

Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate¹

Danielle da Silva Trentin²
Raquel Brandt Giordani³
Alexandre José Macedo⁴

Resumo

Estima-se que 80% das infecções humanas estejam associadas a biofilmes bacterianos, especialmente aquelas que envolvem implantes biomédicos, como próteses e cateteres. Devido ao aumento da expectativa de vida humana, maior é a necessidade de substituição de funções biológicas, aumentando, assim, o número de pessoas que receberão algum dispositivo implantável. Nesse sentido, grandes esforços são destinados à busca de terapias, capazes de prevenir ou erradicar biofilmes patogênicos, incluindo a pesquisa de novos compostos, novos mecanismos de ação e a criação de materiais com superfícies anti-infectivas. Esta revisão descreve os aspectos envolvidos na adesão e formação de biofilmes bacterianos, a importância clínica e econômica dessas infecções, bem como as recentes estratégias, para o seu combate.

Palavras-chave: Adesão bacteriana. Biofilme. Implantes biomédicos.

Abstract

It is estimated that 80% of human infections are associated with bacterial biofilms, especially those related to medical implants, such as catheters and prostheses. Due to the increasing life expectancy, greater is the need for replacement of biological functions, thereby increasing the number of people who will receive some implantable medical device. Therefore, great efforts are aimed at seeking therapies, which are capable of preventing or eradicating pathogenic biofilms, including the search for new compounds, new action mechanisms and the design of materials presenting anti-infective surfaces. This review focuses on the issues involved in bacterial adhesion and biofilm formation, the clinical and economical importance of these infections, as well as the recent strategies against biofilms.

Keywords: Bacterial adhesion. Biofilm. Implanted medical devices.

¹ Este artigo é o resumo da revisão da literatura da tese apresentada no Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil, em 04/02/2013, sob a orientação do Prof. Dr. Alexandre José Macedo e coorientação da Prof. Dr. Raquel Brandt Giordani. Este estudo contou com o apoio financeiro do CNPq e da CAPES (NANOBIOTEC-Brasil) e o apoio técnico do Centro de Microscopia Eletrônica (CME/UFRGS).

² Aluna de pós-doutorado da Faculdade de Farmácia e Centro de Biotecnologia, Grupo de Biofilmes e Diversidade Microbiana (UFRGS), Porto Alegre, RS. E-mail: danistrentin@gmail.com

³ Doutora em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS e professora da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, RN, Brasil. E-mail: raquebg@hotmail.com

⁴ Doutor em Microbiologia pela Technische Universität Braunschweig, Alemanha e professor da UFRGS, Porto Alegre, RS. E-mail: alexandre.macedo@ufrgs.br

1 Introdução

Infecções, causadas por agentes etiológicos amplamente resistentes aos antimicrobianos, representam um dos grandes desafios atuais da saúde pública, acarretando em altas taxas de morbi-mortalidade, aumento no tempo de internação e nos gastos do sistema de saúde (NEIDELL *et al.*, 2012). O crescente uso de biomateriais implantáveis vem elevando a expectativa de vida humana, através do re-estabelecimento de inúmeras funções vitais, mas concomitantemente, exarceba esse problema, sendo que as infecções associadas a biomateriais passaram a ser reconhecidas como um dos maiores problemas clínicos (BUSSCHER *et al.*, 2012). De acordo com o órgão norte-americano “National Institutes of Health”, aproximadamente 80% de todas as infecções no mundo estão associadas a biofilmes, especialmente, envolvendo biomateriais.

Na década de 90, a importância dos biofilmes bacterianos foi destacada por Costerton, Stewart e Greenberg (1999), os quais salientaram que a formação de biofilmes e a sua inerente resistência aos antimicrobianos constituem a causa de muitas infecções crônicas e persistentes. O estudo dos biofilmes é bastante recente, possuindo em torno de 35 anos, e envolve diversas áreas do conhecimento científico, sendo uma ciência multidisciplinar. Sua importância destaca-se pela presença de mais de 24 mil artigos científicos publicados em base de dados. No entanto, ainda há muito a ser entendido no que diz respeito aos biofilmes bacterianos, desde a sua formação, a sua regulação, assim como os mecanismos envolvidos na resistência dos biofilmes aos agentes antimicrobianos. Nesse contexto, cabe salientar a importância dos estudos, envolvendo a fisiologia de biofilmes e, ao mesmo tempo, é extremamente desafiador os estudos que envolvem a busca por novas estratégias para controlar esse complexo modo de vida bacteriano.

2 Aspectos gerais da adesão bacteriana e formação de biofilmes

A diversidade metabólica e a capacidade de adaptação a estresses ambientais são características fundamentais dos micro-organismos. As bactérias existem em dois estados de vida básicos: como células planc-tônicas, também conhecidas como células de vida livre ou como células sésseis, também conhecidas como biofilmes. As células planctônicas são importantes para a rápida proliferação e propagação dos micro-organismos para novos territórios, enquanto que as células sésseis caracterizam a cronicidade. Biofilmes têm sido descritos em muitos sistemas desde que Antony van Leeuwenhoek, em 1675, examinou “pequenos animais” no seu próprio dente, mas a teoria geral da existência de biofilmes só foi promulgada em 1978 (COSTERTON; GEESEY; CHENG, 1978). Desde então, estudos têm revelado que a maioria das bactérias não cresce como células individuais, mas em comunidades estruturadas como organismos pseudomulticelulares ou biofilmes, estando presentes em praticamente todos os ecossistemas naturais e patogênicos (COSTERTON *et al.*, 1987; LÓPEZ; VLAMAKIS; KOLTER, 2010).

A adesão bacteriana, seja em uma superfície abiótica (inanimada, como plásticos e metais) ou biótica (como células e tecidos animais ou vegetais), é o primeiro estágio na formação de biofilmes e é considerado um processo bastante complexo. Como regra geral, a adesão primária (ou adesão reversível) entre bactérias e superfícies abióticas ocorre mediada por interações físico-químicas não específicas, enquanto que a adesão a superfícies bióticas é acompanhada por interações moleculares mediadas por ligações específicas do tipo receptor-ligante (DUNNE, 2002).

Considerando superfícies abióticas, a atração inicial das células bacterianas planctônicas à superfície ocorre aleatoriamente, através do movimento browniano e da força

gravitacional ou, de modo dirigido, via quimiotaxia e motilidade, através de flagelos e pili (O'TOOLE; KOLTER, 1998). O estágio de adesão reversível é, portanto, ditado por interações físico-químicas não específicas de

longo alcance entre a bactéria e o material, incluindo forças hidrodinâmicas, interações eletrostáticas, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas (DUNNE, 2002; PAVITHRA; DOBLE, 2008) (figura 1).

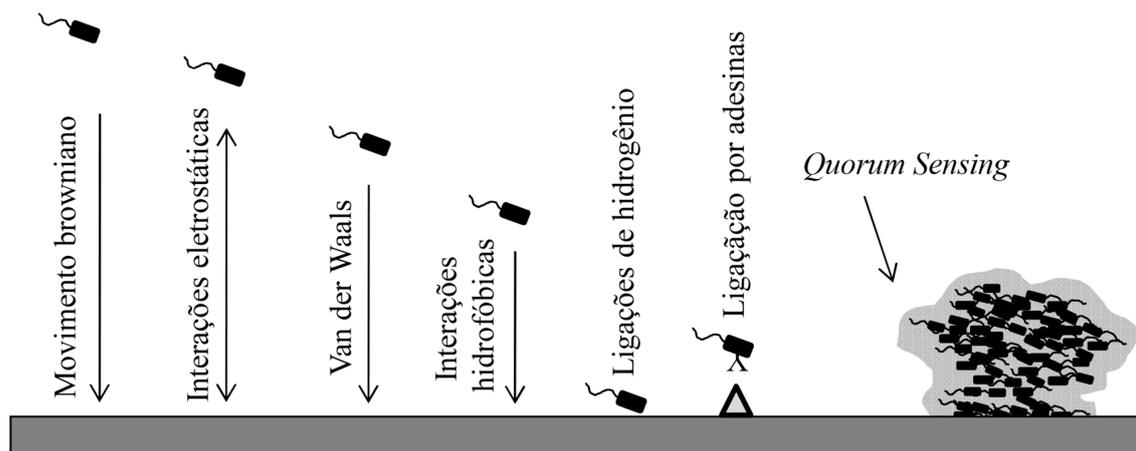


Figura 1: Interações envolvidas na adesão reversível de células bacterianas planctônicas à superfície abiótica. A atração inicial das bactérias à superfície ocorre através do movimento browniano ou de modo dirigido, através de flagelos. As interações físico-químicas não específicas, envolvidas na adesão reversível, incluem as interações eletrostáticas de van der Waals e hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e por adesinas, podendo culminar na adesão irreversível

Fonte: Adaptado de Pascual (2002).

Uma vez que o organismo e a superfície alcançam uma proximidade crítica (em torno de 1 nm), a determinação final de adesão depende da soma de forças de atração ou repulsão gerada entre as duas superfícies. Essas interações eletrostáticas tendem a favorecer a repulsão, porque a maioria das bactérias e superfícies inertes é carregada negativamente; por outro lado, as interações hidrofóbicas parecem apresentar maior influência sobre o resultado da adesão primária. A repulsão entre duas superfícies pode ser superada por interações do tipo ligações de hidrogênio ou por interações moleculares específicas, mediadas por adesinas, como o pili (figura 1). A fim de entender se a fixação bacteriana às superfícies é regulada pelas mesmas interações físico-químicas que determinam a deposição

de partículas coloidais inanimadas (partículas dispersas com diâmetro compreendido entre 1 nm e 1 µm), a utilização de modelos teóricos, para prever esse fenômeno, vêm sendo considerada (KATSIKOIANNI; MISSIRLIS, 2004).

Ao se considerar que a superfície do material em questão pode ser um dispositivo biomédico (como cateteres urinários, cateteres venosos centrais, tubos endotraqueais, próteses e válvulas cardíacas) e que esse dispositivo será implantado em um hospedeiro, a adesão reversível entre a bactéria e a superfície pode ocorrer de maneira direta ou através de um filme condicionante (figura 2). O filme condicionante é um filme orgânico que possui composição variável, de acordo com o sítio de inserção, mas é constituído, prin-

principalmente, por proteínas, como albumina, imunoglobulina, fibrinogênio e fibronectina (HERRMANN *et al.*, 1988; GOTTENBOS *et al.*, 2002; ROCHFORD; RICHARDS; MORIARTY, 2012). Uma vez que uma superfície está condicionada, suas propriedades

são permanentemente alteradas, de modo que a afinidade de um micro-organismo por uma superfície original ou condicionada pode ser bastante diferente, evidenciando a dificuldade imposta, para controlar a adesão bacteriana às superfícies abióticas.

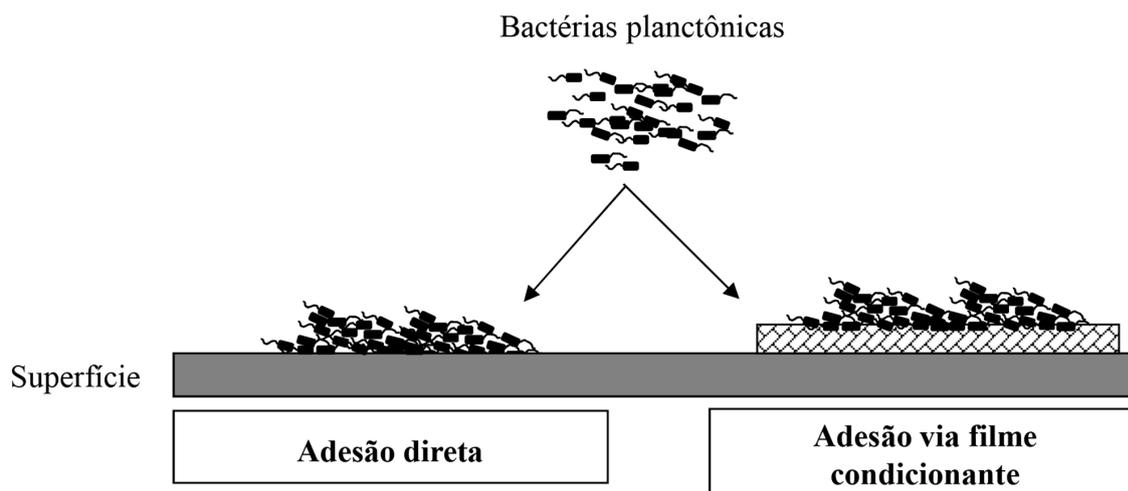


Figura 2: Adesão bacteriana em superfícies abióticas. A adesão bacteriana direta ocorre no momento ou próximo do momento da inserção de um implante, enquanto que a adesão via filme condicionante ocorre mais tarde, dias depois da inserção do implante.

Fonte: Os autores (2013).

Muitas evidências indicam que, após a adesão de células bacterianas, ocorre um aumento na produção, na liberação e na detecção de moléculas sinalizadoras autoindutoras que regulam a formação de biofilme (DAVIES *et al.*, 1998; BJARNSHOLT; GIVSKOV, 2007; HODGKINSON; WELCH; SPRING, 2007). Conforme a densidade bacteriana aumenta, essas moléculas autoindutoras podem se acumular e induzir a transcrição de genes específicos que regulam várias funções como motilidade, virulência, produção de matriz exopolissacarídica (EPS) e a formação de biofilmes. Esse processo de comunicação encontrado em muitas bactérias patogênicas, que acopla a transcrição de genes específicos com a densidade celular bacteriana, é referido como *Quorum sensing* (QS). O sistema

QS de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Vibrio cholerae* encontra-se, ao menos em parte, elucidado (RUTHERFORD; BASSLER, 2012).

A segunda etapa da adesão bacteriana é a adesão secundária ou adesão irreversível. Nesse momento, os micro-organismos fracamente ligados à superfície consolidam o processo de adesão, através da produção de EPS. Durante essa fase de adesão, os micro-organismos são capazes de se ligar a células da mesma ou de diferentes espécies, formando agregados que vão estar firmemente ligados à superfície (STOODLEY *et al.*, 2002). A figura 3 ilustra o processo da formação de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, destacando a progressiva produção de EPS, de acordo com o aumento no tempo de incubação.

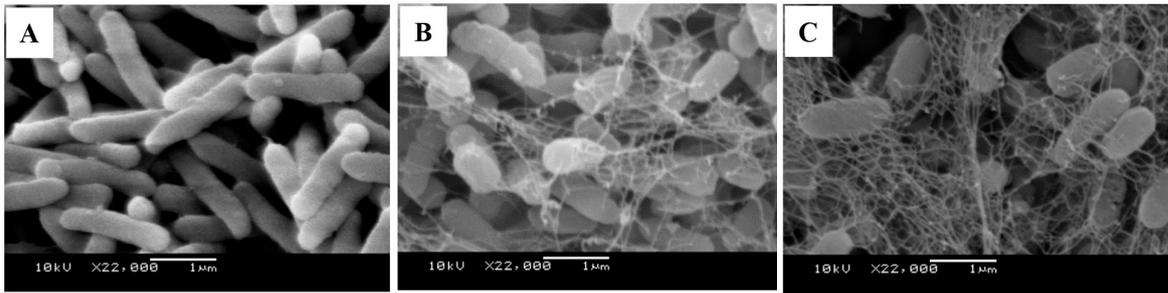


Figura 3: Imagens (A, B, C) de microscopia eletrônica de varredura demonstram o processo de adesão e formação de biofilme de *P. aeruginosa* ATCC 27853 e a progressiva produção de EPS. A, B e C representam os tempos de incubação de 6, 24 e 48 horas, respectivamente, a 37°C com magnificação de 22 000X
 Fonte: Os autores (2012).

Tipicamente, biofilmes maduros consistem de estruturas semelhantes a cogumelos, envoltos pelo EPS, permeados por canais de água. Esses canais funcionam como um sistema circulatório de entrega de nutrientes, da interface para o interior do biofilme e de remoção de restos metabólitos (HALL-STOODLEY COSTERTON; STOODLEY, 2004). As bactérias por si mesmas representam uma fração variável (5-35%) do total do

volume do biofilme, o restante do volume é de EPS (POZO; PATEL, 2007). Sob determinadas situações, quando o ambiente não se encontra mais favorável ou, ainda, devido a uma programação celular para a virulência, ocorre o desprendimento de células planc-tônicas ou de grupos de células unidas pelo EPS que podem colonizar novo local (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2005; BAYLES, 2007) (figura 4).

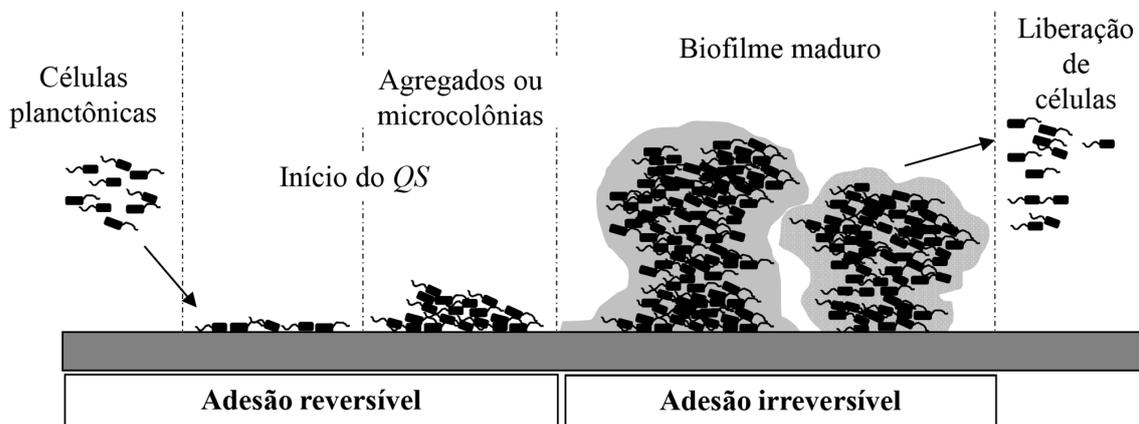


Figura 4: Estágios do desenvolvimento dos biofilmes: adesão reversível com a formação de microcolônias, a adesão irreversível com a produção de EPS e formação de estruturas com formato típico de cogumelos e, por fim, a ruptura dos biofilmes
 Fonte: Adaptado de Macedo e Abraham (2009).

Dessa maneira, a adesão bacteriana é um processo bastante complexo que envolve a interação multifacetada de três componentes: a bactéria, a superfície (biótica ou abiótica) e

o microambiente em que eles se encontram (DAROUICHE, 2001). Nesse sentido, existem diversas variáveis que podem influenciar esse processo, como os ilustrados na figura 5.

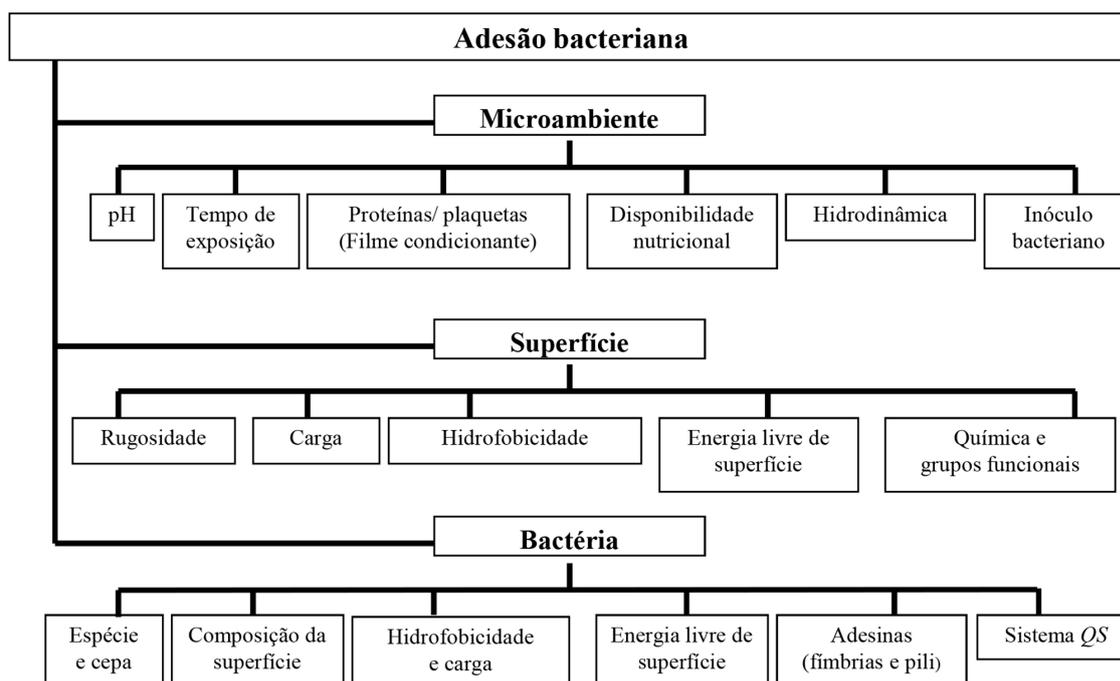


Figura 5: Diversos parâmetros que influenciam na adesão bacteriana, dentre eles, fatores relacionados à superfície em questão, à bactéria envolvida e ao microambiente em que ambos se encontram

Fonte: Adaptado de Darouiche (2001).

3 Importância clínica e impacto econômico das infecções associadas a biofilmes

A adesão bacteriana e a consequente formação de biofilme possuem um papel importante na patogênese, representando um grande obstáculo para a saúde humana, sendo causa comum de infecções persistentes (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). De acordo com o órgão norte-americano “National Institutes of Health”, biofilmes estão associados a aproximadamente 80% de todas as infecções médicas no mundo (NIH, 2002), incluindo endocardites, otites, prostatites, periodontites, conjuntivites, vaginites, infecções relacionadas à fibrose cística e como importantes colonizadores de implantes biomédicos, tais como cateteres venosos, arteriais e urinários, dispositivos intrauterinos, lentes de contato e próteses (DONLAN; COSTERTON, 2002; HOIBY *et al.*, 2011).

Uma das mais importantes características dos biofilmes bacterianos é a sua resistência ao sistema imune do hospedeiro e aos agentes antimicrobianos. Bactérias que vivem nessas comunidades são frequentemente de 10 a 1000 vezes mais tolerantes aos antimicrobianos do que quando na forma planctônica (DAVIES, 2003), indicando que alguns dos mecanismos envolvidos na resistência dos biofilmes aos antimicrobianos diferem dos mecanismos responsáveis pela resistência de bactérias planctônicas aos mesmos agentes (STEWART, 2002). Dessa maneira, micro-organismos que apresentam suscetibilidade a determinados antimicrobianos em testes laboratoriais convencionais são, na verdade, altamente resistentes aos mesmos, quando na forma de biofilmes e, como consequência, doenças envolvendo biofilmes são geralmente crônicas e difíceis de tratar. Diversos fatores têm sido postulados, para explicar a baixa suscetibilidade

aos antimicrobianos de células na forma de biofilmes (DONLAN; COSTERTON, 2002; DAVIES, 2003), incluindo:

a) Baixa penetração de agentes químicos:

O EPS reduz a capacidade de penetração de antimicrobianos em todas as áreas do biofilme. O EPS pode: (i) atuar como barreira física para difusão, retendo grande parte dos agentes antimicrobianos e, assim, reduzir a quantidade do mesmo para agir sobre as células e (ii) interagir, quimicamente, com esses agentes, sequestrando os antimicrobianos hidrofílicos e carregados positivamente, tais como os aminoglicosídeos (NICHOLS *et al.*, 1988). Além disso, bactérias na forma de biofilme resistentes a antimicrobianos podem se apresentar suscetíveis ao tratamento, após a dispersão ou desagregação do biofilme, uma observação que suporta a ideia de que a matriz de EPS protege o biofilme, através da limitação do transporte de agentes antimicrobianos (DAVIES, 2003);

b) Crescimento lento de células no interior do biofilme:

As bactérias em biofilmes constituem populações heterogêneas com variada taxa de crescimento e variada suscetibilidade aos antimicrobianos (STEWART; FRANKLIN, 2008). A tolerância aos antimicrobianos pode resultar da inibição da morte celular natural em uma população de células bacterianas, conhecidas como células dormentes ou persistentes (“persisters”). Essa população apresenta reduzida taxa metabólica e comumente encontra-se na base da estrutura dos biofilmes, onde há limitada oferta de oxigênio. O baixo metabolismo dessas células persistentes garante a sua resistência ao tratamento com antimicrobianos, visto que os antimicrobianos geralmente agem na fase de crescimento bacteriano, como síntese protéica, síntese de ácidos nucleicos e de parede celular. Dessa forma, o tratamento pode conduzir à erradicação da maior parte da população do biofilme, mas a fração de células persistentes não é atingida e atua, portanto, como um núcleo para reinfecção, após a descontinuação terapêutica (STEWART, 2002; LEWIS, 2012) (figura 6);

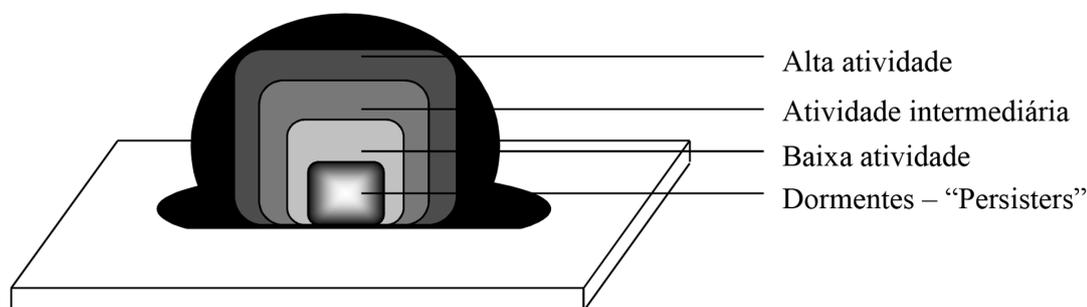


Figura 6: A heterogeneidade populacional com variada atividade metabólica em uma microcolônia de biofilme: no interior, a presença de células em estado de latência metabólica; no topo do biofilme, as células que apresentam alta atividade metabólica

Fonte: Adaptado de Davies (2003).

c) Transferência de genes de resistência: Biofilmes são idealmente adequados para a troca de material genético devido à proximidade das células bacterianas. Dessa forma, a vida em comunidade facilita a transferência horizontal de genes, através de plasmídeos, os quais podem codificar

resistência para múltiplos agentes antimicrobianos (MADSEN *et al.*, 2012);

d) Falha no reconhecimento dos biofilmes pela defesa imunológica humana:

Devido à presença do EPS, o sistema imune encontra dificuldade para reconhecer os biofilmes. Dessa forma, as células do

interior do biofilme estão protegidas contra a ação de anticorpos, radicais livres e outros compostos reativos produzidos pelos fagócitos que são recrutados para o combate de infecções (BRYERS, 2008).

Embora os fatores acima citados contribuam para o entendimento da baixa suscetibilidade das células na forma de biofilmes, cada fator isoladamente não suporta a ideia de que bactérias em biofilme sejam mais resistentes aos antimicrobianos do que bactérias planctônicas. Tanaka e colaboradores (1999) mostraram que a ação bactericida de fluorquinolonas em biofilmes de *P. aeruginosa* ocorre independente da taxa de crescimento bacteriano. Walters e colaboradores (2003) compararam a penetração de antimicrobianos, com a limitação de oxigênio e com os efeitos da atividade metabólica na tolerância de biofilmes de *P. aeruginosa* ao ciprofloxacino e à tobramicina. Os resultados sugerem que a limitação de oxigênio e a baixa atividade metabólica no interior dos biofilmes, mais do que a penetração do antimicrobiano, sejam os responsáveis pela tolerância a esses fármacos. Assim, nota-se que a resistência dos biofilmes é multifatorial e esses mecanismos têm se desenvolvido como uma resposta de estresse bacteriano, onde a vida em biofilmes permite que as células respondam às diferentes alterações ambientais (MAH, 2012).

A formação de biofilmes está frequentemente associada às infecções que envolvem o uso de dispositivos biomédicos implantáveis e sabe-se que 60-70% das infecções hospitalares estão associadas ao uso desses dispositivos (WENZEL, 2007). As infecções hospitalares são a quarta causa de morte nos Estados Unidos, sendo responsáveis por 2-4 milhões de casos anualmente, elevando em mais de US\$ 5 bilhões o custo médico adicional por ano (WENZEL, 2007). Considerando o Brasil, de acordo com o estudo do programa “SCOPE Surveillance and control of pathogens of epidemiological importance”, a taxa de mortalidade associada às

infecções nosocomiais sanguíneas, de 2007 a 2010, atingiu 40% (MARRA *et al.*, 2011); de maneira semelhante, no Rio Grande do Sul, a taxa de mortalidade associada a infecções em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) foi de 45% em 2003 (LISBOA *et al.*, 2007).

A inserção de dispositivos implantáveis tem se tornado indispensável em quase todas as áreas da medicina, particularmente em UTIs. Com o aumento da expectativa de vida humana, maior é a necessidade de substituição e reparo de funções biológicas e, portanto, é estimado um aumento no número de pessoas hospitalizadas e que irão receber implantes biomédicos. Estima-se o uso de mais de 5 milhões de dispositivos biomédicos por ano, apenas nos Estados Unidos (BRYERS, 2008). A indústria de biomateriais, ou seja, substâncias a partir das quais podem ser fabricados os dispositivos que interagem com sistemas biológicos, movimenta, atualmente, cerca de US\$ 28 bilhões por ano e encontra-se em rápida expansão, com taxa de crescimento anual de 15% (HOLZAPFEL *et al.*, 2013). Independentemente da sofisticação do implante, todos os dispositivos biomédicos estão suscetíveis ao risco de colonização microbiana e infecção (TRETER; MACEDO, 2011; BUSSCHER *et al.*, 2012), devido, principalmente, ao déficit imunológico local na interface implante-hospedeiro (ROCHFORD; RICHARDS; MORIARTY, 2012).

A tabela 1 mostra a magnitude das infecções associadas a implantes no Brasil, enquanto a tabela 2 apresenta esse panorama nos Estados Unidos. As verdadeiras taxas de infecções podem ser maiores do que as apresentadas, pois: (i) a taxa de infecção de dispositivos reimplantados aumenta em diversas vezes (BUSSCHER *et al.*, 2012); (ii) os antimicrobianos geralmente são administrados previamente à coleta, para a realização de exame cultural, podendo gerar resultados falso negativos e (iii) os dados referentes a tabela 1 e 2 encontram-se defasados em, no mínimo 7 e 12 anos, respectivamente.

Tabela 1: Taxa de infecção e taxa de mortalidade atribuída às infecções associadas a dispositivos biomédicos em UTIs de 3 hospitais brasileiros, no período de abril de 2003 a fevereiro de 2006

Dispositivo	Infecção associada	Taxa de infecção (%)	Mortalidade atribuída (%)
Ventilador mecânico	Pneumonia	13,2	34,5
Cateter venoso central	Infecção sanguínea	8,3	47,1
Cateter urinário	Infecção do trato urinário	8,2	30,0

Fonte: Adaptado de Salomão *et al.* (2008).

Tabela 2: A magnitude do problema de infecções associadas a implantes biomédicos: número de inserções de dispositivos biomédicos, por ano, nos Estados Unidos, a taxa de infecção na primeira inserção e a mortalidade atribuída

Dispositivo	Número de inserções por ano	Taxa de infecção na primeira inserção (%)	Mortalidade atribuída ^a
Cateteres urinários	> 30 milhões	10-30	Baixa
Cateteres venosos central	5 milhões	3-8	Moderada
Dispositivos de fixação de fratura (placas e pinos)	2 milhões	5-10	Baixa
Implantes dentários	1 milhão	5-10	Baixa
Próteses articulares	600 mil	1-3	Baixa
Enxertos vasculares	450 mil	1-5	Moderada
Marca-passos cardíacos	300 mil	1-7	Moderada
Implantes mamários	130 mil	1-2	Baixa
Válvulas cardíacas mecânicas	85 mil	1-3	Alta
Dispositivos de assistência cardíaca	700	25-50	Alta

^a Escala semiquantitativa: Baixa (< 5%); Moderada (5-25%); Alta (>25%)

Fonte: Adaptado de Darouiche (2001).

A dificuldade de tratamento, devido à resistência bacteriana em infecções associadas a biofilmes, possui consequências diretas (maior tempo de internação, custo de antibioticoterapia e medicamentos complementares, custos com médicos e procedimentos diagnósticos) e indiretas (absenteísmo e desemprego) no desfecho clínico e na qualidade de vida do paciente. Estima-se que o gasto relacionado com

o tratamento dessas infecções seja maior do que o gasto envolvido com a retirada e com a troca do dispositivo biomédico e, frequentemente, o principal manejo nas infecções em dispositivos é a sua remoção. No entanto, esse procedimento pode estar associado com o aumento de morbidade e mortalidade, prolongando a hospitalização e elevando os custos para o sistema de saúde.

Em muitos casos, quando o dispositivo infectado não pode ser removido, os pacientes enfrentam uma supressiva terapia antimicrobiana, para a prevenção de infecções sistêmicas recorrentes (SCHINABECK; GHANNOUM, 2005). O custo para tratar infecções associadas a implantes biomédicos está estimado em torno de 5 a 7 vezes o custo da inserção original (BANDYK; ESSES, 1994). No caso de um cateter venoso central (CVC), a sua remoção e substituição pode ser tão elevada quanto US\$ 14 mil, por incidência (THOMAS; LITTON; RINDE, 2005) e o custo anual de pacientes, com infecções sanguíneas associadas a CVC, varia de US\$ 296 milhões a US\$ 2.3 bilhões (VON EIFF *et al.*, 2005). Da mesma maneira, com base em cálculos para internações, uma incidência de sepse custa entre US\$ 22 mil e US\$ 70 mil, os custos de pneumonia variam de US\$ 12 mil a US\$ 22 mil e, quando associada à ventilação US\$ 41 mil, por paciente (THOMAS; LITTON; RINDE, 2005).

3.1 Bactérias de importância médica formadoras de biofilme

Biofilmes podem envolver apenas uma ou diferentes espécies microbianas. No caso de uma infecção multiespécie, algumas espécies apenas desempenham o papel de favorecer a virulência e a organização estrutural do biofilme, o que protege e permite a sobrevivência das demais espécies envolvidas, que, por sua vez, participam ativamente da infecção (BURMOLLE *et al.*, 2010).

Os patógenos formadores de biofilme mais comumente encontrados em infecções humanas, relacionadas a dispositivos biomédicos, estão listados no Anexo A. Dentre esses, cabe destacar: *Staphylococcus spp.* – o principal causador de infecções, associadas a implantes biomédicos, com crescente importância na medicina moderna (UÇKAY *et al.*, 2009; ANTUNES *et al.*, 2011); *Pseudomonas aeruginosa* – micro-organismo formador de biofilme, capaz de causar infecções crônicas

progressivas em pacientes com fibrose cística (LYCZAK; CANNON; PIER, 2002; KERR; SNELLING, 2009); e enterobactérias, como *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; *Serratia marcescens* e *Enterobacter cloacae* – as quais demonstram grande potencial de epidemia, devido à alta resistência aos antimicrobianos, incluindo carbapenêmicos (NORDMANN; CORNAGLIA, 2012). Em 2011, Won e colaboradores observaram uma extensa transmissão de enterobactérias produtoras de carbapenemases entre hospitais e lares de idosos, alertando a alta prevalência dessas infecções em pacientes que utilizam dispositivos biomédicos, como cateter venoso central (67,5%), ventilação mecânica (30%) e que realizam hemodiálise (50%).

4 Estratégias de combate aos biofilmes

A abordagem multidisciplinar para o tratamento e controle de biofilmes tem resultado da valorização crescente do papel que eles desempenham na medicina moderna. As estratégias para o combate de biofilmes podem, basicamente, ser divididas em dois segmentos: a inibição da formação de biofilmes e a erradicação ou tratamento de biofilmes já formados, cujos principais alvos para intervenção são ilustrados na figura 7.

Considerando o modo como pode ser alcançada a inibição da formação de biofilmes, duas grandes classificações podem ser feitas: através da inibição do crescimento bacteriano, pelo uso de compostos bactericidas ou bacteriostáticos ou, através do bloqueio da adesão bacteriana e, conseqüentemente, da formação de biofilme por uma via que não envolve a morte bacteriana - característica marcante de um novo conceito de terapia: as terapias antivirulência. As terapias antivirulência exploram novos mecanismos de ação de compostos, visando dificultar o rápido desenvolvimento de resistência bacteriana. Por não afetar o crescimento de bactérias e por manter as células em estado planctônico, a

inibição de fatores de virulência (como a formação de biofilmes) deve tornar o patógeno mais suscetível ao sistema imunológico e aos antimicrobianos tradicionalmente utilizados (CLATWORTHY; PIERSON; HUNG, 2007;

RASKO; SPERANDIO, 2010). Assim, essas novas terapêuticas podem ser consideradas alternativas e/ou complementares à antibioterapia tradicional, com base em novos mecanismos de ação em diferentes alvos.

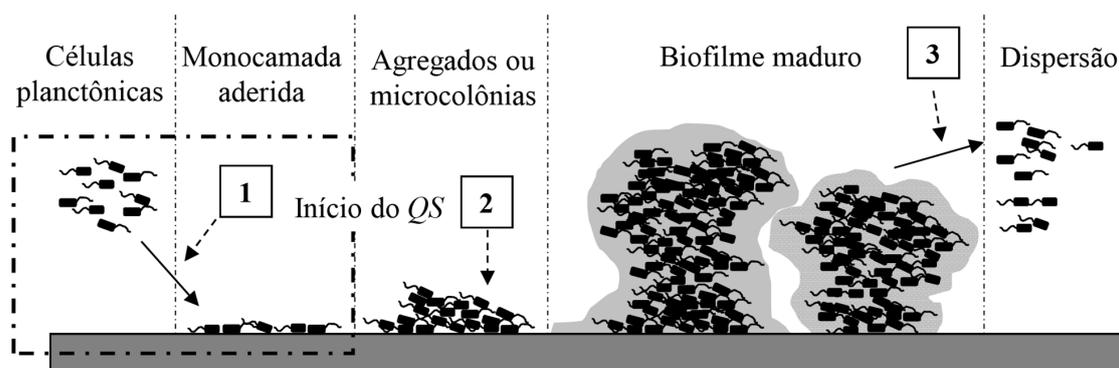


Figura 7: Principais alvos para combate aos biofilmes microbianos: a inibição da formação de biofilmes via bloqueio da adesão bacteriana à superfície (etapa 1) ou o rompimento da comunicação celular bacteriana - *Quorum sensing* (etapa 2) e erradicação ou tratamento de biofilmes já formados (etapa 3)

Fonte: Adaptado de Macedo e Abraham (2009).

4.1 Inibição da formação de biofilmes

O desenvolvimento de novas estratégias para prevenir a formação de biofilme, principalmente, em dispositivos biomédicos, tem recebido bastante atenção. A inibição da formação de biofilmes pode ser obtida através do bloqueio da adesão celular bacteriana a uma superfície ou por meio do rompimento da comunicação celular bacteriana (*Quorum sensing*), conforme ilustrado na etapa 1 e 2 da figura 7, respectivamente.

4.1.1 Bloqueio da adesão celular bacteriana à superfície

Considerando superfícies abióticas, o uso profilático de antibióticos e biocidas (incluindo revestimentos de dispositivos biomédicos, imersão do dispositivo em soluções antibióticas, irrigação do sítio cirúrgico com antibióticos e a terapia de bloqueio com antibiótico utilizada em cateteres) podem reduzir a incidência de infecções associadas

a biofilmes em dispositivos implantáveis. Embora o uso da profilaxia antimicrobiana seja controverso, devido à curta duração da sua eficácia e ao seu potencial, para aumentar a resistência antimicrobiana, essa prática é cada vez mais comum em grupos de pacientes de alto risco (LYNCH; ROBERTSON, 2008). Ainda em relação a substratos abióticos, o desenvolvimento de novas superfícies com características físicas de antiaderência (evitando interações físico-químicas que medeiam a adesão primária ao substrato), bem como o recobrimento de superfícies com os mais diversos compostos, incluindo antibióticos e moléculas inibidoras do sistema QS, representam uma outra alternativa na prevenção da formação de biofilmes que está abordado no item 4.3.

Para a inibição da adesão celular bacteriana a um substrato biótico (figura 7, etapa 1), importantes exemplos são os compostos pilicidas e os compostos quelantes de ferro. Os pilicidas, como as 2-piridonas

bicíclicas, são capazes de inibir a biossíntese de pili, uma das estruturas bacterianas responsáveis pela adesão de certas bactérias às células humanas. Dessa maneira, esses compostos são capazes de evitar 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). Com relação aos compostos quelantes de ferro, Singh e colaboradores (2002) demonstraram que a lactoferrina, uma proteína encontrada na maioria dos fluidos corporais, é capaz de quelar ferro, um elemento crítico para a adesão bacteriana a superfícies. A lactoferrina, em concentrações subinibitórias, foi capaz de inibir a adesão bacteriana e a formação de biofilme de *P. aeruginosa*, sem afetar o crescimento bacteriano, através da privação de ferro. Em concentrações mais altas, a lactoferrina é conhecida por inibir o crescimento bacteriano rompendo a membrana bacteriana através da ligação aos lipopolissacarídeos (ELLISON, 1994). Devido à eficácia comprovada da lactoferrina contra patógenos capazes de formar biofilme, patentes que descrevem o seu uso em tratamentos de lesões superficiais de pele foram registradas (AMMONS, 2010). Estudos similares foram desenvolvidos com outros quelantes de ferro, como ácido 2,2'-dipiridil dietilenotriaminopentacético (DTPA), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), etilenodiamina-N,N'-ácido diacético (EDDA) e mesilato de deferoxamina (O'MAY *et al.*, 2009). Destacam-se também produtos naturais com ação antifomação de biofilme como extratos aquosos obtidos de diversas plantas medicinais da caatinga brasileira (TRENTIN *et al.*, 2011a) e o filtrado de bactéria associada à esponja marinha (TRENTIN *et al.*, 2011b), da mesma forma que produtos naturais isolados, como o dipeptídeo cíclico obtido de fungo associado à esponja marinha (SCOPEL *et al.*, 2013) e o peptídeo esteroidal obtido da cera de ovos de carrapato bovino (ZIMMER *et al.*, 2013). Esses compostos

isolados, o filtrado bacteriano marinho, bem como a maioria dos extratos vegetais previnem a formação de biofilme sem interferir no crescimento bacteriano, sugerindo vias de ação alternativas para esses metabólitos. Os taninos purificados de plantas medicinais representam uma importante classe de compostos bioativos e impedem a formação de biofilme de *P. aeruginosa* por inibirem o crescimento bacteriano (efeito bacteriostático) (TRENTIN *et al.*, 2013).

Ao se considerar ambas as superfícies, abióticas e bióticas, um novo alvo para impedir a adesão bacteriana encontra-se em estudo. Trata-se da desina sortase, uma enzima de membrana que catalisa reações de transpeptidação, ligando covalentemente proteínas ao peptidoglicano, além de estarem envolvidas na montagem do pili (MARRAFFINI; DEDENT; SCHNEEWIND, 2006). Bactérias mutantes em sortase A (gene *strA*) apresentam uma deficiência de proteínas de superfície e dificuldade em aderir a superfícies de hidroxiapatita na presença de saliva. Outras moléculas, como o metanotiosulfonato e o ácido p-hidroxi-mercuribenzóico, estão sendo reconhecidas como inibidores de sortases. Sendo um fator de virulência universal de bactérias Gram-positivas, essas enzimas poderão servir como um bom alvo para fármacos antiadesão, com amplas aplicações clínicas (CHEN; WEN, 2011).

4.1.2 Rompimento da comunicação celular bacteriana

Para estabelecer uma infecção e produzir uma doença, bactérias patogênicas devem desenvolver diferentes mecanismos de virulência para colonizar, disseminar e se adaptar aos vários microambientes impostos. Durante a formação de agregados e no início da maturação do biofilme, as bactérias usam sistemas de comunicação célula-célula para regular a expressão dos genes envolvidos na formação do biofilme.

A inibição da formação de biofilmes,

após a etapa da adesão primária, pode ser obtida através da interferência nessa sinalização intercelular bacteriana (figura 7, etapa 2). O uso de moléculas inibidoras do sistema QS (QSI), as quais competem com o receptor das moléculas sinalizadoras ou de enzimas conhecidas como *Quorum Quenching* (QQ), as quais degradam as moléculas de sinalização, podem bloquear a comunicação celular bacteriana (MARTIN; HOVEN; COOK, 2008). Dessa maneira, a produção de EPS, dentre outras atividades, é inibida, o que dificulta a manutenção da estrutura tridimensional dos biofilmes (adesão irreversível) (LAZAR, 2011), e a associação desses interferentes do sistema QS com antimicrobianos tradicionais pode aumentar a efetividade dos fármacos correntemente utilizados, facilitando o controle de infecções bacterianas relacionadas a biofilmes.

Dentre um grande número de patentes (ROMERO; ACUÑA; OTERO, 2012) e compostos QSI relatados na literatura, as furanonas halogenadas e o peptídeo inibidor do RNA III (RIP) parecem ser os compostos mais investigados, inibindo a formação de biofilme de *P. aeruginosa* e *Staphylococcus* spp. (MUSK; HERGENROTHER, 2006; CHEN; WEN, 2011). No entanto, alguns estudos estão demonstrando que a formação de biofilmes de *P. aeruginosa* e de *S. aureus* pode ocorrer independente da modulação do sistema QS (SCHABER *et al.*, 2007, COELHO *et al.*, 2008), corroborando com a hipótese de que os mecanismos envolvidos na formação dos biofilmes são complexos e multifatoriais.

4.2 Erradicação de biofilmes já formados

Atualmente, a erradicação de biofilmes (figura 7, etapa 3), quando possível, ocorre basicamente através do uso de antimicrobianos e da substituição de dispositivos biomédicos. Essa prática, porém, acarreta onerosos custos tanto ao paciente quanto ao sistema

de saúde, conforme descrito no item 3 desta revisão.

A formação de biofilme não é um processo irreversível e os micro-organismos por si só são capazes de dissolver um biofilme em condições desfavoráveis, como mudanças de pH e privação nutricional. Para isso, eles coordenam o comportamento, a fim de converter ao estado planctônico. Assim, o conhecimento e elucidação dessas moléculas, as quais estimulam o mecanismo natural de dispersão de biofilmes, auxilia a busca de compostos para a erradicação de biofilmes (MACEDO; ABRAHAM, 2009; OTTO, 2013). Ainda que incipiente, o recente progresso na descoberta dos mecanismos implicados na conversão de células sésseis em células planctônicas, no caso de *S. aureus* e de *S. epidermidis*, indicam o envolvimento da solubilização da matriz do biofilme (BOLES; HORSWILL, 2011).

Para erradicar biofilmes já formados, em fase de estudo, principalmente, encontram-se enzimas e algumas outras moléculas capazes de desintegrar a matriz (EPS) que engloba as células bacterianas. A intenção não é necessariamente inibir o crescimento bacteriano, mas, sim, perfurar a estrutura do biofilme (através de ruptura enzimática), sendo útil em combinação com um agente antimicrobiano para o tratamento de infecções associadas a biofilmes. A diversificada constituição química da matriz do biofilme, incluindo material protéico, DNA extracelular e polissacarídeos, torna o EPS suscetível à degradação por uma série de enzimas exogenamente adicionadas (como proteinase K, tripsina e DNase I) (BOLES; HORSWILL, 2011). Nesse sentido, o uso de enzimas do tipo alginato liase, capazes de degradar o polímero alginato, provocou importante erradicação de biofilme de *P. aeruginosa* (ALKAWASH; SOOTHILL; SCHILLER, 2006); a adição de ânions polivalentes (poliaspartato) e/ou DNase, também ocasionaram importante erradicação de biofilme de *P. aeruginosa* e

de *S. aureus* (MANN *et al.*, 2009; TOLKER-NIELSEN; HOIBY, 2009). A dispersina B, uma N-acetilglucosaminidase (KAPLAN *et al.*, 2003) é um outro exemplo; essa enzima é capaz de inibir a formação de biofilme e de promover a erradicação de biofilmes já formados em muitas cepas de *S. epidermidis* e *S. aureus* que possuem poli-N-acetilglucosamina (PNAG) como um componente dominante da sua matriz (KAPLAN *et al.*, 2004).

Após duas décadas de incansável esforço, recentes patentes (PAN; REN, 2009; AMMONS, 2010; CARVALHO, 2012; ROMERO; ACUÑA; OTERO, 2012) e mais de 250 mil publicações (CHEN; WEN, 2011) ainda estamos à espera, para o lançamento do primeiro produto antibiofilme. Nesse ponto, os esforços coletivos no campo da antiadesão, interrupção do sistema QS e erradicação de biofilmes - os três grandes alvos no combate aos biofilmes - geram expectativa no fornecimento de novos fármacos, embora o conjunto de diferentes alvos pareça ser a maneira mais apropriada para combater os biofilmes.

4.3 Modificação de superfícies: recobrimento com compostos bioativos

Conforme relatado no item 3 desta revisão, biomateriais utilizados para a fabricação de dispositivos biomédicos são facilmente colonizados por micro-organismos, após a sua implantação. O tipo de material utilizado na fabricação dos dispositivos biomédicos pode diferenciar em relação à propensão de adesão bacteriana (ROCHFORD; RICHARDS; MORIARTY, 2012). De acordo com Darouiche (2001), o cloreto de polivinila (PVC) favorece mais a adesão bacteriana do que o teflon; o polietileno (PE) mais que o poliuretano (PU); o látex mais que o silicone; o silicone mais que o politetrafluoretileno (PTFE) e o aço inoxidável mais que o titânio. Além disso, superfícies irregulares e texturizadas favorecem mais a adesão bacteriana

do que superfícies regulares e lisas. Assim, as respostas biológicas aos materiais dependem basicamente da química e estrutura das superfícies envolvidas, tornando de extremo interesse a modificação de superfície de materiais.

A modificação de superfícies, de maneira geral, permite: (i) modificar a superfície externa de um material para dificultar a adesão e colonização microbiana e/ou facilitar a biocompatibilidade material-tecido, mantendo inalteradas as propriedades mecânicas, o volume e as funcionalidades desejáveis do material (BAZAKA *et al.*, 2012) e (ii) introduzir sítios na superfície do material para a imobilização de moléculas ativas (GODDARD; HOTCHKISS, 2007).

O recobrimento de superfícies com os mais diversos compostos bioativos passou a ser fortemente investigado para prevenir a formação de biofilmes em biomateriais. Esse recobrimento pode ocorrer, basicamente, por adsorção ou por ligação covalente do composto com a superfície. O Anexo B exemplifica materiais e coberturas com funções anti-infectivas, destacando o estado atual em que se encontram as avaliações biológicas ou clínicas.

Conforme o Anexo B, os principais biomateriais com cobertura, atualmente disponíveis no mercado, são aqueles com revestimentos a base de antissépticos ou antibacterianos. Entretanto, um dos principais desafios é obter “in vivo” a efetividade encontrada nos experimentos “in vitro”, principalmente em períodos de uso mais prolongados. Uma metanálise sobre cateteres urinários mostrou que o uso de cateteres cobertos por liga de prata, por minociclina/rifampicina ou nitrofurazona, diminui o risco de infecção do trato urinário a curto prazo (menos de 7 dias), no entanto, após esse período, a redução não foi significativa (SCHUMM; LAM, 2008). Da mesma maneira, endopróteses uretrais expansíveis (“stents”) cobertas com triclosan não apresentaram efetividade,

para reduzir infecções urinárias em longos períodos de uso (120 dias) (CADIEUX *et al.*, 2009). Considerando a clorexidina, os cateteres revestidos com esse antisséptico não demonstraram vantagens na prevenção de sepse em relação aos cateteres não revestidos (PEMBERTON *et al.*, 1996). Uma desvantagem adicional dos cateteres com clorexidina são os relatos de choque anafilático (STEPHENS *et al.*, 2001). No caso da prata, existem relatos de que a sua incorporação na superfície de tubos endotraqueais seja extremamente efetiva na redução da colonização bacteriana (BALAZS *et al.*, 2004), outros estudos mostram não haver diferença significativa nas taxas de infecção em relação a cateteres revestidos com prata e não revestidos (PEMBERTON *et al.*, 1996; SCHIERHOLZ; BEUTH; PULVERER, 1999). Evidências experimentais sugerem que a diminuída atividade antimicrobiana pode ser devida à adsorção da prata à albumina (NAGAMUNE *et al.*, 2000).

Por outro lado, resultados promissores têm sido demonstrados em estudos de impregnação do antisséptico gendine (violeta genciana e clorexidina) a cateteres urinários e a tubos endotraqueais (CHAIBAN *et al.*, 2005; HACHEM *et al.*, 2009; RAAD *et al.*, 2011). Considerando o CVC, uma metanálise indicou que a cobertura desses com antibacterianos, principalmente minociclina/ri-fampicina, reduzem as infecções sanguíneas relacionadas ao cateter (HOCKENHULL *et al.*, 2009). Da mesma forma, a imobilização de antibióticos em implantes ortopédicos de titânio previne a colonização bacteriana, mas a eficácia a longo prazo ainda não foi estabelecida (HICKOK; SHAPIRO, 2012). Recentemente, a imobilização de peptídeos antimicrobianos (AMPs), isolados de animais, plantas, bactérias, fungos e vírus, em biomateriais têm sido investigada. Esses peptídeos, oferecem vantagens atraentes: exibem propriedades bactericidas e fungicidas em concentrações muito baixas, sendo

menos propensos a promover resistência e apresentam alta estabilidade com relação à alteração de temperatura e pH, mesmo quando imobilizados (COSTA *et al.*, 2011). Entretanto, como descrito anteriormente, o uso da profilaxia antibiótica é controverso, devido à curta duração da sua eficácia, uma vez que ocorre a liberação do mesmo na circulação e devido ao potencial para aumentar a resistência aos antimicrobianos (VON EIFF *et al.*, 2005). Isso resulta na demanda por coberturas alternativas, como moléculas que controlem a adesão bacteriana por vias que não envolvam a inibição do crescimento bacteriano.

Considerando os produtos naturais, o revestimento de superfícies com produtos vegetais bioativos também está sendo investigado, sendo que um dos principais desafios é a manutenção da atividade biológica de um composto quando ele está retido em uma superfície. Bazaka e colaboradores (2010) enfocam essa problemática, ao descrever a síntese e a caracterização de substratos revestidos por filmes finos de terpinen-4-ol, o principal constituinte antimicrobiano do óleo de *Melaleuca alternifolia*, para a prevenção do crescimento de *P. aeruginosa*.

A enzima dispersina B, capaz de inibir a formação e de promover a erradicação de biofilmes, está sendo estudada juntamente com o antisséptico triclosan em cateteres venosos centrais. Esses cateteres mostraram eficácia em evitar a colonização de *S. aureus* em modelo animal e uma atividade mais prolongada foi obtida, quando comparado com cateteres revestidos por clorexidina/sulfadiazina de prata. O efeito sinérgico de combinação da atividade antimicrobiana do triclosan e antibiofilme da dispersina B “in vitro” possivelmente se deve ao fato de que a dispersina evita o recobrimento bacteriano pela matriz de EPS, tornando as células mais suscetíveis à ação antimicrobiana do triclosan (DAROUCHE *et al.*, 2009).

Inibidores do sistema QS, como as

furanonas e o peptídeo inibidor do RNA III, também estão sendo explorados quanto ao recobrimento de superfícies. Hume e colaboradores (2004) descrevem a incorporação do 3-(10-bromoexil)-5-dibromometileno-2(5 H)-furanona em estireno e a sua ligação covalente a cateteres. Resultados “in vivo” mostraram a inibição da colonização por *S. epidermidis* e sugerem que as furanonas sejam capazes de controlar a infecção por até 65 dias no modelo animal. Cirioni e colaboradores (2007) mostraram que “stents” ureterais revestidos com o peptídeo inibidor do RNAIII, implantados em bexigas de ratos, apresentaram a formação de biofilme de *S. aureus* suprimida. Esse “stent” revestido foi especialmente eficaz quando combinado com o antimicrobiano teicoplanina, aumentando a eficácia do antimicrobiano na prevenção de infecções ureterais estafilocócicas associadas ao “stent”.

5 Considerações finais

Pesquisas em biofilmes bacterianos tornaram-se mais consistentes nos últimos 40 anos. No entanto, o entendimento e o controle da formação de biofilmes é uma tarefa muito complexa. Essa complexidade pode ser atribuída: (i) à heterogeneidade das superfícies bacterianas, incluindo a variabilidade entre diferentes espécies e cepas e (ii) a dificuldade em reunir várias áreas do conhecimento científico, para abordar o problema de forma suficientemente interativa. Nosso grupo de pesquisa encontra-se, atualmente, inserido em um projeto da REDE NANOBIOTEC - BRASIL/CAPES, o qual permite a interação de distintas áreas do conhecimento e possibilita o desenvolvimento de trabalhos multidisciplinares, contribuindo no entendimento das interações entre superfícies físicas e biológicas. Faz-se importante destacar que, à medida que o estudo multidisciplinar de biofilmes – cunhado pelo termo biofilmologia – avança, através

da pesquisa básica de fisiologia dos biofilmes, ampliam-se as expectativas para o desenvolvimento de alternativas eficazes para o combate dos mesmos.

Referências

ALKAWASH, M.A.; SOOTHILL, J.S.; SCHILLER, N.L. Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 114, p. 131-138, 2006.

AMMONS, C.B. Anti-biofilm strategies and the need for innovations in wound care. **Recent Patents on Antiinfective Drug Discovery**, v. 5, p. 10-7, 2010.

ANTUNES, A.L.S. *et al.* High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 51-55, 2011.

BALAZS, D.J. *et al.* Inhibition of bacterial adhesion on PVC endotracheal tubes by RF-oxygen glow discharge, sodium hydroxide and silver nitrate treatments. **Biomaterials**, v. 25, p. 2139-2151, 2004.

BANDYK, D.F.; ESSES, G.E. Prosthetic graft infection. **The Surgical Clinics of North America**, v. 74, p. 571-590, 1994.

BAYLES, K.W. The biological role of death and lysis in biofilm development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 721-726, 2007.

BAZAKA, K. *et al.* Plasma-enhanced synthesis of bioactive polymeric coatings from monoterpene alcohols: a combined experimental and theoretical study. **Biomacromolecules**, v. 11, p. 2016-2026, 2010.

_____ *et al.* Efficient surface modification

- of biomaterial to prevent biofilm formation and the attachment of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, p. 299-311, 2012.
- BERG, V. *et al.* Carboxylic acid isosteres improve the activity of ring-fused 2-pyridones that inhibit pilus biogenesis in *E. coli*. **Bioorganic & Medicinal Chemical Letters**, v. 18, p. 3536-3540, 2008.
- BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M. The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning aggressor *Pseudomonas aeruginosa*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, p. 409-414, 2007.
- BOLES, B.R.; HORSWILL, A.R. Staphylococcal biofilm disassembly. **Trends in Microbiology**, v. 19, p. 449-455, 2011.
- BRYERS, J.D. Medical biofilms. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, p. 1-18, 2008.
- BURMOLLE, M. *et al.* Biofilms in chronic infections - a matter of opportunity - monospecies biofilms in multispecies infections. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 59, p. 324-36, 2010.
- BUSSCHER, H.J. *et al.* Biomaterial-associated infection: locating the finish line in the race for the surface. **Science Translational Medicine**, v. 4, p. 1-11, 2012.
- CADIEUX, P.A. *et al.* Use of triclosan-eluting ureteral stents in patients with long-term stents. **Journal of Endourology**, v. 23, p. 1187-1194, 2009.
- CARVALHO, C.C. Biofilms: new ideas for an old problem. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 6, p. 13-22, 2012.
- CHAIBAN, G. *et al.* A rapid method of impregnating endotracheal tubes and urinary catheters with gentamicin: a novel antiseptic agent. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, p. 51-56, 2005.
- CHEN, L.; WEN, Y.M. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. **International Journal of Oral Sciences**, v. 3, p. 66-73, 2011.
- CIRIONI, O. *et al.* RNAIII-inhibiting peptide affects biofilm formation in a rat model of staphylococcal ureteral stent infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 4518-4520, 2007.
- CLATWORTHY, A.E.; PIERSON, E.; HUNG, D.T. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. **Nature Chemical Biology**, v. 3, p. 541-548, 2007.
- COELHO, L.R. *et al.* agr RNAIII divergently regulates glucose-induced biofilm formation in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Microbiology**, v. 154, p. 3480-3490, 2008.
- COSTA, F. *et al.* Covalent immobilization of antimicrobial peptides (AMPs) onto biomaterial surfaces. **Acta Biomaterialia**, v. 7, p. 1431-1440, 2011.
- COSTERTON, J.W.; GEESEY, G.G.; CHENG, K.J. How bacteria stick. **Scientific American**, v. 238, p. 86-95, 1978.
- _____ *et al.* Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 435-464, 1987.
- _____; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infectious. **Science**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.
- DAROUICHE, R. Device-associated infections: a macroproblem that starts with a microadherence. **Clinical Infectious Disease**,

v. 33, p. 1567-1572, 2001.

_____. *et al.* Antimicrobial and antibiofilm efficacy of triclosan and Dispersin B combination. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p. 88-93, 2009.

DAVIES, D.G. *et al.* The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v. 280, p. 295-298, 1998.

_____. Understanding biofilm resistance to antimicrobial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 114-122, 2003.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p.167-193, 2002.

DUNNE JR., W.M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 155-166, 2002.

ELLISON, R.T. The effects of lactoferrin on Gram-negative bacteria. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 357, p. 71-90, 1994.

GEORGOPAPADAKOU, N.H. Antibiotic resistance in biofilms. In: PACE, J.L.; RUPP, M.E.; FINCH, R.G. (Org.). **Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy**. Londres: Taylor & Francis Group, 2005. p. 401-407.

GODDARD, J.; HOTCHKISS, J. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 698-725, 2007.

GOTTENBOS, B. *et al.* Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, v. 13, p. 717-722, 2002.

HACHEM, R. *et al.* Novel antiseptic urinary

catheters for prevention of urinary tract infections: correlation of *in vivo* and *in vitro* test results. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 5145-5149, 2009.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J.W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 95-108, 2004.

_____; STOODLEY, P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. **Trends in Microbiology**, v. 13, p. 7-10, 2005.

HERRMANN, M. *et al.* Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. **The Journal of Infectious Disease**, v. 158, p. 693-701, 1988.

HICKOK, N.J.; SHAPIRO, I.M. Immobilized antibiotics to prevent orthopaedic implant infections. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 1165-1176, 2012.

HOCKENHULL, J.C. *et al.* The clinical effectiveness of central venous catheters treated with anti-infective agents in preventing catheter-related bloodstream infections: a systematic review. **Critical Care Medicine**, v. 37, p. 702-712, 2009.

HODGKINSON, J.T.; WELCH, M.; SPRING, D.R. Learning the language of bacteria. **ACS Chemical Biology**, v. 2, p. 715-717, 2007.

HOIBY, N. *et al.* The clinical impact of bacterial biofilms. **International Journal of Oral Sciences**, v. 3, p. 55-65, 2011.

HOLZAPFEL, B.M. *et al.* How smart do materials need to be?: a translational science and clinical point of view. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2013, *in press*.

- HUME, E.B. *et al.* The control of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and in vivo infection rates by covalently bound furanones. **Biomaterials**, v. 25, p. 5023-5030, 2004.
- HUNG, D.T. *et al.* Small-molecule inhibitor of *Vibrio cholerae* virulence and intestinal colonization. **Science**, v. 310, p. 670-674, 2005.
- KAPLAN, J.B. *et al.* Detachment of *Actinobacillus actinomycescomitans* biofilm cells by an endogenous beta-hexosaminidase activity. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 4693-4698, 2003.
- _____ *et al.* Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 2633-2636, 2004.
- KATSIKOIANNI, M.; MISSIRLIS, Y.F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. **European Cells & Materials**, v. 8, p. 37-57, 2004.
- KERR, K.G.; SNELLING, A.M. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. **The Journal of Hospital Infection**, v. 73, p. 338-44, 2009.
- LAZAR, V. Quorum sensing in biofilms - How to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power? **Anaerobe**, v. 17, p. 280-285, 2011.
- LEWIS, K. Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 211, p. 121-133, 2012.
- LISBOA, T. *et al.* Prevalência de infecção nosocomial em Unidades de Terapia Intensiva do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, p. 414-420, 2007.
- LYCZAK, J.B.; CANNON, C.L.; PIER, G.B. Lung infections associated with cystic fibrosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 194-222, 2002.
- LYNCH, A.S.; ROBERTSON, G.T. Bacterial and fungal biofilm infections. **Annual Review of Medicine**, v. 59, p. 415-428, 2008.
- LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. Biofilms. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, p. 1-11, 2010.
- MACEDO, A.J.; ABRAHAM, W.R. Can infectious biofilm be controlled by blocking bacterial communication? **Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 517-528, 2009.
- MADSEN, J.S. *et al.* The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 65, p. 183-195, 2012.
- MAH, T.F. Biofilm-specific antibiotic resistance. **Future Microbiology**, v. 9, p. 1061-1072, 2012.
- MANN, E.E. *et al.* Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. **PLoS One**, v. 4, p. 1-12, 2009.
- MARRA, A.R. *et al.* Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 1866-1871, 2011.
- MARRAFFINI, L.A.; DEDENT, A.C.; SCHNEEWIND, O. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, p. 192-221, 2006.
- MARTIN, C.A.; HOVEN, A.D.; COOK, A.M. Therapeutic frontiers: preventing and

- treating infectious diseases by inhibiting bacterial quorum sensing. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, p. 635–642, 2008.
- MUSK, D.J.; HERGENROTHER, P.J. Chemical countermeasures for the control of bacterial biofilms: effective compounds and promising targets. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 2163-2177, 2006.
- NAGAMUNE, H. *et al.* Evaluation of the cytotoxic effects of Bis-quaternary ammonium antimicrobial reagents on human cells. **Toxicology in Vitro**, v. 14, p. 139-147, 2000.
- NEIDELL, M.J. *et al.* Costs of healthcare and community-associated infections with antimicrobial-resistant versus antimicrobial-susceptible organisms. **Clinical Infectious Disease**, v. 55, p. 807-815, 2012.
- NICHOLS, W.W. *et al.* Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, p. 518-523, 1988.
- NIH: National Institutes of Health [Internet]. 2002. Available from: <http://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/PA-03-047.html>.
- NORDMANN, P.; CORNAGLIA, G. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a call for action! **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, p. 411-412, 2012.
- O'MAY, C.Y. *et al.* Iron-binding compounds impair *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, especially under anaerobic conditions. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 765-773, 2009.
- O'TOOLE, G.A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**, v. 30, p. 295-304, 1998.
- OTTO, M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. **Annual Review of Medicine**, v. 64, p. 175-188, 2013.
- PAN, J.; REN, D. Quorum sensing inhibitors: a patent overview. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 19, p. 1581-1601, 2009.
- PASCUAL, A. Pathogenesis of catheter-related infections: lessons for new designs. **Clinical Microbiology and Infections**, v. 8, p. 256-264, 2002.
- PAVITHRA, D.; DOBLE, M. Biofilm formation, bacterial adhesion and host response on polymeric implants-issues and prevention. **Biomedical Materials**, v. 3, p. 1-13, 2008.
- PEMBERTON, L.B. *et al.* No difference in catheter sepsis between standard and anti-septic central venous catheters. **Archives of Surgery**, v. 131, p. 986-989, 1996.
- PINKNER, J.S. *et al.* Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 17897-17902, 2006.
- POZO, J.L.; PATEL, R. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 82, p. 204-209, 2007.
- RAAD, I.I. *et al.* The prevention of biofilm colonization by multidrug-resistant pathogens that cause ventilator-associated pneumonia with antimicrobial-coated endotracheal tubes. **Biomaterials**, v. 32, p. 2689-2694, 2011.
- RASKO, D.A.; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nature Reviews Drug Discovery**,

v. 9, p. 117-128, 2010.

ROCHFORD, E.T.; RICHARDS, R.G.; MORIARTY, T.F. Influence of material on the development of device-associated infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, p. 1162-1167, 2012.

ROMERO, M.; ACUÑA, L.; OTERO, A. Patents on quorum quenching: interfering with bacterial communication as a strategy to fight infections. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 6, p. 2-12, 2012.

RUTHERFORD, S.T.; BASSLER, B.L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, p. 1-26, 2012.

SALOMÃO, R. *et al.* Device-associated infection rates in intensive care units of Brazilian hospitals: findings of the International Nosocomial Infection Control Consortium. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 24, p. 195-202, 2008.

SCHABER, J.A. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* forms biofilms in acute infection independent of cell-to-cell signaling. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 3715-3721, 2007.

SCHIERHOLZ, J.M.; BEUTH, J.; PULVERER, G. Silver coating of medical devices for catheter-associated infections? **The American Journal of Medicine**, v. 107, p. 101-102, 1999.

SCHINABECK, M.K.; GHANNOUM, M.A. Biofilm-related indwelling medical device infections. In: PACE, J.L.; RUPP, M.; FINCH, R.G. **Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy**. Londres: Taylor & Francis Group, 2005. p. 39-48.

SCHUMM, K.; LAM, T.B. Types of urethral catheters for management of short-term

voiding problems in hospitalised adults. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 16, p. 1-56, 2008.

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

SINGH, P.K. *et al.* A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. **Nature**, v. 417, p. 552-555, 2002.

STEPHENS, R. *et al.* Two episodes of life-threatening anaphylaxis in the same patient to a chlorhexidine-sulphadiazine-coated central venous catheter. **British Journal of Anaesthesia**, v. 87, p. 306-308, 2001.

STEWART, P.S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, p. 107-113, 2002.

_____; FRANKLIN, M.J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 199-210, 2008.

STOODLEY, P. *et al.* Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2002.

TANAKA, G. *et al.* Effect of the growth rate of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on the susceptibility to antimicrobials agents: beta-lactams and fluoroquinolones. **Chemotherapy**, v. 45, p. 28-36, 1999.

THOMAS, J.G.; LITTON, I.; RINDE, H. Economic impact of biofilms on treatment costs. In: PACE, J.L.; RUPP, M.E.; FINCH, R.G. (Org.). **Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy**. Londres: Taylor & Francis Group, 2005. p. 21-38.

- TOLKER-NIELSEN, T.; HOIBY, N. Extracellular DNA and F-actin as targets in antibiofilm cystic fibrosis therapy. **Future Microbiology**, v. 4, p. 645-647, 2009.
- TRENTIN, D.S. *et al.* Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 327-335, 2011a.
- _____ *et al.* Antibiofilm activity of *Cobettia marina* filtrate upon *Staphylococcus epidermidis* catheter-related isolates **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1329-1333, 2011b.
- _____ *et al.* Tannins possessing bacteriostatic effect impair *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation. **PLoS One**, v. 8, p. 1-13, 2013.
- TRETER, J.; MACEDO, A.J. Catheters: a suitable surface for biofilm formation. In: MENDEZ-VILAS, A. (Ed.) **Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**. Badajoz: Formatex, 2011. p. 835-842.
- UÇKAY, I. *et al.* Foreign body infections due to *Staphylococcus epidermidis*. **Annals of Medicine**, v. 41, p. 109-119, 2009.
- VON EIFF, C. *et al.* Infections associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis. **Drugs**, v. 65, p. 179-214, 2005.
- WALTERS, M.C. *et al.* Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 317-323, 2003.
- WENZEL, R.P. Health care-associated infections: major issues in the early years of the 21st century. **Clinical Infectious Disease**, v. 45, p. 85-88, 2007.
- WON, S.Y. *et al.* Emergence and Rapid Regional Spread of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. **Clinical Infectious Disease**, v. 53, p. 532-540, 2011.
- ZIMMER, K.R. *et al.* A steroidal molecule present in the egg wax of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inhibits bacterial biofilms. **Environmental Microbiology**, v. 15, p. 2008-2018, 2013.

ANEXOS

Anexo A - Micro-organismos formadores de biofilme comumente encontrados em infecções humanas e de implantes biomédicos, de acordo com o sítio de infecção

Infecção/sítio	Micro-organismo(s) causador(es)
Cáries dentárias	<i>Streptococcus mutans</i>
Cateteres venosos central	<i>Staphylococcus coagulase negativos</i> (SCoN); <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Candida</i> spp.
Dispositivos intrauterinos	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ; <i>Enterococcus</i> spp.; <i>Streptococcus</i> b - hemolítico; <i>Lactobacilos</i>
Endocardite (válvulas nativas)	<i>Streptococcus</i> grupo viridans
Endocardite (válvulas mecânicas)	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus</i> spp.; <i>Enterococcus</i> spp.; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>Candida</i> spp.; <i>Aspergillus</i> spp.
Esôfago (em aidéticos)	<i>Candida</i> spp.
Enxertos vasculares	SCoN; <i>S. aureus</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; outros Gram- negativos
Lentes de contato e intraoculares	<i>P. aeruginosa</i> ; <i>Serratia marcescens</i> e cocos Gram-positivos
Osteomielite	<i>S. aureus</i>
Otite média	<i>S. aureus</i>
Peritonite (cateteres de diálise peritoneal)	<i>S. aureus</i> ; <i>Candida</i> spp.; <i>P. aeruginosa</i> ; outros Gram- negativos
Prostatites	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Clamidia trachomatis</i> ; <i>Mycoplasma</i>
Próteses ortopédicas	<i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>
Trato respiratório	<i>Streptococcus pneumoniae</i> e bacilos Gram-negativos
Trato respiratório (em fibrose cística)	<i>P. aeruginosa</i> e <i>Burkholderia cepacia</i>
Trato urinário (cateteres urinários)	<i>E. coli</i> ; <i>Proteus mirabilis</i> ; SCoN; <i>E. faecalis</i> ; <i>Candida</i> spp.; <i>K. pneumoniae</i> ; outros Gram-negativos
Tubos endotraqueais	Gram-negativos entéricos; <i>Staphylococcus</i> spp.; <i>Streptococcus</i> spp.; <i>Enterococcus</i> spp.;
Vagina	<i>Candida</i> spp.

Fonte: Adaptado de Georgopapadakou (2005) e Thomas, Litton e Rinde (2005).

Anexo B - Exemplos de materiais e coberturas com funções anti-infectivas, “status” atual e exemplos de aplicação clínica

Funcionalidade	Base química	“Status” atual	Aplicação clínica
Antiadesiva	Revestimento de polímero hidrofílico	Aplicado clinicamente	Lentes de contato, tubos endotraqueais, cateteres urinários
	Revestimento de polímeros em escova	Experimentos “in vitro” e em animais	Não especificado
Integradora de tecidos	Peptídeos promotores de adesão celular	“In vitro”	Enxerto vascular
	Revestimento de hidroxiapatita	Aplicado clinicamente	Implantes ortopédicos e dentários
	Revestimento de filmes finos de titânio	“In vitro”	Implantes dentários
Matadores de contato	Imobilização de compostos de amônio quaternário	“In vitro”	Não especificado
	Revestimento de selênio	“In vitro”	Lentes de contato
	Revestimento de prata	Aplicado clinicamente	Cateteres urinários
Liberadores de antimicrobianos	Acrilatos liberadores de antibióticos	Aplicado clinicamente	Próteses ortopédicas articulares
	Liberadores de carbonato de prata e diacetato de clorexidina	Aplicado clinicamente	Malhas cirúrgicas
	Revestimento de prata, clorexidina, rifampicina ou minociclina	Aplicado clinicamente	Cateteres vasculares
	Suturas liberadoras de triclosan	Aplicado clinicamente	Suturas
	Revestimento de polímero biodegradável e gentamicina	Aplicado clinicamente	Malhas cirúrgicas
Recobrimento multifuncional	Coenxerto de polímero em escovas e antibiótico	“In vitro”	Possivelmente para implantes de titânio
	Coenxerto de polímero em escovas e ligante celular	“In vitro”	Não especificado

Fonte: Adaptado de Busscher *et al.* (2012).