



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL



FACULDADE DE FARMÁCIA

DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

INFECÇÕES BACTERIANAS ASSOCIADAS A BIOFILMES EM SUPERFÍCIES BIÓTICAS: CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS, TRATAMENTOS E PERSPECTIVAS

Graziela de Araújo Lock

Porto Alegre, Junho de 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**INFECÇÕES BACTERIANAS ASSOCIADAS A
BIOFILMES EM SUPERFÍCIES BIÓTICAS:
CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS, TRATAMENTOS E
PERSPECTIVAS**

Graziela de Araújo Lock

Profa. Dra. Teresa Dalla Costa
Orientadora

Porto Alegre, Junho de 2015.

“A mente que se abre para uma ideia, jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

RESUMO

Biofilmes bacterianos constituem um modelo de agregação que caracteriza o crescimento bacteriano diante de ambiente hostil, que ameaça a sobrevivência da espécie. São envoltos por uma matriz polimérica extracelular sintetizada pelas bactérias que o compõem. Algumas bactérias estão comumente relacionadas à formação de biofilme como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* e *Haemophilus influenzae*, entre outros. Os biofilmes constituem um grande problema clínico, estando relacionados à cronicidade de diversas doenças como fibrose cística, otite do ouvido médio e feridas crônicas devido aos mecanismos que dificultam a ação da terapia antimicrobiana quando a bactéria está na forma de biofilme. Assim, a farmacoterapia tradicional, que utiliza doses investigadas em bactérias planctônicas, não é adequada para tratar os biofilmes, tendo em vista que as concentrações de antimicrobianos necessárias para erradicação das bactérias nesse fenótipo podem ser cerca de 100 a 1000 vezes maiores que as tradicionais. Esse trabalho revisa, a partir da pesquisa nas bases de dados *Science Direct*, *Web of Science* e *Pubmed*, as principais bactérias formadoras de biofilmes e as patologias nas quais o biofilme comumente se apresenta em superfícies bióticas, mostrando os tratamentos atuais e os sob investigação para a erradicação dos mesmos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. INFECÇÕES RELACIONADAS A BIOFILMES: CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS E TÉCNICAS PARA IDENTIFICAÇÃO	16
3. BACTÉRIAS FORMADORAS DE BIOFILMES	19
3.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
3.2 <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i>	21
3.3 <i>Haemophilus influenzae</i>	24
4. INFECÇÕES PROVOCADAS POR BACTERIAS FORMADORAS DE BIOFILMES ADERIDAS A SUPERFÍCIES BIÓTICAS E SEUS TRATAMENTOS	27
4.1 Fibrose Cística	29
4.1.1 Tratamentos	32
4.1.1.1 Terapia de erradicação	37
4.1.1.2 Tratamento de infecção crônica	37
4.1.1.3 Exacerbações pulmonares	40
4.1.2 Perspectivas para o tratamento da Fibrose Cística	42
4.1.2.1 Quorum sensing	42
4.1.2.2 Peptídeos antimicrobianos	43
4.1.2.3 Bacteriófagos	43
4.1.2.4 Polissacarídeos exógenos x terapia enzimática	44
4.1.2.5 Nanopartículas	45
4.1.2.6 Modulação de vias metabólicas	46
4.2 Otite do Ouvido Médio	46
4.2.1 Tratamentos	48
4.3 Feridas Crônicas	51
4.3.1 Tratamentos	54
4.3.1.1 Antibioticoterapia	55
4.3.1.2 Alteração na estrutura da matriz	55
4.3.1.2.1 Ultrassom	55

4.3.1.2 Digestão da SPE	57
4.3.1.2.2 Bacteriófagos	57
4.3.1.2.3 Enzimas.....	57
4.3.1.3 Prevenção do quorum sensing.....	57
4.3.1.5 Remoção física do biofilme.....	58
4.3.1.5 Controle da adesão bacteriana	60
4.3.1.5.1 Prata iônica	60
4.3.1.5.2 Mel medicinal	61
4.3.1.6 Prevenção	63
4.3.1.6.1 Iodo.....	63
4.3.1.7 Estratégias adicionais - Utilização de fibroblastos fetais	64
5. CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS.....	66

AGRADECIMENTOS

Conhecimento não se constrói sozinho. É conquistado a partir da leitura, da discussão e, com certeza, de todas as dúvidas que surgem pela estrada. O grande desafio é como você vai lidar com todas as leituras, todas as discussões e todas essas dúvidas. Para isso, Alguém muito importante coloca pessoas fantásticas durante o trajeto: para que possamos encontrar no meio das adversidades a superação, os mil e um motivos para seguir em frente e os mil e um sorrisos a cada conquista concretizada. É nos dada uma das coisas mais imateriais do mundo: a amizade. E, é devido à participação de cada amigo, que conseguimos realmente alcançar nossas metas e, quem sabe, surpreender até a nós mesmos.

Obrigada a minha família por estar sempre presente, pelo carinho, por todas as caronas, todos os abraços e total apoio logístico. Às amigas de estágio que tornaram meu aprendizado muito mais leve tanto a nível industrial quanto magistral. De Canoas e região: saibam que sem misturar farmácia, arquitetura, odontologia, biologia, engenharia e mais farmácia minha vida acadêmica não teria sido a mesma! Às orientadoras de histologia, bioquímica e farmacocinética que permitiram a experiência de aprender, mas também ensinar, muito obrigada pela dedicação e pelo exemplo. Em especial, àquela cuja ideia permitiu a construção deste trabalho que atendeu muito mais do que as expectativas que eu tinha quanto a um TCC, muito obrigada pelo apoio, pelas discussões e pela confiança. Aos meus amigos PK's por esses três anos e meio metamorfoseando minhas preocupações em muito aprendizado, muito trabalho, muitos sorrisos e por fazerem com que eu me sentisse em casa. Obrigada pela contribuição de cada um, comprovando que boas ideias merecem sempre uma oportunidade para existirem e que o conhecimento, definitivamente, se constrói em conjunto.

1. INTRODUÇÃO

A presença dos biofilmes em infecções nosocomiais constitui grave problema de saúde pública (DONLAN, 2002). De acordo com Bixler & Bhushan (2012), mais de 45% das infecções hospitalares podem ser relacionadas ao uso de dispositivos médico-hospitalares infectados com bactérias formadoras de biofilme. Além disso, diversas doenças tem seu tratamento prejudicado devido à colonização por bactérias oportunistas, sendo que as formadoras de biofilme podem representar um fator importante no desenvolvimento de doenças crônicas (ALVAREZ *et. al.*, 2004).

Os biofilmes constituem um modelo de agregação que caracteriza o crescimento bacteriano em virtude da exposição a ambientes favoráveis ao seu crescimento ou também a um ambiente hostil que coloque em risco a sobrevivência da espécie (DONLAN, 2002; WILKINS *et al.*, 2014). Podem ser considerados heterogêneos devido à sua estrutura formada basicamente por comunidades de células sésseis (WILKINS *et. al.*, 2014) envoltas por uma substância polimérica extracelular (SPE), semelhante a um gel, que elas próprias sintetizam ou que podem advir do próprio hospedeiro (ex. fibrina, colágeno). A matriz composta de SPE é então distribuída alternadamente entre as células bacterianas, como pilares de bactérias e matriz, dando forma ao biofilme propriamente dito (KARATAN & WATNICK, 2009). Essa estrutura torna o biofilme capaz de incorporar grandes quantidades de água e formar canais que permitam o fluxo de pequenas moléculas (KARATAN & WATNICK, 2009).

No biofilme é possível a presença de uma mesma espécie de bactéria ou a coexistência de diferentes espécies bacterianas em simbiose (PASTERNAK, 2009; TRINIDAD *et al.*, 2010; WOLCOTT *et al.*, 2013). Desse modo, conforme os microrganismos predominantes, o formato dos pilares de bactérias e matriz pode originar uma estrutura final semelhante a cogumelos, como no biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*, ou a torres, como no biofilme de *Staphylococcus aureus*. A espessura do biofilme será delimitada a partir do número de espécies diferentes coexistindo no biofilme: quando as espécies *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, coexistem, por exemplo, o biofilme formado é mais espesso do que a estrutura formada quando elas apresentam-se separadas, o que poderia indicar que

a presença de uma espécie estaria contribuindo para a estabilidade da outra (DONLAN, 2002).

A matriz que compõe o biofilme contém polissacarídeos de origem bacteriana (SHUNMUGAPERUMAL, 2010) e outros materiais como lipídios, fosfolipídios, proteínas e ácidos nucleicos (DNA) aprisionados no seu interior (DONLAN, 2002; SIMÕES *et al.*, 2010), sendo muitas dessas moléculas responsáveis pela estabilidade mecânica dessas comunidades bacterianas. Quando advindos de bactérias Gram-negativas, os biofilmes são compostos basicamente por polissacarídeos neutros ou polianiônicos; quando formados por bactérias Gram-positivas são constituídos por polímeros catiônicos (SHUNMUGAPERUMAL, 2010), o que influi na conformação primária da matriz.

Essa mesma matriz é um importante fator de virulência, responsável pela defesa do biofilme. Segundo Galanakis e colaboradores (2009), a constituição de uma comunidade bacteriana envolta por matriz funciona como mecanismo de sobrevivência contra alterações ambientais como a resposta imune do hospedeiro. Mesmo que durante a resposta imune ocorra o ataque de neutrófilos e macrófagos, essas células serão incapazes de erradicar completamente o biofilme. A fagocitose ineficaz resultante deste processo implica na liberação crônica de substâncias citotóxicas e proteolíticas pelo hospedeiro, como citocinas pró-inflamatórias (LEID, 2009; SETH *et al.*, 2012) que contribuirão para aumentar o dano aos tecidos circundantes ao biofilme formado (BJARNSHOLT *et al.*, 2009). Assim, a matriz constitui importante barreira física conferindo resistência aos antimicrobianos em virtude de sua constituição, disposição e agregação diferenciadas, impedindo a difusão e penetração de fármacos para o interior do biofilme (PASTERNAK, 2009; SETH *et al.*, 2012; WILKINS *et al.*, 2014).

O ciclo de vida de um biofilme (Figura 1) é dinâmico e possui basicamente quatro estágios: fixação/adesão, crescimento/proliferação, maturação e dispersão (DONLAN, 2002; WILKINS *et al.*, 2014).

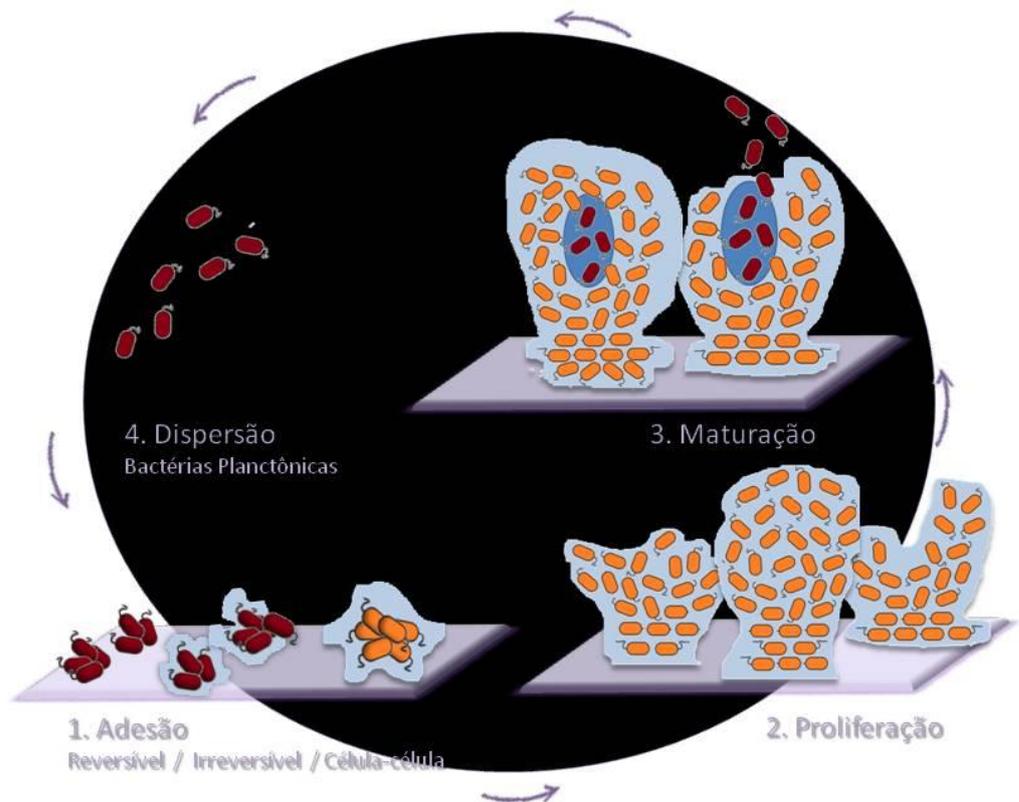


Figura 1. Ciclo de vida de um biofilme bacteriano, compreendendo as fases de adesão, proliferação, maturação e dispersão. (Adaptado de SIMÕES *et al.*, 2010; BIXLER & BHUSHAN, 2012; e WILKINS *et al.*, 2014).

Todas as etapas do ciclo são reguladas por genes, diferindo da regulação que ocorre em bactérias livres, também conhecidas pelo seu fenótipo planctônico (BJARNSHOLT *et al.*, 2013). A etapa de fixação pode ser agrupada com a etapa de adesão, pois inicialmente as células bacterianas distribuem-se pela superfície biótica (tecidos, por exemplo) ou abiótica (cateteres e próteses, por exemplo) de forma reversível (BIXLER & BHUSHAN 2012) formando uma monocamada e, a seguir, conforme ocorrer a produção de matriz, a ligação passa a ser irreversível, compondo a multicamada caracterizada pela adesão entre células e superfície (KARATAN & WATNICK 2009). A monocamada de células é propensa à formação da multicamada desde o início da adesão. Pode ser constituída por bactérias que contenham flagelo, estrutura motora que reforça a interação com a superfície (KARATAN & WATNICK 2009) facilitando a adesão transitória (SIMÕES *et al.* 2010). Em bactérias Gram-

negativas é a fímbria que tem papel importante na adesão. Esse apêndice filamentoso é visto como a causa da hidrofobicidade do biofilme à medida que diminui a barreira eletrostática existente entre o substrato e a célula bacteriana, permitindo que sejam estabelecidas interações moleculares entre a bactéria e a superfície a ser aderida, que normalmente é de natureza não-polar. Assim, a eficiência de adesão deve-se as características celulares da bactéria (presença de fímbria ou flagelo) em conjunto com as propriedades físico-químicas do biofilme, do microambiente e da superfície como pH, níveis de nutrientes, temperatura e força iônica (DONLAN, 2002; ESPER, 2011).

Os biofilmes podem ser tanto hidrofóbicos quanto hidrofílicos: o fator determinante é o percentual de carbonos orgânicos que compõem os polissacarídeos da matriz, que pode variar de 50 a 90% (SETH *et al.*, 2012; WILKINS *et al.*, 2014). É a hidrofobicidade que contribui para a adesão ao aumentar a natureza não-polar das superfícies envolvidas (SIMÕES *et al.* 2010). Dessa forma, devido a modificações estruturais na bactéria, as mesmas passam a sintetizar adesinas cuja função é facilitar a adesão à superfície de células eucariotas. Em seguida, modificações no próprio ambiente como falta de nutrientes ou ameaça à sobrevivência da espécie serão o estímulo para que ocorra a síntese de novas adesinas, permitindo a interação do grupo inicial de células bacterianas com o grupo seguinte. Como consequência há formação de matriz construindo a multicamada e estruturando o biofilme (KARATAN & WATNICK 2009).

Durante a adesão, as características do substrato influenciam a formação do biofilme. A presença ou ausência de glicose na superfície do substrato pode aumentar ou inibir a adesão (KARATAN & WATNICK 2009), bem como as propriedades da superfície celular, sendo as superfícies rugosas mais propensas à formação de biofilme (DONLAN, 2002). As características do meio aquoso, como os níveis de nutrientes, pH, força iônica e temperatura do meio, por exemplo, também influenciam na formação de biofilme, pois certas bactérias tem a adesão aumentada com o aumento de cátions no meio (DONLAN, 2002; SIMÕES *et al.*, 2010; BIXLER & BHUSHAN, 2012).

Segundo Galanakos e colaboradores (2009) células bacterianas não se diferenciam, mas respondem às modificações ambientais adaptando sua expressão

genética quando necessário. Por essa razão torna-se mais apropriado dizer que biofilmes são comunidades interativas e não simplesmente *microrganismos* multicelulares. A comunicação entre as bactérias do biofilme se dá através de seu sistema de sinalização célula-célula, conhecido como *quorum sensing*, que coordena a expressão genética de maneira densidade-dependente (KONEMAN, 2012). Ele é responsável por importantes atividades microbianas (SIMÕES *et al.*, 2010) como a produção da matriz, bioluminescência, secreção de fatores de virulência, tendo papel importante durante a adesão (SIMÕES *et al.*, 2010). Esse sistema auto-organizacional baseia-se no processo de auto-indução, liberando pequenas moléculas sinalizadoras conhecidas como auto-indutores (SIMÕES *et al.*, 2010) que se acumulam no ambiente em que está sendo constituído o biofilme. (ESPER, 2011; RUTHERFORD & BASSLER, 2012; WILKINS *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2015). Quando a densidade populacional está baixa, os auto-indutores encontram-se em menor quantidade e acabam por induzir a modificação na expressão fenotípica (WILKINS *et al.*, 2014) fazendo com que a bactéria seja convertida de sua forma livre para a forma de biofilme, facilitando a adesão com as células bacterianas previamente fixadas à superfície do hospedeiro, aumentando assim a densidade do biofilme. Bactérias Gram-positivas utilizam oligopeptídeos modificados (KARATAN & WATNICK, 2009) e Gram-negativas utilizam lactonas como auto-indutores. O texto de Karatan e colaboradores (2009) apresenta uma abordagem bioquímica detalhada sobre a regulação positiva e negativa desse mecanismo de auto-indução.

Após a adesão, na fase de proliferação, as microcolônias irreversivelmente ligadas passam a secretar mais moléculas sinalizadoras a fim de aumentar o biofilme. A matriz formada na base do biofilme, através da secreção de substância polimérica extracelular é expandida e o biofilme amadurece tendo, inclusive, as bactérias o potencial de reproduzir-se. É nessa etapa em que são formados canais de água na matriz, como uma espécie de sistema circulatório primitivo que contribui para a homeostase do biofilme e para oxigenação e transporte de nutrientes (SHUNMUGAPERUMAL, 2010; WILKINS *et al.*, 2014). No biofilme maduro, a proporção de matriz e células é de aproximadamente 70-95% e 5-25%, respectivamente (SHUNMUGAPERUMAL, 2010). Nesta fase, outras espécies de bactérias podem aderir ao biofilme formado. Cabe lembrar que tanto *microrganismos* aeróbios quanto anaeróbios podem coexistir, sendo esses últimos predominantes

nas camadas mais profundas dos biofilmes, enquanto os demais podem ficar aderidos às camadas superiores do biofilme, conforme a afinidade com as bactérias que o originaram. No final do ciclo de vida do biofilme, uma parte das bactérias retorna ao fenótipo planctônico dispersando-se e vindo a colonizar outras superfícies, criando novas comunidades (WILKINS *et al.*, 2014).

De certa forma, os biofilmes são auto-suficientes: em caso de falta de nutrientes sua energia é proveniente do consumo dos mesmos polissacarídeos que o compõem a partir da secreção de enzimas que o digerem (WILKINS *et al.*, 2014). KARATAN e colaboradores (2009), em sua revisão, mostraram que a presença de glicose pode ter efeito estimulador na síntese de matriz polimérica, da mesma forma que o indol e complexos contendo ferro tem a função de ativar a produção de biofilmes. O indol, por ser resultante da hidrólise do aminoácido triptofano, pode servir de recurso energético quando as comunidades bacterianas apresentam níveis baixos de nutrientes. Em biofilmes de bactérias que não produzem indol, como a *P. aeruginosa*, por exemplo, a utilização de meio de cultura enriquecido com indol pode aumentar a formação de biofilme. Em contrapartida, o ferro, é considerado ativador da formação de biofilmes, conforme a espécie bacteriana em questão. O biofilme de *S. epidermidis* tem sua formação estimulada pelos baixos níveis de ferro. Diferentemente do que ocorre com a *P. aeruginosa* que em presença de baixas quantidades de ferro tem a formação do biofilme inibida devido a ligação com a lactoferrina.

Estando na forma de biofilme as bactérias mostram-se cerca de 10 a 1000 vezes mais resistentes aos antimicrobianos do que quando na sua forma livre (WILKINS, *et.al.* 2014), apresentando diversos mecanismos de defesa contra o hospedeiro, o que lhes permite sobreviver a ataques de células fagocitárias e a mudanças de pH do meio, havendo, assim, a capacidade de causar infecções que diferem daquelas causadas pela bactéria na forma livre.

A tolerância dos biofilmes à defesa imune e aos antimicrobianos está relacionada ao modo de crescimento do biofilme (CIOFU *et al.*, 2014). Diversos fatores relacionados aos biofilmes podem explicar, em parte, a sua tolerância a farmacoterapia antimicrobiana:

1) A troca de informações entre as bactérias realizada através de plasmídeos ocorre com mais frequência em biofilmes, facilitando a transferência de genes de resistência (LEID, 2009);

2) A atividade metabólica das bactérias situadas nas camadas mais profundas do biofilme diminui, prejudicando a ação de fármacos que originalmente atuariam na divisão e no metabolismo celular (CATALDI *et al.*, 2014). Essa diminuição da atividade metabólica explicaria a difícil erradicação de infecções em pacientes que fazem uso de dispositivos médicos implantáveis infectados com biofilmes (EHRlich *et al.*, 2011), bem como a menor efetividade de aminoglicosídeos em condições de anaerobiose (CRAMTON *et al.*, 2001; SHARMA *et al.*, 2014);

3) Presença de “células persistentes” (LEWIS, 2005). Dentre as células metabolicamente inativas localizadas no interior dos biofilmes, as células persistentes compõem uma pequena subpopulação (PERCIVAL *et al.*, 2011; CIOFU *et al.*, 2014) cujo crescimento é mais lento e que resiste aos antimicrobianos, atuando como reservatórios que podem ser reativados após o término do tratamento com antibiótico (RABIN *et al.*, 2015).

4) A matriz retarda a difusão de fármacos. A matriz composta de alginato e DNA extracelular da *P. aeruginosa*, por exemplo, pode ligar-se a aminoglicosídeos e induzir tolerância a antibióticos como a tobramicina (CIOFU *et al.*, 2014);

5) O sistema de *quorum sensing* através da liberação de fatores que sinalizam a necessidade de adesão. Segundo Ciofu e colaboradores (2014) aparentemente esse mecanismo influenciaria a tolerância de biofilmes a antimicrobianos, mas não em bactérias planctônicas. No caso da *P. aeruginosa*, por exemplo, a produção de DNA extracelular, presente na matriz polimérica, inibiria a penetração de diversos antimicrobianos no interior do biofilme.

Além dos mecanismos citados acima, o aumento da atividade de bombas de efluxo de fármacos é responsável pela diminuição do efeito antimicrobiano no biofilme (LEID, 2009). Embora presentes em bactérias planctônicas, alguns genes que codificam as bombas de efluxo são ativados somente quando os *microrganismos* encontram-se na forma de biofilme. Em estudo de Zhang e colaboradores (2008) através da utilização de cepas de *P. aeruginosa* foram

comparadas as concentrações bactericidas mínimas de biofilmes (MBC-Bs) e de células planctônicas (MBC-Ps) de cepas com e sem deleção em genes responsáveis pela codificação de bombas de efluxo. Os resultados mostraram que a deleção não acarretava diferenças nas MBC-Ps frente aos antimicrobianos testados, entretanto, as MBC-Bs de cepas com a deleção apresentaram valores até três vezes menores que as cepas sem a deleção, comprovando que as bombas de efluxo são mais expressas em biofilmes.

Apesar da resistência dos biofilmes ao tratamento antimicrobiano estar bem difundida na literatura científica, atualmente utiliza-se as mesmas doses de antimicrobianos indicadas para tratamento de infecções agudas causadas por bactérias não formadoras de biofilme, o que acarreta na melhora dos sintomas da infecção, mas não erradica os *microrganismos* no interior do biofilme formado (KOBAYASHI, 2001). Essa prática terapêutica contribui para o estabelecimento de infecções crônicas (BJARNSHOLT *et. al.*, 2013), para o desenvolvimento de resistência bacteriana aos antimicrobianos bem como estimula o crescimento desses biofilmes, à medida que as doses de antimicrobianos utilizadas podem produzir concentrações subinibitórias (KARATAN & WATNICK, 2009). Em muitos casos, os tratamentos mais efetivos podem envolver métodos físicos e químicos (aplicação de ultrassom, antibioticoterapia e antissepsia) ou a direta remoção do biofilme seja por lavagem, desbridamento ou reparo cirúrgico (BIXLER & BHUSHAN, 2012), sendo esse último procedimento responsável pelo aumento do índice de mortalidade de pacientes.

Diante do exposto, fica evidente que os biofilmes são um problema importante no tratamento de infecções bacterianas e o conhecimento sobre o tema é fundamental para a busca de tratamentos mais efetivos. O presente trabalho revisa dois tópicos relevantes relacionados a infecções com biofilme: (1) as bactérias prevalentes na formação de biofilme e (2) as doenças onde o biofilme é mais comum, com seus respectivos tratamentos atuais e sob investigação.

Para essa revisão foram escolhidas as bases de dados *Web of Science*, *Science Direct* e *Pubmed*, utilizando os termos “antibiotics”, “antimicrobials”, “bacterial”, “biofilm”, “clinical”, “disease”, “formation”, “management”, “medical devices”, “microbiology”, “patients”, “review” e “treatment”, bem como cruzamento

dessas palavras. A busca restringiu-se aos últimos quinze anos desde a data da publicação. Devido a grande quantidade de publicações relacionadas a biofilmes, mas não específicas da área da saúde, a busca foi refinada selecionando-se apenas estudos pré-clínicos e clínicos, dando prioridade àqueles publicados nos últimos cinco anos e disponíveis gratuitamente. Referências dos primeiros artigos selecionados também foram utilizadas, nesse caso, não houve restrição quanto ao ano da publicação.

2. INFECÇÕES RELACIONADAS A BIOFILMES: CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS E TÉCNICAS PARA IDENTIFICAÇÃO

O modelo de crescimento bacteriano *in vitro* baseado em microrganismos planctônicos permite mimetizar a maioria das infecções agudas, mas, como exposto anteriormente, difere do desenvolvimento de infecções crônicas (WOLCOTT *et al.*, 2013), pois estas envolvem microrganismos agregados em comunidades (biofilmes) que visam protegê-los da resposta imune do hospedeiro. Segundo Parsek & Singh (2003), os critérios para diagnosticar infecções relacionadas a biofilmes norteiam-se em seis pontos básicos:

1) Associação de bactéria patogênica a uma superfície: infecções crônicas envolvendo biofilmes podem se estabelecer em tecidos, como a mucosa do ouvido (na otite do ouvido médio), em feridas na pele (em queimados), no endocárdio (na endocardite), pulmão (na fibrose cística), ou em dispositivos médicos, como cateteres (SHUNMUGAPERUMAL, 2010) e próteses.

2) Exame direto do tecido infectado: quando identificadas células bacterianas agregadas em grupos (micro ou macrocolônias), circundadas por matriz, sendo de origem bacteriana ou do próprio hospedeiro (como fibrina, colágeno e fibronectina) (DONLAN, 2002);

3) Infecção é restrita a um local específico no hospedeiro: tropismo de certos microrganismos por determinado tecido do paciente. Em caso de dispositivos médicos, pode estar restrita ao local de inserção do material (SETH *et al.*, 2012);

4) Resistência a antibioticoterapia após demonstrar susceptibilidade a bactérias planctônicas: a resposta ao tratamento pode variar conforme o fenótipo expresso pela bactéria. Como mencionado anteriormente, biofilmes formam-se como estratégia de sobrevivência bacteriana (DE LA FUENTE-NUÑEZ *et al.*, 2013);

5) Cultura negativa mesmo após documentação de alta suspeita clínica de infecção: amostras convencionais de sangue ou de aspirado broncoalveolar podem não conter bactérias em virtude de estarem aderidas à superfície ao compor o biofilme;

6) Resposta deficiente do hospedeiro: por exemplo, quando ocorre a chamada “fagocitose frustrada” processo em que polimorfonucleares encontram o patógeno, mas não conseguem engolfá-lo (como é o caso do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* que, por conter alginato em sua matriz acaba por resistir a resposta imune do hospedeiro) (LEID, 2009).

Para auxiliar na elucidação do diagnóstico, as técnicas disponíveis para identificação dos patógenos abrangem métodos convencionais como biópsia tecidual, cultura bacteriológica e detecção por imagem até técnicas mais sofisticadas que envolvam biologia molecular (SETH *et al.*, 2012). A escolha adequada do método diagnóstico pode basear-se no objetivo da equipe médica: se o objetivo principal for determinar a presença de bactéria no sítio de infecção para iniciar o tratamento, não é necessária a identificação da sua espécie e do seu fenótipo, se planctônico ou formador de biofilme. Entretanto, se a identificação do patógeno constituir fator determinante para a escolha do tratamento, como por exemplo, realizar ou não a remoção de um implante ou apenas promover a remoção mecânica do biofilme, torna-se importante avaliar a presença de biofilme bem como a espécie do patógeno.

Nesse aspecto, diagnósticos de bactérias formadoras de biofilmes são complicados: biofilmes não são detectados em amostras convencionais de sangue e líquido cefalorraquidiano em virtude de sua adesão a superfícies (WILKINS *et al.*, 2014). Comumente ocorrem resultados falso-negativos. Além disso, a presença da matriz extracelular forma uma barreira física que reduz a resposta inflamatória do hospedeiro (SETH *et al.*, 2012). O diagnóstico nesses casos seria através da

presença de bactérias expressando o fenótipo planctônico no material amostrado, mas nem sempre isso ocorre.

A aplicabilidade de cada técnica diagnóstica é definida a partir do tipo de amostra a ser investigada (FUX *et. al.*, 2006). Para identificação de infecções com bactérias formadoras de biofilme em que não é possível a utilização de cultura convencional destacam-se métodos moleculares como reação em cadeia da polimerase (PCR), através da amplificação da região 16S do rDNA bacteriano, para identificação do microrganismo (FUX *et. al.*, 2006), e fluorescência por hibridização *in situ* (FISH) (GALANAKOS, 2009), pois devido a sua grande sensibilidade, podem auxiliar a detecção e identificação das bactérias (WOLCOTT *et. al.*, 2013) quando há alta suspeita de infecção. Cerca de 80 a 100% dos casos de otite do ouvido médio com efusão, por exemplo, conseguem ser detectados por PCR ou FISH (WILKINS *et. al.*, 2014).

Quando é necessária a caracterização morfológica, assim como maiores informações sobre a extensão do biofilme formado, a técnica considerada padrão-ouro (TRINIDAD *et. al.*, 2010) é a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Valendo-se desta técnica, Fux e colaboradores (2006), analisaram amostras de válvulas retiradas de pacientes com hidrocefalia objetivando diagnosticar presença de biofilmes. A MEV mostrou-se eficiente na detecção da morfologia e da extensão da formação de biofilmes de diferentes espécies (*S. aureus*, *S. epidermidis*, dentre outros), corroborando com os resultados obtidos por cultura bacteriana convencional realizada para comparação. Apesar de eficiente, a MEV apresenta a desvantagem de requerer desidratação do espécime a ser analisado, o que provoca distorção da amostra e aparecimento de artefatos. Dessa forma, em estudos de desenvolvimento de fármacos cujo alvo é o glicocálice (matriz polimérica extracelular, altamente hidratada), a técnica a ser utilizada é a microscopia eletrônica de varredura ambiental (MEV-ambiental) que mantém a amostra intacta e hidratada (TRINIDAD *et. al.*, 2010).

3. BACTÉRIAS FORMADORAS DE BIOFILMES

Diversas são as bactérias formadoras de biofilmes de importância clínica, sendo muitas delas responsáveis pela cronicidade de um mesmo grupo de doenças. Os *microrganismos* comumente associados a infecções crônicas no ambiente hospitalar são *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis* e *Burkholderia cepacia* (BIXLER & BHUSHAN, 2012; RABIN *et al.*, 2015). Em seus biofilmes é possível identificar polissacarídeos em comum como manose, galactose, glucose (mais abundantes) e N-acetil-glucosamina, ácido galacturônico, arabinose, fucose, rhamnose e xilose. Algumas apresentam polissacarídeos não específicos, mas que aumentam em resposta ao estresse, como o ácido colânico (antígeno M) na *Escherichia coli* e o alginato na *Pseudomonas aeruginosa*.

Em alguns casos, patógenos responsáveis por quadros infecciosos agudos recorrentes como o *Haemophilus influenzae* em infecções pulmonares, por exemplo, acabam por danificar o órgão possibilitando a colonização por microrganismos mais agressivos, como a *P. aeruginosa*, levando a piora do prognóstico. Alguns trabalhos mais recentes indicam que algumas cepas de *H. influenzae* também podem formar biofilme (CARDINES, 2012).

Em geral, as infecções relacionadas a biofilmes funcionam como agravantes de um quadro clínico inicial que idealmente não pressupunha presença bacteriana. Diante disso, doenças de ordem genética ou doenças que não afetam órgãos ou tecidos específicos (coração, pulmão e rins, por exemplo) podem debilitar o paciente tornando-o susceptível ao desenvolvimento de infecções, como é o caso da fibrose cística. Outras enfermidades, como infecções em próteses implantadas (SETH *et al.*, 2012), ferimentos crônicos (GETHIN, 2009) e infecções em cateteres (PASTERNAK, 2009), podem desenvolver-se devido à carência de cuidados durante os procedimentos cirúrgicos e ambulatoriais envolvendo, inclusive, a microbiota do próprio paciente (MAHAMI, 2011).

Independente do fator que tornou o indivíduo susceptível à colonização bacteriana torna-se importante conhecer as peculiaridades de cada espécie durante a formação de seu biofilme, a fim de buscar as melhores estratégias para a sua erradicação. No presente trabalho quatro patógenos foram escolhidos para

detalhamento estrutural de seus biofilmes por impactarem negativamente no prognóstico das patologias pesquisadas.

3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

A *P. aeruginosa* compõe o grupo dos bacilos Gram-negativos não fermentadores. Seu biofilme difere dos demais por sua matriz constituir-se predominantemente de alginato (monômeros de ácido manurônico e ácido gulurônico) (CATALDI *et al.*, 2014), polímero responsável pela aparência mucóide das colônias quando cultivadas em meio de cultura (BARTH & BARROS, 2001). Além disso, açúcares como PEL-glicose e PSL-manose também podem ser encontrados (KARATAN & WATNICK). O alginato aprimora a estrutura tridimensional do biofilme, previne a fagocitose por células do hospedeiro e liga-se a antibióticos catiônicos como aminoglicosídeos (BJARNSHOLT *et al.*, 2008). A regulação da hidrólise do alginato mediante atividade enzimática do biofilme ocorre através de ativação genética, e isso pode causar a liberação das células na superfície do biofilme, contribuindo para a sua dispersão (DONLAN, 2002). Além do alginato, o segundo maior componente do biofilme de *P. aeruginosa* é o DNA extracelular, que atua estabilizando a matriz do biofilme. É liberado através dos mecanismos de sinalização célula-célula e também através de estruturas como pili e flagelo (SHARMA *et al.*, 2014).

Importante fator de virulência, o sistema *quorum sensing* de *P. aeruginosa* é regulado a partir de dois tipos de moléculas sinalizadoras: N-acil-homoserina lactonas (do inglês N-acylhomoserine lactones – AHL) e 4-quinolonas (SHARMA *et al.*, 2014; SINGH *et al.*, 2000). Quando em altas concentrações, essas moléculas indicam que a população bacteriana está aumentada e, assim, ao ligarem-se a receptores específicos, esses sinalizam que deve ser restringida a expressão de genes relacionados ao aumento da densidade celular. Além disso, o *quorum sensing* é importante no controle da produção de pioverdina, piochelina e piocianina, os quais são sideróforos (ZAGO *et al.*, 2000) e podem auxiliar na formação dos biofilmes; e na prevenção do acúmulo de óxido nítrico que é liberado durante

respiração anaeróbia sendo tóxico para esse patógeno quando em altas concentrações (CIOFU *et al.*, 2014).

A *P. aeruginosa* cresce mais rápido quando em monocultura, formando um biofilme com estrutura semelhante ao formato de um cogumelo (BJARNSHOLT *et al.*, 2013). A *P. aeruginosa* possui como um dos mecanismos de defesa a baixa permeabilidade de membrana, pois o bacilo limita a entrada de antibióticos ao alterar suas proteínas de transporte como as porinas, por exemplo (MESAROS *et al.*, 2007). Isso faz com que ocorra o efluxo de antibióticos para fora da célula, não permitindo o acúmulo dos mesmos no citoplasma da célula bacteriana (KONEMAN, 2012).

3.2 *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*

Do gênero *Staphylococci*, destacam-se duas espécies relacionadas a infecções nosocomiais: *S. aureus* (coagulase positivo) e *S. epidermidis* (coagulase negativo). O *S. aureus* pode ser encontrado colonizando adultos saudáveis e seu aparecimento em infecções nosocomiais deve-se à contaminação advinda do próprio paciente ou da equipe que lhe presta atendimento (ARCHER *et al.*, 2011). Por outro lado o *S. epidermidis*, que compõe a microbiota epitelial humana, é comumente encontrado em pacientes imunocomprometidos, embora também esteja presente em pacientes saudáveis, causando infecções devido ao contato com mucosas, traumas ou implantes (OTTO, 2008). Ambos são patógenos oportunistas que podem apresentar fenótipo formador de biofilmes.

Em estudo publicado por Rohde e colaboradores (2007) com cepas isoladas de próteses articulares de quadril e joelho, cerca de 69% das cepas pesquisadas de *S. epidermidis* apresentaram fenótipo formador de biofilme; enquanto que para o *S. aureus*, todas as cepas expressaram esse fenótipo. Em estudo com cateteres urinários infectados por essas mesmas bactérias formadoras de biofilmes foi observado que a utilização de vancomicina eliminava apenas as bactérias planctônicas, incluindo as resistentes à meticilina (MRSA), mas o biofilme se mantinha como uma espécie de reservatório bacteriano. Os autores concluíram que, visando à erradicação bacteriana, a infecção por *S. aureus* requereria maiores

cuidados que a infecção por *S. epidermidis* principalmente quando se trata de cepas resistentes MRSA, causadoras das infecções mais graves. A mesma conclusão foi obtida no estudo de JONES e colaboradores (2001). Pode-se explicar os resultados dessas duas investigações através dos relatos de Bixler e Bhushan (2012) que mostraram que o biofilme de *S. aureus* forma-se mais rapidamente e é mais espesso tendo em vista que o tratamento com antimicrobianos não tem a mesma eficácia em biofilmes se comparado a bactérias livres.

As cepas do gênero *Staphylococci* formam um biofilme multicamada envolto por glicocálice (ARCHER *et al.*, 2011) ou por *slimes*, que são estruturas semelhantes a cápsulas que auxiliam na aderência a superfícies de células e de implantes sintéticos enquanto inibem a fagocitose pelas células de defesa do hospedeiro (BARTH & BARROS, 2001). A parede da célula bacteriana é constituída principalmente por peptídeoglicano, além de ácido ribitol teicóico (Polissacarídeo A em *S. aureus*) e ácido glicerol teicóico (Polissacarídeo B, fator de virulência em *S. epidermidis*) (ROHDE *et al.*, 2007). Quando o ácido teicóico é ancorado a lipídios de membrana é conhecido como ácido lipoteicóico (OTTO, 2008; KONEMAN, 2012). O biofilme, portanto, é composto por esses polissacarídeos e por proteínas bacterianas e do hospedeiro. Ambas as espécies tem a capacidade de expressar diversas adesinas (ROHDE *et al.*, 2007) que permitem sua fixação em proteínas da matriz extracelular do hospedeiro, favorecendo sua adesão a superfícies poliméricas ou metálicas presentes em implantes, por exemplo (GALANAKOS, *et al.*, 2009). Dentre a adesinas, a responsável pela adesão intercelular é conhecida como adesina polissacarídica intercelular (*polysaccharide intercellular adhesin*, PIA) (MACK *et al.*, 1996; OTTO, 2008; ROHDE *et al.*, 2010) também chamada de poli-N-acetil-glucosamina (PNAG) (RABIN *et al.*, 2015). Considerada importante fator de virulência, essa adesina é formada pelo polissacarídeo poli-N-acetil- β (1,6)-glucosamina cuja produção pode ser estimulada por condições de anaerobiose (CRAMTON *et al.*, 2001) como, por exemplo, em biofilmes formados em ferimentos profundos (MACK *et al.*, 1996; ARCHER *et al.*, 2011). Quando desacetilada, a adesina polissacarídica intercelular libera grupamentos que tornam o ambiente positivamente carregado, o que facilita a adesão entre as células, pois essas possuem carga negativa em sua superfície devido a presença do ácido teicóico (OTTO, 2008).

Além da proteína polissacarídica intercelular, o DNA extracelular (eDNA) exerce papel importante na formação de biofilmes desse gênero, (ARCHER *et al.*, 2011), pois a proximidade entre células proporcionada pelo biofilme somada a presença de eDNA fornecem as condições necessárias para a troca de material genético (ARCIOLA *et al.*, 2012). O eDNA atua como componente estrutural da matriz polimérica, facilita a agregação intercelular e contribui como fator de virulência, entre outras funções. Em biofilmes de *S. aureus* é visto como uma importante adesina estrutural para a matriz do biofilme, se comparado ao biofilme de *S. epidermidis* (DOROSHENKO *et al.*, 2014).

A presença de proteínas de superfície pode influenciar os microrganismos de maneiras diferentes. O estudo publicado por Martí e colaboradores (2010), mostra que a formação de biofilme de *S. aureus* também está associada com a produção de proteínas ancoradas à superfície e, quando estas são degradadas por proteases, a formação de biofilme é inibida, contrariamente ao que acontece com *S. epidermidis* em que a formação é estimulada (ARCIOLA *et al.*, 2012). Conforme pode ser visualizado na Figura 2, além de cepas PIA-dependentes, para uma mesma espécie é possível encontrar cepas conhecidas como PIA-independentes (OTTO, 2008; ARCIOLA *et al.*, 2012) que utilizam adesinas diferentes durante a adesão primária à superfície e, assim constituir o biofilme. Cepas de *S. epidermidis* e *S. aureus*, por exemplo, utilizam respectivamente as proteínas Aap e Bap como adesinas intercelulares (ROHDE *et al.*, 2007), enquanto que algumas cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) utilizam proteínas ligantes de fibronectina (*fibronectin-binding proteins*, FnBPs) que atuam no biofilme em maturação (NEILL *et al.*, 2008).

Nesse aspecto, Houston e colaboradores (2011), bem como Cha e colaboradores (2013), demonstraram que alterações genéticas como a deleção de um dos genes relacionados à produção de adesinas influencia de maneira diferente cada uma dessas proteínas (PIA e FnBPs). A deleção do gene *atl*, por exemplo, causa prejuízo na formação de biofilmes dependentes de proteínas ligantes de fibronectina, mas não há modificação na formação de biofilmes dependente de PIA. No artigo de Houston e colaboradores (2011) são relatados outros genes que, quando bloqueados, interferem nessas duas adesinas dificultando a formação de biofilmes em superfícies de poliestireno.

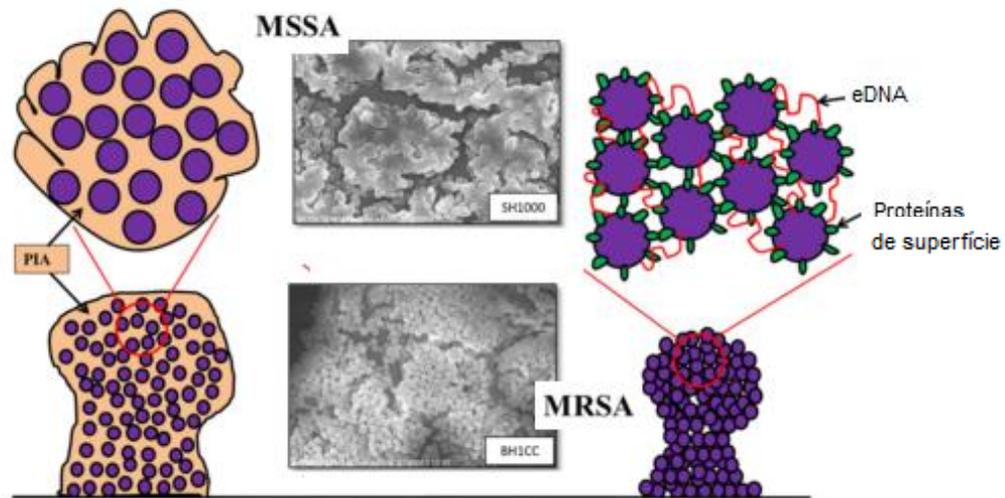


Figura 2. Representação dos biofilmes formados por cepas de *S. aureus* sensíveis (MSSA) e resistentes (MRSA) à meticilina: formação PIA-dependente (esquerda) e PIA-independente (direita). Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em aumento de 3500 vezes. (Adaptado de MCCARTHY *et al.*, 2015).

Em estudo de Arciola e colaboradores (2012) observou-se que, diferentemente do que ocorre com as bactérias Gram-negativas, a comunicação célula-célula através do *quorum sensing* ocorre de outra forma em bactérias Gram-positivas: a expressão dos genes que regulam o *quorum sensing* diminui conforme o biofilme vai sendo formado durante a infecção, facilitando o desprendimento das bactérias e consequente dispersão dessas a partir de uma redução na expressão de adesinas como a PIA.

3.3 *Haemophilus influenzae*

Haemophilus influenzae é um patógeno que costuma acometer o trato respiratório superior e inferior humano (MOXON *et al.*, 2008), associado a doenças como otites do ouvido médio, sinusites (NIZET *et al.*, 1996) e complicações de doenças pulmonares como bronquite crônica e fibrose cística (FC) (STARNER *et al.*, 2006). Compõe os bacilos Gram-negativos pleomórficos (cocobacilos). Esta espécie é dividida entre cepas tipáveis (que reagem com os sorotipos a-f) e não-tipáveis (que

não reagem com os mesmos sorotipos) (MARIN & SILVA, 2005). A cepa conhecida como não-tipável (*Haemophilus influenzae* Non-typeable - NTHi) não possui cápsula e é tida como formadora de biofilmes, contribuindo para a persistência bacteriana e patogênese de doenças (STARNER *et al.*, 2006). Além disso, apresenta-se como componente da microbiota natural da nasofaringe, podendo atuar como patógeno oportunista na otite média recorrente (JURCISEK; BAKALETZ, 2007).

Para a formação de um biofilme a adesão é essencial, permitindo que ele se desenvolva e resista à resposta inflamatória do hospedeiro, por exemplo. Nesse aspecto, ao contrário de outras espécies bacterianas, o *H. influenzae* não-tipável possui as proteínas HMW1 e HMW2, a Hia e o pili hemoaglutinante como fatores de aderência (KRASAN *et al.*, 1999). As proteínas HMW1 e HMW 2, ao serem expressas nas cepas de *H. influenzae*, permitem a colonização mais rápida da nasofaringe. Segundo Krasan e colaboradores (1999) em estudo com isolados de nasofaringe e ouvido médio de crianças, a Hia tem a função de promover também a adesão entre diversas células epiteliais humanas, mas aparece em menor proporção que as duas adesinas anteriormente citadas. A aderência ao muco respiratório e a fibronectina deve-se a presença de pili ou fímbria (ST. GEME *et al.*, 2002).

Além dessas adesinas, a proteína externa de membrana P2, que é basicamente uma porina fortemente imunogênica contribui para o desenvolvimento de doenças crônicas. Ela protege o *H. influenzae* da ação de anticorpos, através da interação com a mucina presente no muco, devido ao reconhecimento dos oligossacarídeos ligados ao ácido siálico que compõem essa molécula. Essa proteção não impacta em indivíduos com função mucociliar normal, mas é preocupante em indivíduos com fibrose cística. Nesses casos, os pacientes passam a ter dois fatores que contribuem para o surgimento de infecções: a presença de muco viscoelástico nos pulmões devido a FC, que predispõe à adesão e colonização bacteriana, e as adesinas inerentes ao patógeno, que favorecem a sua ligação a superfície de um epitélio pulmonar doente (ST. GEME, 2002; JURCISEK & BAKALETZ, 2007; KING, 2012).

Em estudo de Starner e colaboradores (2006) avaliou-se *in vivo* a presença de estruturas (agrupamentos celulares envoltos por matriz polimérica) correspondentes a formação de biofilmes de NTHi utilizando amostras de lavado broncoalveolar de pacientes fibrocísticos jovens, sendo a primeira evidência de que

esses biofilmes estariam presentes no pulmão, visto que diversos estudos na literatura mencionavam esses biofilmes na otite do ouvido médio, mas não em doenças pulmonares como a fibrose cística. Das dez amostras analisadas, em duas foram encontradas evidências morfológicas (constituição de microcolônias) que sugeriam a presença de biofilme. Para comprovar esse resultado, testou-se *in vitro* a capacidade de formação de biofilmes dessas cepas não-tipáveis de *H. influenzae*. Dez isolados clínicos formaram biofilmes em superfícies plásticas. A fim de transpor os resultados para a perspectiva *in vivo*, os isolados cujos biofilmes apresentaram-se robustos foram submetidos a culturas de epitélio das vias aéreas e observou-se a formação de biofilmes na superfície apical das células, comprovado também por microscopia. Como o muco produzido pelas células durante a cultura poderia ser confundido com o biofilme, devido a sua constituição semelhante à matriz polissacarídica desse, os autores utilizaram cepas de *H. influenzae* contendo mutações nos genes que expressam o ácido siálico ligado ao esqueleto polissacarídico que forma a matriz polimérica do biofilme para confirmar os achados com os isolados clínicos. As cepas contendo a mutação não produziram biofilmes robustos como os produzidos pelas cepas isoladas dos pacientes, com ausência dessa mutação. Esses resultados são relevantes, pois indicam que seria interessante tratar pacientes fibrocísticos ainda assintomáticos, uma vez que o *H. influenzae* acaba por danificar o tecido pulmonar facilitando ainda mais a colonização por patógenos mais agressivos, como a *P. aeruginosa*.

3.4 Infecções Polimicrobianas

Evidências clínicas sugerem que infecções polimicrobianas são mais severas em função da atuação sinérgica dos *microrganismos*. Por exemplo, em co-cultura, o *H. influenzae* produtor de β -lactamase aumenta a relação CIM/CBM (Concentração Inibitória Mínima/Concentração Bactericida Mínima) da amoxicilina para o *Streptococcus pneumoniae*. A *P. aeruginosa* em co-cultura com *S. aureus* aumenta a infecção em ratos (WOLCOTT *et. al.*, 2013). Uma característica importante das espécies de *Pseudomonas*, segundo Ochoa e colaboradores (2015), é justamente a sua capacidade de adquirir e trocar material genético com outras espécies

causadoras de infecções nosocomiais, como a *Klebsiella pneumoniae* e a *Escherichia coli*.

A presença de biofilmes polimicrobianos pode influenciar positivamente na perpetuação de espécies patogênicas. Em estudo de Armbruster e colaboradores (2010) observou-se que, durante co-cultura de *H. influenzae* com *Moraxella catarrhalis*, que é também um patógeno oportunista das vias aéreas, a presença de *M. catarrhalis* aumentou a resistência das cepas de *H. influenzae* à ampicilina. Quando testada a associação de ampicilina e ácido clavulânico sobre o biofilme polimicrobiano, esse efeito foi anulado, permitindo a constatação de que a produção de β -lactamases por parte da *M. catarrhalis* contribui para a diminuição da susceptibilidade do *H. influenzae* aos antimicrobianos. O mesmo aconteceu quando o biofilme foi exposto a sulfametoxazol e trimetoprima.

4. INFECÇÕES PROVOCADAS POR BACTERIAS FORMADORAS DE BIOFILMES ADERIDAS A SUPERFÍCIES BIÓTICAS E SEUS TRATAMENTOS

A presença dos biofilmes nas infecções pode ser devida a doenças que predispõem o paciente à invasão microbiana que leva à colonização de superfícies bióticas como coração, pulmões, rins, seios nasais, ouvidos e tecido epitelial. Dentre elas, podem ser citadas a fibrose cística, em que o muco mais viscoso que o normal facilita a colonização por patógenos oportunistas; a otite do ouvido médio, que quando crônica pode manifestar-se na forma de colesteatoma, favorecendo a adesão microbiana; e as feridas crônicas, que permitem um ambiente propício a infecções, inclusive por *microrganismos* anaeróbios. Na Tabela 1 encontram-se as doenças que serão abordadas neste capítulo e os microrganismos que contribuem para a sua cronicidade.

4.1 Fibrose Cística

A fibrose cística é uma doença genética causada por mutações no gene que regula o transporte de eletrólitos através da membrana do tecido pulmonar (WANG *et al.*, 2014). Afeta, além das vias aéreas, o pâncreas, intestino, fígado e glândulas exócrinas (CIOFU *et al.*, 2014). Em todo o mundo, atinge cerca de 70 mil pessoas, sendo que no Brasil, segundo o Ministério da Saúde, a proporção de indivíduos acometidos pela doença é em torno de 1:7000 habitantes. Nessa doença, os pacientes nascem com os pulmões estruturalmente normais (DA SILVA FILHO *et al.*, 2013) e, progressivamente, ocorre redução do diâmetro das vias aéreas enquanto que a absorção excessiva de íons sódio impede a movimentação do muco e a secreção defeituosa de íons cloreto leva à desidratação dessas secreções (WANG *et al.*, 2014). Esse desequilíbrio eletrolítico torna o muco viscoso e hiperosmolar (CARDINES *et al.*, 2012), tornando o ambiente propício para a colonização bacteriana do trato respiratório (SHUNMUGAPERUMAL, 2010).

Os pacientes costumam ser acometidos por infecções por patógenos como *S. aureus*, *H. influenzae* e bacilos Gram-negativos não fermentadores de açúcar, como *P. aeruginosa* e *Burkholderia cepacia*. A prevalência varia com a idade: normalmente pacientes mais jovens são acometidos por *Staphylococcus* spp. e a *P. aeruginosa* costuma aparecer tardiamente (Figura 3). Entretanto, a colonização precoce por *P. aeruginosa* principalmente se associada com colonização concomitante com *S. aureus* piora o prognóstico em termos de morbidade e mortalidade (DA SILVA FILHO *et al.*, 2013). Já o *H. influenzae* costuma estar relacionado a quadros agudos recorrentes, contudo, existem estudos sobre sua contribuição para a cronicidade da doença (CARDINES *et al.*, 2012).

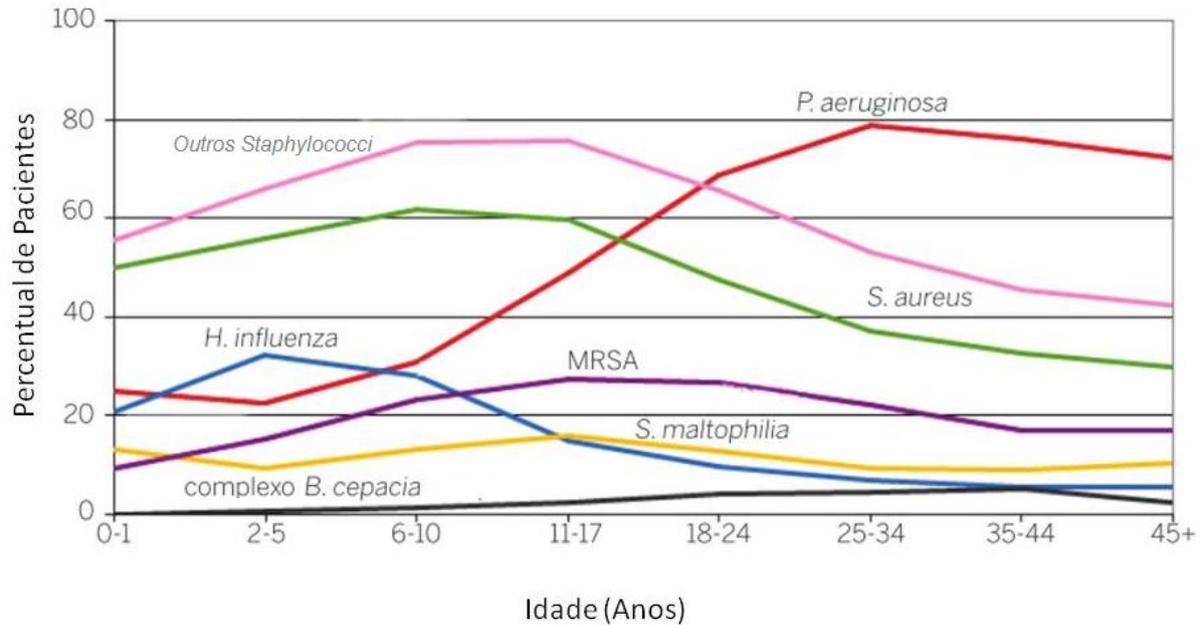


Figura 3 Patógenos responsáveis por agravar a condição respiratória de pacientes fibrocísticos e prevalência em que aparecem conforme a idade do paciente (Dados do Anuário de 2008 da Fundação de Fibrose cística dos Estados Unidos)

O diagnóstico desses patógenos nos pacientes com fibrose cística pode ser feito através de culturas de escarro, broncoscopia e esfregaço de orofaringe. Existem também métodos alternativos, como sorologia e técnicas moleculares a fim de identificar precocemente infecções por *P. aeruginosa*, por exemplo (Alvarez *et al.*, 2004). Técnicas sorológicas podem detectar *P. aeruginosa* entre seis a doze meses antes do aparecimento de culturas positivas (ALVAREZ *et al.*, 2004). Entretanto, o resultado pode variar conforme os kits diagnósticos utilizados havendo risco de falha na detecção (DA SILVA FILHO *et al.*, 2013).

Estudo realizado por Cardines e colaboradores (2012) buscou compreender como o *H. influenzae* pode estar relacionado a infecções crônicas. Através de amostras de escarro, broncoscopia ou *swab* orofaríngeo de 300 pacientes pediátricos com fibrose cística foram isoladas 79 cepas, todas formadoras de biofilmes, sendo 72 de *H. influenzae* não encapsulado (não-tipável), que apresenta maior resistência aos antimicrobianos e à resposta imune do hospedeiro. Dependendo das adesinas expressadas por cada cepa (HMW 1, HMW 2 ou Hia) a formação de biofilme pode aumentar ou diminuir, pois elas favorecem a colonização da bactéria no trato respiratório. Entretanto, quando analisados sete genótipos com

combinações diferentes dessas adesinas, não foram encontradas diferenças estatísticas importantes nos níveis de biofilme formado. Constatou-se também que a colonização por este patógeno é dinâmica: uma cepa acaba sendo substituída por outra cepa com ou sem cápsula, visto que diferentes cepas foram encontradas em amostras do mesmo grupo de pacientes coletadas em períodos diferentes, sem ser descartada a possibilidade de um paciente possuir mais de uma cepa causando a infecção. Essa alternância permitiu constatar que cepas persistentes tendem a formar mais biofilmes quando comparadas a cepas não-persistentes, confirmando que este patógeno é de difícil erradicação, pois as variações durante os diferentes estágios da infecção o tornam resistente a diferentes condições ambientais e de estresse.

A *P. aeruginosa* é responsável por promover o declínio da capacidade pulmonar levando à pneumonia e está relacionada com o estabelecimento da cronicidade em 90% das infecções em adultos fibrocísticos (TRÉ-HARDY *et al.*, 2009a). Sua difícil erradicação deve-se a múltiplos mecanismos de resistência aos antimicrobianos, incluindo produção de β -lactamases, bombas de efluxo, diminuição de permeabilidade de membrana externa e atuação no sítio alvo de alguns antimicrobianos (LODISE *et al.*, 2007) aliados à mutação das cepas bacterianas, de planctônica para biofilme (DA SILVA FILHO *et al.*, 2013). Estando na forma de biofilme, a *P. aeruginosa* pode apresentar o fenótipo mucóide (KARATAN & WATNICK) no qual há hiperprodução de alginato. Isso permite o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos com relativa facilidade somado ao fato de que a presença de muco espesso no tecido pulmonar impede a transferência de moléculas de fármacos e partículas na barreira ar-sangue (WANG *et al.*, 2014). Existem relatos de que os biofilmes de *P. aeruginosa* no pulmão localizam-se na zona condutora (que compreende a traqueia, brônquios e bronquíolos) e não na zona respiratória (bronquíolos terminais, bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e sacos alveolares), que é rica em polimorfonucleares do hospedeiro (RABIN *et al.*, 2015). A dificuldade em erradicar a infecção resulta em resposta inflamatória com aceleração da perda funcional e piora do prognóstico dos pacientes.

4.1.1 Tratamentos

No tratamento da infecção pulmonar na fibrose cística busca-se diagnosticar precocemente o patógeno a fim de prevenir a formação de biofilmes (FERNÁNDEZ-OLMOS *et al.*, 2012). Assim, as concentrações comumente testadas com sucesso em *microrganismos* planctônicos poderiam ser utilizadas evitando-se a colonização por patógenos oportunistas e complicações pulmonares inerentes ao curso da doença (MARTINS & SANTOS, 2006).

A partir da escolha do tratamento, é importante definir a via de administração dos fármacos, que pode ser por via oral, intravenosa e/ou inalatória, conforme o quadro do paciente. Segundo a revisão de (HØIBY *et al.*, 2014), a administração por via sistêmica permite atingir nos pulmões concentrações adequadas à erradicação de *microrganismos* planctônicos, mas inadequadas ao tratamento de infecções por biofilmes. Em contrapartida, a administração por via inalatória prevê altas concentrações a região em que se localizam os biofilmes. Em função disso, é comum o tratamento utilizando ambas as vias. Não há comprovação de qual delas promova o melhor resultado. A escolha da via deve considerar os casos de presença de comprometimento renal do paciente, por exemplo, em que se prefere a via inalatória a fim de obter menores concentrações sistêmicas.

Assim, a escolha da via pode ser influenciada pela região pulmonar que se deseja atingir. Segundo estudo de Bjarnsholt *et al.* (2009) com amostras de tecido preservadas de pacientes que morreram devido à infecção crônica por *P. aeruginosa*, os biofilmes estão localizados na zona condutora, impregnados ao muco e não ao epitélio pulmonar; e bactérias planctônicas encontram-se na zona respiratória, normalmente fagocitadas. Terapias agressivas não erradicam patógenos na zona condutora, apenas os restringem a esse local, que passa a funcionar como uma espécie de reservatório bacteriano, permitindo que a zona respiratória mantenha-se aparentemente protegida de uma infecção massiva por biofilme. Esse fato também indica que a infecção por *P. aeruginosa* parece ser localizada, pois pacientes podem apresentar função pulmonar normal e ainda assim existirem regiões do pulmão destruídas pela resposta inflamatória provocada pelos biofilmes, o que, futuramente levaria ao agravamento da doença devido ao decréscimo da função pulmonar (BJARNSHOLT *et al.*, 2009).

Para o tratamento da infecção pulmonar na FC, o uso de antibioticoterapia é necessário em três situações: (1) para erradicação, se o patógeno for identificado precocemente; (2) na terapia de manutenção, em infecção já estabelecida (crônica) e (3) em casos de exacerbação (agudização dos sintomas) (CÉSAR & CASTRO 2011). As doses terapêuticas dos fármacos comumente utilizados nesses tratamentos encontram-se nas Tabelas 2 e 3, separadas por patógeno. As doses comumente utilizadas envolvem estudos em bactérias planctônicas. Desse modo, a estratégia adotada na clínica consiste na utilização de associações de fármacos visando, também, evitar o desenvolvimento de tolerância, cuja probabilidade é maior quando é utilizada monoterapia.

Tabela 2. Farmacoterapia para a infecção pulmonar por *P. aeruginosa*.

Fármaco	Dose Pediátrica	Dose Adulto
Aminoglicosídeos		
Amicacina (i.v)	20-30 mg 24/24 h [2] Nível sérico < 3 mg/mL [2]	5 mg/kg [1] ou 30 mg 24/24h (máximo 1,5 g/dia)[2] Nível sérico < 3 mg/mL [2]
Gentamicina (i.v.)	10-12 mg 24/24 h [2] Nível sérico de vale < 1 mg/mL [2]	5 mg/kg [1] 10-12 mg 24/24 h (máximo 600 mg/dia) [2] Nível sérico vale < 1 mg/mL [2]
Tobramicina	Intravenosa (infusão 30 min): 1 mês-18anos: 10 mg/kg 24/24 h 10-12 mg 24/24h [2] Nível sérico: <1 µg/mL [2] Inalatório: 300 mg 12/12 h [2]	7 mg/kg [1] 10-12 mg 24/24h (máximo 600 mg/dia) [2] Nível sérico vale < 1 mg/mL [2] Inalatória 300 mg 12/12 h [2]
Antituberculosos		
Rifampicina (v.o.)	10 mg 12/12 h [2]	300 mg 12/12 h (máxi. 200 mg/dia)
Carbapenênicos		
Meropenem i.v. <i>bolus</i> por 5 min ou infusão de 15-30 min [3]	120 mg 8/8 h [2] Crianças < 50 kg: 1-2 g 8/8 h [3] 4-18 anos: 25-40 mg/kg 8/8 h [3]	1 g 8/8 h [1] ou 2 g 8/8 h (máximo 6 g/dia) [2] Adultos: 1-2 g 8/8 h [3]
Imipenem (i.v)	60-100 mg 6/6 h [2]	1 g 8/8 h [1] ou 6/6 h (máximo 4 g/dia) [2]
Monobactâmicos		
Aztreonam	Intravenoso 1 mês – 2 anos 30 mg/kg 6/6 h 8/8 h [3] 2 – 12 anos 50 mg/kg 6/6 h 8/8 h [3] 20-25 mg 8/8 h [2] Inalatório: 75 mg 3x/dia [2]	Intravenoso Acima 12 anos/adultos: 2 g 6/6 h ou 8/8 h [3] 2 g 8/8 h, Max 8 g/dia [2] Inalatório: 75 mg 3x/dia [2]

(Continuação)		
Penicilinas		
Amoxicilina/clavulanato (v.o)	40-80 mg da amoxicilina 8/8 h ou 12/12 h [2]	500 mg 8/8 h ou 875 mg 12/12 h [2]
Flucloxacilina (30 min infusão iv)	<18 anos: 50 mg/kg 6/6 h [3]	2-3 g 6/6 h [3]
Oxacilina (i.v.)	200 mg 6/6 h [2]	200 mg 6/6 h (máximo 12 g/dia) [2]
Piperacilina/tazobactam iv por 3-5 min ou infusão de 20-30 min [3]	300-400 mg de piperacilina 6/6 h [2] < 12 anos 90 mg/kg 6/6 h ou 8/8 h [3]	4,5 g 6/6 h [1] 3-4 g da piperacilina 6/6 h (máximo 16 g/dia) [2] > 12 anos 4,5 g 6/6 h ou 8/8 h [3]
Ticarcilina/clavulanato	300-400 mg da ticarcilina 4/4 h ou 6/6 h [2] 1 mês-18 anos 80-100 mg/ kg 6/6 h ou 8/8 h [3]	3-4 g 4/4 h ou 6/6 h (Max. 18-24 g/dia) [2] Adulto: 3,2 g 6/6 h ou 8/8 h [3]
Polimixinas		
Colistina (Polimixina E)	Inalatório: 250.000 UI – 1.000.000 UI 12/12 h [2] Intravenoso: 60.000 UI – 75.000 UI 8/8 h [2]	Intravenosa (infusão 30 min): < 60 kg 25.000 Unidades/kg 8/8 h [3] > 60 kg 1-2 milhões de Unidades 8/8 h [3] Inalatório: 1.000.000 UI – 2.000.000 UI 12/12 h [2] Intravenoso: 60.000-75.000 UI 8/8 h [2]
Quinolonas		
Ciprofloxacino	Oral 20-40 mg 12/12 h [2] Intravenoso 30 mg 8/8 h ou 12/12 h [2]	400 mg 8/8 h [1] 500-750 mg 12/12 h (máximo 1,5 g/dia) 200-400 mg 8/8h ou 12/12 h (máximo 1,2 g/dia) [2]
Levofloxacino (v.o. e i.v)	8 mg 12/12 h [2]	500 mg 12/12 h 500-750 mg 24/24 h [2]
Sulfonamidas		
Sulfametoxazol/trimetoprim (TMP)	Oral: 15-20 mg TMP, 12/12 h [2] Intravenoso: 15-20 mg TMP 6/6 h [2]	Oral 15-20 mg TMP, 12/12 h [2] Intravenoso: 15-20 mg TMP 6/6 h (máximo 320 mg TMP) [2]

(Continuação)		
Tetraciclínas		
Doxiciclina	2-4 mg 12/12 h [2]	100 mg 12/12 h (máximo 200 mg/dia) [2]
Glicopeptídeos		
Vancomicina (i.v.)	40 mg 6/6 h [2]	40-60 mg 6/6 h [2] Nível sérico vale 5-10 µ/mL [2]
Outros		
Linezolida (v.o. e i.v.)	< 12 anos: 30 mg 8/8 h [2]	> 12 anos: 600 mg 12/12 h [2]

Adaptado de [1] MESAROS *et al.* (2007); [2] HOFFMANN & PROCIANOY (2011) e [3] UK CYSTIC FIBROSIS TRUST ANTIBIOTIC WORKING GROUP (2009)

Tabela 3. Farmacoterapia para infecção pulmonar por *S. aureus*

Classe	Fármaco	Via de administração	Dose (mg/kg/dia)/Intervalo
Fusidanas	Ácido fusídico	Oral / i.v.	25-50 (6/6 h ou 8/8 h)
Lincosaminas	Clindamicina	Oral / i.v.	20-40 (6/6 h ou 12/12 h)
Antituberculosos	Rifampicina	Oral / i.v.	15-20 (12/12 h)
Glicopeptídeos	Vancomicina	i.v.	40 (12/12 h)
	Teicoplanina	i.v.	10 (24 h)
Penicilinas	Flucloxacilina	Oral	100 (6/6 h ou 8/8 h)
	Dicloxacilina	Oral / i.v.	50 (6/6 h ou 8/8 h)
Outros	Linezolida	Oral / i.v. < 5 anos	30 (8/8 h)
		Oral / i.v. > 5 anos	20 (12/12 h)

Adaptado de (DÖRING *et al.*, 2012)

4.1.1.1 Terapia de erradicação

Em geral, o objetivo do tratamento deve ser prevenir o aparecimento de infecção crônica por *P. aeruginosa* que, se estabelecida, é dificilmente erradicada. Para isso, procura-se iniciar o quanto antes uma terapia agressiva de erradicação em caso de cultura positiva para esse patógeno, visto que normalmente os melhores resultados são encontrados em pacientes que iniciaram o tratamento em até 12 semanas da detecção inicial (HØIBY *et al.*, 2014). Sendo assim, o tratamento pode ser iniciado através de administração de ciprofloxacino (30-40 mg/kg/dia, 12/12 h no máximo 1,5 g/dia via oral) seguida de nebulização com colistina (1.000.000 UI, 12/12 h durante 28-30 dias) durante três semanas ou por utilização de monoterapia com solução de tobramicina inalatória (STI, 300 mg 12/12 h) (HOFFMANN & PROCIANOY, 2011; MESAROS *et al.*, 2007). Segundo a revisão de Döring e colaboradores (2012), estudos com esses dois tratamentos apresentaram resultados positivos havendo negatificação das culturas para *P. aeruginosa*. A utilização de tobramicina (STI) foi considerada mais segura para pacientes jovens e, diferentemente dos aminoglicosídeos administrados por via intravenosa, esse tratamento não causa efeitos adversos. Nesse caso, a estratégia recomendada para erradicação compreende 28 dias de utilização de tobramicina inalatória.

4.1.1.2 Tratamento de infecção crônica

Quando o diagnóstico de infecção ocorre tardiamente devido a inobservância dos sintomas característicos de infecção ou por má adesão ao tratamento de erradicação, o quadro cronifica, principalmente em infecções que envolvam *P. aeruginosa*. Em geral, nesses casos, a terapia objetiva retardar o declínio da função pulmonar (DA SILVA FILHO *et al.*, 2013), que é preditora de sobrevida (CIOFU *et al.*, 2014). Embora o tratamento não necessariamente leve à cura (RABIN *et al.*, 2015), a melhora dos sintomas pode ter grande impacto na qualidade de vida dos pacientes. Assim, a terapia compreende o uso de medicamentos inalatórios como tobramicina (300 mg 12/12 h em ciclos alternados de 28 dias) (HOFFMANN & PROCIANOY, 2011), que deverão ser utilizados pelo paciente durante toda a vida, associados à administração intravenosa de antimicrobianos anti-pseudomonas

(tobramicina ou colistina e ceftazidima, piperacilina e tazobactam ou carbapenem, aztreonam ou ciprofloxacino) (HØIBY *et al.*, 2011). A colistina ou o aztreonam são indicados se o patógeno estiver na zona condutora. Se o patógeno estiver na zona respiratória, pode ser utilizado tratamento sistêmico como mencionado anteriormente. Comumente são utilizadas combinações desses fármacos em virtude de a infecção envolver todo o órgão.

O tratamento com azitromicina também pode ser empregado. Em estudo multicêntrico realizado por Saiman e colaboradores (2003) com 185 pacientes fibrocísticos utilizando doses de 250 mg (para pacientes com peso inferior a 40 kg) e 500 mg (para pacientes com peso superior a 40 kg), a maioria com infecção crônica por cepas de *S. aureus* e cepas mucóides de *P. aeruginosa*, foi demonstrado que a terapia com azitromicina melhorou a função pulmonar e a qualidade de vida dos pacientes quando comparados ao grupo placebo. Entretanto, nesse estudo o fármaco teve impacto mínimo na diminuição da densidade de *P. aeruginosa* e não erradicou as cepas de *S. aureus* ainda que tenha diminuído o número de hospitalizações. Os autores afirmam que possa existir um pequeno grau de sinergismo entre esse fármaco e outros antimicrobianos utilizados concomitantemente contra *P. aeruginosa*, como as quinolonas, e que sua efetividade pode estar relacionada a uma terapia prolongada.

Entretanto, deve-se utilizar os macrolídeos com cautela. Segundo Ciofu e colaboradores (2014) o efeito dessa classe de antimicrobianos parece diminuir com o uso frequente, o que aumenta a possibilidade das concentrações do fármaco passarem a ser subinibitórias com o tempo. Considerando que as doses utilizadas normalmente são obtidas de estudos com *microrganismos* planctônicos, que requerem menores concentrações que as ideais para a erradicação de biofilmes, a diminuição do efeito com o tempo de uso pode contribuir como mais um fator para o aumento da tolerância aos antimicrobianos, desenvolvimento de resistência e crescimento do biofilme.

A infecção por *P. aeruginosa* tem grande impacto na qualidade de vida do paciente e nos índices de morbi-mortalidade a ela atrelados. Em estudo retrospectivo realizado por Keays e colaboradores (2008) sobre susceptibilidade aos antimicrobianos, analisou-se o tratamento de 110 pacientes fibrocísticos infectados

com *microrganismos* multirresistentes, dentre eles *P. aeruginosa* e *B. cepacia*, a fim de verificar a aplicabilidade das doses utilizadas para o tratamento de bactérias na forma planctônica para o tratamento de infecções com biofilmes. Os autores realizaram culturas com os isolados das bactérias armazenadas desses pacientes e testaram diferentes combinações de antimicrobianos que apresentavam eficácia comprovada somente contra bactérias planctônicas. Dentre as associações mais utilizadas na época do estudo (2008) destacam-se tobramicina/meropenem e ciprofloxacino/meropenem. Os desfechos dos pacientes cujo biofilme foi susceptível a esses tratamentos foram comparados com aqueles cujo biofilme não foi susceptível. Dentre as culturas realizadas com os isolados clínicos, em 60% dos casos as combinações de antimicrobianos inibiram as bactérias planctônicas, mas não os biofilmes. Somente 22% das culturas de isolados apresentaram crescimento de biofilmes susceptíveis aos antimicrobianos nas doses utilizadas para tratamento da forma planctônica. Ao comparar os desfechos clínicos com os testes de susceptibilidade *in vitro* com as cepas dos isolados dos pacientes, os autores observaram que os melhores desfechos clínicos, como melhora da função pulmonar, por exemplo, ocorreram nos pacientes cuja terapia foi também efetiva contra os biofilmes *in vitro*. Esse estudo sugere que não é adequado basear as posologias para tratamento de infecções com biofilme nos estudos com microrganismos na forma planctônica quando o objetivo é erradicação do mesmo, visto que as concentrações exigidas para o tratamento do biofilme seriam maiores.

A associação de fármacos pode ser uma estratégia importante para (i) erradicar ambos os fenótipos planctônico e biofilme, (ii) favorecer a atuação de determinados fármacos em condições de anaerobiose e, assim, (iii) evitar desenvolvimento de resistência bacteriana. Em estudo de Tré-Hardy e colaboradores (2009), foram avaliados *in vitro* 23 isolados de pacientes fibrocísticos colonizados por *P. aeruginosa* (6 apresentando fenótipo mucóide e 17 não-mucóide) em um modelo que utilizava biofilmes maduros de doze dias, a fim de mimetizar as condições *in vivo* e, assim, demonstrar o sinergismo entre tobramicina e claritromicina contra esse patógeno. Os resultados mostraram que a associação apresentou melhor atividade antimicrobiana (47,8%) se comparada à tobramicina em monoterapia (26,1%). Segundo os autores, nesse estudo as cepas mucóides aparentaram ser mais susceptíveis à tobramicina ou à terapia combinada do que as

cepas não-mucóides, diferentemente de outros relatos na literatura. O efeito sinérgico entre esses fármacos pode estar relacionado, também ao aumento da permeabilidade do biofilme provocado pela claritromicina. Esse sinergismo também pode ser observado na associação de colistina a fármacos como β -lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas (CIOFU *et al.*, 2014) que tem seu mecanismo de ação prejudicado em regiões do biofilme em que há falta de oxigênio. A colistina atua sobre células metabolicamente ativas em condições anaeróbias, provocando o rompimento da membrana citoplasmática. A associação da colistina com a tobramicina mostrou-se mais eficaz na eliminação de biofilmes de *P. aeruginosa* do que a tobramicina isolada (MESAROS *et al.*, 2007).

Aliado à terapia antimicrobiana, comumente utilizam-se medicamentos que atuam no muco ciliar, tornando-o mais fluido, visando facilitar a ação dos fármacos administrados por via inalatória. Entre os fármacos empregados tem-se o ambroxol que, por exemplo, é um mucocinético e expectorante que teria propriedades anti-biofilme, sendo utilizado também para profilaxia. Ele atua através da inibição da atividade dos neutrófilos exercendo efeitos anti-inflamatórios e contribui para a melhora do *clerance* mucociliar, pois interfere nos canais iônicos presentes no epitélio pulmonar (CATALDI *et al.*, 2014) e no gene regulador da condutância transmembrana (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance*, CFTR) que é afetado na fibrose cística. (A revisão de Hassett e colaboradores (2002) aborda em detalhes o mecanismo de inibição deste gene).

4.1.1.3 Exacerbações pulmonares

Na FC as exacerbações pulmonares (agudizações) resultam em uma deterioração progressiva da função pulmonar (MARTINS & SANTOS, 2006). Em geral, tenta-se prevenir a exacerbação através do tratamento das colonizações por *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. cepacia* (CARDINES *et al.*, 2012). Segundo César & Castro (2011), sendo a *P. aeruginosa* o patógeno de maior prevalência, comumente escolhe-se o tratamento utilizando fluorquinolonas orais quando o quadro apresenta-se leve (administração de ciprofloxacino via oral durante 14-21 dias) (HOFFMANN & PROCIANOY, 2011). Se a gravidade for maior, podem ser utilizadas associações de antimicrobianos intravenosos e inalatórios (tobramicina e ceftazidima, por exemplo)

(HOFFMANN; PROCIANOY, 2011), mas deve-se considerar que o emprego de duas vias de administração concomitantes pode acarretar em aumento de toxicidade (DÖRING *et al.*, 2012). Em pacientes que têm a via aérea colonizada, os medicamentos de administração inalatória, como a tobramicina e aztreonam, são utilizados como supressivos e oferecem menores riscos de toxicidade, pois possibilitam a vetorização do efeito farmacológico (MARTINS & SANTOS, 2006). Além disso, utilizam-se medicamentos mucolíticos como a DNase recombinante (ou alfadornase) e nebulização com solução salina hipertônica por curto prazo de tempo. Como broncodilatadores comumente são utilizados o formoterol e o salmeterol para os casos de hiper-reatividade brônquica. Por fim, anti-inflamatórios como ibuprofeno e corticosteróides são utilizados, mas seu uso ainda é restrito (BHATT, 2013).

A terapia através da nebulização com DNase I (FRANKLIN, 1996) associada a antibióticos durante o tratamento diminui a viscoelasticidade do muco presente no pulmão do paciente através da clivagem do DNA extracelular. Existem estudos sobre a DNase encontrada nas células epiteliais e seu efeito em diminuir a formação de biofilme (ARCHER *et al.*, 2011), visto reduzir a viscosidade do muco pulmonar. Segundo Rohde e colaboradores (2010) e Arciola e colaboradores (2012), existem dois mecanismos que permitem que a DNase I iniba a formação de biofilme em *Staphylococci*: ela pode dissolver os ácidos nucleicos associados a superfície bacteriana que atuam como adesinas promotoras da adesão inicial; ou então pode degradar o eDNA (DNA extracelular) que é o principal fator de adesão célula-célula em biofilmes jovens.

Para a erradicação de patógeno como *S. aureus*, comumente encontrado em crianças fibrocísticas cujo diagnóstico é recente, utiliza-se a oxacilina ou a amoxicilina associada ao clavulanato. Segundo César & Castro (2011) e Hoffmann & Procianoy (2011), se a cepa for resistente à metilina utiliza-se linezolida, vancomicina ou teicoplanina. Entretanto, como alternativa a linezolida em termo de custos, Döring e colaboradores (2012) recomendam a substituição por associações de rifampicina e ácido fusídico ou rifampicina e clindamicina.

O *H. influenzae* costuma estar associado a um quadro de bronquiectasias devido a sua permanência no tecido pulmonar causar danos ao órgão, acarretando obstrução do fluxo de ar (KING, 2012). Como tratamento de primeira escolha são

indicados os β -lactâmicos, como amoxicilina associada à clavulanato durante quatro semanas. Se a cepa for produtora de β -lactamases, podem ser utilizadas cefalosporinas, tetraciclinas, quinolonas e macrolídeos. Para a cepa não tipável, que tem a habilidade de viver intracelularmente e por isso não sofre ação de β -lactâmicos, pode-se utilizar macrolídeos, tetraciclinas e quinolonas, que apresentam boa penetração intracelular (CÉSAR & CASTRO, 2011).

4.1.2 Perspectivas para o tratamento da Fibrose Cística

Segundo Sharma e colaboradores (2014), diversas terapias têm sido testadas visando a erradicação da *P. aeruginosa* em pacientes com FC. Dentre elas, tem-se a utilização de moléculas inibidoras do *quorum sensing*, de compostos naturais, de peptídeos antimicrobianos, de bacteriófagos, de anticorpos, de enzimas e de nanopartículas, todas abordadas a seguir.

4.1.2.1 Quorum sensing

O mecanismo de sinalização célula-célula exerce papel importante nos processos que regulam o crescimento/amadurecimento do biofilme. Nesse aspecto tem sido realizados testes com inibidores do *quorum sensing* atuando de forma sinérgica com outros fármacos a fim de bloquear moléculas que sinalizam o agrupamento das bactérias. Através dessa estratégia é possível conter o crescimento de biofilmes como o de *P. aeruginosa* (CIOFU *et al.*, 2014; TAYLOR *et al.*, 2014; WILKINS *et al.*, 2014). Como exemplo, para o tratamento dessa bactéria, tem-se a utilização de análogos sulfúricos atuando sobre genes responsáveis pela produção de biofilmes. Esses compostos, quando associados ao ciprofloxacino, ampliaram a efetividade do fármaco contra os biofilmes (SHARMA *et al.* 2014¹). Em outro estudo, o uso de inibidores do *quorum sensing* levou à diminuição produção de fatores de virulência como a piocianina produzida por *P. aeruginosa*, a partir de

¹ SHARMA, G. *et al.* Pseudomonas aeruginosa biofilm: potential therapeutic targets. **Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization**, v. 42, p. 1–7, 2014. *apud* GANGULY, K. *et al.* Design, synthesis, and a novel application of *quorum sensing* agonists as potential drug-delivery vehicles. **Journal of Drug Targeting**, V; 19, p. 528-539, 2011.

inibidores dos genes responsáveis pela sua biossíntese. Da mesma forma, a utilização de extratos contendo ácido gálico associados à tobramicina, levaram ao aumento da susceptibilidade ao fármaco. Para detalhamento dos inibidores do *quorum sensing*, recomenda-se a revisão de Kalia (2013). Segundo o que foi visto nesse trabalho, uma das vantagens da utilização destes inibidores é a menor propensão ao desenvolvimento de resistência a eles quando comparada à resistência desenvolvida atualmente aos antimicrobianos. Entretanto, em artigo publicado em 2014 (Kalia *et al.*, 2014) pelo mesmo autor, há o relato quanto a utilização indiscriminada desses inibidores colocar a bactéria sob pressão seletiva a tal ponto que necessite desenvolver mecanismos para fugir a atuação desses inibidores, tornando-se resistente a eles.

4.1.2.2 Peptídeos antimicrobianos

Com o objetivo de eliminar as células constituintes do biofilme, tem sido testados tratamentos com peptídeos antimicrobianos anfifílicos e catiônicos (TAYLOR *et al.*, 2014). Encontrados em diversos microrganismos esses peptídeos podem ser, inclusive, provenientes da própria bactéria e ainda assim causarem danos a diferentes cepas de uma mesma espécie, como é o caso das piocinas produzidas por cepas de *P. aeruginosa*, que podem ter atividade anti-biofilme contra cepas diferentes dessa bactéria, protegendo o hospedeiro de possíveis infecções (SHARMA *et al.*, 2014). Segundo De la Fuente-Núñez e colaboradores (2013), peptídeos sintéticos catiônicos, variantes do peptídeo natural humano LL-37 e do peptídeo bovino indolicidina, mostram-se estratégias promissoras pois são capazes de inibir a formação de biofilme e promover a desestruturação de biofilmes maduros. Essa estratégia mostrou-se promissora, pois, no caso desses dois peptídeos, as concentrações necessárias para erradicar os patógenos encontram-se bem abaixo da CIM para bactérias planctônicas.

4.1.2.3 Bacteriófagos

A terapia utilizando bacteriófagos tem sido vista como uma alternativa ao tratamento antimicrobiano. Consiste na utilização de vírus específicos constituídos de um cromossomo (RNA ou DNA) e de uma capa protéica que não infectam células

eucarióticas (TAYLOR *et al.* 2014). Esses vírus infectam a célula bacteriana e injetam o material cromossômico diretamente no interior da mesma, deixando a capa protéica do lado externo (BARTH & BARROS, 2001). Em estudo de Alemayehu e colaboradores (2012) foram isolados dois bacteriófagos, um podovirus (øMR 299-2) e um myovirus (øNH-4), que apresentaram atividade contra *P. aeruginosa*, podendo atuar sobre biofilmes dessa bactéria. Em modelo *in vitro*, viu-se que é necessário mais tempo de contato do bacteriófago com o biofilme (22-24 h), em virtude de que o bacteriófago precisar penetrar na matriz polissacarídica do biofilme, se comparado com o tempo necessário para erradicar a bactéria planctônica (5-6 h). Em modelo *in vivo* em camundongos infectados por cepas mucóides e não-mucóides de *P. aeruginosa* observou-se a proliferação das bactérias na ausência dos bacteriófagos, enquanto que quando expostos ao tratamento com esses houve prevenção do crescimento do biofilme e redução da carga bacteriana para níveis não detectáveis após 6 h, apesar de não haver erradicação do mesmo. Segundo Kutateladze & Adamia (2010) em geral, as diferenças entre antimicrobianos e bacteriófagos é que esses não alteram a microbiota natural do hospedeiro. Além disso, enquanto as concentrações de antimicrobianos diminuem com o passar do tempo, os fagos continuam a multiplicar-se. Pode-se destacar também a capacidade dos bacteriófagos em serem efetivos contra alvos específicos. Para uma revisão dos bacteriófagos aplicáveis ao tratamento de infecções por *P. aeruginosa*, dentre outros patógenos, recomenda-se o artigo de Donlan (2009).

4.1.2.4 Polissacarídeos exógenos x terapia enzimática

Considerando os polissacarídeos formadores da matriz que envolve o biofilme existem duas abordagens:

(1) A fim de prevenir o desenvolvimento de biofilmes de bactérias Gram-positivas, pode-se adicionar polissacarídeos exógenos que passam a limitar a formação de biofilmes (DE LA FUENTE-NÚÑEZ *et al.*, 2013). Segundo a revisão de Rendueles e colaboradores (2012) existem estudos que indicam que a presença de polissacarídeos sintetizados por outras espécies bacterianas possa exercer efeito inibitório da formação de biofilmes de uma determinada espécie, como é o caso de polissacarídeos produzidos pelas cepas de *Escherichia coli* que são capazes de

inibir a formação de bactérias Gram-positivas como *S. aureus* e *S. epidermidis*, embora não sejam eficazes contra Gram-negativas como *P. aeruginosa* e a própria *E. coli*. Os autores relatam que o mecanismo de ação desses polissacarídeos não está bem definido, havendo hipóteses que envolvam modulação genética ou bloqueio das proteínas que se ligantes de açúcares presentes na superfície bacteriana, por exemplo;

(2) A segunda estratégia envolve a utilização de enzimas que promovam a lise das ligações polissacarídicas e, assim a matriz do biofilme é destruída. Nesse caso, como exemplo, tem-se a utilização de alginato liases associadas a antimicrobianos a fim de eliminar cepas mucóides de *P. aeruginosa* produtoras de alginato (SHARMA *et. al.*, 2014).

4.1.2.5 Nanopartículas

A utilização de antimicrobianos lipossomais ou de nano-antimicrobianos poliméricos pode prolongar a retenção do fármaco nos pulmões enquanto que o antimicrobiano é liberado lentamente na região. Dessa forma, antimicrobianos potentes como a claritromicina poderiam ser entregues em altas concentrações que seriam liberadas lentamente no local da infecção evitando a hepatotoxicidade, por exemplo. Segundo a revisão de Hadinoto & Cheow (2014), diversos estudos já foram realizados testando a eficácia *in vitro* e *in vivo* de formulações de antimicrobianos lipossomais em bactérias planctônicas e, estudos mais recentes englobam testes em biofilmes, como é o caso da amicacina. Nos lipossomas é possível, inclusive, incorporar metais como gálio e bismuto-tiol na formulação. Devido a suas propriedades antimicrobianas, esses metais teriam efeito sinérgico com a tobramicina, por exemplo. A partir desses estudos, observou-se que a eficácia *in vitro* é aumentada com a utilização de lipossomas catiônicos, pois estes interagem melhor com as membranas negativamente carregadas da *P. aeruginosa*. Segundo os autores, formulações lipossomais de amicacina e de ciprofloxacino encontram-se em estudos clínicos para fibrose cística e para bronquiectasias não relacionadas à fibrose cística. Outra abordagem seria a utilização de nanopartículas poliméricas para formulações em que os lipossomas não podem ser empregados devido a

limitações de pH, temperatura e concentração, que comprometeriam sua estabilidade na formulação.

4.1.2.6 Modulação de vias metabólicas

Outras estratégias para o tratamento de infecções com biofilme consideram a modulação de vias metabólicas dos biofilmes envolvendo o segundo-mensageiro di-GMP cíclico, que é responsável por funções celulares como formação do biofilme, virulência, motilidade e dispersão. Estudos *in vitro* investigaram a transição da forma de biofilme para a forma planctônica em biofilmes de *P. aeruginosa* na presença de óxido nítrico. Com baixas concentrações de óxido nítrico ocorre o estímulo de fosfodiesterases que levam a degradação do GMP cíclico, aumentando a dispersão das células bacterianas, reduzindo a formação de biofilme (BARRAUD *et al.*, 2009).

4.2 Otite do Ouvido Médio

A otite média consiste de um grupo de doenças infecciosas e inflamatórias que afetam o ouvido médio, sendo causadas geralmente por bactérias oportunistas do tipo *Staphylococci* coagulase-negativos. Costuma afetar principalmente lactentes e crianças pequenas (PEREIRA & RAMOS, 1998) e está relacionada a complicações em quadros de meningite e abscessos cerebrais. Quando não tratada adequadamente, a otite média pode levar à perda de audição (QUREISHI *et al.*, 2014). A otite média pode manifestar-se de três maneiras: aguda, supurativa e crônica. A forma aguda, causada por infecção viral ou bacteriana, afeta crianças menores de dois anos. Nessa fase a cura pode ocorrer espontaneamente, sem que seja necessário o uso de antimicrobianos. Na forma supurativa, há presença de pus e pode haver perfuração do tímpano, contribuindo para a cronicidade da doença (QUREISHI *et al.*, 2014). A forma crônica pode ser provocada por um quadro agudo que apresentou complicações como perfuração do tímpano, por exemplo. Diferentemente das outras manifestações, pode haver formação de biofilmes, dificultando a erradicação do patógeno (ARMBRUSTER *et al.*, 2010). Além disso, os danos causados ao tecido devido à presença microbiana podem levar à necrose e erosão óssea. A secreção resultante da otite média é denominada de efusão e pode ser serosa (líquida e fina), mucóide (espessa e viscosa) ou purulenta (PEREIRA &

RAMOS, 1998). Consiste basicamente da mucina naturalmente produzida na região que acaba alterada devido à condição infecciosa. Devido a essa secreção, um dos sintomas comuns é a perda auditiva. Em geral, a otite crônica com efusão atinge principalmente crianças entre 3 e 7 anos.

Os patógenos comumente relacionados à otite média são *S. pneumoniae* e *H. influenzae*, podendo ocorrer colonização por *P. aeruginosa*, *S. aureus* (SMITH *et al.*, 2011) e *S. epidermidis*. Em estudo de Paluch-Olés e colaboradores (2011) avaliou-se a capacidade de formação de biofilmes utilizando amostras de aspirado de efusão de crianças com otite do ouvido médio e com rinosinusite. A partir de 97 amostras de efusão auricular foram isoladas 50 espécies bacterianas diferentes. Dessas, 30% correspondiam aos *Staphylococci* coagulase-negativos, sendo que a cepa identificada com mais frequência foi o *S. epidermidis* (23%). Em menor escala foram identificados outros patógenos (20% do total) como *H. influenzae*, *S. aureus* e *S. pneumoniae*, por exemplo. A partir desses resultados, os autores verificaram a presença de fatores de virulência, como os *slimes*, estruturas importantes para a constituição de comunidades microbianas. Assim, durante a avaliação da capacidade de formação de biofilmes dessas cepas quando comparadas com cepas-controle advindas de isolados de *swab* nasal de crianças com rinosinusite observou-se que das 50 espécies isoladas, cerca de 40% das cepas eram produtoras de *slime* e 23% expressavam os genes que codificam a PIA. Entre essas amostras foram identificadas cepas de *S. epidermidis* também formadoras de *slimes*, comprovando a contribuição dessa estrutura como fator de virulência e de colonização devido seu papel em auxiliar na adesão bacteriana.

Dentre as variações da otite crônica pode-se destacar as manifestações como otite supurativa e o colesteatoma. A otite supurativa pode ocorrer após agravamento de quadro agudo e, se não tratada, tornar-se crônica. Por outro lado, o colesteatoma é uma manifestação caracterizada por uma alteração destrutiva de parte da membrana mucosa que passa a ser constituída de tecido epitelial que, somado a presença de bactérias planctônicas e/ou desenvolvimento de biofilmes bacterianos, leva à reação inflamatória e lesão do tecido auricular. Akyildiz e colaboradores (2012) estudaram a formação de biofilmes em pacientes com otite crônica (n = 10) a partir da comparação com um grupo controle formado por pacientes submetidos à cirurgia para implantação coclear (n = 9). Em todos os pacientes do primeiro grupo

evidenciou-se formação de biofilme, no entanto no grupo controle identificou-se apenas dois casos. Quando os grupos foram redivididos considerando o desenvolvimento de colesteatoma, os biofilmes foram encontrados em 100% dos pacientes com essa manifestação e em 30% dos pacientes que não a manifestaram. Assim, a presença de colesteatoma pode contribuir para o agravamento da infecção, pois há crescimento de biofilmes paulatinamente ao desenvolvimento dessa lesão auricular, o que explicaria as dificuldades de tratamento durante a manifestação crônica da doença.

4.2.1 Tratamentos

Antes de iniciar o tratamento antimicrobiano é necessário realizar-se um diagnóstico criterioso, pois diversas otites médias agudas curam-se espontaneamente, por serem de causa viral. Dessa forma, a antibioticoterapia não é recomendada inicialmente (DANIEL, 2013), a fim de evitar o desenvolvimento de resistência caso a etiologia da doença não seja bacteriana. Segundo a revisão de Qureishi e colaboradores (2014), existem metanálises que estimam que em aproximadamente 80% dos casos a cura é espontânea. Se necessária, a administração de antibióticos deve ser iniciada entre 48 h e 72 h após o início do tratamento sintomático em que foi não foi constatada melhora dos sintomas.

Segundo o *Guideline* da Organização Mundial da Saúde para o tratamento da otite crônica supurativa (ACUIN, 2004), é possível empregar um tratamento através de irrigação do canal auditivo. Para isso, pode-se utilizar peróxido de hidrogênio e soluções salinas, entre outras formulações, que permitam a irrigação da região duas a três vezes ao dia. Segundo a revisão da base de dados Cochrane apontada por este *Guideline*, essa limpeza aliada ao uso de antimicrobianos mostrou-se mais efetiva que a limpeza sem farmacoterapia associada. Quando sozinha, os resultados mostraram-se efetivos para 29% dos casos, em contrapartida, durante associação com clindamicina via oral, a cura foi de 93%. Entretanto, esses dados não apresentaram informações se as bactérias tratadas eram ou não formadoras de biofilmes, de maneira que talvez essa terapia não seja eficaz em todos os tratamentos.

Em caso de tratamentos com antimicrobianos, o fármaco de primeira escolha para infecções com bactérias planctônicas é a amoxicilina via oral exceto para patógenos produtores de β -lactamases, como é o caso de algumas cepas de *H. influenzae*, devendo-se nesses casos utilizar a associação de amoxicilina e ácido clavulânico. Em caso de uso de cefalosporinas, são recomendados os fármacos da segunda geração, pois seu espectro é ampliado para *microrganismos* Gram negativos como o *H. influenzae*. Eventualmente, se o patógeno envolvido na otite for a *P. aeruginosa*, deve-se atentar para o uso de cefalosporinas de terceira geração ativas contra o mesmo. (ACUIN, 2004).

Para atingir as altas concentrações necessárias à erradicação dos biofilmes no ouvido médio, a administração de antibióticos por via oral não seria a mais adequada devido a toxicidade sistêmica (DANIEL, 2013). Se ainda assim for adotado o uso de antibióticos, pode haver desenvolvimento de resistência aos mesmos, visto que a infecção diminuirá, mas o biofilme frequentemente volta a formar-se após o término do tratamento. Belfield e colaboradores (2015) verificaram as concentrações de antibióticos após administração oral que poderiam ser alcançadas no ouvido médio para tratamento de *microrganismos* planctônicos e compararam níveis plasmáticos e níveis atingidos no ouvido médio encontrados na literatura com as concentrações mínimas inibitórias indicadas para patógenos como *H. influenzae*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* e *Moraxella catarrhalis*. O uso de antibióticos pareceu não contribuir para o desfecho dos casos analisados em virtude de muitas das infecções estarem relacionadas à formação de biofilmes, levando em consideração que as concentrações mínimas inibitórias para a erradicação de biofilmes são cerca de 1000 vezes mais elevadas que as concentrações requeridas para os *microrganismos* planctônicos.

Segundo Hannley e colaboradores (2000), as apresentações tópicas seriam a primeira linha de tratamento para a maioria dos pacientes, pois não causariam toxicidade sistêmica, sobrepondo-se inclusive à utilização de medicação sistêmica associada à tópica. As preparações tópicas contêm aminoglicosídeos como neomicina, efetiva contra *S. aureus* e *Proteus spp.* e atividade limitada contra *P. aeruginosa*; e polimixina B, efetiva contra *P. aeruginosa*, associadas a um esteroide de uso tópico. As fluorquinolonas utilizadas na otite são combinadas com hidrocortisona, como é o caso do ciprofloxacino. São efetivas contra cepas de *S.*

pneumoniae, *Staphylococci* e *Pseudomonas spp.* A revisão de Qureishi e colaboradores (2014) alerta para a possibilidade de potencial ototoxicidade quando formulações tópicas de aminoglicosídeos são utilizados durante quadro de membrana timpânica perfurada. Embora a efetividade de antimicrobianos tópicos seja melhor, o *Guideline* da Organização Mundial da Saúde (ACUIN, 2004) indica que o uso de antibióticos sistêmicos deve ser considerado em pacientes com infecções invasivas.

Por isso, nos tratamentos para a otite crônica considerar-se o avanço da infecção. Na manifestação simples, costumam ser associadas neomicina e polimixina com corticosteroides, como mencionado anteriormente. Se controlada a infecção, a recuperação da perda auditiva depende de cada caso. Na otite média supurativa, também se utiliza antibiótico sistêmico associado ao uso tópico. Além dos antibióticos supracitados, também é utilizado cloranfenicol. Quando a manifestação envolver formação de colesteatoma, a remoção cirúrgica do tecido infectado é o tratamento de escolha para a reestruturação do canal auricular. Entretanto, para crianças que já foram submetidas a esse procedimento, mas ainda apresentam sintomatologia, recomenda-se a adenoidectomia (PEREIRA & RAMOS, 1998), pois se houver hipertrofia das adenóides, a obstrução nasal pode contribuir para a continuidade de infecções no ouvido médio, visto que as adenóides passam a servir de reservatório ou porta de entrada para o ouvido médio.

Na otite média com efusão assintomática a administração por via tópica normalmente é preferida em casos de membrana timpânica perfurada, e contribui para a diminuição da toxicidade aos antimicrobianos (BELFIELD *et al.*, 2015). Se persistente por mais de três meses, quando há indícios de perda auditiva, vertigem e desequilíbrios, recomenda-se cirurgia para colocação de tubo de ventilação aliada a profilaxia antimicrobiana, embora seja efetiva apenas durante o tempo de duração do tubo de ventilação (DANIEL, 2013). O tratamento, se cirúrgico, não requer profilaxia antibiótica.

Como vias alternativas para a farmacoterapia antimicrobiana, a revisão de Qureishi e colaboradores (2014) apresenta as vias transtimpânica (que permite a difusão de moléculas através do tímpano para o canal do ouvido médio) e intratimpânica (em que a administração se dá diretamente no ouvido médio). Sua

utilização permitiria maiores doses de fármaco a fim de eliminar biofilmes sem implicar em altas concentrações sistêmicas.

4.3 Feridas Crônicas

As feridas crônicas resultam de falha no processo regenerativo que permitiria a recuperação do tecido tornando-o íntegro anatômica e funcionalmente e estão diretamente relacionadas a patologias pré-existentes como diabetes e problemas vasculares. Por essa razão, diferem das feridas agudas, que advêm de trauma ou processo cirúrgico (PERCIVAL *et al.*, 2011) e tem um processo cicatricial organizado e a cura se dá em semanas. Nas feridas crônicas, a falha cicatricial ocorre por período maior que três meses e pode ser caracterizada por presença de tecido necrosado, diminuição da granulação saudável do tecido, palidez e cor acinzentada (MOTA *et al.*, 2012; WERDIN *et al.*, 2009). Ambas as feridas, agudas e crônicas, são susceptíveis a infecção devido a inerente incapacidade de mantê-las completamente estéreis, facilitando o desenvolvimento de comunidades microbianas (biofilmes) (PERCIVAL *et al.*, 2012). Fato comprovado por James e colaboradores (2008), em estudo com amostras de feridas de 50 pacientes analisadas por MEV. Das 50 amostras de feridas crônicas, 30 apresentaram presença de biofilmes e, das 16 amostras de feridas agudas, apenas uma apresentou formação de biofilme, havendo predomínio de cocos como do gênero *Staphylococcus*, embora também tenham sido encontrados bacilos do gênero *Pseudomonas*. A presença de biofilmes no quadro infeccioso contribui para a dificuldade em cicatrizar a ferida. Segundo a revisão de Metcalf & Bowler (2013), biofilmes de *P. aeruginosa* e *S. aureus* atrasam significativamente a cicatrização em termos de epitelização e formação de tecido granular. Quando colonizadas por biofilmes as feridas apresentam baixos níveis de marcadores inflamatórios em oposição ao que acontece nas feridas infectadas.

Há que considerar também indivíduos imunocomprometidos, cujas limitações do sistema imune relacionadas à remoção do patógeno também contribuem para o aumento do tempo de infecção (RHOADS *et al.*, 2008). As feridas crônicas estão relacionadas à significativa morbidade de pacientes (PERCIVAL *et al.*, 2011), inclusive, devido a complicações oriundas do estabelecimento de processos infecciosos.

O processo inflamatório gerado pelas feridas crônicas é caracterizado pela presença de polimorfonucleares e de citocinas pró-inflamatórias na região. Na primeira fase da cicatrização o tecido desvitalizado é removido por metaloproteases, que também participam da fase de reparo, sendo necessária a angiogênese, a migração de fibroblastos e queratinócitos bem como a epitelização (BJARNSHOLT *et al.*, 2008). A ferida é um ambiente propício à colonização microbiana, que pode ocorrer sem causar infecção em se tratando de microbiota natural do hospedeiro. Entretanto, diante de colonização por patógenos, há excesso de metaloproteases e redução em seus inibidores, o que provoca destruição da matriz extracelular (WERDIN *et al.*, 2009). A bactéria pode desenvolver resistência à terapia com antimicrobiano e, se for altamente virulenta, acaba por penetrar no tecido do hospedeiro e desenvolver a infecção. A forte presença bacteriana pode agravar o quadro inflamatório ao aumentar a produção de metaloproteases e promover a infiltração adicional de polimorfonucleares. As bactérias planctônicas migram para a superfície da ferida e utilizam de adesinas para fixarem-se. Sua presença inicia a resposta inflamatória e o exsudato liberado durante a resposta supre de nutrientes o biofilme formado (LINE, 2012). A formação de biofilme implica em agravamento da infecção e conseqüente aumento do tempo cicatricial. Além disso, dependendo da ferida, há menor irrigação sanguínea na área infectada, resultando em um decréscimo da resposta do hospedeiro, aumento da virulência do biofilme e necrose tecidual (RHOADS *et al.*, 2008). Biofilmes podem influenciar a senescência de fibroblastos, prejudicar os queratinócitos e a levar à falha das células endoteliais para iniciar a angiogênese. A presença de bactéria oportunista como a *P. aeruginosa*, por exemplo, contribui também para a inflamação ao produzir ramnolipídeos (PERCIVAL *et al.*, 2012) que protegem o biofilme da fagocitose à medida que interrompem a função dos neutrófilos, causando sua destruição. Bjarnsholt e colaboradores (2008) propuseram, inclusive que os ramnolipídeos atuariam como um escudo contra os polimorfonucleares o que explicaria a persistência da *P. aeruginosa* tanto em feridas crônicas quanto em doenças como a fibrose cística, discutida anteriormente, visto que a eliminação de células polimorfonucleares favoreceria a colonização.

A literatura refere-se basicamente a quatro grupos principais de feridas crônicas: úlceras venosas, arteriais, diabéticas e de pressão (WERDIN *et al.*, 2009).

As úlceras venosas nas pernas são oriundas do mau funcionamento das válvulas venosas causando hipertensão venosa, aumento da pressão capilar e edema (BJARNSHOLT et al., 2008). Se não tratadas, podem resultar na amputação do membro. Úlceras em pés diabéticos ocorrem em cerca de 15% dos pacientes com diabetes. Quando crônicas podem ocorrer devido à neuropatia localizada que leva a feridas não identificáveis por longo período de tempo, resultando em rápido desenvolvimento e deterioração da úlcera. A pobre circulação e o prejuízo à cicatrização podem levar também a amputação (PERCIVAL et al., 2012). Além disso, estudos realizados *in vivo* mostram que o uso de insulina pode estar associado a dificuldade de erradicação do biofilme de *P. aeruginosa*, por exemplo, além de promover tolerância à gentamicina (WATTERS et al., 2013).

As úlceras de pressão são resultado de sobrecarga sustentada ou repetitiva em áreas vulneráveis como a região sacral, ombros e calcanhares (BJARNSHOLT et al., 2008). Elas decorrem da imobilidade de pacientes devido a danos neurológicos como paraplegia e esclerose múltipla e em pacientes acamados durante período longo de hospitalização (WERDIN et al., 2009).

A microbiota das feridas é polimicrobiana (GJØDSBØL et al., 2006), predominando espécies como *P. aeruginosa*, encontrada na região mais profunda das feridas, e *S. aureus*, localizado mais próximo à superfície (LINE, 2012). Em úlceras venosas nas pernas, esses *microrganismos* são responsáveis por, respectivamente, 33% e 88% das infecções (PERCIVAL et al., 2011), sendo que a *P. aeruginosa* pode estar relacionada com o aumento das úlceras e consequente atraso na cicatrização (GJØDSBØL et al., 2006). Além dessas duas espécies, podem ser encontradas *S. epidermidis*, *Serratia marcescens*, *Enterococcus faecalis* e *Corynebacterium spp.*(PERCIVAL et al., 2012). Em geral, os mais estudados são *P. aeruginosa* e *S. aureus*, além do que, são facilmente identificáveis por cultura, visto encontrarem-se também na forma planctônica.

Em um biofilme polimicrobiano, pode haver sinergismo entre os *microrganismos* que o compõem, como mencionado anteriormente. Dowd e colaboradores (2008) analisaram, através de biologia molecular, 40 amostras oriundas de desbridamento de indivíduos com úlceras nas extremidades provocadas pelo diabetes a fim de identificar os *microrganismos* presentes nesse tipo de

infecção. Das populações encontradas, as mais prevalentes foram *Pseudomonas*, *Anaerococcus*, *Enterococcus*, *Bacterioides*, *Veillonella*, *Finnegoldia* e *Clostridium*. Contrariando as expectativas iniciais dos autores, em cada amostra não foi encontrado apenas um patógeno prevalente, como o esperado *S. aureus* nas comunidades estabelecidas por *microrganismos* tanto aeróbios quanto anaeróbios, não necessariamente patogênicos. Os autores denominaram estas comunidades como patogrupos funcionalmente equivalentes (*functionally equivalent pathogroup – FEP*), onde populações que, quando sozinhas, não são patogênicas, ao coexistirem em um mesmo grupo conviveriam de maneira simbiótica ou sinérgica, contribuindo para a cronicidade das feridas. Assim, espécies anaeróbias obrigatórias, por exemplo, são favorecidas ao coexistirem com espécies aeróbias, pois essas formam regiões específicas em que há maior proporção de oxigênio, permitindo que os *microrganismos* anaeróbios sobrevivam em regiões em que há ausência de oxigênio.

4.3.1 Tratamentos

De acordo com a literatura, para o manejo dos biofilmes em feridas crônicas existem cinco estratégias: (1) interferir na formação da matriz, (2) digerir a substância polimérica extracelular (SPE), (3) prevenir *quorum sensing*, (4) remover o biofilme já formado e (5) parar a adesão bacteriana às células do hospedeiro.

Segundo Rhoads e colaboradores (2008) inicialmente deve ser feito o curativo do ferimento e, a seguir, aplicadas as demais estratégias. O mais importante no tratamento deve ser controlar o biofilme, evitando-se o agravamento da condição do hospedeiro. O tratamento deve continuar enquanto a ferida estiver aberta, sendo que o objetivo não é a erradicação do biofilme, mas a supressão a níveis que impeçam sua interferência na cicatrização. Além disso, pode-se acrescentar a prevenção como um dos fatores a ser observado diante da formação de uma ferida a fim de evitar a colonização por bactérias patogênicas e também bactérias que constituem a microbiota da pele. Segundo Metcalf & Bowler (2013), a combinação de estratégias como uso de antimicrobianos, desbridamento e utilização de produtos para manejo da ferida até sua completa resolução compõem o melhor protocolo de tratamento para feridas com potencial formação de biofilme.

4.3.1.1 Antibioticoterapia

Antibióticos devem ser considerados quando o tempo de cicatrização se apresenta maior do que o esperado, como ocorre nas feridas crônicas (GETHIN, 2009), e somente quando há suspeita clínica de infecção ou confirmação desta por avaliação clínica e microbiológica (METCALF & BOWLER, 2013). A terapia antibiótica comumente utilizada em feridas agudas, como queimaduras e feridas pós-operatórias, utiliza da via tópica devido a sua menor toxicidade e efeitos colaterais, além de permitir altas concentrações dos fármacos no sítio da infecção (LIO *et al.*, 2011). Nas feridas crônicas, existe a discussão sobre qual via seria mais adequada, pois se discute que os fármacos tópicos, embora diminuam a probabilidade de toxicidade sistêmica, não atuam de forma eficaz em infecções profundas. Assim, antimicrobianos sistêmicos seriam mais adequados para infecções profundas, como úlceras de pés diabéticos e úlceras venosas, ou quando marcadores clínico-laboratoriais sugerirem infecção sistêmica (RHOADS *et al.*, 2008). Se utilizado tratamento sistêmico sem observar corretamente o quadro, os sinais clínicos acabam retornando aos níveis normais porque o antimicrobiano suprimiu apenas as células metabolicamente ativas, localizadas na superfície do biofilme, restando as células do interior que possuem metabolismo lento.

A utilização mais adequada de antimicrobianos se dá quando são associados a outros tipos de tratamentos. A utilização de antissépticos e antimicrobianos tópicos é recomendada para a diminuição da carga microbiana na ferida.

4.3.1.2 Alteração na estrutura da matriz

4.3.1.2.1 Ultrassom

O ultrassom tem a função de desestruturar o biofilme. É dividido basicamente em duas classes: de baixa e de alta intensidade (frequências acima de 1 MHz) podendo também ser classificadas de acordo com o contato (se direto ou indireto) do transdutor na superfície afetada. A baixa intensidade permite estimular a resposta fisiológica à lesão enquanto que a alta intensidade destrói os tecidos seletivamente. É o chamado “efeito da cavitação acústica” que atua sobre os *microrganismos*. Segundo a revisão de Erriu e colaboradores (2014) a vibração provocada pelo

equipamento promove a formação de pequenas bolhas de gás na superfície dos tecidos. Essas bolhas colidem devido a gradientes de pressão, atuando sobre os *microrganismos* aderidos a sua superfície ou na parede bacteriana. Além disso, ocorre a formação de agentes bactericidas como peróxido de hidrogênio, devido a degradação “sonoquímica” da água. Segundo Kim & Steinberg (2012), é uma terapia relativamente pouco dolorida e que requer múltiplas sessões de 15 a 30 minutos, conforme o tamanho da ferida. Comumente é utilizado para ferimentos menores ou quando não pode ser realizado procedimento de remoção cirúrgica. A efetividade da técnica pode ter variações decorrentes da frequência e da intensidade utilizadas, bem como das formas bacterianas em questão (planctônicas ou biofilmes).

Segundo Erriu e colaboradores (2014) a utilização de alta intensidade promove a degradação da substância polimérica extracelular (SPE) e de efeito bactericida, enquanto que baixas intensidades podem estimular o crescimento bacteriano. O que determina o resultado final é a prevalência de cada efeito e as condições em que o ultrassom é utilizado. Nessa revisão os autores mencionam que na presença de antibióticos como gentamicina, a utilização de baixas intensidades também pode apresentar efeito bactericida. A Figura 4 representa os diferentes efeitos do ultrassom quando frequência e intensidade são alteradas.

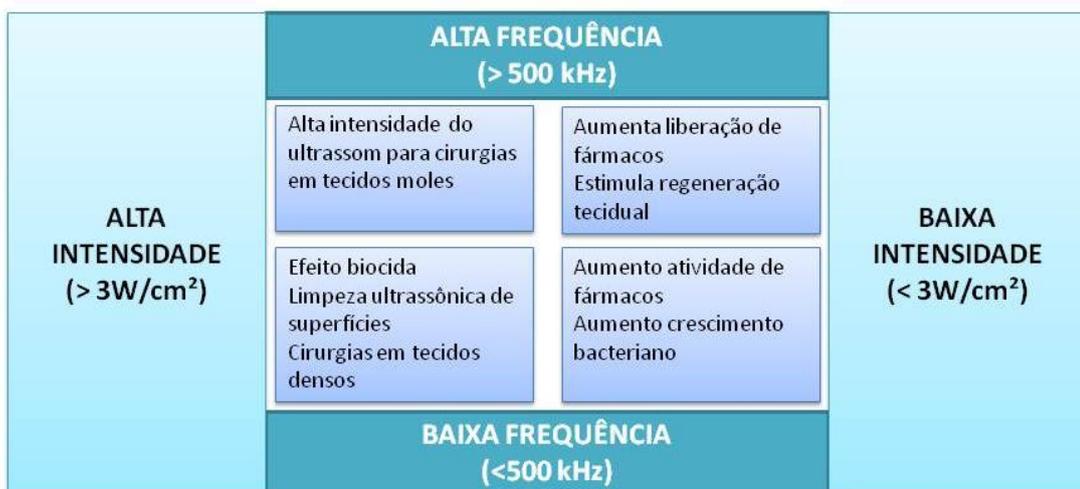


Figura 4. Efeitos da aplicação de ultrassom (Adaptado de ERRIU, *et al.*, 2014).

4.3.1.2 Digestão da SPE

4.3.1.2.2 Bacteriófagos

Como mencionado para o tratamento da fibrose cística, os bacteriófagos apresentam-se eficazes para o manejo de infecções, tendo como vantagem o fato de somente replicarem-se nos sítios infecciosos, acumulando-se nos locais em que o alvo bacteriano aderiu. Os bacteriófagos atuam na degradação da matriz polimérica (RHOADS *et al.* 2008; DONLAN, 2009).

4.3.1.2.3 Enzimas

A glicose oxidase pode ser utilizada juntamente com outras enzimas para remover biofilmes de superfícies. Outra enzima que pode ser utilizada é a dispersina B, uma enzima bacteriana que contém propriedades anti-biofilme e atua degradando a matriz polimérica extracelular, desestruturando o biofilme (RHOADS *et al.*, 2008).

4.3.1.3 Prevenção do quorum sensing

Os agentes antibiofilmes podem interferir na comunicação celular promovendo a desestruturação da matriz. Ainda não são completamente difundidos na prática clínica, pois faltam evidências *in vivo* sobre sua efetividade (METCALF & BOWLER, 2013), mas apresentam grande potencial para atuar de forma sinérgica com antimicrobianos.

4.3.1.4. Agentes antibiofilme

A lactoferrina é uma proteína de origem animal utilizada para proteger superfícies da formação de biofilmes, a partir do bloqueio da adesão de células planctônicas, atuando na primeira etapa do ciclo de vida do biofilme. Ela apresenta efeito bactericida contra *microrganismos* planctônicos ao ligar-se aos polissacarídeos de membrana de bactérias Gram-negativas (RHOADS *et al.* 2008).

Segundo a revisão de Percival e colaboradores (2012), o xilitol e o ácido salicílico são compostos utilizados para tratamento de biofilmes polimicrobianos, sendo que o xilitol atinge preferencialmente a *P. aeruginosa*, inibindo a formação de biofilmes, e ácido salicílico atua sobre o *S. aureus* (PERCIVAL *et al.*, 2012).

Utilizado para tratamento de hipercalemia, estudos indicam que baixas doses de nitrato de gálio interferem no desenvolvimento de biofilmes (RHOADS *et al.* 2008).

Quelante de metais, o ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) apresentou efeitos bactericidas contra isolados de *S. epidermidis* em cateteres. Quando o edetato de sódio é incorporado em géis para feridas, há aumento das propriedades antibiofilme contra *P. aeruginosa* (RHOADS *et al.* 2008).

4.3.1.5 Remoção física do biofilme

A remoção física do biofilme (desbridamento) é comumente a estratégia mais utilizada e considerada mais bem sucedida para o tratamento de úlceras nos pés (DOWD *et al.*, 2008). Ela reduz a presença de *microrganismos* e de componentes desvitalizados na ferida: são removidos todos os tecidos não viáveis e os debris até que o tecido normal e bem vascularizado volte a aparecer. Após ser executado o desbridamento é necessária a utilização de antimicrobianos e agentes tópicos antibiofilme a fim de garantir sua efetividade (RHOADS *et al.*, 2008). O desbridamento cirúrgico costuma ser doloroso e eventualmente requer uso de anestésicos locais. Pode ser usado para úlceras venosas, úlceras de pé diabético e úlceras de pressão, mas com cautela, pois tecidos isquêmicos tendem a dessecar após o desbridamento, o que pode expandir o tamanho da úlcera (FONDER *et al.*, 2008). O desbridamento tem por função remover a proteção do biofilme, que é a substância polimérica extracelular, obrigando a bactéria a se reconstituir de maneira que o seu fenótipo é revertido para uma forma metabolicamente ativa criando uma janela terapêutica temporal na qual as bactérias são mais susceptíveis a outros tratamentos, como a utilização de antimicrobianos e antissépticos tópicos como iodo e biguanida de políexametileno (METCALF & BOWLER, 2013).

O desbridamento pode ocorrer também por processo enzimático, por irrigação ou por bio-desbridamento. Quando enzimático, utiliza-se enzimas como colagenase e papaína, que promovem a digestão do tecido necrosado. A papaína promove maior remoção que a colagenase, segundo a revisão de Fonder e colaboradores (2008). Entretanto, segundo Sarabahi e colaboradores (2012), uma das limitações da papaína é que não é seletiva, e há intensa resposta inflamatória e dano a porções viáveis do tecido. O desbridamento por irrigação a alta pressão é considerado uma das melhores alternativas e pode ser realizado com água, solução salina ou antibiótica. É efetivo na remoção de bactérias, material particulado e debris, diminuindo a taxa de infecção se comparada à irrigação de baixa pressão. É comumente utilizada em articulações sendo também indicada para feridas profundas. O bio-desbridamento utiliza de larvas medicinais provenientes de moscas da espécie *Lucilia sericata* em úlceras com grande quantidade de tecido necrosado. Elas secretam enzimas proteolíticas somente nos tecidos danificados, apresentando-se efetivas contra cepas MRSA e contra *Streptococcus* β -hemolítico. Como desvantagem tem-se o desconforto local (SARABAH, 2012).

A utilização de larvas de moscas para desbridamento de feridas tem sido empregada devido a seu papel em desinfetar e ajudar a formação de granulação tecidual. Segundo a revisão de Abdolmaleki e colaboradores (2015), o tipo utilizado de larva deve alimentar-se de tecido vivo, nesse aspecto, a espécie comumente empregada é *Lucilia sericata*. Possuem maior efetividade ao atuar em infecções por *microrganismos* Gram-positivos. A duração do tratamento depende da largura e profundidade da ferida e da quantidade de tecido necrosado. Em geral, é um método de desbridamento mais rápido que os demais. Além disso, o odor e o exsudato são reduzidos. Ao alimentarem-se as larvas liberam enzimas proteolíticas que auxiliam na digestão dos tecidos. O material excretado por elas contém propriedades antibacterianas contra *microrganismos* Gram-positivos, inibindo-os. Além disso, são liberadas substâncias que tornam o meio desfavorável ao crescimento bacteriano, como alantoína que, inclusive tem propriedades que contribuem para a cicatrização. Algumas desvantagens como dor e sangramento podem ocorrer, esse último principalmente em pacientes que façam uso de terapia antiplaquetária. Deve-se evitar usá-las em caso de desbridamento no entorno de vasos mais calibrosos. E média são utilizadas cerca de 100 larvas para cada 50 gramas de tecido necrosado.

Para a determinação dessa quantidade deve-se também considerar a profundidade da ferida: feridas acima de 2 cm de profundidade devem ter a proporção de larvas multiplicada pela área superficial. Segundo a revisão de Mota e colaboradores (2012) as larvas *Lucilia sericata* previnem e desagregam o biofilme de *S. aureus*. Para *P. aeruginosa*, elas inicialmente favorecem as interações intercelulares, mas como tempo, provocam o colapso do biofilme, necessitando de quantidade dez vezes superior a inicialmente utilizada.

4.3.1.5 Controle da adesão bacteriana

Os antissépticos auxiliam a conter a comunidade bacteriana devido a sua capacidade de penetrar nos biofilmes. Sua utilização é recomendada após desbridamento e estabelecimento de terapia antimicrobiana. Devem ser adotados com cautela, pois alguns danificam proteínas como anticorpos e citocinas, além de eliminar, também, células humanas (RHOADS *et al.*, 2008). Comumente os antissépticos são utilizados impregnados em curativos, como é o caso da prata.

4.3.1.5.1 Prata iônica

Em geral curativos protegem as feridas de contaminação externa, absorvem o exsudato superficial e podem atuar diminuindo a carga bacteriana. A prata é um agente antisséptico que pode ser utilizado em gazes, hidrocolóides, alginatos, cremes e géis. Os íons de prata eliminam a bactéria por ligação e desestruturação da parede celular, danificando membranas intracelular e nuclear, desnaturando DNA e RNA bacteriano. Como desvantagens, podem ser tóxicos aos queratinócitos e aos fibroblastos (FONDER *et al.*, 2008). Alguns autores referem-se a ela como tendo propriedades antimicrobianas. Quando na forma de nitrato ou sulfadiazina de prata, concentrações de 10-40 ppm apresentaram atividade *in vitro* contra *microrganismos* patogênicos (SARABAH, 2012). Em outros estudos, curativos impregnados de prata iônica preveniram a formação de biofilmes quando comparados a curativos que não a continham (RHOADS *et al.*, 2008; KIM & STEINBERG, 2012), mas para que haja combate efetivo de biofilmes as concentrações presentes nesses curativos ainda seriam inferiores às necessárias (RHOADS *et al.*, 2008). Ao contrário, em estudo

apontado na revisão de Kim e colaboradores (2012), não houve diferenças entre os curativos normais e os impregnados pela prata, o que demonstra que a relação entre a ferida e o uso de materiais antimicrobianos em curativos ainda não está bem elucidada. Alguns estudos mencionam que são necessárias concentrações pequenas de prata iônica para desestabilizar a matriz exopolimérica de *S. epidermidis* (RHOADS *et al.*, 2008; MOTA *et al.*, 2012). Em estudo realizado em 2008 por Fonder e colaboradores, os íons de prata foram eficazes contra bactérias Gram-negativas e microrganismos como MRSA e *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina. Diversos produtos à base de prata estão disponíveis no mercado. Para mais detalhamento sobre o tema recomenda-se a revisão de Fonder e colaboradores (2008) que disponibiliza a relação de curativos impregnados com prata bem como suas vantagens e desvantagens.

4.3.1.5.2 Mel medicinal

O mel medicinal (*Manuka honey*) apresenta atividade antibacteriana, mas ainda é discutido se os efeitos sobre os biofilmes devem-se ao seu potencial osmótico ou à alteração sobre um alvo biológico nas bactérias (RHOADS *et al.*, 2008). Segundo a literatura, o mel pode difundir-se através da matriz de biofilmes bacterianos de espécies resistentes à meticilina, como o *S. aureus*. Já na *P. aeruginosa*, a frutose presente no mel poderia ligar-se competitivamente a receptores que atuam em adesinas importantes para a fixação bacteriana a superfícies, inibindo a adesão (LERRER *et al.*, 2007). A hiperosmolaridade do mel pode impedir o crescimento bacteriano (LIO & KAYE, 2011) e, além disso, diminuiria o aporte de água às bactérias. Ainda, o elevado teor de glicose estimularia a ação dos macrófagos (MOTA *et al.*, 2012) e sua baixa atividade de água assim como seu baixo pH (3.2-4.5) poderiam prevenir o crescimento bacteriano (VANDAMME *et al.*, 2013). Ademais, a presença de fatores conhecidos como inibinas (que englobam flavonoides, ácidos fenólicos e peróxido de hidrogênio) teriam efeitos antibacterianos que contribuiriam para a cicatrização, segundo a revisão de Lio e colaboradores (2011).

Em estudo realizado por Cooper e colaboradores (2009), sabendo que bactérias planctônicas de *P. aeruginosa* em suspensão eram susceptíveis ao mel em concentrações menores que 10% (m/v), os autores conduziram experimentos *in vitro* para testar o os efeitos do mel sobre biofilmes de 24 h. Cinco isolados clínicos de diferentes pacientes com feridas infectadas por *P. aeruginosa* foram cultivados em placas de 96 poços e tratados com caldo Luria-Bertani (LB) puro ou caldo LB contendo mel nas proporções de 20 e 40% (m/v). As análises demonstraram que o crescimento foi menor quando 40% de mel foi incorporado ao meio, com efeitos pronunciados entre 9 h e 11 h de experimento. Após esse período, os biofilmes voltaram a crescer. O estudo mostrou que devem ser observados os níveis utilizados de mel nos curativos, pois se inadequados podem favorecer o crescimento microbiano. Além disso, mesmo que o crescimento seja contido, os curativos precisariam ser trocados a cada 12 h, visto que sua eficácia diminuiu após 11 horas de experimento, sugerindo que o efeito inibitório não é mantido. Como as concentrações adotadas na clínica envolvem curativos impregnados com 80 a 100% de mel, possivelmente as aplicações tópicas tenham um efeito inicialmente redutor do crescimento.

Quanto a aplicabilidade clínica, segundo a revisão sistemática elaborada por Vandamme e colaboradores (2013), quando comparado a sulfadiazina de prata, o mel apresentou melhor efeito anti-bacteriano. As maiores evidências de suas propriedades anti-bacterianas foram verificadas em tratamento de feridas localizadas em queimaduras. Enquanto em úlceras o efeito antibacteriano do mel mostrou-se de moderado a fraco. Segundo os autores, o estudo mais completo encontrado na literatura² mostrou que o mel não pode ser clinicamente relevante quando comparado à terapia padrão, devendo ser utilizado na terapia como estimulante da cicatrização. Além disso, diversos estudos não padronizam ou especificam o mel utilizado, sendo que alguns não fazem uso de mel medicinal como o *Manuka honey* e *Medihoney*, que são estéreis.

Sabendo das propriedades antibacterianas do mel estudadas isoladamente para curativos, o estudo recente realizado por Liu e colaboradores (2015) buscou

² VANDAMME, L. *et al.* Honey in modern wound care: a systematic review. **Burns**, 8 (39), p.1514-25, 2013 *apud* JULL, A. *et al.* A randomized clinical trial of honey-impregnated dressings for venous leg ulcers. **Br. J. Surg**, 2 (95), p. 175-82, 2008.

analisar o efeito sinérgico do mel com a farmacoterapia tópica comumente utilizada no tratamento de feridas crônicas, a fim de conter cepas MRSA tanto planctônicas quanto formadoras de biofilmes. Foram testadas associações com clindamicina, gentamicina, oxacilina e rifampicina, e estabelecidos valores de MIC e MBC. No teste de difusão em ágar a adição de 5% de mel causou o aumento de duas vezes no halo inibitório para a rifampicina e a oxacilina tanto para cepas MRSA quanto MSSA. Para clindamicina, o efeito também foi positivo, embora algumas cepas MRSA tenham permanecido resistentes e para a gentamicina não foi observado efeito. Em ensaios de erradicação de biofilmes utilizando cristal violeta observou-se um efeito sinérgico dos agentes antimicrobianos combinados com o mel. Os autores defendem que esse sinergismo poderia ser adotado para feridas crônicas de difícil tratamento utilizando terapia sistêmica antimicrobiana, que atingiria as camadas mais profundas do ferimento, associada à terapia tópica com mel (curativos), inibindo o crescimento microbiano.

4.3.1.6 Prevenção

Do ponto de vista clínico, devido a dificuldade em erradicar biofilmes maduros, a melhor estratégia é a prevenção (GALANAKOS et al., 2009). Em casos de feridas abertas, por exemplo, uma infecção atrasaria o processo de cura – e consequente fechamento da ferida – aumentando as chances de um paciente hospitalizado evoluir para sepse com risco de morte (GETHIN, 2009). Nesses casos, recomenda-se o uso de antimicrobianos tópicos cujo espectro de ação é mais amplo e não levam à resistência bacteriana. Como prevenção adicional, se faz uso de desinfetantes e agentes que atuam no nível de multiplicação celular como álcoois (etanol 70°), biguanidas (clorexidina), compostos clorados ou iodados, compostos de prata e de amônio quaternário, além de peróxidos (GETHIN, 2009; WU et. al., 2015).

4.3.1.6.1 Iodo

O iodo costuma ser utilizado para prevenção de infecções. Alguns estudos questionam sua possível toxicidade aos tecidos. Pode ser utilizado em biofilmes polibacterianos de *P. aeruginosa* e *S. aureus*, jovens ou maduros. O iodo em

compressa de algodão tem liberação gradual, sendo mais efetivo que quando em pomada ou em solução. Se o tratamento for interrompido, ocorre o retorno aos níveis bacterianos preexistentes. Existe no mercado o cadexômero de iodo (IodosorbTM), que consiste em microesferas de amido modificado que apresenta atividade antimicrobiana de largo espectro (72 h). Nessa formulação o iodo é liberado lentamente enquanto que o cadexômero de amido absorve debris e exsudatos do leito da ferida. A liberação é controlada e os níveis não chegam a ser tóxicos para o paciente (FONDER et al., 2008).

4.3.1.7 Estratégias adicionais - Utilização de fibroblastos fetais

Comumente após o desbridamento da região em que se localiza a ferida, utilizam-se bandagens até que o tecido se restabeleça. A utilização de fibroblastos fetais humanos visa contribuir para a cicatrização, não sendo considerada diretamente como uma estratégia para tratamento de biofilmes. Entretanto, considerando as dificuldades de cicatrização especialmente no caso de pacientes diabéticos a utilização de artifícios que favorecessem a evolução do quadro clínico para o fechamento da ferida diminuiria a probabilidade do estabelecimento de biofilmes na região. Assim, considerando que o surgimento das feridas em pacientes com diabetes está relacionado ao prejuízo na capacidade de crescimento dos fibroblastos, existem estudos que mostram que a utilização de fibroblastos advindos de pele humana poderiam contribuir para a completa cicatrização das feridas entre 6 e 18 meses após o início do tratamento. Estudos recentes relatam a possibilidade de utilização de fibroblastos fetais, devido ao eficiente sistema de reparo que a pele do feto tem se comparada a pele de um adulto (LARIJANI et al., 2015).

5. CONCLUSÕES

Os biofilmes são responsáveis por cerca de 50 % das infecções nosocomiais, atingindo principalmente pacientes que fazem uso de dispositivos médicos implantáveis ou que apresentam doenças cuja patogênese predispõe à colonização

bacteriana como a fibrose cística, a otite do ouvido médio e as ulcerações. Nesses casos, bactérias formadoras de biofilmes como *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *H. influenzae* apresentaram-se como as mais prevalentes e, ao entrarem em contato com o hospedeiro, acabam por contribuir para o desenvolvimento de uma infecção crônica e de difícil tratamento. Relatos na literatura indicam que, para a erradicação dos biofilmes, são necessárias concentrações cerca de 100 a 1000 vezes superiores do que as utilizadas na farmacoterapia para microrganismos na forma planctônica. Entretanto, constatou-se nesta revisão a ausência de dados mostrando as doses necessárias para o tratamento de infecções relacionadas a biofilmes. Na prática, o tratamento antimicrobiano clínico antibiofilme continua sendo empírico. A literatura também recomenda que se utilizem associações de antimicrobianos a fim de evitar o desenvolvimento de tolerância. Vários relatos promissores foram encontrados visando a busca por novos tratamentos através da utilização de estratégias para destruição da matriz do biofilme ou inibição do sistema bacteriano *quorum sensing*, que poderão futuramente ser utilizadas como terapias adjuvantes aos tratamentos com antimicrobianos. Sem dúvida, mais estudos são necessários para (1) a realização do correto diagnóstico de infecções causadas por biofilmes, (2) para a padronização de doses e vias de administração apropriadas para infecções causadas por bactérias na forma de biofilmes, (3) confirmar a efetividade dessas terapias adjuvantes, e bem como para (4) testar novas estratégias na busca por tratamentos efetivos contra bactérias em biofilme.

REFERÊNCIAS

- ABDOLMALEKI, A. *et al.* Maggot debridement therapy: concepts, methods, issues and future. **International Journal of Pharmacotherapy**, v. 5, n. 1, p. 27–31, 2015.
- ACUIN, J. I. Chronic Suppurative Otitis media: Burden of illness and Management options. **Child and Adolescent Health and Development Prevention of Blindness and Deafness**, 2004.
- AKYILDIZ, I. *et al.* Bacterial Biofilm Formation in the Middle-Ear Mucosa of Chronic Otitis Media Patients. **Indian Journal of Otolaryngology and Head and Neck Surgery**, v. 65, n. December, p. 1–5, 2012.
- ALEMAYEHU, D. *et al.* Bacteriophages øMR299-2 and øNH-4 can eliminate *Pseudomonas aeruginosa* in the murine lung and on cystic fibrosis lung airway cells. **mBio**, v. 3, n. 2, p. 1–9, 2012.
- ALVAREZ, A. E. *et al.* Fibrose cística em um centro de referência no Brasil: características clínicas e laboratoriais de 104 pacientes e sua associação com o genótipo e a gravidade da doença. **Jornal de Pediatria**, v. 80, p. 371–379, 2004.
- ARCHER, N. K. *et al.* *Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation, and roles in human disease. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 445–459, 2011.
- ARCIOLA, C. R. *et al.* Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. **Biomaterials**, v. 33, n. 26, p. 5967–5982, 2012.
- ARMBRUSTER, C. E. *et al.* Indirect pathogenicity of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in polymicrobial otitis media occurs via interspecies quorum signaling. **mBio**, v. 1, n. 3, p. 1–9, 2010.
- BARRAUD, N. *et al.* Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 23, p. 7333–7342, 2009.
- BARTH, L. A.; BARROS, E. Estrutura, fisiologia e classificação bacteriana. In: BARROS, E. *et al.* (Eds.). . **Antimicrobianos: Consulta rápida**. 3rd. ed. Porto Alegre: [s.n.]. p. 17–25.
- BELFIELD, K. *et al.* Do orally administered antibiotics reach concentrations in the middle ear sufficient to eradicate planktonic and biofilm bacteria? A review. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 79, n. 3, p. 296–300, 2015.
- BHATT, J. M. Treatment of pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. **European Respiratory Review**, v. 22, n. 129, p. 205–216, 2013.

BIXLER, G. D.; BHUSHAN, B. Biofouling: lessons from nature. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 370, p 2381-2417, 2012.

BJARNSHOLT, T. *et al.* Why chronic wounds will not heal: A novel hypothesis. **Wound Repair and Regeneration**, v. 16, n. 1, p. 2–10, 2008.

BJARNSHOLT, T. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. **Pediatric pulmonology**, v. 44, n. 6, p. 547–558, 2009.

BJARNSHOLT, T. *et al.* The in vivo biofilm. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 9, p. 466–474, 2013.

CARDINES, R. *et al.* *Haemophilus influenzae* in children with cystic fibrosis: Antimicrobial susceptibility, molecular epidemiology, distribution of adhesins and biofilm formation. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 302, n. 1, p. 45–52, 2012.

CATALDI, M. *et al.* Biofilm-dependent airway infections: A role for ambroxol? **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 28, n. 2, p. 98–108, 2014.

CÉSAR, M.; CASTRO, S. DE. O Tratamento na Fibrose Cística e suas Complicações. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, Ano 10, Out, 2011.

CIOFU, O. *et al.* Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2014.

COOPER, R. Honey modulates biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* in a time and dose dependent manner. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v. 1, n. 1, p. 6–10, 2009.

CRAMTON, S. E. *et al.* Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Infection and Immunity**. v. 69, n. 6, p. 4079–4085, 2001.

DA SILVA FILHO, L. V. R. F. *et al.* Infecção por em pacientes com *Pseudomonas aeruginosa* fibrose cística: evidências científicas sobre o impacto clínico, diagnóstico. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 39, n. 4, p. 495–512, 2013.

DANIEL, M. Antibiotics for otitis media with effusion in children. **Clinical Otolaryngology**, v. 38, n. 1, p. 54–55, 2013.

DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C. *et al.* Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: Antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, p. 580–589, 2013.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881–890, 2002.

- DONLAN, R. M. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 66–72, 2009.
- DÖRING, G. *et al.* Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: Current and future strategies. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 11, n. 6, p. 461–479, 2012.
- DOROSHENKO, N. *et al.* Extracellular DNA impedes the transport of vancomycin in *Staphylococcus epidermidis* biofilms preexposed to subinhibitory concentrations of vancomycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7273–7282, 2014.
- DOWD, S. E. *et al.* Polymicrobial nature of chronic diabetic foot ulcer biofilm infections determined using bacterial tag encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). **PLoS ONE**, v. 3, n. 10, 2008.
- EHRlich, G. D. *et al.* Mucosal biofilm formation on middle ear in the Chinchilla Model of otitis media. **JAMA**, v. 287, n. 13, p. 1710–1715, 2011.
- ERRIU, M. *et al.* Microbial biofilm modulation by ultrasound: Current concepts and controversies. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 1, p. 15–22, 2014.
- ESPER, L. M. R. “Formação de Biofilmes Microbianos”. **V Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada. Universidade Federal Fluminense**, p. 1–19, 2011.
- FERNÁNDEZ-OLMOS, A. *et al.* *In vitro* prevention of *Pseudomonas aeruginosa* early biofilm formation with antibiotics used in cystic fibrosis patients. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 2, p. 173–176, 2012.
- FONDER, M. A. *et al.* Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, n. 2, p. 185–206, 2008.
- FRANKLIN, J. Systematic reviews in cystic fibrosis. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 89, n. 9, p. 538, 1996.
- FUX, C. A. *et al.* Biofilm-related infections of cerebrospinal fluid shunts. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 4, p. 331–337, 2006.
- GALANAKOS, S. P. *et al.* Biofilm and orthopaedic practice: the world of microbes in a world of implants. **Orthopaedics and Trauma**, v. 23, n. 3, p. 175–179, 2009.
- GETHIN, G. Role of topical antimicrobials in wound management. **Journal of wound care/active healthcare supplement**, p. 0–4, 2009.
- GJØDSBØL, K. *et al.* Multiple bacterial species reside in chronic wounds: A longitudinal study. **International Wound Journal**, v. 3, n. 3, 2006.
- HADINOTO, K.; CHEOW, W. S. Nano-antibiotics in chronic lung infection therapy against *Pseudomonas aeruginosa*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 116, p. 772–785, 2014.

HANNLEY, M. T.; DENNENY, J. C.; HOLZER, S. S. Use of ototopical antibiotics in treating 3 common ear diseases. **Otolaryngology head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 122, n. 6, p. 934–940, 2000.

HASSETT, D. J. *et al.* Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: Rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 1425–1443, 2002.

HOFFMANN, A.; PROCIANOY, E. DA FONSECA A. Infecção respiratória na fibrose cística e tratamento cystic fibrosis respiratory infection and treatment. **Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, v. 31, n. 2, p. 216–223, 2011.

HØIBY, N. *et al.* The clinical impact of bacterial biofilms. **International journal of oral science**, v. 3, n. 2, p. 55–65, 2011.

HØIBY, N. *et al.* ESCMID GUIDELINES ESCMID Guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections. p. 1–25, 2014.

JAMES, G. A. *et al.* Biofilms in chronic wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 16, n. 1, p. 37–44, 2008.

JONES, S. M.; HUMPHREY, T. J.; LAPPIN-SCOTT, H. Effect of vancomycin and rifampicin on meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms for personal use only . **The Lancet** . v. 357, p. 40–41, 2001.

JURCISEK, J. A.; BAKALETZ, L. O. Biofilms formed by nontypeable *Haemophilus influenzae* in vivo contain both double-stranded DNA and type IV pilin protein. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 10, p. 3868–3875, 2007.

KALIA, V. C. *Quorum sensing* inhibitors: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 2, p. 224–245, 2013.

KALIA, V. C.; WOOD, T. K.; KUMAR, P. Evolution of resistance to *quorum sensing* inhibitors. **Microb. Ecol.** July, 68(1): 13-23, 2014.

KARATAN, E.; WATNICK, P. Signals , Regulatory Networks , and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, n. 2, p. 310–347, 2009.

KEAYS, T. *et al.* A retrospective analysis of biofilm antibiotic susceptibility testing: A better predictor of clinical response in cystic fibrosis exacerbations. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 8, n. 2, p. 122–127, 2009.

KIM, P. J.; STEINBERG, J. S. Wound care: Biofilm and its impact on the latest treatment modalities for ulcerations of the diabetic foot. **Seminars in Vascular Surgery**, v. 25, n. 2, p. 70–74, 2012.

KING, P. *Haemophilus influenzae* and the lung (*Haemophilus* and the lung). **Clinical and Translational Medicine**, v. 1, n. 1, p. 10, 2012.

KOBAYASHI, H. Airway biofilm disease. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, p. 351–356, 2001.

KONEMAN, E. W. **Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas colorido**. 6th. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

KRASAN, G. P. *et al.* Adhesin expression in matched nasopharyngeal and middle ear isolates of nontypeable *Haemophilus influenzae* from children with acute otitis media. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 449–454, 1999.

KUTATELADZE, M.; ADAMIA, R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 12, p. 591–595, 2010.

LARIJANI, B. *et al.* Human fetal skin fibroblasts: extremely potent and allogenic candidates for treatment of diabetic wounds. **Medical Hypotheses**, v. 84, n. 6, p. 577–579, 2015.

LEID, J. G. Bacterial biofilms resist key host defenses. **Microbe**, v. 4, n. 2, p. 66–70, 2009.

LERRER, B. *et al.* Honey and royal jelly, like human milk, abrogate lectin-dependent infection-preceding *Pseudomonas aeruginosa* adhesion. **The ISME journal**, v. 1, n. 2, p. 149–155, 2007.

LEWIS, K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. **Biochemistry (Moscow)**, v. 70, n. 2, p. 267–274, 2005.

LINE, C. B. Wound Infection: Biofilms defined and described. **Wound Practice and Research**, v. 20, n. 4, p. 6–8, 2012.

LIO, P. A.; KAYE, E. T. Topical antibacterial agents. **Medical Clinics of North America**, v. 95, n. 4, p. 703–721, 2011.

LIU, M. *et al.* Antibiotic-specific differences in the response of *Staphylococcus aureus* to treatment with antimicrobials combined with manuka honey. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. January, p. 1–9, 2015.

LODISE, T. P.; LOMAESTRO, B.; DRUSANO, G. L. Piperacillin-tazobactam for *Pseudomonas aeruginosa* infection: clinical implications of an extended-infusion dosing strategy. **Clinical infectious diseases: an official publication of the infectious diseases Society of America**, v. 44, n. 3, p. 357–363, 2007.

MACK, D. *et al.* The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear ??-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 1, p. 175–183, 1996.

- MAHAMI, T. Biofilm-associated infections: public health implications. **Research Journal of Microbiology**, v. 2, n. November, p. 375–381, 2011.
- MARIN, J. M.; SILVA, M. E. N. B. Ocorrência de *Haemophilus influenzae* em crianças atendidas em creches. **Journal of basic and applied pharmaceutical sciences**, v. 26, n. 3, p. 167–174, 2005.
- MARTÍ, M. *et al.* Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 1, p. 55–64, 2010.
- MARTINS, L. A.; SANTOS, L. DOS. Acompanhamento Farmacoterapêutico de pacientes com fibrose cística na internação pedátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. **Infarma**, p. 13–18, 2006.
- MCCARTHY, H. *et al.* Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, January, p. 1–9, 2015.
- MESAROS, N. *et al.* Review -*Pseudomonas aeruginosa*: Resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, p. 560–578, 2007.
- METCALF, D.; BOWLER, P. Biofilm delays wound healing: A review of the evidence. **Burns and Trauma**, v. 1, n. 1, p. 5–12, 2013.
- MOTA, M. DA CONCEIÇÃO; MELO, S. C. DE; COSTA, T. P. Estratégias de gestão de biofilmes em feridas crônicas. Revisão de Literatura. **Journal of Tissue Regeneration & Healing**, n. 1, 2012.
- MOXON, E. R. *et al.* *Haemophilus influenzae* biofilms: hypothesis or fact? **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 95–100, 2008.
- NEILL, E. O. *et al.* A Novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the Fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 11, p. 3835–3850, 2008.
- NIZET, V. *et al.* A virulent nonencapsulated *Haemophilus influenzae*. **The Journal of infectious diseases**, v. 173, n. 1, p. 180–186, 1996.
- OCHOA, S. A. *et al.* Phenotypic characterization of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from pediatric patients associated to biofilm formation. **Microbiological Research**, v. 172, p. 68–78, 2015.
- OTTO, M. *Staphylococcal* biofilms. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 322, p. 207–228, 2008.
- PALUCH-OLEŚ, J. *et al.* The phenotypic and genetic biofilm formation characteristics of coagulase-negative staphylococci isolates in children with otitis media. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 75, n. 1, p. 126–130, 2011.

PARSEK, M. R.; SINGH, P. K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annual review of microbiology**, v. 57, p. 677–701, 2003.

PASTERNAK, J. Biofilmes: um inimigo (in)visível. **SBCC**, n. 6, p. 6–8, 2009.

PERCIVAL, S. L. *et al.* Antimicrobial tolerance and the significance of persister cells in recalcitrant chronic wound biofilms. **Wound Repair and Regeneration**, v. 19, n. 1, p. 1–9, 2011.

PERCIVAL, S. L. *et al.* A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 20, n. 5, p. 647–657, 2012.

PEREIRA, M. B. R.; RAMOS, B. D. Otite média aguda e secretora. **Jornal de Pediatria**, v. 74, p. 21–30, 1998.

QUREISHI, A. *et al.* Update on otitis media - Prevention and treatment. **Infection and Drug Resistance**, v. 7, p. 15–24, 2014.

RABIN, N. *et al.* Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future Medical Chemistry**, v. 2, n. 5253, p. 493–512, 2015.

RENDUELES, O.; KAPLAN, J. B.; GHIGO, J. Antibiofilm polysaccharides. **Environmental Microbiology**, 2012.

RHOADS, D. D.; WOLCOTT, R. D.; PERCIVAL, S. L. Biofilms in wounds: management strategies. **Journal of wound care**, v. 17, n. 11, p. 502–509, 2008.

ROHDE, H. *et al.* Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. **Biomaterials**, v. 28, p. 1711–1720, 2007.

ROHDE, H. *et al.* Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. **European Journal of Cell Biology**, v. 89, n. 1, p. 103–111, 2010.

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

SAIMAN, L. *et al.* Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial. **JAMA: the journal of the American Medical Association**. V.290, núm 13, p. 1749-1756, 2003.

SARABAH, S. Recent advances in topical wound care Indian. **Journal of Plastic Surgery**, 2012.

SETH, A. K. *et al.* *In vivo* modeling of biofilm-infected wounds: A review. **Journal of Surgical Research**, v. 178, n. 1, p. 330–338, 2012.

SHARMA, G. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets. **Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization**, v. 42, p. 1–7, 2014.

SHUNMUGAPERUMAL, T. Part 1: Development and characterization of biofilms. **In: Biofilm Eradication and Prevention: A Pharmaceutical Approach to Medical Device Infections**. John Wiley & Sons, Inc. Publication, 2012.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 573–583, 2010.

SINGH, P. K. *et al.* *Quorum-sensing* signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. **Nature**, v. 407, p. 762–764, 2000.

SMITH, A.; BUCHINSKY, F. J.; POST, J. C. Eradicating chronic ear, nose, and throat infections: a systematically conducted literature review of advances in biofilm treatment. **Otolaryngology--head and neck surgery: official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 144, n. 3, p. 338–347, 2011.

ST GEME, J. W. Molecular and cellular determinants of non-typeable *Haemophilus influenzae* adherence and invasion. **Cellular Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 191–200, 2002.

STARNER, T. D. *et al.* *Haemophilus influenzae* forms biofilms on airway epithelia: Implications in cystic fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 174, n. 2, p. 213–220, 2006.

TAYLOR, P. K.; YEUNG, A. T. Y.; HANCOCK, R. E. W. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Towards the development of novel anti-biofilm therapies. **Journal of Biotechnology**, v. 191, p. 121–130, 2014.

TRÉ-HARDY, M. *et al.* Effect of antibiotic co-administration on young and mature biofilms of cystic fibrosis clinical isolates: the importance of the biofilm model. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, p. 40–45, 2009a.

TRÉ-HARDY, M. *et al.* Evaluation of long-term co-administration of tobramycin and clarithromycin in a mature biofilm model of cystic fibrosis clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, p. 370–374, 2009b.

TRINIDAD, A; IBÁÑEZ, A; GÓMEZ, D. Application of environmental scanning electron microscopy for study of biofilms in medical devices. **Microscopy: Science, Technology, Applications and Education**, p. 204–210, 2010.

Guideline Antibiotic treatment for cystic fibrosis. **UK cystic fibrosis trust antibiotic working group**.. 3rd edition, March 2009

VANDAMME, L. *et al.* Honey in modern wound care: A systematic review. **Burns**, v. 39, n. 8, p. 1514–1525, 2013.

WANG, Y. *et al.* The impact of pulmonary diseases on the fate of inhaled medicines — A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 461, n. 1-2, p. 112–128, 2014.

WATTERS, C. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* biofilms perturb wound resolution and antibiotic tolerance in diabetic mice. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 202, n. 2, p. 131–141, 2013.

WERDIN, F. *et al.* Evidence-based management strategies for treatment of chronic wounds. **Eplasty**, v. 9, p. e19, 2009.

WILKINS, M. *et al.* New approaches to the treatment of biofilm-related infections. **Journal of Infection**, v. 69, p. S47–S52, 2014.

WOLCOTT, R. *et al.* The polymicrobial nature of biofilm infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 2, p. 107–112, 2013.

WU, Y.; QUAN, X.; SI, X. Incorporation of brominated furanone into Nafion polymer enhanced anti-biofilm efficacy. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 99, p. 39–44, 2015.

ZHANG, L.; MAH, T. F. Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 13, p. 4447–4452, 2008.

ZAGO, V.C.P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N.G. *Pseudomonas spp.* Fluorescentes – Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola. **Seropédica: Embrapa Agrobiologia**, dez. 2000. 32p. (Embrapa-CNPAB.Documentos, 127).