the matrix of a biofilm are known to retard the diffusion of antibiotics<sup>6</sup>. Cells within the biofilm have dramatically reduced susceptibility to antimicrobial agents and are resistant to host immune system clearance<sup>10</sup>. The dental biofilm is a highly organized consortium of co-operating bacterial species that maintains a long-term relationship with the host<sup>23</sup>.

The host defence systems cannot cope very well with biofilms, therefore, infections tend to persist for long periods of time. Our first line of defence, formed by phagocytic cells, finds it very difficult to ingest bacteria within biofilms because of the anti-phagocytic properties of the biofilm matrix. In the absence of specific antibodies, the polysaccharide also blocks complement activation. Even when antibodies are produced, they may well be rendered ineffective by the matrix.

The polysaccharides are able to inhibit chemotaxis and degranulation by polymorphs and macrophage phagocytosis and also to depress the response of monocytes. Not only are host defences unable to deal effectively with biofilms, but their continuous ineffectual efforts actually cause tissue damage. The persistent attack of polymorphs on dental biofilm produces an inflammatory response resulting in gingivitis, which may turn into periodontitis.

The biofilm tolerates high concentrations of antimicrobial agents because when the antimicrobial agent binds to the extracellular matrix of the biofilm, its penetration is limited. Moreover, the antimicrobial agent is inactivated by enzymes trapped in the biofilm matrix. The reduced growth rate of bacteria in biofilms renders them less susceptible to the antimicrobial agent. The altered micro-environment within biofilms (e.g. pH, temperature, oxygen content) can reduce the activity of the agent. Altered gene expression by organisms within the biofilm can result in a phenotype with reduced susceptibility to the antimicrobial agent.

Biofilms also can facilitate processing and uptake of nutrients, cross-feeding (one species providing nutrients for another), removal of potentially harmful metabolic products (often by utilization by other bacteria) as well as the development of an appropriate physicochemical environment such as a properly reduced oxidation reduction potential.

Researchers also agree that the knowledge acquired so far has not been enough and there is still much to be learned on biofilm. During adhesion, there are unclear facts that may help microorganisms approach the

surface<sup>2</sup>. Since mechanical removal of the biofilm is likely to disturb the delicate three-dimensional relationship among cells, matrix, space, and substratum, studies of the structure and organization of the biofilm have not been possible. There is little information, however, concerning the structures of biofilms existing on human tissues *in vivo*, which harms the development of effective treatment therapies<sup>33</sup>. There are around 700 different bacterial species within the dental biofilm, including organisms that are currently uncultivable<sup>31</sup>. Relatively little is known of the characteristics of the subgingival biofilm<sup>3</sup>. When conditions in the biofilm change, interactions between species may determine which cells survive, which perish, and which move on. An understanding of the relationships among species in the biofilm is essential<sup>30</sup>. The key to success may hinge upon a more complete understanding of what makes the biofilm phenotype so different from the planktonic phenotype<sup>10</sup>.

A better understanding on one of these factors may break the protection the biofilm provides for all the members of its communities which may help discover a more effective treatment.

The biofilm can be altered by various therapies that can be combined or not. The treatment can affect bacteria directly by physical removal and/or chemotherapeutic agents. Treatment can also affect the habitat by meticulously removing supragingival biofilm. The bacteria affect their habitat and the habitat affects the bacteria so that the elimination of pockets or the removal of supragingival biofilm will provide a less favorable environment for the growth of subgingival species, particularly those associated with the disease. Antimicrobial agents along with scaling and root planing may be a good alternative against bacteria that have the ability to invade human gingival epithelial cells and to improve the host response. Modification of host response affects the microbiota and its habitat. Periodontal treatment can affect the composition of the biofilm directly, the host response, the habitat or can affect all of these three factors. Alterations of any of them can impact on the remaining ones in this triad resulting in a more effective treatment. Besides that, which factor or factors will be altered by the periodontal therapy will depend on type of the disease, genetic background of the subject, environmental influences such as smoking and systemic well-being of the patient.

## Conclusion

According to all knowledge on dental biofilm acquired so far, it may be understood that its formation, composition, structure and behavior provide protection for the bacteria that play a central role in the etiology and pathogenesis of caries, gingivitis, and periodontitis against antimicrobial agents and host response. All these pieces of information were fundamental to improve the periodontal therapy, making it more effective. However, considering the limitation of this work, we can also come to the conclusion that more studies must be made in order to discover unknown characteristics, which can be relevant to therapy of periodontal diseases.

## References

1. Bos R, Van Der Mei HC, Busscher HJ. Co-adhesion of oral microbial pairs under flow in the presence of saliva and lactose. *J Dent Res.* 1996; 75(2):809-15.
2. Bos R, Van Der Mei HC, Busscher HJ. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol Rev.* 1999;23:179-230.
3. Bowden GHW, Li YH. Nutritional influences on biofilm development. *Adv Dent Res;* 1997 1(1):81-9.
4. Brading MG, Jass J, Lappin-Scott HM. Dynamics of bacterial biofilm formation. *In: Lappin-Scott HM, Costerton JW. Microbial biofilms.* Cambridge: Cambridge University Press; 1995. p.46-63.
5. Contreras A, Slots J. Herpesviruses in human periodontal disease. *J Periodontal Res.* 2000; 35:17-25.
6. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg E P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284:1318-22.
7. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Ann Rev Microbiol.* 1995;49:711-45.
8. Darby I, Curtis M. Microbiology of periodontal disease in children and young adults. *Periodontol 2000.* 2001;26(1):33-53.
9. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* 1998;280:295-8.
10. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. [citado em 26 jul 2003]. Disponível em: <<http://www.medscape.com/viewarticle/441355>>
11. Duguid JP, Smith IW, Dempster G, Edmunds PN. Non-flagella filamentous appendages ("fimbriae") and haemagglutinating activity in *Bacterium col.* *J Pathol Bacteriol.* 1991;13:28-34.
12. Ezzo PJ, Cutler CW. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2003; 32(1): 24-35.
13. Genco RJ. Placa dental microbiana. *In: Genco RJ, Goldman HM, Cohen DW. Periodontia contemporânea.* 3. ed. São Paulo: Santos; 1999. p.126-134.
14. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 1994;5:78-111.
15. Handley PS. Structure, composition and functions of surface structures on oral bacteria. *Biofouling.* 1990;2:239-64.
16. Hausch HG. Targeted research on oral microbial biofilms. [citado em 26 jul 2003]. Disponível em: <<http://www.odphp.osophs.gov/pubs/hp2000/default.htm>>
17. Jorge AOC. Placa bacteriana. *In: Jorge AOC. Microbiologia bucal.* 2. ed. São Paulo: Santos; 1998.
18. Kolenbrander PE, Andersen RN, Clemans DL, Whittaker CJ, Klier CM. Potential role of functionally similar coaggregation mediators in bacterial succession. *In: Newman HN, Wilson M. Dental plaque revisited.* Cardiff: Bioline; 1999. p.171-86.
19. Lang NP, Mombelli A, Attstrom R. Placa e cálculo dental. *In: Lindhe J. Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral.* 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999, p.66-91.
20. Potera C. Forging a link between biofilms and disease. *Science.* 1999; 283:1837-9.
21. Quirynen M, Bollen CML. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra and subgingival plaque formation in man. *J Clin Periodontol.* 1995;22:14.
22. Ramberg P, Axelsson P, Lindhe J. Plaque formation at healthy and inflamed gingival sites in young individuals. *J Clin Periodontol.* 1995;22:85-8.
23. Roberts FA, Darveau RP. Beneficial bacteria of the periodontium. *Periodontol 2000.* 2002;30:40-50.

24. Scannapieco FA, Levine MJ. Saliva e películas dentais. *In*: Genco RJ, Goldman HM, Cohen DW. Periodontia contemporânea. 3ª ed. São Paulo: Santos; 1999. p.177-25.
25. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000. 2002; 28:12-55.
26. Socransky SS, Haffajee AD. Effect of therapy on periodontal infections. *J Periodontol*. 1993;64:754-9.
27. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol*. 1992;63:322-31.
28. Stoodley P, Dodds I, Boyle JD, Lappin-Scott HM. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *J Appl Microbiol*. 1999;85:19-28.
29. Uzeda M. Microbiologia oral: etiologia da cárie, doença periodontal e infecções endodônticas. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2002.
30. Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol*. 2000 ;182(10):2675-9.
31. Wilson M. Bacterial biofilms and human disease. *Science Progress*. 2001;84(3):235-54.
32. Wilson M, Reddi K, Henderson B. Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. *J Periodont Res*. 1996;31:393-407.
33. Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, Robinson C. Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *J Dent Res*. 2000;79(1):21-7.

Received in 28/4/2006

Accepted in 26/6/2006