

Áurea Priscila Campos Barbosa

Biofilmes e Resistência Antibiótica nas Infecções do Trato Respiratório
Superior



Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto 2015

Áurea Priscila Campos Barbosa

Biofilmes e Resistência Antibiótica nas Infecções do Trato Respiratório
Superior



Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto 2015

Biofilmes e Resistência Antibiótica nas Infecções do Trato Respiratório
Superior

Áurea Priscila Campos Barbosa

Projeto de Pós Graduação apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Professor Doutor Eurico Monteiro

Biofilmes e Resistência Antibiótica nas Infecções do Trato Respiratório
Superior

Resumo

O conceito de biofilme tem por base a descrição que Van Leeuwenhoek efetuou, usando microscópios simples, ao observar microrganismos na superfície dos seus próprios dentes, no século XVII. No entanto, a teoria geral da predominância efetiva destes biofilmes foi promulgada em 1978 (Donlan e Gosterton, 2002).

O desenvolvimento de biofilmes assenta num antigo processo de adaptação dos procariotas e representa um modo de crescimento que faz com que as bactérias sobrevivam em ambientes adversos e invadam novos locais (Hall-Stoodley e Stoodley, 2009).

A definição de biofilmes tem evoluído ao longo dos últimos 25 anos. Assim, os biofilmes são definidos como um grupo de células microbianas que são incorporadas, por uma matriz de material polissacarídeo com resistência aumentada aos antibióticos e aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Os biofilmes podem formar-se em diversas superfícies, tais como tecidos vivos, dispositivos médicos e industriais, sistemas de água potável ou mesmo sistemas aquáticos naturais (Donlan, 2002).

Os biofilmes são importantes reservatórios ambientais para alguns agentes patogénicos, pelo que o modo de crescimento destes biofilmes pode originar organismos com vantagens de sobrevivência em ambientes naturais e aumentar até a sua virulência (Parsek e Singh, 2003).

Palavras-chave: Biofilme, Resistência antibiótica, Infecções trato respiratório, cateter.

Abstract

Biofilms have been described after the observation of micro-organisms on the surface of your own teeth by Van Leeuwenhoek, using simple microscopes, in the seventeenth century. However, the general theory of the predominance of biofilms was only accepted in 1978 (Donlan and Gosterton, 2002).

The development of biofilms is an ancient adaptive prokaryote mechanism and a growth model that permits bacteria's survive in adverse environments and invade new locations (Hall-Stoodley, and Stoodley, 2009).

The definition of biofilms has evolved over the last 25 years. So, biofilms are defined as a group of microbial cells primarily built of a matrix of polysaccharide material with increased resistance to antibiotics and host defense mechanisms. Biofilms can be observed in several surfaces, such as living tissues, medical and industrial devices, drinking water or natural aquatic systems (Donlan, 2002).

Biofilms are important as environmental reservoirs for several pathogens whereby the biofilm type of growth can lead to survival benefits for micro organisms in natural environments that may increase their virulence (Parsek and Singh, 2003).

Keywords: Biofilm, Antibiotic resistance, Respiratory tract infections, Catheter.

Metodologia

A realização deste trabalho teve como objetivo uma revisão bibliográfica atualizada acerca da problemática dos biofilmes e o seu papel na resistência antibiótica designadamente nas infeções do trato respiratório superior, sendo que esta dissertação de índole teórica estará isenta de qualquer tipo de trabalho prático experimental.

Em termos metodológicos e tendo por base os objetivos delineados, procedeu-se inicialmente à pesquisa de artigos científicos e outras publicações, num período compreendido entre os meses de Maio de 2014 e Setembro de 2015, utilizando como fontes de pesquisa científica: a PubMed, a Science Direct e a b-On e outros motores de busca tais como, o Google Académico e o AltaVista Search. A escolha destas bases de dados para pesquisa bibliográfica prende-se com o facto de serem aquelas que em regra compilam o maior número de artigos científicos recentemente publicados na área da saúde. As palavras-chave utilizadas na pesquisa foram: biofilme, resistência antibiótica, infeções trato respiratório, cateter.

Os critérios usados para a seleção dos artigos resultantes da pesquisa científica incluíram o interesse para o tema, tendo a pesquisa sido limitada a artigos científicos escritos em inglês, português e espanhol, com data de publicação até 10 anos de recuo a partir da data do fim da revisão. O conteúdo dos artigos teria de ser relevante e aos artigos deveriam conter evidências experimentais acerca do tema. Esta foi a base da recolha do material que conduziu à elaboração desta tese.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Eurico Monteiro pela sua dedicada orientação, pelo apoio, disponibilidade e compreensão e cuja profunda experiência e saber muito valorizaram esta monografia.

Aos meus amigos, que sempre me apoiaram e deram motivação para ultrapassar todas as dificuldades ao longo destes anos.

O maior agradecimento é dirigido aos meus pais, ao meu namorado e aos pais do meu namorado, que estão sempre presentes com o seu amor e incentivo, proporcionando-me ainda os meios para poder progredir.

Índice Geral

	Página
	i
Sumário	ii
Abstract	iii
Metodologia	iv
Agradecimentos	vi
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	vii
Abreviaturas	
1. Introdução	1
1.1. Mecanismo de formação dos biofilmes	6
2. Resistência aos antibióticos	13
2.1. Estratégias de prevenção da formação do biofilme	18
2.2.1. Inibição da adesão celular bacteriana à superfície	19
2.2.2. Interrupção da comunicação celular bacteriana (<i>Quorum sensing</i>)	21
2.3.3. Erradicação de biofilmes	22
3. Biofilmes nas doenças do trato respiratório superior	24
3.1. Biofilme e otite média (OM)	24
3.2. Amigdalite crónica recidivante	26
3.3. Infecções da cavidade oral	29
3.4. Cancro oral	29
3.5. Rinossinusite	33
3.6. Fibrose cística	34
3.7. Biofilmes e cateteres	38
	40
4. O Desafio para a indústria farmacêutica	46
Conclusão	48
Bibliografia	50

Índice de figuras	Página
Figura 1. Estrutura de um biofilme.	1
Figura 2. Etapas de formação de um biofilme.	7
Figura 3. Fases de formação do biofilme ao longo do tempo.	9
Figura 4. Pili, flagelos e as fímbrias de uma bactéria.	10
Figura 5. Mecanismos de resistência das bactérias aos antibióticos.	13
Figura 6. Mecanismos de resistência dos antibióticos aos biofilmes.	16
Figura 7. Diferentes níveis de atividade das populações no biofilme.	18
Figura 8. Estrutura geral das 2-piridonas-bicíclicas (R ¹ , R ³ , R ⁴ representam o grupo CH ₃ , CN, COOR, onde R pode ser o H, CH ₃ , R ² representa um anel heterocíclico.	19
Figura 9. Formação de ligações entre as bactérias pioneiras (lilás) e as moléculas da superfície (azul) envolvendo as adesinas (vermelho)	20
Figura 10. Hidroxiapatita ou fosfato de cálcio cristalino (Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂) do esmalte dos dentes.	20
Figura 11. Furanonas que atuam como inibidores do sistema de <i>quorum sensing</i> .	22
Figura 12. Imagem de biofilme bacteriano (setas) na cripta tonsilar.	25
Figura 13. Recetores oligossacarídeos.	30
Figura 14. Cárie dentária.	31
Figura 15. Cancro oral.	34
Figura 16. Biofilme associado à rinosinusite.	35
Figura 17. Fibrose cística.	38
Figura 18. Distribuição de espécies bacterianas das vias respiratórias em função da idade.	39
Figura 19. Biofilme colonização no cateter venoso após 24 horas de inserção	41

Índice de tabelas

	Página
Tabela 1. Exemplos de biofilmes associados a infecções humanas.	4

Abreviaturas

AcrAB-TolC - Principal sistema de efluxo da *Escherichia coli*

AHL - N-acil homoserina lactona

CBC - Complexo *B. cepacia*

CDE - Centers for disease control and prevention

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNAase - Desoxirribonuclease

EPS - *Extracellular Polymeric Substances*

FC - Fibrose cística

LPS - Lipopolissacáridos

MCVL - Microscopia confocal de varredura a laser

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MRSA - *S. aureus* resistentes à metilina

NTHi - *Haemophilus influenzae* não-tipáveis

OM - Otite média

OMA - Otite média aguda

OMAr - Otite média aguda recorrente

OME - Otite média com efusão

OMSC - Otite média suprativa crônica

PNAG - Poli-*N*-acetilglicosamina

PTFE – Politetrafluoretileno

PVC – Policloreto de vinilo

QQ - Quorum Quenching

QS - Quorum Sensing (

QSI - Substâncias inibidoras do sistema QS

RAGE - Receptor for advanced glycation endproducts

RNA - Ácido ribonucleico

RND - Sistema de efluxo das bactérias

RSC - Rinossinusite crónica

1. Introdução

Robert Koch, Médico patologista e bacteriologista alemão, formulou, em 1800, os conhecidos postulados de Koch que associavam a relação entre o agente patogénico e o hospedeiro, ou seja, uma bactéria seria o agente causal de uma determinada doença. Estes postulados basearam-se no paradigma de “uma doença para uma bactéria”, e era necessário o isolamento em cultura dessa bactéria supostamente patogénica para confirmar aquela relação. A etiologia mono-microbiana das doenças infecciosas pressupunha que cada espécie bacteriana se comportaria como uma entidade isolada quer no homem quer na natureza. No entanto, a partir de década de setenta os estudos vieram a demonstrar que na maioria das vezes os microrganismos existem integrados em comunidades mistas, aderindo a superfícies ou interfaces numa densa matriz de exopolissacáridos característicos, figura 1. Estas comunidades complexas e dinâmicas de microrganismos tomaram a designação de biofilmes, e podem incluir bactérias, fungos filamentosos, leveduras e protozoários (Costerton *et al.*, 1995; Costerton e Lewandowski, 1997; Nascimento e Taveira, 2001).

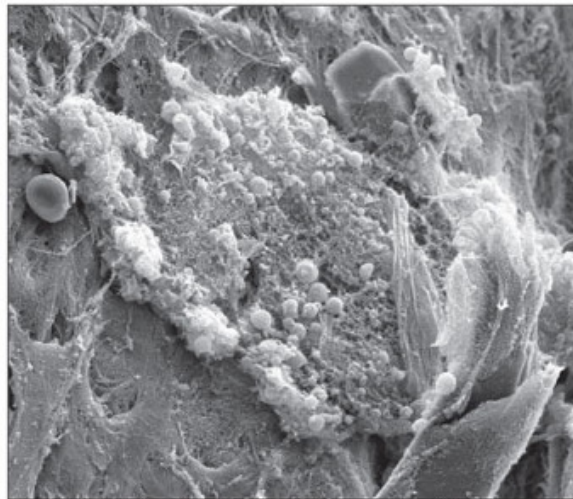


Figura 1. Estrutura de um biofilme.

Assim, um biofilme representa uma comunidade microbiana aderente a uma superfície, com células formando microcolônias revestidas por uma matriz extracelular de polissacarídeos produzida em resposta a estímulos ambientais e físicos, tais como a elevada densidade celular, a nutrição e as tensões físicas. Esta comunidade microbiana sendo autossuficiente permite que o biofilme funcione como um foco de disseminação dos microrganismos que a constituem e podem vir a originar infecções (Nascimento e Taveira, 2001).

As bactérias que constituem os biofilmes são metabólicas e morfologicamente diferentes das bactérias em suspensão isoladas em cultura pura, e geralmente apresentam uma maior resistência aos antibióticos e desinfetantes. Na prática médica, os biofilmes podem formar-se nos dispositivos médicos implantados, tais como cateteres vasculares e, têm sido associados a diversos tipos de infecções. Já nos meios industriais a formação de biofilmes pode provocar entre outros a corrosão e a obstrução de tubagens e a contaminação de produtos alimentares (Costerton *et al.*, 1999).

Nos últimos anos, tem-se vindo a verificar que os biofilmes têm também um papel fundamental na patogénese de várias infecções que não envolvem biomateriais. Estudos referem que cerca de 65% das infecções humanas de origem bacteriana podem estar associadas a biofilmes. Estas infecções podem afetar áreas como a cavidade oral (dentes e gengivas), o trato urogenital e o trato respiratório superior e inferior (Costerton *et al.*, 1999).

As infecções provocadas pelos biofilmes microbianos, em regra, apresentam cronicidade, o que dificulta o diagnóstico microbiológico, e aumenta a resistência aos tratamentos antibióticos. Os biofilmes humanos em comparação com os biofilmes formados sobre superfícies e sistemas inertes apresentam uma estrutura mais complexa, facto este associado à ação da fibronectina do hospedeiro sobre os glóbulos vermelhos e outros materiais que, em conjunto com os exo-polissacarídeos bacterianos contribuem para a formação do biofilme (Potera, 1999; Nascimento e Taveira, 2001).

Os biofilmes podem ter efeitos prejudiciais ou benéficos, em diversas áreas tais como a indústria, o ambiente e a saúde.

Na indústria a produção indesejada de biofilmes é designada por "lixo biológico" (*biofouling*) e é observado em áreas tais como as torres de arrefecimento, os permutadores de calor em centrais térmicas de produção de energia, na deterioração por corrosão de equipamentos, nos tubos e nas válvulas de transporte de água potável diminuindo a qualidade desta e aumentando os riscos para a saúde pública, etc.. Para além destes riscos uma das principais consequências deste "*biofouling*" são os custos económicos associados à diminuição da eficiência dos equipamentos e dos processos, e ainda os associados à substituição precoce das peças ou dos equipamentos deteriorados (Characklis e Marshall, 1990).

A nível da saúde humana, os biofilmes bacterianos que se desenvolvem podem entre outros explicar problemas como as cáries dentárias e outras doenças da boca, doenças pulmonares, mau funcionamento de cateteres urinários e de lentes de contacto, infeções graves em tecidos (osteomielite e endocardite) e rejeições de material protésico (Costerton *et al.*, 1987; Neu, 1996). Os biofilmes responsáveis pelas infeções de regiões anatómicas estéreis geralmente são constituídos por uma única espécie bacteriana ou fúngica, tabela 1.

Nos doentes com fibrose quística é frequente encontrar biofilmes bacterianos dos quais cerca de 80 a 90% são constituídos unicamente por *Pseudomonas aeruginosa*. Estes biofilmes são muito resistentes aos antibióticos devido à produção de quantidades elevadas de polissacáridos extracelulares e contribuem de forma determinante para a morte destes doentes por insuficiência respiratória (Singh *et al.*, 2000).

Na tuberculose, os biofilmes de *Mycobacterium tuberculosis* podem ser determinantes na patogénese desta doença. As amostras de expectoração de doentes portadores de tuberculose pulmonar em fase tardia da doença apresentavam conglomerados de *Mycobacterium tuberculosis*, semelhantes aos de *Pseudomonas aeruginosa* encontrados nos doentes com fibrose quística. Os biofilmes constituídos por *Haemophilus influenzae* podem estar associados a infeção nos portadores de cálculos renais infetados e otites de repetição (Costerton *et al.*, 1999; Hall-Stoodley e Lappin-Scott, 1998).

Tabela 1. Exemplos de biofilmes associados a infecções humanas (Nascimento e Taveira, 2001).

Infeção ou doença	Espécies bacterianas envolvidas
Cárie dentária	<i>Streptococcus mutans</i> , <i>Lactobacillus</i> spp.
Periodontite	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i>
Otite média	Estirpes não tipificáveis de <i>Haemophilus influenzae</i>
Infeções músculo-esqueléticas	Cocus Gram (+) (<i>Staphylococcus</i> sp.)
Fascite necrosante	Estreptococo do grupo A
Infeções do trato biliar	Bactérias entéricas (ex. <i>Escherichia coli</i>)
Osteomielite	Várias espécies de bactérias e fungos (geralmente misto)
Prostatite bacteriana	<i>E. coli</i> e outros bacilos Gram (-)
Endocardite subaguda bacteriana	Estreptococos do grupo <i>viridans</i>
Pneumonia da fibrose quística	<i>P. aeruginosa</i> e <i>Burkholderia cepacia</i>
Melioidose	<i>Burkholderia pseudomallei</i>
Infeções nosocomiais:	
Pneumonia	Bacilos Gram (-)
Suturas	<i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>S. aureus</i>
<i>Shunt</i> arteriovenoso	<i>S. epidermidis</i> e <i>S. aureus</i>
Cistite dos cateteres urinários	<i>E. coli</i> e outros bacilos Gram (-)
Peritonite dos dialisados	Variedade de bactérias e fungos
Tubos endotraqueais	Variedade de bactérias e fungos
Cateteres venosos centrais	<i>S. epidermidis</i> e outros
Válvulas mecânicas do coração	<i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>
Agrafos vasculares	Cocos Gram (+)
Aparelhos ortopédicos	<i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>
Próteses do pênis	<i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>

A *Candida albicans* é um importante agente oportunista associado a infecções nosocomiais que podem provocar micoses superficiais e profundas em hospedeiros imunocomprometidos. A maioria das septicemias nosocomiais provocadas por *Candida albicans* são provocadas pela formação de biofilmes em cateteres intravasculares. Estes biofilmes, do mesmo modo que os biofilmes bacterianos, são bastante resistentes ao tratamento com agentes antifúngicos (Baillie e Douglas, 1999).

As infecções por biofilmes apresentam características comuns, apesar das etiologias poderem ser diferentes tais como:

- i. Crescimento lento;
- ii. Libertação de antígenos que promovem a produção de anticorpos e de imunocomplexos específicos que podem originar lesões nos tecidos adjacentes;
- iii. Padrão de desenvolvimento preferencial em superfícies inertes, tecidos mortos e instrumentos médicos;
- iv. Serem agentes causais de infecções graves em indivíduos imunocomprometidos;
- v. As células bacterianas poderem separar-se da estrutura do biofilme em qualquer fase da infecção e estabelecer uma nova infecção aguda;
- vi. Os antibióticos eliminarem os sintomas da infecção provocada pelos biofilmes mas não o biofilme em si, levando ao aparecimento de infecções recorrentes, tornando-se necessário utilizar procedimentos mecânicos para remover estes biofilmes (Costerton *et al.*, 1999; Nascimento e Taveira, 2001).

Existem na natureza outros biofilmes, como os que se acumulam nos depósitos dos rios, lagos ou no mar e que são benéficos pois contribuem para a remoção de agentes

contaminantes nessas águas. Estes biofilmes têm vindo a ser utilizados em processos biotecnológicos para o tratamento de efluentes e para a eliminação de poluentes orgânicos e inorgânicos de águas contaminadas. É disto exemplo a utilização de sistemas com biofilmes como os filtros de areia para o tratamento de efluentes e para a purificação de água. Na indústria agroalimentar os biofilmes podem ser aplicados na produção de ácido cítrico e na produção do *sherry* (Gjaltema, 1996) e do vinagre por oxidação biológica do etanol (Melo, 1994).

1.1. Mecanismo de formação dos biofilmes

As bactérias e os fungos patogénicos podem formar biofilmes mistos ou puros. As características do substrato são fundamentais no processo de adesividade dos biofilmes. De um modo geral, características de maior rugosidade e hidrofobicidade, permitem o desenvolvimento mais rápido dos biofilmes. A forma de crescimento dos biofilme confere aos microrganismos constituintes uma maior resistência aos agentes antimicrobianos. A acumulação de biofilmes nas superfícies é um processo natural nos meios aquosos e resulta de processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem simultaneamente (Nascimento e Taveira, 2001).

Na figura 2 estão esquematizadas as diferentes etapas de formação de um biofilme.

Etapa 1. Transporte de células livres do meio líquido para uma superfície sólida com subsequente fixação;

Etapa 2. Crescimento e divisão das células fixas à custa de nutrientes provenientes do líquido circundante, conjuntamente com a produção e excreção de EPS (*Extracellular Polymeric Substances*);

Etapa 3. Fixação de células bacterianas flutuantes (e outras partículas), contribuindo para a acumulação do biofilme;

Etapa 4. Libertação de material celular por diversos mecanismos: erosão superficial (perda de células individuais), descolamento (*sloughing off*), abrasão e ataque por predadores.

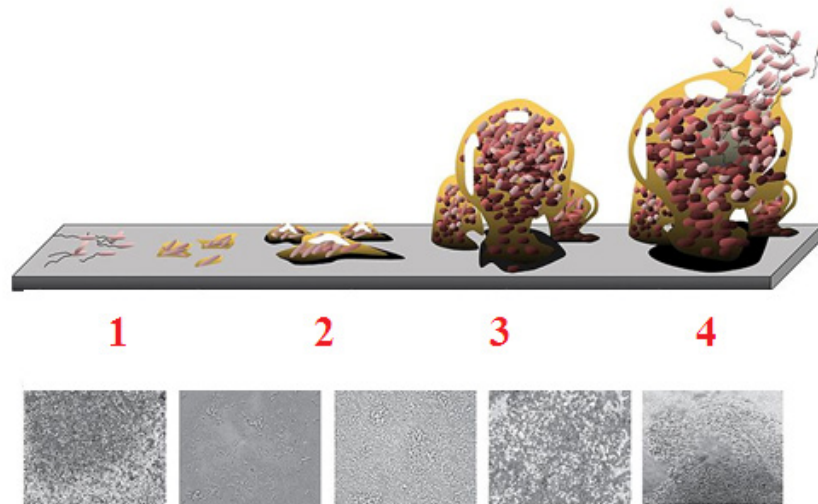


Figura 2. Etapas de formação de um biofilme (<http://www.blogdolibs.com>).

As etapas de transporte e adsorção à superfície de substâncias orgânicas dissolvidas no meio aquoso e o transporte de células livres do meio aquoso para uma superfície sólida ocorrem em poucos minutos (Etapa 1 e 2). A velocidade a que ocorre a formação da fase inicial do biofilme, o chamado filme condicionador, depende da concentração de moléculas orgânicas no meio aquoso em contacto com a superfície sólida, da afinidade das moléculas para com o suporte e das condições hidrodinâmicas do meio líquido (Chamberlain, 1992). A adesão das moléculas orgânicas à superfície sólida depende das suas características, nomeadamente da carga superficial, da energia livre de superfície e da rugosidade da estrutura de suporte (Marshall e Blainey, 1990).

Após a formação do filme condicionador, ocorre o transporte de células microbianas desde o meio aquoso para a superfície sólida (Etapa 3). Este transporte resulta da diferença de gradiente de concentrações de microrganismos entre o meio aquoso e a superfície sólida. As moléculas existentes no filme condicionador estabelecem ligações com os microrganismos, através da formação de cadeias poliméricas, facilitando a forte adesão e estabilidade do biofilme, ou, decorrente da mobilidade que os microrganismos

apresentam, devido à existência de apêndices filamentosos externos, tais como os *flagela*, as *pili* e ou as *fimbriae* (Characklis, 1990). Uma vez formada a primeira camada de microrganismos, a adesão de novos microrganismos é favorecida termodinamicamente. Por outro lado, o desenvolvimento e a reprodução dos primeiros colonizadores podem contribuir para a modificação das propriedades da superfície do suporte, tornando-a mais adequada para a subsequente colonização dos microrganismos secundários e favorecimento da acumulação dos biofilmes (Charackils *et al.* 1990).

O processo de libertação de frações de biomassa do biofilme para o meio aquoso pode resultar de mecanismos de erosão superficial, descolamento (*sloughing off*), de abrasão e de ataque por predadores (Characklis *et al.*, 1990; Gjaltema, 1996; Gantzer *et al.*, 1989) (Etapa 4). A erosão consiste na perda contínua de porções de biofilme decorrente de alterações ambientais, de alterações do fluxo e do pH e, da velocidade de movimento dos fluidos, tendo esta dois conhecidos efeitos. Por um lado, o aumento da velocidade do fluido desencadeia um incremento das forças hidrodinâmicas e conseqüentemente erosão, por outro lado favorece a formação de depósitos com maior resistência mecânica. A percentagem de remoção do biofilme aumenta à medida que este se vai formando (Vieira, 1995).

O descolamento ou *sloughing off*, corresponde à libertação de grandes porções de biofilme em consequência das alterações das condições dentro da própria estrutura do biofilme, tais como a elevada espessura, o desenvolvimento num ambiente rico em nutrientes ou em condições de baixa tensão de corte.

A abrasão resulta da perda de biofilme resultante de colisões sucessivas entre a superfície sólida que o suporta e as partículas suspensas existentes no fluido. (Gjaltema, 1996).

O ataque por predadores ou “*grazing*” nos biofilmes bacterianos resulta do ataque de protozoários que se alimentam à superfície destes biofilmes (Ratsak *et al.*, 1996).

As células constituintes dos biofilmes podem ainda desprender-se mediante a secreção e excreção de enzimas que quebram as ligações destas à matriz polimérica (Boyd e Chakrabarty, 1994).

Na figura 3 relacionam-se as fases de formação do biofilme ao longo do tempo (Pereira, 2001).

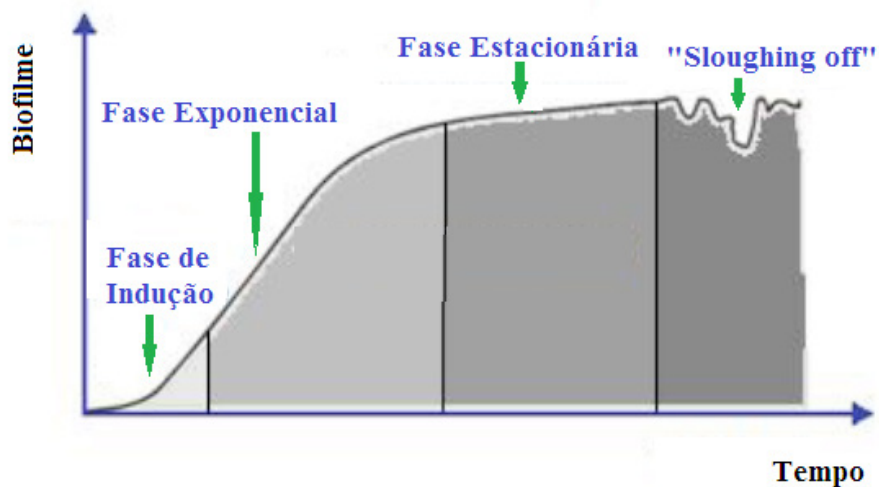


Figura 3. Fases de formação do biofilme ao longo do tempo.

As bactérias são os microrganismos que comumente têm capacidade de produzir biofilmes em condições de meios menos exigentes ou em condições extremas. O reduzido tamanho das bactérias, as elevadas taxas de reprodução, a grande capacidade de adaptação e a produção de substâncias e estruturas extracelulares que as protegem do meio, são as principais características que facilitam a colonização das superfícies (Capelletti, 2006).

A capacidade de adesão de um microrganismo a uma superfície e, a capacidade de manter os biofilmes estáveis dependem do seu fenótipo e genótipo, da presença de estruturas celulares como o pili, os flagelos e as fímbrias (Figura 4), de algumas proteínas da superfície, bem como os sistemas *quorum sensing* (Boari, 2008).

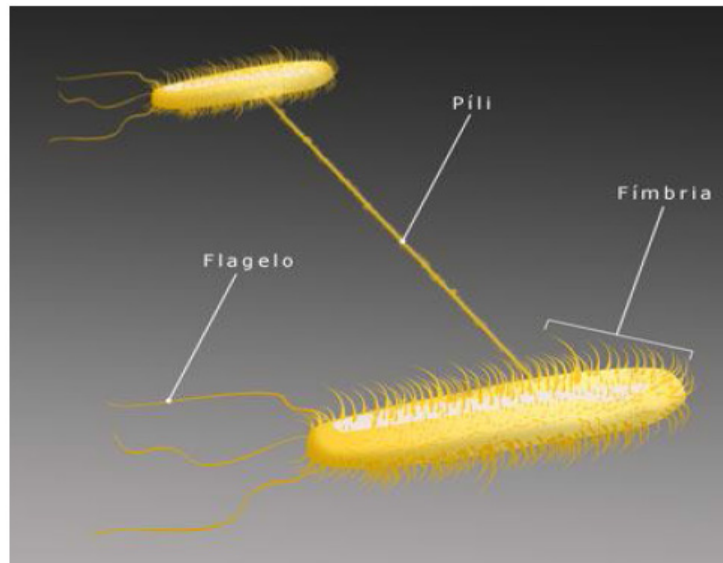


Figura 4. Pili, flagelos e as fimbrias de uma bactéria.

O pili é um componente essencial no processo de adesão inicial e de colonização de superfícies, designadamente em microrganismos gram-negativos (Boari, 2008). O pili tipo IV é constituído por moléculas de pilina helicoidalmente organizadas, com 145 a 160 aminoácidos, localizado numa das extremidades da célula. O tipo de mobilidade que esta estrutura confere ao microrganismo, permite que este se movimente em superfícies semi sólidas como os agares, e sólidas, como o aço inoxidável, formando microcolónias com expansão radial média de aproximadamente 1 milímetro por hora (Boari, 2008).

O pili do tipo IV tem a capacidade de se ligar com diversas superfícies bióticas ou abióticas. A colonização de superfícies e o deslocamento de microcolónias onde o pili tipo IV está presente, necessita do contato célula a célula, orientado por nutrientes e sinalizadores, processo que se designa de quimiotaxia (Boari, 2008).

Outra entidade de elevada importância para a adesão e colonização de superfícies por microrganismos gram-negativos são os flagelos. Estes organelos utilizados na locomoção dos microrganismos, são constituídos por unidades de flagelina e emergem por uma extensão da membrana externa. Alguns microrganismos apresentam flagelos polares que em meios aquosos facilitam o processo inicial de adesão às superfícies.

Contudo, após esta adesão inicial, inicia-se uma diferenciação da expressão génica, sendo o flagelo polar substituído por um flagelo lateral, o qual confere à célula maior capacidade de movimentação em superfícies sólidas e semi sólidas (Boari, 2008).

O Sistema *Quorum Sensing* (QS) consiste num sistema de comunicação entre as bactérias. As bactérias, num determinado sistema, sintetizam compostos sinalizadores de baixo peso molecular, os autoindutores bacterianos, que são excretados para o meio ambiente. Quando se atinge uma quantidade crítica de autoindutores, ou seja um *quorum* de bactérias, estas detetam a presença dos mesmos e respondem ativando ou reprimindo certos genes (Viana, 2006).

As etapas do ciclo de constituição de um biofilme requerem um adequado sistema de comunicação célula-célula para a uma boa distribuição, ordenação e sincronização da atividade dos genomas procariontes fundamentais para a manutenção da homeostasia da colónia microbiana (Boari, 2008).

Assim sendo, este sistema de comunicação facilita o acesso aos nutrientes e/ou a ambientes mais favoráveis, permitindo que as bactérias organizem respostas defensivas contra hospedeiros eucarióticos. Por outro lado permite que estas aperfeiçoem a sua capacidade de diferenciação assumindo formas mais adaptadas à sobrevivência em ambientes hostis (Viana, 2006).

Nos microrganismos gram-negativos, as moléculas sinalizadoras são derivadas da N-acil homoserina lactona (AHL) e a sua regulação ocorre por meio das proteínas homólogas LuxI e LuxR. A primeira atua como uma enzima (AHL sintetase) e a segunda, quando se liga à AHL, forma o complexo AHL-LuxR, que é responsável pela ativação e expressão de inúmeros genes. Nas bactérias gram-positivas a comunicação célula a célula ocorre por meio da secreção de pequenos peptídeos (Boari, 2008).

No caso dos gram-negativos, há um amplo espectro de homoserinas lactonas, produzindo os microrganismos constantemente estas moléculas sinalizadoras.

Quando as concentrações dos microrganismos são baixas, as concentrações dos autoindutores também são pequenas, e, o seu impacto sobre a expressão genética é diminuto (Boari, 2008). Contudo, quando a densidade populacional de microrganismos aumenta, também aumenta a concentração dos autoindutores no meio, influenciando a regulação génica (Boari, 2008).

Este processo influi sobre a sobrevivência do microrganismo quando em condições desfavoráveis dos biofilmes, nomeadamente na fase de maturidade dos biofilmes, fase em que a disponibilidade de oxigénio, nutrientes, e, componentes orgânicos e inorgânicos como o ferro é pequena, bem como a restrição do espaço físico (Viana, 2006).

2. Resistência aos antibióticos

Desde 1970 que se vem verificando um aumento significativo da resistência aos agentes antimicrobianos resultante da utilização muitas vezes indiscriminada de agentes antimicrobianos de amplo espectro, de doenças crônicas que podem induzir imunossupressão como a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e, da prática médica com utilização de terapias que deprimem o sistema imunológico (Beck-Sagué, 1993). Assim, o uso indiscriminado de antimicrobianos teve como consequência inevitável o aumento de patógenos resistentes (Brunton *et al.*, 2010).

Segundo Kratzer C. *et al.* (2007) as bactérias dos biofilmes são de 10 a 1000 vezes mais resistentes aos antibióticos do que as bactérias geneticamente idênticas.

Diversos estudos *in vitro* demonstraram que células bacterianas sésseis podem desenvolver maior resistência à ação dos antibióticos, relativamente às células bacterianas cultivadas de forma planctônica (livres, em suspensão) (Smith, 2005). Para além dos mecanismos de resistência comuns das bactérias aos antibióticos, nomeadamente, a transferência de genes de resistência homólogos, as mutações naturais evolutivas, (Figura 5) (Alekhun e Levy 2007; Hoiby *et al.*, 2010), foram propostos outros mecanismos para explicar o aumento das resistências a antimicrobianos em micro-organismos produtores ou constituintes de biofilmes, tais como:

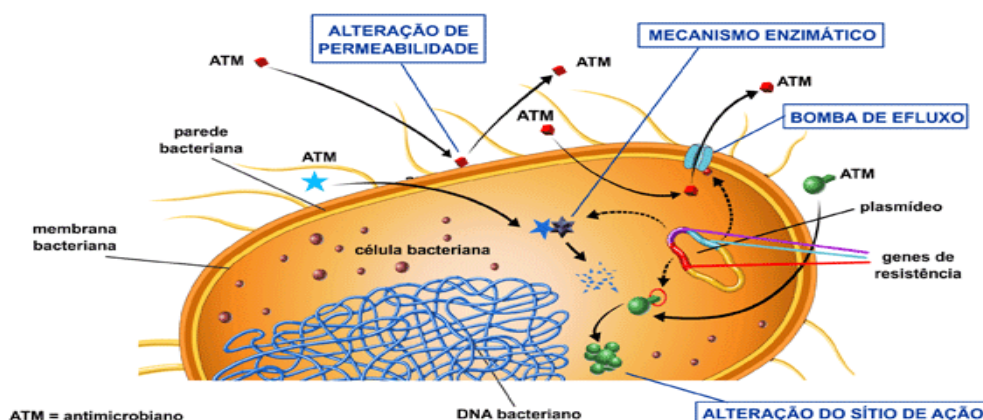


Figura 5. Mecanismos de resistência das bactérias aos antibióticos (Disponível na internet).

i. Deficiente penetração e difusão dos antibióticos através da matriz polisacarídica estável: os poros dentro da matriz polissacarídea são de reduzida dimensão, bloqueando a passagem de determinadas moléculas, incluindo os antibióticos (Figura 6).

ii. Adsorção dos antibióticos na matriz exopolimérica: devido à natureza aniônica e hidrofílica destas substâncias, estas podem adsorver á matriz exopolimérica e, a concentração terapêutica do antibiótico no meio intracelular não é atingida (Smith, 2005).

iii. Resposta fisiológica dos microrganismos ao ambiente químico heterogêneo existente nos biofilmes: as zonas de reduzido crescimento bacteriano e, as células dormentes, proporcionam condições de crescimento bastante diferentes das camadas superiores. A camada interna do biofilme apresenta condições de escassez de nutrientes e de oxigênio, podendo ocorrer anaerobiose, o que obriga o biofilme a entrar na fase estacionária de crescimento, gerando fenômenos de tolerância. Neste sentido, os microrganismos tornam-se menos suscetíveis à ação dos antibióticos cuja ação é dependente da multiplicação bacteriana, como é o caso dos beta-lactâmicos. Assim sendo, existem dentro de um biofilme duas subpopulações celulares fenotipicamente distintas, uma metabolicamente ativa e outra inativa. A primeira subpopulação encontra-se localizada à superfície do biofilme, estando em contato com o meio exterior sendo geralmente vulnerável aos mecanismos de ação dos antibióticos. A segunda subpopulação, encontra-se rodeada pela matriz exopolimérica, fica no interior do biofilme onde a taxa de divisão celular é lenta e, torna-se menos vulnerável á ação dos antibióticos (Stewart e Franklin, 2008; Jayraman, 2009; Soto, 2013).

iv. Presença de células persistentes (*persistor cells*): estas células são resistentes ao efeito *cida* quando expostas aos antimicrobianos. As bactérias persistentes não são consideradas células mutantes, contudo, existe a possibilidade de traduzirem uma variação fenotípica (Lewis, 2007) (Figura 6).

v. Idade do biofilme: a idade dos biofilmes pode influenciar a suscetibilidade dos microrganismos aos antibióticos. Alguns estudos relatam que o aumento da idade de biofilmes de *Staphylococcus epidermidis* reduz a eficácia de diversos agentes antimicrobianos, nomeadamente, da clindamicina, da cefalotina, da eritromicina, da teicoplanina e da vancomicina. O aumento da quantidade de matriz produzida, decorrente da crescente idade do biofilme, pode resultar em gradientes de nutrientes e de oxigénio deficitários que, diminuem o metabolismo e as taxas de crescimento dos microrganismos com consequentemente alteração da suscetibilidade dos mesmos aos antibióticos (Donlan, 2002).

vi. Produção de enzimas inativadoras dos antibióticos: A produção de enzimas que inativam antibióticos por parte das bactérias, como as β -lactamases e, a sua acumulação nos biofilmes, produz gradientes de concentração que fornecem proteção às células bacterianas subjacentes (Smith, 2005).

vii. Estrutura populacional densa e proximidade das células bacterianas: O aumento da população de microrganismos dentro dos biofilmes facilita a dispersão de genes de resistência por conjugação ou por transformação, aumentando o número de microrganismos resistentes aos antibióticos (Hausner e Wuertz, 1999; Smith, 2005).

viii. Aumento da expressão de bombas de efluxo: Os genes deste mecanismo de resistência são regulados positivamente quando as células formam biofilmes. O sistema de efluxo AcrAB-TolC, pertencente à família RND, é o melhor caracterizado por exemplo na *Escherichia coli* e, confere resistência ao cloranfenicol, às quinolonas, e às tetraciclínas. (Soto, 2013).

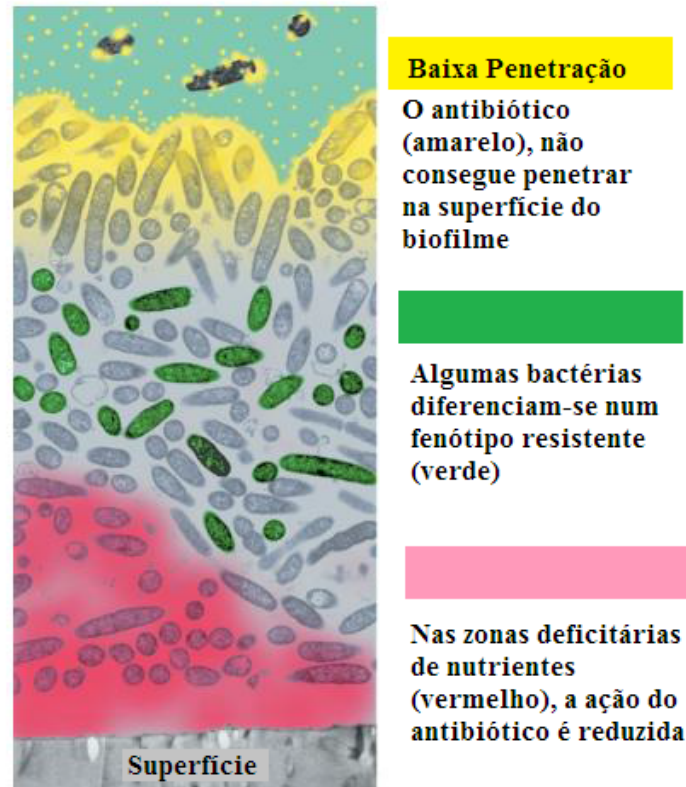


Figura 6. Mecanismos de resistência dos antibióticos aos biofilmes (Stewart e Costerton, 2001).

A resistência aos antibióticos tornou-se um problema crescente para os sistemas de saúde e para a sociedade desde os anos 70 (Hawkey, 2008). O número de estudos com vista ao desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de infeções resistentes têm vindo a aumentar, contudo, apenas um número limitado destes novos fármacos são eficazes (Allen e Nicas, 2003).

Na prática clínica as infeções por biofilmes microbianos são geralmente tratadas com combinações de antibióticos em altas dosagens (Hoiby *et al.*, 2011; Romling e Balsalobre, 2012). Os estudos demonstram que a associação de múltiplos antibióticos é mais eficaz no combate aos biofilmes bacterianos, do que a administração em regime de monoterapia ou a associação de dois antibióticos. Tal facto pode estar associado à diversidade de tipos de microrganismos que constituem os biofilmes (Dales *et al.*, 2009). Nos biofilmes bacteriano/fúngico composto por *S. epidermidis* e *Candida albicans*, o polímero extracelular estafilocócico pode proteger as células da levedura

através da ação dos azóis. Por outro lado as células da levedura pareceram reduzir a atividade da vancomicina contra as células bacterianas (Adam *et al.*, 2002).

O sucesso do tratamento antimicrobiano de uma infecção depende da concentração alcançada no foco infeccioso, sendo que esta deve ser suficientemente alta para inibir a proliferação dos micro-organismos patogênicos. Sendo assim, o antibiótico precisa atingir o seu alvo numa forma ativa, ligar-se a este e interferir na sua função.

As concentrações antibióticas necessárias para erradicar as bactérias variam de acordo com o tipo de bactéria. Por exemplo, a concentração necessária do imipenem para erradicar o biofilme formado pela estirpe padrão de *P. aeruginosa* é superior a 1,024 µg/mL, enquanto que 1 µg/mL de imipenem eliminou as formas planctônicas deste microrganismo. Também para a estirpe padrão de *E. coli* cultivada planctonicamente foram necessárias concentrações de ampicilina superiores a 2 µg/mL, sendo necessária uma concentração de 512 µg/mL para erradicar a forma séssil (Ceri *et al.*, 1999).

Várias hipóteses têm vindo a ser propostas para explicar o aumento da resistência aos agentes quimioterápicos em células sésseis e para que a concentração adequada do antimicrobiano não seja atingida nos tecidos do hospedeiro nem no ambiente intracelular. Mecanismos como a deficitária penetração e difusão dos antimicrobianos através da matriz polisacarídica, a qual é geralmente de arquitetura estável, a sua adsorção a matriz exopolimérica do biofilme, devido à sua natureza muitas vezes aniônica e hidrofílica, foram associados às baixas concentrações de agentes quimioterápicos nos biofilmes (Patel, 2005; Smith, 2005).

Contudo, a administração de múltiplos antibióticos no combate das infecções, tende a induzir resistência bacteriana, formação de biofilmes recalcitrantes (Cummins *et al.*, 2009) e gerar intolerância tóxica (Baker-Austin *et al.*, 2006).

De referir que a natural heterogeneidade dos biofilmes (Figura 7) resultante dos diferentes níveis de atividade resultante do gradiente de oxigénio, disponibilidade de nutrientes e resíduos poderá levar à existência de diversos mecanismos de resistência que exercem uma ação conjunta, proporcionando um elevado nível de resistência.

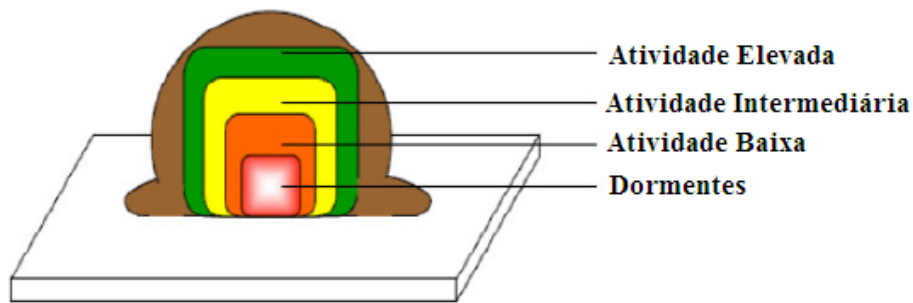


Figura 7. Diferentes níveis de atividade das populações no biofilme. (Adaptado de Davis, 2003).

A resistência específica de um biofilme inclui a tolerância aos agentes antimicrobianos e significa que o mecanismo de resistência ocorre predominantemente em células sésseis e não somente em células planctônicas. Contudo, os mecanismos clássicos de resistência proporcionam uma resistência adicional ao biofilme, contribuindo para o nível global de resistência (Mah, 2012).

2.1. Estratégias de prevenção da formação do biofilme

O desenvolvimento de estratégias para prevenir a formação de biofilmes tem recebido nos últimos anos bastante atenção pela comunidade científica. A inibição da formação de biofilmes pode ser conseguida inibindo a adesão celular bacteriana à superfície ou por interrupção da comunicação celular bacteriana (*Quorum sensing*), fase 1 e 2 da figura 2.

2.2.1. Inibição da adesão celular bacteriana à superfície

Nas superfícies abióticas, a inibição da adesão celular bacteriana a um substrato biótico (Figura 2, etapa 1), importantes exemplos são os compostos pilicidas e os compostos quelantes de ferro. Os pilicidas, como as 2-piridonas-biciclícas, figura 8, inibem a biossíntese da pili das estruturas bacterianas impedindo a adesão das bactérias às células humanas.

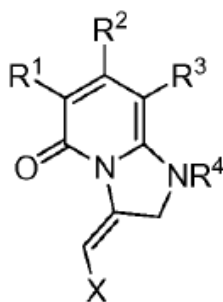


Figura 8. Estrutura geral das 2-piridonas-biciclícas (R^1 , R^3 , R^4 representam o grupo CH_3 , CN , COOR , onde R pode ser o H , CH_3 , R^2 representa um anel heterocíclico. (Fonte: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/55790/1/ES2379919A1.pdf>).

Estes compostos inibem a adesão de *E. coli* às células da bexiga (Pinkner *et al.*, 2006; Berg *et al.*, 2008) e do *Vibrio cholerae* às células intestinais (Hung *et al.*, 2005). Os compostos quelantes de ferro como a lactoferrina, uma proteína presente na maioria dos fluidos corporais, quelata o ferro essencial à adesão bacteriana a superfícies. Em concentrações sub-inibitórias a lactoferrina permite inibir a formação do biofilme de *P. aeruginosa*, sem inibir o crescimento bacteriano. Em concentrações mais elevadas também inibe o crescimento bacteriano, rompendo a membrana através da ligação aos lipopolissacarídeos (Singh, 2002). Alguns produtos naturais, como os extratos aquosos da caatinga brasileira (Trentin *et al.*, 2011a), o filtrado de bactérias da esponja marinha (Trentin *et al.*, 2011b), o dipeptídeo cíclico do fungo associado à esponja marinha (Scopel *et al.*, 2013) e o peptídeo esteroide da cera de ovos de carrapato bovino (Zimmer *et al.*, 2013) apresentaram ação inibitória na formação de biofilmes sem interferir no crescimento bacteriano. Também os taninos purificados de plantas medici-

nais, são considerados uma importante classe de compostos bioativos no bloqueio à formação de biofilmes de *P. aeruginosa* resultante da sua ação bacteriostática (Trentin *et al.*, 2013).

A desina sortase, uma enzima de membrana que catalisa reações de transpeptidação, ligando-se covalentemente às proteínas e ao peptidoglicano interferindo na montagem do pili poderão vir a ser um bom alvo para fármacos antiadesão, com amplas aplicações clínicas (Marraffini *et al.*, 2006; Chen e Wen, 2011) (Figura 9). As bactérias mutantes em sortase A (gene *strA*) apresentam uma deficiência de proteínas de superfície, o que leva a diminuição da adesão destas bactérias às superfícies da hidroxiapatita do esmalte dentário na presença de saliva (Figura 10). O metanotiosulfonato e, o ácido *p*-hidroximercuribenzoico podem funcionar como inibidores da desina sortases. (Chen e Wen, 2011).

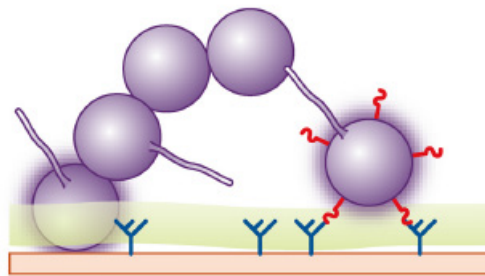


Figura 9. Formação de ligações entre as bactérias pioneiras (lilas) e as moléculas da superfície (azul) envolvendo as adesinas (vermelho) (Adaptado de Nobbs *et al.*, 2009).

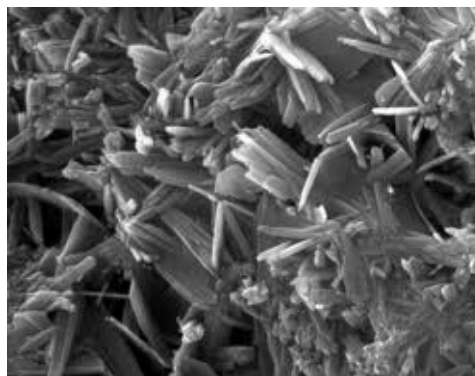


Figura 10. Hidroxiapatita ou fosfato de cálcio cristalino ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) do esmalte dentário (Disponível na internet).

2.2.2. Interrupção da comunicação celular bacteriana (*Quorum sensing*)

Para que uma infecção se instale, as bactérias desenvolvem diferentes mecanismos de virulência para colonizar, disseminar e adaptar-se aos diversos microambientes. Na fase de formação de agregados e, no início da maturação do biofilme, as bactérias dispõem de um sistema de comunicação célula a célula para regular a expressão dos genes envolvidos na formação do biofilme (*Quorum sensing*).

Após a etapa da adesão primária, a inibição da formação de biofilmes pode ser conseguida interferindo na sinalização intercelular bacteriana. As substâncias inibidoras do sistema *QS* (*QSI*) competem com o recetor das moléculas sinalizadoras ou de enzimas designadas por *Quorum Quenching* (*QQ*), degradando as moléculas de sinalização e, conseqüentemente a comunicação celular bacteriana (Martin *et al.*, 2008). Assim sendo ocorre uma inibição da produção de EPS e conseqüentemente da manutenção da estrutura tridimensional do biofilme (adesão irreversível) (Lazar, 2011). A associação dos interferentes do sistema *QS* com antimicrobianos poderá aumentar a efetividade do controle de infecções bacterianas relacionadas com a formação de biofilmes.

As furanonas halogenadas (Figura 11) e o peptídeo inibidor do RNA III (RIP) são compostos potencialmente inibidores da formação dos biofilmes de *P. aeruginosa* e *Staphylococcus* spp. (Chen e Wen, 2011). Os inibidores de sistemas de *QS* podem afetar a integridade do biofilme e desta forma tornar as bactérias mais suscetíveis à antibioterapia minimizando a possibilidade das bactérias se tornarem resistentes. Contudo, diversos estudos demonstraram que a formação de biofilmes por estas bactérias é independente da modulação do sistema *QS* (Schaber *et al.*, 2007) o que reflete a complexidade dos mecanismos na formação dos biofilmes.

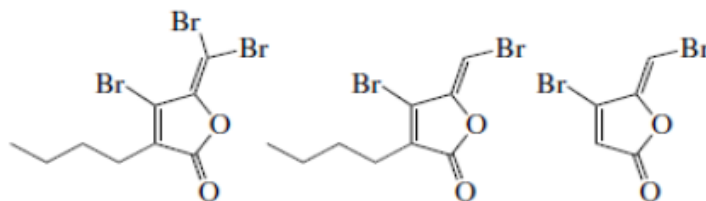


Figura 11. Furanonas que atuam como inibidores do sistema de *quorum sensing* (Disponível na internet).

2.2.3. Erradicação de biofilmes

Os antimicrobianos e a substituição de dispositivos biomédicos implantados são os únicos procedimentos disponíveis para a erradicação de biofilmes.

Os microrganismos em condições desfavoráveis, como são as alterações de pH e a escassez de nutrientes, podem só por si destruir o biofilme. Neste sentido, os microrganismos coordenam o comportamento, a fim de se converterem ao estado planctónico. Assim, algumas investigações têm por base moléculas que estimulam o mecanismo natural de dispersão de biofilmes e a conversão de células sésseis em células planctónicas (Otto, 2013).

Atualmente as investigações tentam encontrar enzimas e outras moléculas capazes de desintegrar a matriz EPS e condicionar a rutura enzimática da estrutura do biofilme. A diversidade da constituição química da matriz do biofilme contendo material proteico, DNA extracelular e polissacarídeos, faz com que o EPS seja suscetível à degradação por enzimas exógenas como a proteinase K, a tripsina e a DNase I) (Boles e Horswill, 2011). Como exemplo referem-se as enzimas do tipo alginato liase que degradam o polímero alginato, poliaspartato e DNase ocasionando a erradicação do biofilme de *P. aeruginosa* (Alkawash *et al.*, 2006) e de *S. aureus* (Mann *et al.*, 2009). A dispersina B,

uma N-acetilglucosaminidase é um outro exemplo de enzima capaz de inibir a formação de biofilmes e de erradicar biofilmes de estirpes de *S. epidermidis* e *S. aureus* que possuem poli-N-acetilglicosamina (PNAG) como constituinte principal da sua matriz (Kaplan *et al.*, 2004).

Apesar de toda a investigação e dos esforços efetuados no sentido de erradicar os biofilmes ainda não foi possível obter o primeiro fármaco antibiofilme.

3. Biofilmes nas doenças do trato respiratório superior

Esta região está em contacto permanente com diversas bactérias. Contudo, nesta área estão presentes características anatómicas e imunológicas que a protegem contra a colonização microbiana, nomeadamente a produção de muco por parte das células epiteliais submucosas e das células caliciformes, que agregam os microrganismos e os eliminam do organismo com a ajuda da função dos cílios vibráteis das células epiteliais; a fagocitose e a destruição dos microrganismos por ação dos macrófagos; a ação bactericida da lisozima do muco nasal (Tlaskalová-Hogenová *et al.*, 2004; Prescott *et al.*, 2005). O tamanho das partículas é outro fator importante, pois apenas as partículas com um tamanho adequado é que alcançam o trato respiratório inferior. Devido a estas características o trato respiratório não apresenta por norma uma flora comensal. Contudo, o trato respiratório superior é usualmente o principal foco de infeção por agentes patogénicos como a *Neisseria meningitides*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis*, entre outros (Davis, 1996).

De seguida descrever-se-á alguns biofilmes associados às doenças do trato respiratório superior.

3.1. Biofilmes e otite média (OM)

Um estudo realizado em 2004 relativamente a biofilmes bacterianos em crianças demonstrou a presença de biofilmes numa biópsia do ouvido médio de uma criança com otite média supurada crónica (OMSC): Num grupo de crianças com otite média aguda recorrente (OMAr) e com otite média com efusão (OME) crónica foram igualmente demonstrados biofilmes de natureza bacteriana. Biofilmes de *S. aureus* foram também observados nas biópsias de oito entre dez adultos com otite média secretora crónica OMSC e, em seis de dez biópsias do ouvido médio de adultos com OMSC. Um estudo realizado na Groelândia verificou a presença de biofilmes em esfregaços de fluido do ouvido médio de crianças com OMSC o mesmo não ocorreu em crianças com OME

crónica. Também foram observados biofilmes nas adenoides de crianças com OM (Figura 9) (Thornton e Coate, 2012).

As crianças com OMA recorrente apresentam uma maior cobertura (97,6%) de biofilmes do que as crianças com OME (27,7%). Os biofilmes presentes contêm agentes patogénicos da OM e são em regra polimicrobianos, (Figura 12). Acredita-se que nestes casos a remoção do biofilme conduza a uma resolução da patologia e diminua a sua capacidade de recidiva por exemplo após uma adenoidectomia.

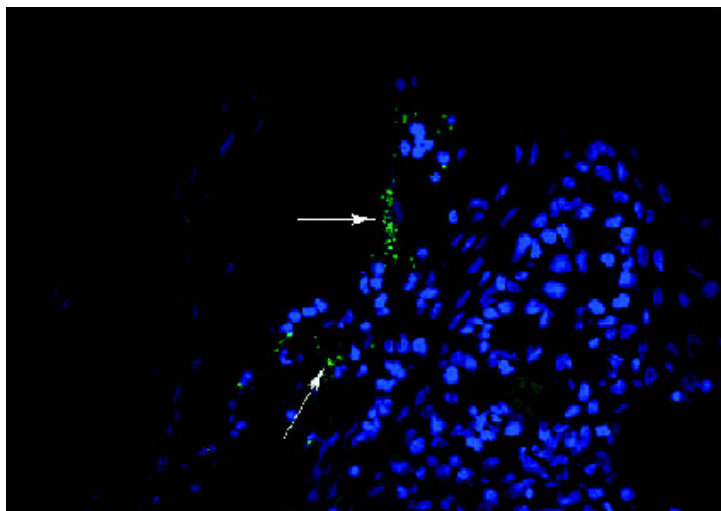


Figura 12. Imagem de biofilme bacteriano (setas) numa cripta amigdalina (Disponível na internet).

A capacidade das bactérias de invadir células epiteliais parece ser uma estratégia para estas colonizarem o trato respiratório e impedirem o reconhecimento imune extracelular. Os agentes patogénicos associados à otite média recorrente e persistente e capazes de invadir e permanecer nas células são os *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* não-tipáveis (NTHi), *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (Thornton e Coate, 2012).

A persistência intracelular destes agentes bacterianos protege as bactérias da ação dos antibióticos, sendo pois, um meio de evitar a depuração plasmática. Também nas células

epiteliais, as bactérias estão protegidas de alguns antibióticos como os antibióticos β -lactâmicos que são geralmente usados no tratamento da OM (Thornton e Coate, 2012).

3.2. Amigdalite crônica recidivante

Chole e Faddis em 2003 observaram biofilmes bacterianos de bactérias gram-positivos e gram-negativos pela primeira vez nas criptas amigdalinas de doentes com amigdalite recidivante e apneia obstrutiva do sono (Chole e Faddis, 2003).

Os padrões infecciosos diferem com a idade, tendo nos lactentes sido observada uma infiltração bacteriana difusa que diminuía após os quatro anos de idade aumentando o número de fissuras e criptas. Nos doentes com mais de 25 anos estas fissuras e bactérias infiltrativas difusas já não estavam presentes e apenas se observam pontos de aderência e comunidades bacterianas na cripta. Outro estudo observou a presença de *H. influenzae* em maior percentagem em lactentes, sendo que estas bactérias se localizavam difusamente pelo tecido. No entanto, em adultos estas bactérias não estavam presentes onde a predominância era de *Streptococcus* spp. Nos indivíduos mais velhos, a espécie dominante era o *S. aureus* e nos doentes com abscesso periamigdalino a predominância era do *S. pyogenes* (Thornton e Coate, 2012).

A amigdalite aguda reage bem aos antibióticos, no entanto, o efeito destes na doença recidivante parece ser limitado. Mais de três quartos das amigdalites recidivantes contêm bactérias produtoras de β -lactamases resistentes aos antibióticos β -lactâmicos. A resposta α inicial ao tratamento com antibióticos e a ausência de recidiva da doença pode estar associado à persistência das bactérias no biofilme ou no espaço intracelular. Portanto, a remoção dos focos purulentos crônicos e das bactérias sequestradas ainda é o principal benefício da amigdalectomia (Thornton e Coate, 2012).

Num teste *in vitro*, todas as estirpes de *S. aureus* isoladas de amigdalite recidivante foram suscetíveis à clindamicina permitindo erradicar estirpes de *S. pyogenes* envolvidas na infecção recidivante (Thornton e Coate, 2012).

Os tratamentos com antibióticos β -lactâmicos como amoxicilina em associação com ácido clavulânico e cefalosporinas são menos eficazes na erradicação bacteriana pois estes não penetram na parede celular bacteriana. Contudo, antibióticos tais como macrólidos, cetolídeos e fluoroquinolonas que apresentam a capacidade de penetrar na parede bacteriana e se concentrarem dentro da célula apresentam-se como potencialmente mais eficazes. No entanto um estudo realizado por Courter *et al.* observou maior falha na terapêutica quando crianças com OMA foram tratadas com macrólidos em comparação com as crianças que receberam tratamento com amoxicilina ou amoxicilina em associação com ácido clavulânico. Esta diferença pode evidenciar a maior resistência bacteriana aos macrólidos comparativamente aos β -lactâmicos (Thornton e Coate, 2012).

Outro estudo comparou a associação da amoxicilina com ácido clavulânico comparativamente com a azitromicina tendo demonstrado maior capacidade terapêutica para erradicar patógenos bacterianos na efusão do ouvido médio o que pode refletir as diferenças nos patógenos-alvo. Por outro lado, os β -lactâmicos podem ser mais eficazes no tratamento de bactérias na fase planctônica aguda, enquanto os macrólidos podem ter um papel importante no sequestro bacteriano intracelular. No entanto, alguns estudos *in vitro* sobre a infecção por *P. aeruginosa* de uma linhagem de célula epitelial sugerem que as bactérias no interior da célula apresentam um fenótipo de biofilme tornando-se insensíveis aos efeitos dos antibióticos (Courter *et al.*, 2010).

Os antibióticos macrólidos (azitromicina e similares) podem afetar o transporte nasofaríngeo de secreções em crianças com OMA reduzindo o estado de portador nasal da *S. pneumoniae* e de *H influenzae* não tipáveis quando comparadas a crianças tratadas com amoxicilina. A nasofaringe de crianças concentra cerca de 36% dos microrganismos em estado não cultivável e não é claro se estes estão presentes na formação de biofilmes ou se permanecem no espaço intracelular De acordo com estes

estudos, demonstrou-se que a presença de patogênicos dentro das células sob a forma de biofilmes é suscetível de tratamento (Morris *et al.*, 2010).

A terapêutica futura poderá envolver tratamentos combinados que incluirão antimicrobianos capazes de atingir os patogênicos dentro e fora das células, mecanismos que interferem com a comunicação bacteriana necessária para a formação e manutenção do biofilme e, novas terapias não tóxicas para a mucosa que rompam diretamente os biofilmes. Os macrólidos ou as quinolonas podem ser úteis como parte destas combinações, pois atingem patogênicos intracelulares, inibem o *quorum sensing* e reduzem a resposta inflamatória do hospedeiro. No entanto, é recomendada a monitorização quando da utilização de um tratamento com o objetivo de atacar os mecanismos, uma vez que a erradicação a menos que completa do biofilme pode estimular a sua proliferação, aumentar a inflamação da mucosa e a gravidade clínica da doença (Al-Mutairi e Kilty, 2011).

A presença de biofilmes e de infecção intracelular com otopatógenos conhecidos na mucosa do ouvido médio de crianças com OMSC permite explicar as diferenças entre o tratamento com ciprofloxacina tópica e com uma combinação de frameticina, gramicidina e dexametazona. Num estudo foi demonstrado que a ciprofloxacina é mais eficaz para o tratamento da OMSC produzida por comunidades bacterianas do que os aminoglicosídeos tópicos como a frameticina. Estas diferenças refletem a capacidade das fluoroquinolonas em penetrar facilmente nas células e atingir os agentes patogênicos sequestrados. Já a ineficácia dos aminoglicosídeos tópicos pode estar associada à indução de formação de biofilmes, nomeadamente para a *P. aeruginosa*, contudo, esta diferença entre a ciprofloxacina e frameticina não tenha sido observada em outros estudos. Esta diferença de resultados para os diferentes estudos pode dever-se ao facto da lavagem do espaço do ouvido médio o que resulta na remoção do biofilme da superfície da mucosa permitindo a penetração e igual ação de ambos os antibióticos (Leach *et al.*, 2008).

Neste sentido a capacidade dos antibióticos para induzir a formação de biofilme bacterianos deve ser considerada no tratamento das otites em especial para os processos crónicos e recidivantes.

3.3. Infecções da cavidade oral

A formação e compreensão do biofilme oral é fundamental para a saúde oral uma vez que as alterações deste sistema e do seu equilíbrio dinâmico com o hospedeiro podem conduzir a patologias, designadamente, a cárie dentária e a patologia periodontal (Silveira, 2012).

A cavidade oral pode apresentar mais de 700 espécies de bactérias sendo que metade pertence ao periodonto, e as restantes habitam outros microambientes, como a língua, as mucosas lisas e a superfície dental. Na cavidade oral, os microrganismos aderem às células e aos componentes teciduais do hospedeiro ou outros microrganismos (coagregação) desenvolvendo biofilmes nos quais a transferência de genes associados à virulência microbiana e à resistência aos antibióticos é comum e para os quais os mecanismos de defesa do hospedeiro têm eficácia limitada (Paster *et al.*, 2006).

A adesão inicial do biofilme oral ocorre entre as moléculas da superfície dos colonizadores primários e, as moléculas de saliva adsorvidas na superfície dentária (película dentária adquirida). Alguns recetores salivares, como é o caso das proteínas ricas em prolina e a estaterina, têm epítomos reconhecidos por *Streptococci* que facilitam a colonização. A α -amilase, imunoglobulinas, fibronectina e a lactoferrina também permitem a união às adesinas da superfície dos colonizadores iniciais facilitando a colonização das bactérias que têm estes compostos (Jenkinson e Lamont, 2005).

É de referir, que algumas moléculas desta película inicial só expõem determinados domínios se estiverem adsorvidas à superfície, pois os locais disponíveis para ligação quando as moléculas estão em solução na saliva são diferentes. Inicialmente, a adesão pode ser conseguida através de vários tipos de ligações, incluindo reconhecimento de recetores oligossacáridos, reações do tipo lectina, interações do tipo proteína-proteína, ou ainda ligações iónicas ou hidrofóbicas, conferindo assim uma união bastante firme à superfície que estão a colonizar (Figura 13) (Jenkinson e Lamont, 2005).

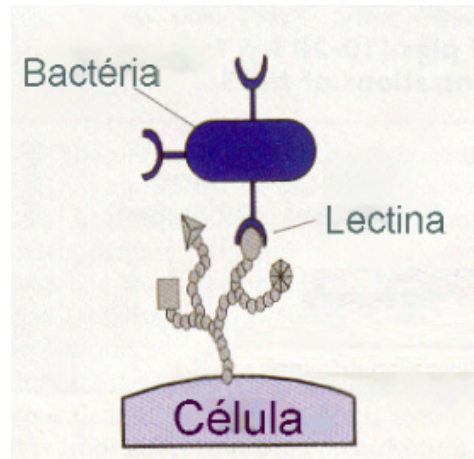


Figura 13. Recetores olissacarídeos (Disponível na internet).

Por outro lado, o crescimento do biofilme depende dos colonizadores iniciais. Quando a cavidade oral é colonizada precocemente pela bactéria *Streptococcus sanguis*, a colonização pela espécie *Streptococcus mutans* ocorre mais tardiamente diminuindo a cariogênese. Assim sendo, a colonização inicial seleciona os colonizadores secundários.

Geralmente as bactérias colonizadoras da cavidade oral encontram-se localizadas no espaço extracelular do hospedeiro, contudo, algumas bactérias oportunistas como a *P. gingivalis*, a *Prevotella intermedia* e o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* podem invadir as células do hospedeiro instalando-se em locais intracelulares (células gengivais e da mucosa jugal) (Singh *et al.*, 2011; Arirachakaran *et al.*, 2012).

A cárie dentária (Figura 14) é a patologia infecciosa mais comum da cavidade oral e a sua patogenicidade está associada ao metabolismo microbiano altamente fermentativo do grupo mutans como a *Streptococcus mutans*, a *Lactobacillus* spp. e quando a dentina é atingida o agente mais frequente é o *Actinomyces* spp.



Figura 14. Cárie dentária (Disponível na internet).

Na presença de dietas deficitárias em alimentos fibrosos que auxiliam na autolimpeza da cavidade oral, e ricas na ingestão de hidratos de carbono fermentáveis, a população destes microrganismos aumenta no biofilme oral desencadeando o processo. Os estreptococos do grupo *mutans* têm a capacidade de colonizar precocemente a superfície dental devido a sintetizarem grandes quantidades de polímeros de carboidratos extra e intracelulares que estabilizam a adesão bacteriana no biofilme e funcionarem como fontes de reservas nutritivas tornando-se microrganismos cariogênicos. Já as bactérias produtoras de ácido láctico, como o *Lactobacillus* spp. estão associadas ao processo de dissolução mineral do dente após o início do processo cariogênico. Quando a cárie atinge a dentina ou quando ultrapassa o esmalte a população microbiana torna-se mais complexa, estando presentes bactérias com grande atividade proteolítica, como o *Actinomyces* spp.. Com o envolvimento dos tubos dentários e do sistema de canais, o microbioma acidogênico é substituído por microrganismos anaeróbios e proteolíticos que se mantêm até à fase de necrose da polpa e o envolvimento dos tecidos periapicais (Gaetti-Jardim Júnior *et al.*, 2010).

Nas periodontopatias como as gengivites e as periodontites após o período de equilíbrio entre o hospedeiro e o microbioma estabelece-se o quadro inflamatório periodontal com a seleção de microrganismos anaeróbios Gram-negativos e com um metabolismo não fermentativo. A retenção do biofilme microbiano à margem gengival origina a alteração do equilíbrio entre o microbioma e o hospedeiro dando início a uma reação inflamatória

que afeta os tecidos de revestimento do periodonto. Microrganismos como o *Actinomyces* spp. e a *Prevotella intermedia* estão associados à patogenicidade da gengivite (Curtis *et al.*, 2005).

Nas gengivites necrotisantes ou associadas a alterações hormonais e de imunossupressão, apresentam um microbioma semelhante ao observado na periodontite avançada contendo *Treponema denticola* e *P. intermedia*. A *P. intermedia* tem a capacidade de utilizar o estradiol como fonte energética no seu metabolismo para a cadeia respiratória e, a reposição das condições hormonais permite que a quantidade destes microrganismos retome ao valor normal e se restitua a saúde periodontal. (Kornman e Loesche, 1982).

A etiologia da gengivite está associada a diversos microrganismos como o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, o *Dialister pneumosintes*, o *Porphyromonas gingivalis*, a *Prevotella intermedia*, a *P. nigrescens*, o *Fusobacterium nucleatum*, a *Tannerella forsythia* e a *T. denticola* por vezes associados a outros microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos, principalmente, anaeróbios estritos (Ledder *et al.*, 2007) originando perda de inserção gengival e inflamação, estabelecendo complexas interações ecológicas entre si, modulando a resposta imunológica e o resultado do tratamento instituído (Kolenbrander *et al.*, 2006; Jervoe-Storm *et al.*, 2007).

Sendo as doenças periodontais infecções mistas e de caráter sinérgico, é difícil determinar o papel desempenhado por cada uma das espécies em particular.

Assim sendo, é de extrema importância o controle do biofilme bacteriano na prevenção das doenças da cavidade oral, uma vez que este é o agente etiológico primário de diversas doenças. O controle do biofilme de bactérias orais pode ser realizado através da sua remoção e a prevenção de sua recorrência, podendo ser realizado utilizando meios mecânicos ou químicos. O controle químico profilático do biofilme é utilizado em conjunto com o mecânico, no sentido de evitar a acumulação de bactérias, prevenindo assim o desequilíbrio do microbioma: O controle profilático químico deve ter em consideração o tipo de bactérias da cavidade oral pois o seu objetivo não é a

eliminação das mesmas, mas, sim, evitar o desequilíbrio promotor da doença (Vieira, 2005).

A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA) é uma alternativa ao tratamento clássico, promovendo a morte bacteriana por meio da fotossensibilização dos componentes microbianos. O processo fotodinâmico resulta da ação da luz sob o fotossensibilizador que na presença do oxigênio origina a destruição da célula alvo. A TFDA antimicrobiana encontra-se bem documentada principalmente nos casos de infecções localizadas e de pouca profundidade. Por outro lado os estudos sugerem que as bactérias orais são suscetíveis a ação da terapia fotodinâmica antimicrobiana quando suspensas em culturas planctónicas (Pereira, 2011).

3.4. Cancro oral

A associação do biofilmes orais e o desenvolvimento de cancro oral (Figura 15) ainda não foi totalmente esclarecido, no entanto, diversas espécies de bactérias orais têm sido implicadas em doenças malignas e designadamente inflamações causadas por infeções. Os microrganismos orais, influenciam as citocinas e outros mediadores inflamatórios que afetam as vias metabólicas envolvidos nos processos carcinogénicos. Por exemplo, o RAGE (*receptor for advanced glycation endproducts*) está associado a respostas pró-inflamatórias e foi considerado um recetor que influencia a carcinogénese resultantes de infeções por via oral (Meurman, 2010).

Foram realizados diversos estudos que visam compreender a fisiopatologia e os mecanismos moleculares envolvidos no cancro. Estudos, *in vitro*, utilizando o teste de *Salmonella* demonstram a associação entre a placa bacteriana e o número de cáries com a atividade genotóxica da saliva. Os microrganismos do biofilme oral podem interagir mutagenicamente com a saliva e atuar como cofatores na carcinogénese. Por outro lado, as populações microbianas da mucosa da boca são diferentes nas zonas saudáveis e nas zonas malignas. Por exemplo, o *Streptococcus anginosus* e a *Treponema denticola* estão associados a carcinomas do trato gastrointestinal superior, a *Capnocytophaga*

gingivalis, a *Prevotella melaninogenica* e o *Streptococcus mitis* apresentam uma maior população em amostras de pacientes com carcinomas de células escamosas e a infecção por *S. anginosus* pode estar associada à carcinogénese da cabeça e do pescoço (Meurman, 2010).



Figura 15. Cancro oral (Disponível na internet).

O cancro da cavidade oral desenvolve-se através de uma acumulação de alterações genéticas que controlam o crescimento celular, a diferenciação, a proliferação e o processo de metastização. Os mecanismos moleculares subjacentes a esta doença ainda não estão claros (Scully, 2002). Fenómenos como crescimento, apoptose, proliferação celular descontrolada, angiogénese, invasão de tecidos e metástase levam ao desenvolvimento de cancro (Raju e Ibrahim, 2011).

3.5. Rinossinusite

Em 2004 foram descritivos os biofilmes em doentes com rinossinusite crónica através de microscopia eletrónica de varredura (MEV) (Figura 16). Nesse mesmo ano outro trabalho avaliou a presença de biofilmes em sondas posicionadas no recesso do seio frontal removidas no pós-operatório de doentes com rinossinusite crónica. Verificou-se

que todas as sondas apresentaram estruturas morfológicas compatíveis com biofilmes bacterianos.

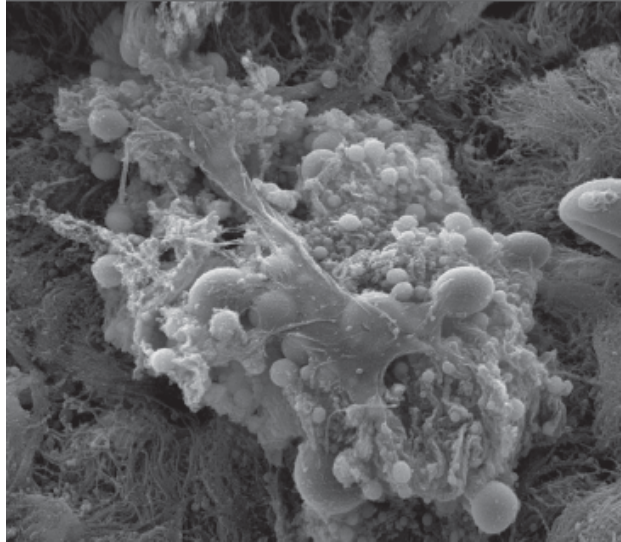


Figura 16. Biofilme associado à rinosinusite (Disponível na internet).

Outro estudo demonstrou que a incidência de biofilmes em doentes com rinosinusite crónica (RSC) é de 80% (24/30) quando observados em biópsia de mucosa. Nenhum dos 4 indivíduos saudáveis seriados como controlo apresentou achados positivos (Sanclement *et al.*, 2005).

Em crianças com RSC e apneia obstrutiva do sono, observou-se a presença de biofilmes em 94,9% da superfície das adenoides e apenas 1,9% na superfície das adenoides nos casos de crianças que só apenas sofriam de apneia obstrutiva do sono. Os autores sugeriram que a presença de biofilmes na nasofaringe de crianças com rinosinusite crónica funciona como reservatório de bactérias resistente ao tratamento clínico. A eliminação do biofilme através da adenoidectomia pode explicar a melhora do quadro clínico nesta população de doentes (Zuliani *et al.*, 2006).

Em outro estudo 14 dos 18 doentes com rinosinusite crónica por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) demonstraram a presença de biofilmes bacterianos nas quais algumas amostras apresentaram marcação polimicrobiana. No entanto, 2 das 5

amostras controlo apresentaram marcação positiva compatível com biofilmes nos doentes com rinosinusite crónica. Apesar destes serem significativamente menores em tamanho, estes autores sugerem ser apenas simples colonizadores. (Sanderson *et al.*, 2006; Psaltis *et al.*, 2007). Por outro lado, 44,7% dos doentes com RSC (17/38) apresentaram achados compatíveis com biofilmes em biópsias da mucosa e os controlos não apresentaram positividade (Psaltis *et al.*, 2007).

Além destas evidências destes estudos um outro estudo *in vitro* utilizando o ensaio modificado de biofilme de *Calgary* em mucosa nasossinusal, demonstrou que 28,6% das amostras obtidas de doentes com RSC apresentavam a formação de biofilmes (Prince *et al.*, 2008).

Apesar dos resultados obtidos para os diferentes estudos relativos à presença de biofilmes na mucosa nasossinusal de doentes com RSC ainda existem muitas dúvidas acerca do papel destes na fisiopatologia desta doença.

Contudo, dois estudos demonstram um possível efeito deletério dos biofilmes na evolução de doentes com RSC. Segundo estes estudos os doentes com estirpes de *Staphylococcus aureus* e de *Pseudomonas aeruginosa* com capacidade de formarem biofilmes *in vitro* apresentam uma evolução desfavorável no pós-operatório de rinosinusite crónica e da polipose nasossinusal (Bendouah *et al.*, 2006) e a presença de biofilmes na mucosa de doentes com RSC também estão associados a um agravamento dos sintomas e a uma inflamação mais intensa na mucosa nasal durante a evolução pós-operatória (Psaltis *et al.*, 2008).

A terapia antibacteriana oral geralmente é ineficaz no tratamento da rinosinusite crónica apesar da elevada taxa de sucesso dos antibióticos no tratamento da sinusite bacteriana aguda. A presença dos biofilmes têm sido apontados como sendo os responsáveis pela falência da terapia antibacteriana para a rinosinusite. Na rinosinusite aguda é possível controlar a infeção porque as bactérias existem no estado planctónico/livre, já no caso da rinosinusite crónica, a organização das bactérias confere-lhes uma maior resistência aos antibióticos (Castro, 2010).

A concentração inibitória mínima (CIM) para uma bactéria planctónica é ineficaz quando essa mesma bacteriana está presente num biofilme. As bactérias presentes nos biofilmes resistem a doses de antibióticos em cerca de 1000 vezes mais que na forma planctónica. O aumento da concentração do antibiótico para além da CIM pode diminuir a capacidade de resistência, no entanto, as elevadas concentrações séricas de antibiótico aumentam o risco de toxicidade (Castro, 2010).

Um outro grupo de doenças genéticas comumente associada à RSC é a designada doença ciliar primária (DCP), que se caracteriza por anomalias na estrutura ciliar resultando no mau funcionamento dos cílios e, que variam desde a aplasia ciliar completa até aos defeitos de orientação ciliar. A DPC inclui diversas patologias tais como: o síndrome de *Kartagener*, a síndrome dos cílios imóveis, a dismotilidade ciliar e o defeitos de orientação ciliar primária (Meeks e Bush, 2000). Os cílios desempenham um papel importante na *clearance* dos seios perinasais e na prevenção de inflamação crónica. Os doentes com discinesia ciliar primária e síndrome de *Kartagener* apresentam elevada prevalência de rinosinusite crónica associada a infeções respiratórias de repetição. Os cílios destes doentes são incapazes de transportar o muco viscoso, causando disfunção ciliar e consequentemente rinosinusite crónica (Castro, 2010).

É precisamente nos locais de deficiente drenagem, arejamento e *clearance* mucociliar que ocorre a inflamação nos doentes com rinosinusite crónica. Na maioria dos doentes é também possível isolar agentes infecciosos, nomeadamente microrganismos mais bactérias aeróbias (86%), nomeadamente *Staphylococcus aureus* (36%), *Staphylococcus coagulase-negativos* (20%), *Streptococcus pneumoniae* (17%) que podem desenvolverem-se em biofilmes. Os agentes anaeróbios são mais prevalentes em infeções secundárias como as infeções dentárias (Castro, 2010; Lund, 2008). No entanto, a cronicidade as bactérias aeróbias é gradualmente substituídas por bactérias anaeróbias resultante da pressão seletiva que favorece o crescimento dos anaeróbios resultante redução da diminuição de oxigénio e pela acidificação no interior dos seios perinasais. Pode ser detetada uma colonização polimicrobiana, incluindo fungos, contudo a contribuição dos diferentes agentes patológicos na patogénese da doença ainda é desconhecida (Castro, 2010; Fokkens *et al.*, 2007).

3.6. Fibrose cística

A fibrose cística (FC) é uma doença genética irreversível, com expressão nas vias aéreas superiores, causando alterações patológicas nos seios paranasais, a prevalência de infecções nestes doentes levou-me a fazer referência aos biofilmes. A fibrose cística (FC) (Figura 17) é uma patologia que afeta a função normal de diversos órgãos do corpo humano, contudo é a disfunção pulmonar que desempenha papel principal na morbidade e mortalidade destes doentes (Lutz *et al.*, 2011).

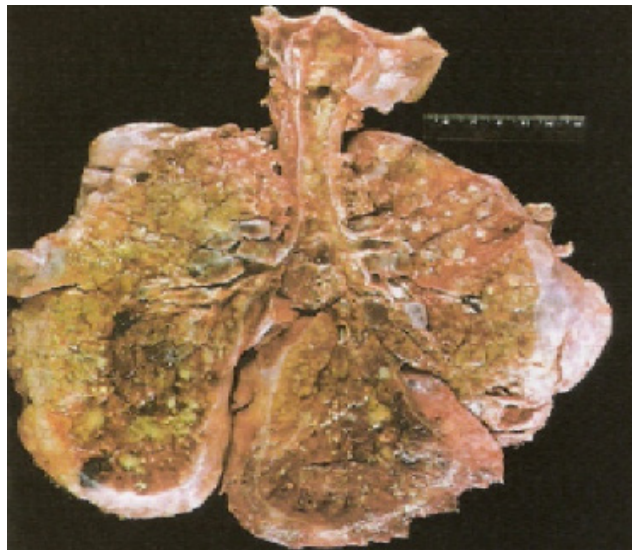


Figura 17. Fibrose cística (Disponível na internet).

Apesar do pulmão de um doente com FC ser histologicamente normal os infiltrados respiratórios são observados durante o período neonatal. Com o crescimento o ambiente das vias aéreas torna-se favorável à colonização bacteriana e a uma elevada percentagem de doentes desenvolverem doença pulmonar supurativa, obstrutiva e progressiva que em geral é responsável pela morte desses doentes (Lutz *et al.*, 2011).

Assim sendo o tratamento do doente fibrocístico baseia-se na manutenção da função pulmonar (Lutz *et al.*, 2011).

As bactérias na infecção respiratória em doentes com FC desenvolvem-se e colonizam o tecido pulmonar na forma de biofilmes. Apesar da grande variedade de espécies microbianas presentes nos biofilmes das secreções respiratórias de doentes com FC, apenas algumas destas têm um papel fundamental na colonização/infecção das vias aéreas destes doentes. Na fibrose cística estão presentes um conjunto de bactérias que são frequentemente adquiridas com a idade (Figura 18) (Lutz *et al.*, 2011).

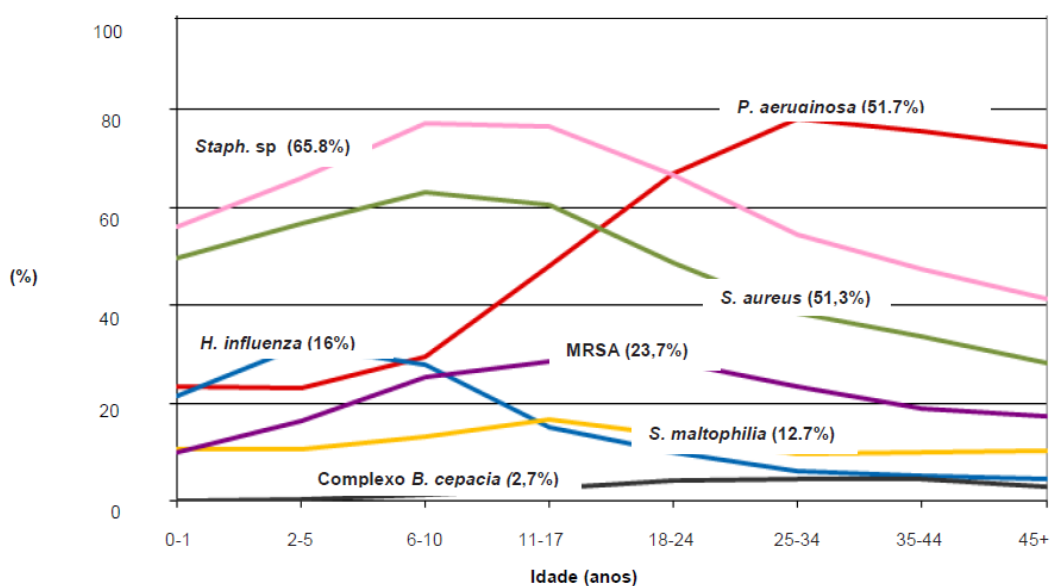


Figura 18. Distribuição de espécies bacterianas das vias respiratórias em função da idade (Lutz *et al.*, 2011).

Nas crianças, as colonizações mais comuns são por agentes patogénicos como o *Staphylococcus aureus*, o *Haemophilus influenzae* e o *Streptococcus pneumoniae*. Por volta dos 11 anos aparecem os patogénicos oportunistas como a *Pseudomonas aeruginosa*, que geralmente coexiste com o *S. aureus*. Cerca de 80% dos adultos fibrocísticos são infetados por *P. aeruginosa* que após colonização crónica a sua erradicação torna-se difícil. As bactérias do complexo *B. cepacia* (CBC) são também patogénicos clássicos nesta doença. Também a infeções viral tem sido associada à patogénese da doença pulmonar por FC, bem como patogénicos emergentes como a *Stenotrophomonas maltophilia*, o *Achromobacter xylosoxidans* e as micobactérias em especial as micobactérias não tuberculosas (Lutz *et al.*, 2011).

O uso de ciclos repetidos de antibióticos bem como a utilização de novas metodologias de diagnóstico microbiológico tem contribuído para maior sobrevivência dos doentes fibrocísticos (Lutz *et al.*, 2011).

No entanto, a utilização frequente de antibióticos promove o aumento da resistência bacteriana sendo que *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), e *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenemos são frequentes em doentes com FC. Neste sentido é necessário a realização de testes seguros de suscetibilidade aos antibióticos aplicados às particularidades da infecção respiratória (como o teste em biofilme) no sentido de fornecer informações mais precisas para o tratamento (Lutz *et al.*, 2011).

3.7. Biofilmes e cateteres

A infecção é a complicação mais grave associada à utilização de cateteres e ocorre em aproximadamente 19% dos doentes, sendo que 7% das infecções são locais. 12% dos casos de bacteremia estão associados ao cateter (Caramori *et al.*, 2002). Tendo em vista que no tratamento de algumas das infecções do trato respiratório superior referidas anteriormente os doentes podem em determinado momento necessitar de colocar cateteres vai ser dada uma panorâmica geral da importância dos biofilmes no cateterismo.

A aderência de microrganismos à superfície de biomateriais desempenha um importante papel para o desenvolvimento de infecções associadas ao cateterismo, venoso, arterial ou urinário. A produção de substância extracelular polissacarídica natural, biofilme (*slime*), à superfície dos materiais que entram na constituição dos cateteres permite que as células bacterianas se aglomerem em multicamadas tornando-se menos acessíveis ao sistema de defesa do organismo e aos antimicrobianos (de Oliveira, 2011).

A patogênese da infecção associada ao cateterismo ocorre devido à migração dos microrganismos da pele no local de inserção cutânea do cateter e, com a colonização da

ponta do cateter, sendo esta a via mais comum de infecção para os cateteres inseridos periféricamente e para os cateteres de curta permanência (Costerton e Stewart, 2000).

Os cateteres venosos centrais são utilizados para a administração de fluidos intravenosos, produtos sanguíneos, medicamentos, nutrição parenteral e monitorização do estado hemodinâmico de doentes em estado crítico (Polderman e Girbes, 2002). A infecção relacionada ao cateter venoso resulta da formação do biofilmes e a maioria dos microrganismos envolvidos na colonização deste não são virulentos na forma planctónica, mas podem causar infecção persistente, quando agrupados no biofilme (Rimondini *et al.*, 2005).

A contaminação através do *hub* do cateter contribui para a colonização do lúmen interno dos cateteres de longa permanência (Costerton e Stewart, 2000). Ocasionalmente, os cateteres venosos podem ser contaminados por disseminação hematogênica devido a um outro foco de infecção (O'Grady, 2002).

Os estudos de microscopia eletrónica de transmissão e varredura mostraram que a maioria dos cateteres venosos centrais inseridos estão colonizados por microrganismos associados a uma matriz de biofilme (Storti, 2006). Os microrganismos do biofilme mais comumente isolados de cateteres venosos são os *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus faecalis* (Donlan *et al.*, 2001). A colonização do cateter venoso pode verificar-se ao final de 24 horas de acordo com o biofilme condicionante produzido pelo hospedeiro (plaquetas, plasma e proteínas tissulares (Figura 19) (Donlan *et al.*, 2001). Nos cateteres de longa permanência (permanência superior a 30 dias) o biofilme forma-se na superfície interna do cateter, já nos cateteres de curta permanência (permanência inferior a 10 dias) o biofilme forma-se predominantemente na superfície externa (Storti, 2006).

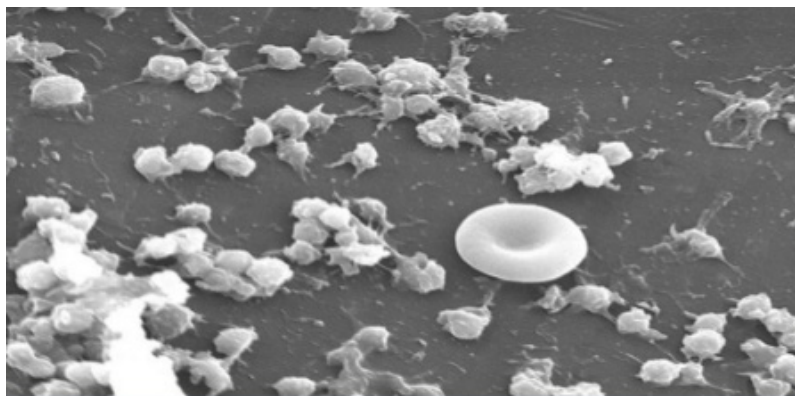


Figura 19. Biofilme colonização no cateter venoso após 24 horas de inserção (CDE).

Segundo Costerton *et al.* as formas sésseis das bactérias nos biofilmes podem aumentar a quantidade de bactérias planctônicas que poderão abandonar o biofilme e dispersarem-se para o meio ambiente. Entre as espécies bacterianas capazes de formar biofilmes em cateteres venosos encontramos o *Staphylococcus epidermidis*, que tem baixo poder patogênico no contexto da pneumonia nosocomial, as *Pseudomonas aeruginosa* e o *Streptococcus pneumoniae* que são agentes patogênicos pulmonares hospitalares que apresentam elevado potencial de agregação aos biofilmes. Os mesmos autores estudaram os passos necessários para o desenvolvimento dos biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* sugerindo que os flagelos são fundamentais para a aderência inicial da *P. aeruginosa* ao cateter durante o primeiro passo da formação do biofilme e o pili IV, e a motilidade *twitching* (por contração) da bactéria permitem a formação de microcolônias (Costerton *et al.*, 1999). Contudo, os estudos também demonstraram que estirpes de *P. aeruginosa* incapazes de formar as microcolônias iniciais não formavam biofilmes maduros sobre superfície de policloreto de vinilo (PVC) (O'Toole e Kolter, 1998; Storti, 2006).

As principais bactérias e fungos associados às infecções por cateteres nos doentes hemodialisados são: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* e o fungo *C. albicans* (Storti, 2006).

Um estudo relativo à sensibilidade aos agentes antimicrobianos em biofilmes de cateteres venosos verificou que 37 estirpes de *Staphylococcus aureus* eram 100,0%

sensíveis à teicoplanina e à vancomicina e, 13,5% a 37,8% pouco sensíveis à rifampicina. Em relação à resistência 37 estirpes eram resistentes a 100,0% à gentamicina, ao cloranfenicol, à ciprofloxacina, à levofloxacina, à clindamicina, à eritromicina, à oxacilina, à penicilina G, ao sulfazotrim, à tetraciclina e 48,7% à rifampicina (Storti, 2006).

Relativamente à cateterização urinária nas últimas décadas os estudos de aderência e crescimento de bactérias na superfície interna do cateter, contribuíram para uma melhor compreensão da patogênese das infecções do trato urinário associadas aos cateteres de alguma permanência. (Simões *et al.*, 2007).

No Estudo Nacional de Prevalência de 2009 a infecção urinária foi a infecção nosocomial mais frequente (24%) estimando-se que cerca de 80 % destes episódios se relacione com a cateterização vesical e, que por cada dia de algaliação o risco de infecção aumenta em 3 % a 10 %, aproximando-se dos 100 % ao fim de 30 dias (Simões *et al.*, 2007).

Existem duas populações de microrganismos no trato urinário cateterizado: a que cresce na urina e a que cresce à superfície do cateter (biofilme) (Simões *et al.*, 2007). O acesso dos microrganismos às vias urinárias pode ocorrer por via extraluminal através da migração de microrganismos ao longo da face externa do cateter urinário, através do meato ao longo da uretra, ou por via intraluminal através da superfície interna do cateter vesical, quer pela utilização de equipamento contaminado quer pela perda da esterilização nas zonas de conexão (Pina *et al.*, 2010).

Segundo um estudo de Simões *et al.* os agentes etiológicos mais frequentes no biofilme de cateteres de permanência são a *E. coli* (29,1%) e a *Klebsiella* spp. (29,1%). Outros autores sugerem que algumas estirpes, como *Proteus* e a *Pseudomonas*, apresentam tendência a se desenvolverem em biofilmes. Assim, se o cateter obstruir, é fundamental o reconhecimento dessas bactérias, pois os resultados obtidos em cultura podem não refletir uma bacteriúria verdadeira e, conseqüentemente ocorrer falha no tratamento, resultante da persistência dos microrganismos aderentes ao biofilme do cateter (Simões *et al.*, 2007).

Relativamente à sensibilidade/resistência aos antibióticos da *E. coli* associada ao cateterismo urinário, verificou-se que 62,5% das estirpes de *E. coli* apresentaram resistência à ampicilina e ao sulfametoxazol/trimetoprim e, eram 100% sensíveis às cefalosporinas de largo espectro, enquanto as estirpes de *Klebsiella* spp., na sua maioria apresentaram 100% de resistência ao sulfametoxazol/trimetoprim e 85,6% às fluoroquinolonas, sendo que 42,8% dessas estirpes produziram enterobactérias produtoras de β -lactamase de largo espectro (Simões *et al.*, 2007).

De referir que cerca de 80% das bactérias Gram-negativas são responsáveis pela infecção do trato urinário em ambiente hospitalar, sendo que a *E.coli* é o agente etiológico mais comum e, entre as complicações mais frequentes destacam-se a cistite, a pielonefrite, a bacteriemia secundária/sépsis e a prostatite (Simões *et al.*, 2007).

Com o objetivo de minimizar ou erradicar os biofilmes microbianos em cateteres, têm sido desenvolvidos diversos estudos nesta área na tentativa de reduzir os altos índices de morbidade e mortalidade associadas à contaminação através destes dispositivos médicos. A técnica de *lock*-terapia ou selo-terapia, na qual se utilizam compostos químicos com ação antimicrobiana e antibióticos no preenchimento do cateter tem sido amplamente estudada. A selo-terapia consiste na instilação de um antibiótico ou antimicrobiano, com ou sem anticoagulante, apenas no lúmen de cateter, numa concentração 100 a 1.000 vezes superior à Concentração Inibitória Mínima usada habitualmente para terapia sistêmica.

O tratamento da bacteremia associada ao cateter pode ser efetuado com *locks*, com antibioticoterapia e com a remoção do cateter (Raad *et al.*,2007). Quando o cateterismo é de longa permanência, deve-se tentar a recuperação do cateter, contudo, sem colocar em risco a saúde do doente.

Segundo Poole *et al.* a utilização de cateteres de hemodiálise com *locks* de vancomicina ou ceftazidima associada a heparina, estão associados a um certo grau de sucesso no tratamento dos doentes com bacteremia relacionada com o cateter, dependente do microrganismo, e na ordem dos 87% para bactérias Gram-negativas, 75% para *Staphylococcus coagulase* negativo e de 40% para *Staphylococcus aureus* (Poole *et*

al.,2004). No entanto, para Maya *et al.* a utilização de antibióticos sistêmicos e em *locks* foram capazes de salvar os cateteres infetados por *Staphylococcus aureus* em apenas 41% dos casos (Maya *et al.*, 2007). Já Raad *et al.*, sugerem que doentes com bacteremia por *Staphylococcus aureus* associada ao cateterismo, devem ser tratados com a remoção do cateter e posterior com antibioticoterapia endovenosa por um período de 10-14 dias. Se após os 3 dias do início do tratamento se verificar a permanência de febre ou cultura for positiva é indicativo de possíveis complicações como endocardite ou osteomielite (Raad *et al.*, 1992; de Oliveira, 2011)

Relativamente ao tipo de material utilizado no fabrico dos cateteres, verificou-se que os cateteres de politetrafluoretileno (PTFE) ou poliuretano estão associados a complicações infecciosas de menor gravidade do que os cateteres feitos de cloreto de poli vinil ou de polietileno (da Silva, 2013).

Embora as agulhas de aço tenham apresentado igual taxa de complicações infecciosas que os cateteres de (PTFE), é necessário avaliar as complicações geradas pelo uso destas, nos casos de infiltração de fluidos endovenosos em tecidos subcutâneos, principalmente associadas a drogas vesicantes (da Silva, 2013).

Assim sendo, para se evitarem os riscos associados às infeções decorrentes do uso de cateteres, devem-se adotar medidas preventivas, tais como a utilização de técnica asséptica e determinados protocolos de manuseamento dos cateteres, e medidas farmacológicas, tais como o uso antibióticos tópicos e *locks* do cateter com a colocação de antibióticos no lúmen (da Silva, 2013).

4. O Desafio para a indústria farmacêutica

Nos últimos anos, a comunidade científica foi alertada para a necessidade acrescida de desenvolver medicamentos antibacterianos para a resolução dos problemas associados à resistência aos antibióticos. Apesar de diversas pesquisas com o objetivo de descobrir novos fármacos antimicrobianos ou de novas modificações moleculares dos fármacos disponíveis no mercado, ainda não há garantias que as atuais pesquisas possam a longo prazo reduzir ou até eliminar a resistência microbiana.

Apesar desses esforços, ainda existe uma escassez no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos que apresentem um mecanismo de ação ou um novo alvo terapêutico de interesse contra bactérias multirresistentes, principalmente para bactérias Gram-negativas multirresistentes. Por outro lado, as indústrias farmacêuticas preferem desenvolver antibióticos de origem microbiana, dos quais existem diversos exemplos de serem altamente eficazes e que podem ser rapidamente comercializados tornando-se economicamente viáveis e de rápida recuperação do investimento. Contudo estes fármacos apresentam a desvantagem do desenvolvimento de resistência bacteriana num curto espaço de tempo.

A descoberta de um novo fármaco requer um longo trabalho árduo e dispendioso em termos de investimento de pessoal e económico. Anualmente, a indústria farmacêutica investe cerca de 40 bilhões de euros em pesquisas para o desenvolvimento de novos medicamentos, representando mais de 20% da sua faturação. Comparando com outros setores da economia a indústria farmacêutica despende mais 10% da sua faturação em relação aos outros setores.

Os estudos em novos materiais para dispositivos médicos que diminuam a adesão bacteriana e a formação de biofilmes é outro dos desafios da indústria. Devido à natureza geralmente hidrofóbica dessas superfícies microbianas, uma das estratégias no combate à aderência das células é o desenvolvimento de revestimentos a base de polímeros hidrofílicos e de superfícies antiadesivas com alterações físicas, químicas e

topográficas e de compostos que inibam a produção de adesinas bacterianas (Fernandes, 2007).

Os cateteres podem ser feitos de vários materiais, contendo um ou mais lumens, ser impregnados com antimicrobianos, antissépticos ou heparina capazes de evitar ou reduzir a proliferação de microrganismos. Estudos atuais mostram que novas estratégias estão a ser desenvolvidas no fabrico dos cateteres, tais como: modificação da superfície do cateter com moléculas hidratadas e propriedades antiaderentes, cateteres revestidos de antibióticos, balonetes impregnados com prata, cateteres com heparina e cateteres impregnados com sulfadiazina de prata, impregnados com antibióticos intra e extra-lúmens tais como a minociclina e a rifampicina (Fernandes, 2007).

As pesquisas têm-se centrado em dois grandes grupos: as pesquisas científicas e as pesquisas tecnológicas. As pesquisas científicas procuram novos compostos, sejam eles sintéticos, vegetais ou animais, as pesquisas tecnológicas procuram melhorias na farmacocinética dos fármacos (administração, absorção, tempo de semivida) e farmacodinâmica (novos recetores menos suscetíveis a resistências).

Conclusão

Os biofilmes são complexos ecossistemas microbianos que podem ser formados por populações desenvolvidas a partir de uma única espécie, ou de múltiplas espécies, podendo ser encontrados em uma variedade de superfícies bióticas e/ou abióticas.

Os biofilmes são constituídos por uma flora microbiana mista de grande diversidade microbiana e, são responsáveis por doenças do trato respiratório superior como a rinossinusite, as patologias da cavidade oral, a fibrose cística, entre outras. Também podem ocorrer como devido à implantação não cirúrgica de dispositivos médicos em regiões anatómicas que possuam uma flora microbiana mista.

Os antibióticos podem eliminar os sintomas da infecção provocada pelos biofilmes mas não o próprio biofilme, levando ao aparecimento de infecções recorrentes

As alterações dos hábitos e das condições de vida da população aumentaram o número e o tipo de doenças infecciosas crônicas relacionadas à produção de biofilmes microbianos. Considerando a crescente capacidade de adaptação que estes microrganismos apresentam e os seus correspondentes mecanismos de adaptação/sobrevivência, é de extrema importância a pesquisa científica nesta área, especialmente os estudos relativos ao desenvolvimento de resistência a antimicrobianos através da formação de biofilme, uma vez que os tratamentos atualmente disponíveis são ineficazes na erradicação da totalidade dos patogênicos.

As infecções bacterianas associadas à formação de biofilmes correspondem a mais de 80% dos casos em todo o mundo, neste sentido a medicina moderna tem direcionado os esforços para solucionar a propagação destas infecções bacterianas. Por outro lado, estas infecções têm sido associadas ao aumento da resistência a diferentes antibióticos, o que aumenta os custos com medicamentos e aumenta a morbimortalidade dos doentes. O

sucesso das terapias para estes quadros clínicos necessita de tratamentos com altas doses de antibióticos e por períodos prolongados.

Os biofilmes bacterianos e as infecções intracelulares têm um papel fundamental nas diversas infecções crônicas do trato respiratório superior. Atualmente, a remoção mecânica dos biofilmes, a remoção do órgão (adenoidectomia, amigdalectomia) ou a terapia específica com antibióticos são as opções atuais de tratamento no caso de infecções respiratórias altas.

Atualmente a formação de biofilmes microbianos tornou-se um problema de saúde pública, uma vez que podem ser formados nas superfícies de dispositivos médicos como: cateteres, lentes de contato, válvulas cardíacas, articulações artificiais e outros implantes. Cerca de 70% das todas as infecções nosocomiais estão associadas à presença de biofilmes em dispositivos médicos, o que contribui para o aumento significativo da morbimortalidade dos doentes. Assim sendo torna-se urgente o desenvolvimento de revestimentos antimicrobianos para superfícies que evitem as infecções. Neste sentido a melhoria da textura da superfície e a adsorção de proteínas com propriedades antiaderentes bem como o uso de *lock*-terapia ou selo-terapia cada vez mais eficientes, serão fundamentais na erradicação dos biofilmes. Por outro lado, as estratégias para a prevenção de infecções associadas a dispositivos invasivos implicam uma atualização permanente dos profissionais de saúde e da implementação de uma cultura de discussão e planejamento dos cuidados de saúde.

Os tratamentos futuros com agentes terapêuticos para agentes patogênicos intracelulares em combinação com novos agentes que destruam os biofilmes poderão estabelecer uma possibilidade terapêutica mais específica e com maior sucesso na erradicação das bactérias presentes nos biofilmes e nas células.

Bibliografia

Adam, B. *et al.* (2002). Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol*; 51, pp. 344–349.

Alekshun, M. N. e Levy, S. B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 23, pp. 1037-1050.

Alkawash, M. A. *et al.* (2006). Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 114, pp. 131-138.

Allen, N. E. e Nicas, T. I. (2003). Mechanism of action of oritavancin and related glycopeptide antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26, pp. 511-532.

Al-Mutairi, D. e Kilty, S. J. (2011). Bacterial biofilms and the pathophysiology of chronic rhinosinusitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.*, 11(1), pp. 18-23.

Arirachakaran, P. *et al.* (2012). Infection of human gingival fibroblasts with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: An in vitro study. *Arch Oral Biol*, 57(7), pp. 964-972.

Baillie G. e Douglas J. (1999). *Candida* biofilms and their susceptibility to antifungal agents. Biofilms. New York: Academic Press.

Baker-austin, C. *et al.* (2006.). Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.*, 14, pp. 176–182.

Bendouah, Z. *et al.* (2006). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* is associated with an unfavorable evolution after surgery for

chronic sinusitis and nasal polyposis. *Otolaryngol Head Neck Surg.*, 134(6), pp. 991-996.

Berg, V. *et al.* (2008). Carboxylic acid isosteres improve the activity of ring-fused 2-pyridones that inhibit pilus biogenesis in *E. coli*. *Bioinorganic & Medicinal Chemical Letters*, 18, pp. 3536-3540.

Boari, C. A. (2008). *Formação de biofilme em aço inoxidável por Aeromonas hydrophila e Staphylococcus aureus sob diferentes condições de cultivo*. Tese de Doutorado em Ciências dos Alimentos. Lavras: Universidade Federal de Lavras.

Boucher, H. W. *et al.* (2009). Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America, *Clin. Infect. Dis.*, 48, pp. 1–12.

Boyd, A., Chakrabarty, A. M. (1994) *Role of alginate lyase in cell detachment of Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2355-2359.

Capelletti, R. V. (2006). *Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluidos de corte na usinagem de metais*. Tese de Mestrado em engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas: Campinas.

Caramori, J. T. *et al.* (2002). *Acessos vasculares para hemodiálise. Doenças vasculares periféricas*. Rio de Janeiro: Medsi.

Castro, S. S. (2010). Rinossinusite crônica: papel dos biofilmes. 48(4), pp. 201-205.

Ceri, H. *et al.* (1999). The Calgary Biofilm Device: Measurement of antimicrobial sensitivity of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol*, 37, pp. 1771-1776.

Chamberlain, A. H. L. (1992) *The role of adsorbed layers in bacterial adhesion*. In: Melo, L. F., Bott, T. R., Fletcher, M. e Capdeville, B. eds. *Biofilm. – Science and Technology*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Characklis, W. G. e Marshall, K. C. (1990) *Biofilm: A basis for an interdisciplinary approach*. New York: John Wiley and Sons Inc.

Chen, L.e Wen, Y. M. (2011). The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. *International Journal of Oral Sciences*, 3, pp. 66-73.

Chole, R. A. e Faddis, B. T. (2003). Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissues: a possible mechanism to explain chronicity. *Arch Otolaryngol HeadNeck Surg.*, 129(6), pp. 634-636.

Costerton, J. W. e Lewandowski, Z. (1997). The biofilm lifestyle. *Adv.Dent.Res*, 11, pp. 192-195.

Costerton, J. W. e Stewart, P. S. (2000). *Biofilms and device related infections. Persistent bacterial infections*. Washington: American Society for Microbiology. DC.

Costerton, J. W. *et al.* (1995). Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol*, 49, pp. 711-745.

Costerton, J. W. *et al.* (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, pp. 1318-1322.

Costerton, J. W. *et al.* (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent *Infections. Science*, 284, pp. 1318-1322

Courter, J. D. *et al.* (2010). Increased clinical failures when treating acute otitis media with macrolides: a meta-analysis. *Ann Pharmacother*, 44(3), pp. 471-478.

Cummins, J. *et al.* Subinhibitory concentrations of the cationic antimicrobial peptide colistin induce the pseudomonas quinolone signal in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 155, pp. 2826-2837, 2009.

Curtis, M. A. *et al.* (2005). Slaney, JM; Aduse-Opoku, J. Critical pathways in microbial virulence. *J. Clin. Periodontol.* 32 (6), pp. 28-38.

da Silva, H. R. (2013). Biofilme: ameaça invisível em ambientes cirúrgicos. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research*, 4(1), pp.43-48.

Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Review Drug Discovery*, 2, pp. 114-122.

Davis C. P. (1996). *Normal Flora*. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. (4th ed.) [Em linha]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7617/>. Consultado em 10 de abril de 2015].

de Oliveira, K. R. (2011). *Análise da formação de biofilmes em cateteres: métodos de identificação e controle*. Monografia para obtenção do grau de pós-graduação. Governador Valadares: universidade vale do Rio Doce.

Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), pp. 881-890.

Donlan, R. M. e Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), pp. 167-193.

Donlan, R. M. e Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *ClinMicrobiol Rev*, 15, pp.167-193.

Donlan, R. M. *et al.* (2001). Protocol for detection of biofilms on needleless connectors attached to central venous catheters. *J. Clin. Microbiol.*, 39, pp. 750-753.

Fernandes, A. T. (2007). Novas tecnologias para o controle das infecções relacionadas ao acesso vascular. *Intravenous*, 17, pp. 5-6.

Fokkens, W. *et al.* (2007). European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps. *Rhinology.*, 45 (20), pp. 1-139.

Gaetti-Jardim Júnior, E. *et al.* (2010). [Em linha]. Disponível em: http://www.icb.usp.br/bmm/mariojac/index.php?option=com_content&view=article&id=48&Itemid=58&lang=br. Consultado em 24 de junho de 2015].

Gamberoni, G. *et al.* (2006). Finding biological process modifications in cancer tissues by mining gene expression correlations. *BMC Bioinformatics*, 7, pp. 6-10.

Gantzer, C. J *et al.* (1989). *Structure and Function of Biofilms*. Chichester: John Wiley & Sons. Chichester.

Gjaltema, A. (1996). Dissertação de Doutorado: *Biofilme Development: Growth versus Detachment*. Delft: Technische Universiteit Delft.

Hall-Stoodley, L. e Lappin-Scott, H. (1998). Biofilm formation by the rapidly growing mycobacterial species, *Mycobacterium fortuitum*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 168, pp. 77-84.

Hall-Stoodley, L. e Stoodley, P. (2009). Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular Microbiology*, 11(7), pp. 1034-1043.

Hoiby, N. *et al.* (2010). O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 35, pp. 322-332.

Hoiby, N. *et al.* (2011). The clinical impact of bacterial biofilms. *International Journal of Oral Science*, 3, pp. 55-65.

Igney, F. H. e Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.*, 2(4), pp. 277-288.

Jayaraman, R. (2009). Antibiotic resistance: an overview of mechanisms and a paradigm shift, *Curr. Sci.*, 96(11), pp. 1475-1484.

Jenkinson, H. F. e Lamont, R. J. (2005). Lamont, *Oral microbial communities in sickness and in health. Trends Microbiol*, 13(12), pp. 589-595.

Jervoe-Storm, P. M. *et al.* (2007). Microbiological outcomes of quadrant versus full-mouth root planning as monitored by real-time PCR. *J. Clin. Periodontol.* 34, pp. 156-163.

Kaplan, J. B. *et al.* (2004). Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, pp. 2633-2636.

Kolenbrander, P. E. *et al.* (2006). Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol.* 2000(42), pp. 47-79.

Kornman, K. S. e Loesche, W. J. (1982). Effects of estradiol and progesterone on *Bacteroides melaninogenicus* and *Bacteroides gingivalis*. *Infect Immun.*, 35(1), pp. 256-263.

Kratzer C. *et al.* (2007). Comparative activities of antibiotics against intracellular non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Wien Klin Wochenschr.*, 119(9-10), pp. 297-302.

Leach, A. *et al.* (2008). Topical ciprofloxacin versus topical framycetin-gramicidin-dexamethasone in Australian aboriginal children with recently treated chronic suppurative otitis media: a randomized controlled trial. *Pediatr Infect Dis J.*, 27(8), pp. 692-698.

Ledder, R. G *et al.* (2007). Molecular analysis of the subgingival microbiota in health and disease. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, pp. 516-523.

Lewis, K. Programmed death in bacteria. (2007). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64, pp. 503-514.

Lund, V. (2008). Therapeutic Targets in Rhinosinusitis: Infection or Inflammation? *Medscape J Med.*, 10(4), pp. 105-111.

Lutz, L. *et al.* (2011). Cystic fibrosis bacteriology. *Rev HCPA*, 31(2), pp. 168-184.

Mah, T. F. (2012). Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiol*, 7(9), pp. 1061-1072.

Mann, E. E. *et al.* (2009). Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One*, 4, pp. 1-12.

Marshall, K. C. e Blainey, B. L. (1990). *Biocorrosion in Industrial Water Systems*. Heidelberg: Springer.

Maya, I. D. *et al.* (2007). Treatment of dialysis catheter-related *Staphylococcus aureus* bacteremia with an antibiotic lock: a quality improvement report. *Am J Kidney Dis.*, 50, pp. 289-295.

Meeks, M. e Bush, A. (2000). Primary ciliary dyskinesia (PCD). *Pediatr Pulmonol.*, 29(4), pp. 307-316.

Melo, L. F. (1994). Biofilmes e o Controle da Poluição. *Boletim de Biotecnologia*, 48(16-25), pp. 203-221.

Meurman, J. H. (2010). Oral microbiota and cancer. *J Oral Microbiol.*, 2, pp. 1-8.

Morris, P. S. *et al.* (2010). Single-dose azithromycin versus seven days of amoxicillin in the treatment of acute otitis media in Aboriginal children (AATAAC): a double blind, randomised controlled trial. *Med J Aust.*, 192(1), pp. 24-9.

Nascimento, T. e Taveira, N. (2001). Os biofilmes microbianos como agentes causais de doenças humanas. *Biologias*, 4, pp. 1-6.

Neu, T. R. (1996) Significance of bacterial surface active compounds in interaction of bacteria with interface. *Microbiol. Rev.*, 60, pp. 151-166.

Nobbs, A. H. *et al.* (2009). Streptococcus Adherence and Colonization. *Microbiology and molecular biology reviews*, 9, pp. 407–450.

O'Grady, N. P. (2002). Applying the science to the prevention of catheter-related infections. *J. Crit. Care.*, 17, pp. 114-121.

O'Toole, G. A. e Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.*, 30, pp. 295-304.

Otto, M. (2013). Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual Review of Medicine*, 64, pp. 175- 188.

Parsek, M. R. e Singh, P. K. (2003). Bacterial Biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual Reviews Microbiology*, 57, pp. 677-701.

Paster, B. J. *et al.* (2006). The breadth of the bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontology*, 2, pp. 80-87.

Patel, R. (2005). Biofilms and antimicrobial resistance. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 437, pp. 41-47.

Pereira, E. S. (2011). *Expressão genética de streptococcus em biofilmes produzidos in vitro submetidos à terapia fotodinâmica antibacteriana*. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia. Ceará: Universidade Federal do Ceará.

Pereira, M. O. (2001) Dissertação de Doutoramento: *Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme*. Universidade do Minho. Braga. Portugal.

Pina, E. *et al.* (2010). Infecções associadas aos cuidados de saúde e segurança do doente. *Rev Port Saúde Pública*, 10, pp. 27-39.

Pinkner, J. S. *et al.* (2006). Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uro-pathogenic bacteria. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, pp. 17897-17902.

Plati, J. *et al.* (2008). Dysregulation of apoptotic signaling in cancer: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *J Cell Biochem.*, 104(4), pp. 1124-1149.

Poole, C. V. *et al.* (2004). Treatment of catheter-related bacteraemia with an antibiotic lock protocol: effect of bacterial pathogen. *Nephrol Dial Transplant.*, 19, pp. 1237-1244.

Potera, C. (1999). Forging a link between biofilms and disease. *Science*, 283, pp. 1837-1839.

Prescott, L. M. *et al* (2005). *Microbiology*. (6th ed., pp. 578- 777). New York: McGraw Hill.

Prince, A. A. *et al.* (2008). Prevalence of Biofilm forming bacteria in Chronic Rhinosinusitis. *Am J Rhinol*, 22(3), pp. 239-245.

Psaltis, A. J. *et al.* (2007). Confocal Scanning Laser Microscopy Evidence of Biofilms in Patients with Chronic Rhinosinusitis. *Laryngoscope*, 117(7), pp. 1302-1306.

Psaltis, A. J. *et al.* (2008). The effect of bacterial biofilms on post-sinus surgical outcomes. *Am J Rhinol.*, 22(1), pp. 1-6.

Raad, I. e Sabbagh, M. F. (1992). Optimal duration of therapy for catheter-related *Staphylococcus aureus* bacteremia: a study of 55 cases and review. *Clin Infect Dis.*, 14, pp. 75-82.

Raad, I. *et al.* (2007). Intravascular catheter-related infections: advances in diagnosis, prevention, and management. *Lancet Infect Dis.*, 7, pp. 645-657.

Raju, B. e Ibrahim, S. O. (2011). Pathophysiology of oral cancer in experimental animal models: a review with focus on the role of sympathetic nerves. *J Oral Pathol Med.*, 40(1), pp. 1-9.

Ratsak, C. H. *et al.* (1996) *Effects of protozoa on carbon mineralization in activated sludge. Review. Wat. Res.* 30, pp.1-12.

Rimondini, L. *et al.* (2005). The microbial infection of biomaterials: a challenge for clinicians and researchers. a short review. *J. Appl. Biomater. & Biomech.*, 3, pp. 1-10.

Romling, U. e Balsalobre, C. (2012). Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of Internal Medicine*, 272: pp. 541–561.

Rufini, A. e Melino, G. (2011). Cell death pathology: the war against cancer. *Biochem Biophys Res Commun.*, 414(3), pp. 445-450.

Sanclément, J. A. *et al.* (2005). Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*, 115(4), pp. 578-582.

Sanderson, A. R. *et al.* (2007). Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope*, 116(7), pp. 1121-1126.

SChaber, J. A. *et al.* (2007). *Pseudomonas aeruginosa* forms biofilms in acute infection independent of cell-to-cell signaling. *Infection and Immunity*, 75, pp. 3715-3721.

Scopel, M. *et al.* (2013). Dipeptide cis-cyclo(LeucylTyrosyl) produced by sponge associated *Penicillium* sp. F37 inhibits biofilm formation of the pathogenic *Staphylococcus epidermidis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23, pp. 624-626.

Scully, C. (2002). Oral squamous cell carcinoma; from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. *Oral Oncol.*, 38(3), pp. 227-234.

Silveira, I. C. M. C. (2012). *OralOme - O Contributo dos Microrganismos*. Dissertação de Mestrado. Porto: Universidade Católica Portuguesa.

Simões, A. M. C. *et al.* (2007). Ocorrência de infecção urinária em pacientes de um hospital universitário. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, 28(2), pp. 215-219.

Singh, A., *et al.* (2011). The capsule of *Porphyromonas gingivalis* leads to a reduction in the host inflammatory response, evasion of phagocytosis, and increase in virulence. *Infect Immun*, 79(11), pp. 4533-4542.

Singh, P. K. *et al.* (2000). Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature*, 407, pp. 762-764.

Singh, P. K. *et al.* (2002). A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*, 417, pp. 552-555.

Smith, A. W. (2005). Biofilms and antibiotic therapy: is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems?. *Adv Drug Deliv Rev.*, 57(10), pp. 1539-1550.

Soto, S. M. (2013). Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*, 4(3), pp. 223-229.

Stewart, P. S. e Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol*, 6, pp. 199–210,

Stewart, P. S., J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet.*, 358(9276), pp. 135-138.

Storpiritis, S. *et al.* (2011). *Ciências Farmaceuticas: Biofarmacotécnica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Storti, A. (2006). *Colonização de cateteres venosos centrais por biofilme microbiano*. Tese de pós graduação em Ciências Farmacêuticas. Araraquara: Universidade Estadual Paulista.

Thornton, R. e Coate, H. (2012). [Em linha]. Disponível em: http://www.iapo.org.br/manuals/x_manual_iapo_pt_25.pdf. Consultado em 10 de abril de 2015].

Tlaskalová-Hogenová, H. *et al.* (2004). Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunology Letters*, 93, pp. 97-108.

Trentin, D. S. *et al.* (2011a). Antibiofilm activity of *Cobetia marina* filtrate upon *Staphylococcus epidermidis* catheter-related isolates *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, pp. 1329-1333.

Trentin, D. S. *et al.* (2011a). Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *Journal of Ethnopharmacology*, 137, pp. 327-335.

Trentin, D. S. *et al.* (2013). Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. *Revista Liberato*, 14(22), pp. 113-238, jul./dez. 2013.

Viana, E. S. (2006). *Moléculas sinalizadoras de quorum sensing em biofilmes formados por bactérias psicotrópicas isoladas de leite*. Tese de Doutorado Microbiologia Agrícola. Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa.

Vieira, L. B. (2005). Eficácia do bochecho de quitosana 0,4% sobre o biofilme e bactérias orais. Dissertação de Mestrado em Odontologia. Rio Grande do Norte: Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Vieira, M. J. (1995) Dissertação de Doutorado: *Estudo da formação de biofilmes biológicos por Pseudomonas fluorescens e dos efeitos associados à transferência de massa interna e à incorporação de partículas de caulino*. Universidade do Minho. Braga. Portugal.

Zimmer, K. R. *et al.* (2013). A steroidal molecule present in the egg wax of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inhibits bacterial biofilms. *Environmental Microbiology*, 15, pp. 2008-2018.

Zuliani, G. *et al.* (2006). Identification of adenoid biofilms in chronic rhinosinusitis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 70(9), pp. 1613-1617.