

NÚCLEO INTERDISCIPLINAR DE PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - PIBIC

RELATÓRIO FINAL DE PESQUISA

INICIAÇÃO CIENTÍFICA

**RELAÇÃO EXISTENTE ENTRE BIOFILMES
BACTERIANOS, QUORUM SENSING, INFECÇÕES E
RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS: UMA REVISÃO
BIBLIOGRÁFICA**

Autor: Neila Batista Damaceno

Orientador: Prof.^a MSC Luciana Ramalho de Farias

2014

Biomedicina – 6º Semestre
Brasília - Distrito Federal - Brasil

Pesquisa Financiada pela Faculdades Integradas Promove de Brasília e
Instituto Superior de Educação do ICESP, por meio do Núcleo
Interdisciplinar de Pesquisa - NIP
É proibida a reprodução total ou parcial

RELAÇÃO EXISTENTE ENTRE BIOFILMES BACTERIANOS, QUORUM SENSING, INFECÇÕES E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

NEILA BATISTA DAMACENO

FACULDADES INTEGRADAS PROMOVE DE BRASÍLIA
INSTITUTO SUPERIOR DE EDUCAÇÃO DO ICESP

RESUMO:

Bactérias constituem a linha de frente quando se trata de infecções por micro-organismos. Estas por sua vez, podem ser causadas por células plactônicas (livre) ou agregadas umas nas outras, formando então o biofilme. Este último é motivo de grande preocupação, uma vez que confere a seus organismos formadores proteção a ação de antibióticos, o que resulta em uma resistência aos fármacos antimicrobianos. Infecções hospitalares causadas por biofilmes ou agravadas por eles é uma grande, se não a maior preocupação no que diz respeito ao tema. Muitos são os mecanismos que levam ao desenvolvimento do biofilme, entretanto, diferentes pesquisas tem mostrado que fatores de virulência, o *quórum sensing* (comunicação célula-célula) e a transferência de DNA extracromossomal (conjugação), são os mecanismos mais conhecidos e estudados.

Palavras Chave: Biofilme, resistência, *quórum sensing*, infecção.

**RELATIONSHIP EXISTING BETWEEN BACTERIAL BIOFILMS,
QUORUM SENSING INFECTIONS AND RESISTANCE TO
ANTIBIOTICS: A LITERATURE REVIEW**

NEILA BATISTA DAMACENO

FACULDADES INTEGRADAS PROMOVE DE BRASÍLIA
INSTITUTO SUPERIOR DE EDUCAÇÃO DO ICESP

ABSTRACT:

Bacteria constitute the front line when it comes to infections by microorganisms. These in turn can be caused by plactônicas cells (free) or some other aggregate in then forming the biofilm. The latter is of great concern, since it gives their bodies forming protective action of antibiotics, resulting in resistance to antimicrobial drugs. Nosocomial infections caused by biofilms or aggravated by them is a great, if not greater concern with regard to the subject. Many mechanisms that lead to biofilm development, however, research has shown that different virulence factors, quorum sensing (cell-cell communication) and the transfer of extrachromosomal DNA (conjugation) are the best known and most studied mechanisms.

Keywords: Biofilm, resistance, *quórum sensing*, infections.

SUMÁRIO

· INTRODUÇÃO	5
· MÉTODO	9
· RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
· CONCLUSÃO	15
· REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16

INICIAÇÃO CIENTÍFICA
RELATÓRIO FINAL DE PESQUISA

INTRODUÇÃO

O biofilme é uma reunião de células microbianas irreversivelmente ancorada a uma superfície inerte ou viva, envolvida por uma matriz de uma substância polimérica extracelular autoproduzida e composta de material primariamente polissacarídico, que representa mais de 90% da massa do biofilme (Bezerra, 2009).

São três etapas até a formação do biofilme maduro: anexo inicial a uma superfície sólida; formação de microcolônias na superfície; e por fim, diferenciação de microcolonias envoltas de expopolissacarídeo (Costerton, 1999)

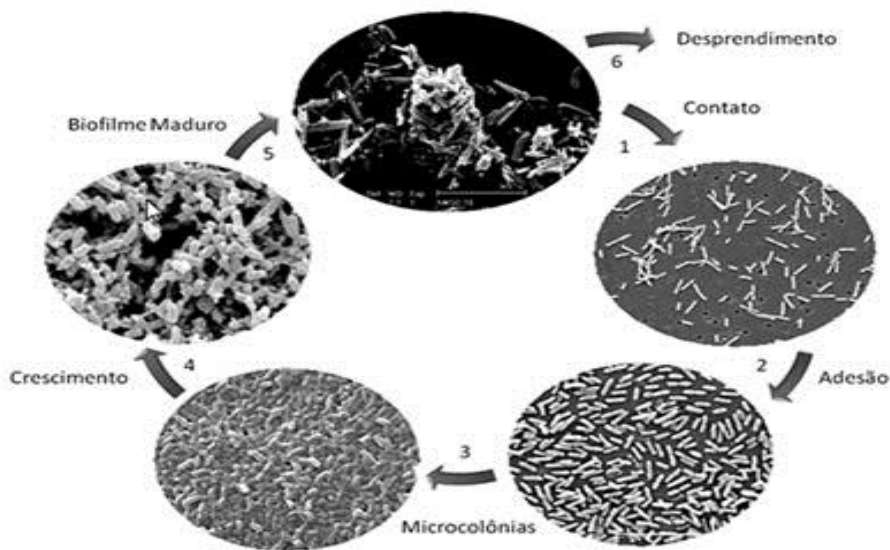


Figura 1 - Ciclo dos biofilmes: 1) Contato da forma planctônica com a superfície 2) Adesão 3) Formação de microcolônias 4) Maturação e crescimento tridimensional 5) Biofilme maduro com matriz extracelular e canais aquosos e 6) Desprendimento de formas planctônicas. Adaptado de: Tamashiro *et al.*, 2008.

No que se refere à composição, os biofilme são compostos principalmente por células microbianas e expopolissacarídeo (EPS), este, considerado o material principal da matriz do biofilme. A composição química do EPS pode variar entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Nas Gram-negativas a presença de ácidos urônicos proporciona a característica aniônica, que por sua vez permite a associação de cátions bivalentes, os quais são importantes para ligações

transversais com as fibras de polímero e proporcionam uma maior força de ligação do biofilme (Donlan, 2002). Em bactérias Gram-negativas a composição química do EPS pode ser catiônica.

Leriché *et al.* (2000) mostraram que diferentes organismos produzem diferentes quantidades de EPS e que a quantidade de EPS aumenta com a idade do biofilme. Além disso, EPS podem associar-se com íons de metais, outras macromoléculas e é ainda altamente hidratado, o que evita a dissecação em alguns biofilmes naturais (Donlan, 2002).

Em termos de estrutura, os biofilmes são heterogêneos, visto que contém microcolônias de células bacterianas envolvidas por uma matriz de EPS e separadas de outras microcolônias por canais de água (Lewandowski, 2000). Nestes canais ocorre fluxo de líquido, o que facilita a difusão de nutrientes, oxigênio e ainda, agentes microbianos de virulência. James *et al.* (1995), mostraram em seu experimento que a espessura do biofilme depende do número de organismos que o compõe. Em culturas puras de *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, o biofilme tem 15 μ e 30 μ respectivamente, contudo, a espessura do biofilme contendo as duas espécies teve cerca de 40 μ . O que leva a crer que uma espécie colabora com a outra.

EPS também contribui para propriedades de resistência antimicrobiana dos biofilmes, uma vez que impede o transporte de massa de antibióticos através do biofilme, provavelmente por se ligarem diretamente a estes agentes (Donlan, 2002).

Segundo Costerton *et al.* (1999), existem três hipóteses em que o biofilme pode ser resistente aos agentes antimicrobianos. A primeira apoia-se no fato de que a resistência acontece devido à falha do agente em penetrar por completo o biofilme. A segunda hipótese postula que em algumas células do biofilme vivam a limitação de nutrientes, portanto, com crescimento lento ou o não crescimento celular, que por sua vez não é susceptível a muitos agentes antimicrobianos. Essa heterogeneidade de estados metabólicos apresentados pelas células que compõe o biofilme, são quase ao certo uma estratégia de sobrevivência a ataques metabólicos diretos. O terceiro mecanismo que pode reduzir a susceptibilidade dos antibióticos é que algumas células adotam um fenótipo diferente, o que confere uma certa proteção, esta, não é uma resposta à limitação de nutrientes, mas sim, uma resposta programada para o crescimento em uma superfície.

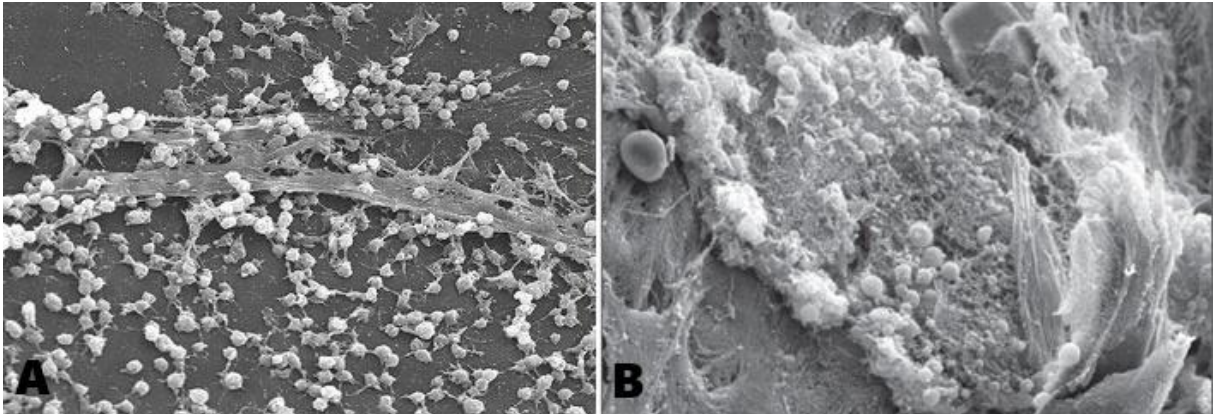


Figura 2: (A) Adesão inicial de células a uma superfície e formação da matriz extrapoli-sacarídica; (B) Biofilme maduro. Adaptado de: Tiba *et al.*, 2009.

Outra questão que influencia claramente para a resistência a agentes antimicrobianos é a troca de plasmídeos, uma vez que podem codificar resistência a vários antibióticos, promovendo então, a difusão da resistência (Donlan, 2002). Devido à grande quantidade de células, o biofilme se torna o nicho ideal para troca de DNA extracromossomal. De acordo com Hausner (1999), a conjugação ocorre em maior taxa entre células que estão dispostas em biofilmes, do que entre células plactônicas. Ghigo (2001) mostra que o pili F (codificado pelo plasmídeo F) atua como um fator de adesão entre as interações célula-célula, o que resulta na formação de um biofilme tridimensional de *Escherichia coli*. Ele também afirma que sem esse plasmídeo, os mesmos microorganismos formariam apenas microcolônias sem qualquer desenvolvimento. Uma explicação para a conjugação melhorada é que o ambiente do biofilme proporciona uma melhor interação célula-célula.

O mecanismo de *quórum sensing* (QS) consiste na produção e liberação de moléculas de sinalização para o meio, provocando a expressão de vários genes (Romero, 2011). Essa comunicação possibilita às bactérias executarem funções biológicas importantes, muitas delas envolvidas com a virulência desses patógenos. Além disso, tem sido demonstrado que o *quórum sensing* desempenha um papel na adesão celular, conferindo ao biofilme uma vantagem sobre os agentes antimicrobianos (Donlan, 2002). Os auto-indutores (AI's), que são os diferentes tipos de sinais do *quórum sensing*, foram identificados na maioria dos casos como moléculas orgânicas que difundem livremente pela célula e fora dela. Existe uma vasta gama de moléculas sinalizadoras, como: Oligopeptídeos, N-lactona-acil-hemosiderina (AHL - AI-1) e Furanosil borato diéster (AI-2) (Kalia, 2012). Os sinais

de QS mais estudados e conhecidos são N-lactona-acil-hemosiderina , os quais são usados por várias bactérias Gram-negativas (Romero, 2011). A bactéria *Vibrio fischeri* constitui o modelo de base para esse sistema, em que é composto por duas proteínas, o sinal de síntese LuxI responsável pela produção de AHL e LuxR que é o receptor de AHL. Bactérias Gram-positivas usam oligopeptídeos, seus receptores estão ligados à membrana e o sinal ocorre através de cascatas de fosforilação (Romero, 2011).

Neste trabalho, teve-se por objetivo estabelecer as relações entre *quórum sensing*, biofilmes, resistência a antimicrobianos e infecções hospitalares com o intuito de propor estratégias de controle de infecções causadas por biofilmes bacterianos.

MÉTODOS

Para elaboração da pesquisa, foram utilizadas bibliografias na forma de livros, artigos científicos, monografias, teses e dissertações. Além de buscas em acervos virtuais. Os artigos científicos são pesquisados através dos seguintes bancos de dados: National Center for Biotechnology Information (NCBI), Scielo, MedLine e Portal CAPES, onde é feita uma seleção dos artigos relevantes ao tema.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como supracitado, existem diferentes tipos de moléculas sinalizadoras. No que se refere ao sistema AHL, as moléculas de sinalização são sintetizadas pelo gene de síntese (tal como *LuxI*), essas, ficam distribuídas em torno da células, em alta densidade celular, essa molécula se liga ao seu receptor (proteína R) e ativa o seu regulador transcricional (Lux R), que por sua vez liga-se à região promotora do gene de interesse e desencadeia a expressão (Zhang *et al.*, 2002). A ligação entre a molécula sinalizadora e seu receptor é bem específica, tendo portanto, um receptor diferente para cada molécula sinalizadora.

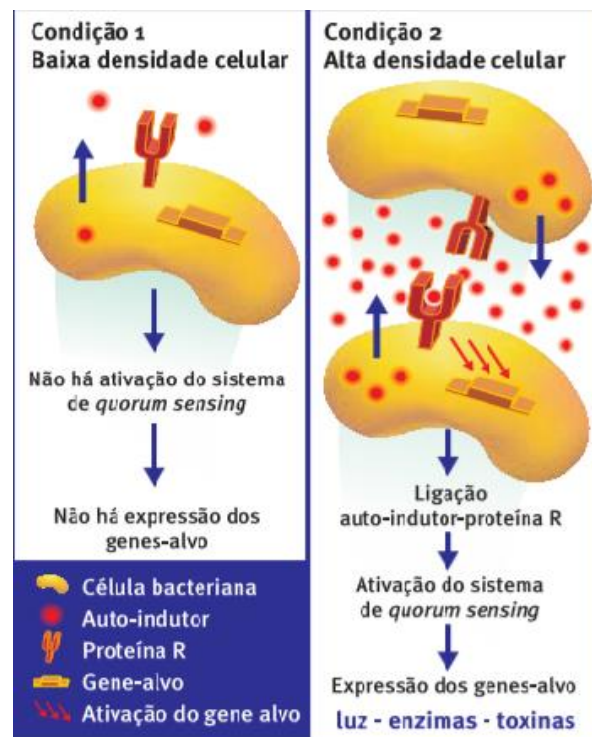


Figura 3: Esquema representando *quórum sensing* em bactérias Gram-negativas, onde em alta densidade celular o limiar de concentração das moléculas sinalizadora é atingido e os mesmos passam a ser reconhecidos pela células. Adaptado de: Antunes, 2003.

Apesar de ser o mais utilizado em bactérias Gram-negativas, há algumas bactérias que usam mais de um sinal de *quórum sensing*, como é o caso da *P. aeruginosa*, que além de do sistema Lux I/Lux R, também utiliza o sistema Rhl/RhR (Pearson *et al.*, 1997). No caso da *P. aeruginosa*, esses genes são responsáveis

pela expressão de múltiplas enzimas extracelulares, formação de biofilme, e metabólitos secundários (Kievil & Iglewski, 2000).

Se tratando de bactérias Gram-positivas, os oligopeptídeos (AIP'S) são codificados como precursores (pró AIP's) e são diferentes em estrutura e sequência. Transportadores especializados são necessários, uma vez que a membrana é impermeável aos peptídeos, os transportadores também processam os AIP's (Rutherford & Bassler, 2012). Após sofrer modificações, é transportado para o meio externo. Quando o limiar de concentração é atingido, dois componentes detectam uma quinase na membrana da célula, esta por sua vez, reconhece o peptídeo e o transfere para o meio interno, fosforilando o próximo componente. Uma proteína que atua como regulador de resposta, se liga ao DNA e assim, regula a expressão dos genes alvos (Sola, 2011). Um exemplo, é a bactéria *Staphylococcus aureus*, que depende da expressão de uma variedade de moléculas para adesão, toxinas e compostos que afetam o sistema imunitário, fatores os quais, são regulados por sistemas de QS (Rutherford & Bassler, 2012).

O sistema de QS, furanosil borato diéster (AI-2), também é de grande importância, sintetizado a partir do gene *LuxS*, possibilita a comunicação de bactérias tanto Gram-positivas, quanto Gram-negativas (Kalia, 2012). Consiste portanto, em uma comunicação universal entre bactérias. Pesquisas revelam que o sistema dependente do AI-2 já foi identificado em mais de 285 espécies de bactérias, principalmente em *Salmonella entérica*, *E. coli*, *Vibrio cholerae* e *Yersinia* sp (Sola, 2011). Em um estudo feito por Raut et al., (2013), utilizando biosensores, foi possível comprovar a presença de moléculas de AI-2 em amostras de fezes e saliva em pacientes com doença inflamatória intestinal.

Após desenvolvido o biofilme pode desencadear infecções, como as hospitalares, ou ainda agravar doenças já existentes. Na fibrose cística, por exemplo, o defeito genético leva à perda da transmembrana reguladora (CFTR). A ausência do canal de cloreto leva a um conteúdo elevado de sal nas vias aéreas, este, inibe a atividade de peptídeos e proteínas envolvidos na imunidade. Sob estas circunstâncias, torna-se fácil a colonização com *P. aeruginosa*, e posteriormente a formação do biofilme no epitélio. Em nível de defesa celular, há anticorpos contra as células plactônicas de *P. aeruginosa*, entretanto, o anticorpo não é capaz de penetrar o biofilme (Costerton, 1999).

Em um estudo de coorte feito por Bezerra *et al.* (2009), evidenciou-se a existência de biofilmes em pacientes com rinosinusite crônica com polipose nasossinusal resistente a antibióticos, como resultado, eles visualizaram a estrutura tridimensional, estruturas esféricas envolvidas por uma matriz expopolissacarídica envoltas por canais de água.

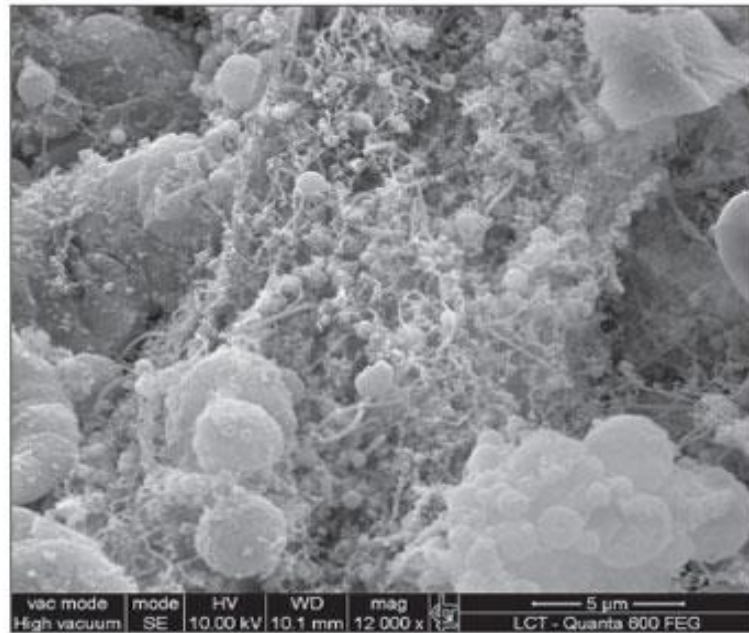


Figura 4: Biofilme maduro, com matriz expopolissacarídica envoltas por canais de água. Bezerra, 2009.

Tiba *et al* (2009), quis relacionar os fatores de virulência de *Escherichia coli* na formação de biofilmes em pacientes com quadro clínico de cistite. Por meio de caracterização molecular, eles observaram que o Antígeno 43 (adesinas afimbriais) é um dos responsáveis pela formação do biofilme e pode ainda estar associado a outros fatores de virulência na formação de biofilme em infecções urinárias.

Muitos são os mecanismos que tornam o biofilme resistente, e em detrimento disso a preocupação é descobrir formas de evitar ou reduzir a formação do biofilme. Por tal motivo, a inibição do *quórum sensing* é um dos maiores interesses no que se refere aos mecanismos de interrupção da formação do biofilme. O *quorum sensing* pode ser desfeito por diferentes modelos, como: redução da atividade da proteína do receptor de AHL, inibição da produção da molécula de QS, degradação de AHL ou ainda, imitação das moléculas de sinalização (Kalia, 2012). O bloqueio dessa sinalização, além de impedir a formação do biofilme, torna as bactérias mais sensíveis às drogas antimicrobianas e ao próprio sistema imunológico (Antunes,

2003). A detecção da molécula de QS é o primeiro passo a ser dado, para isso é necessário a utilização de biosensores, estes, se baseando na resposta fenotípica (Sola, 2011).

Na literatura, pode ser encontrado duas classes de enzimas capazes de degradar as moléculas sinalizadoras AHL: as lactonases, que hidrolisam o anel lactona, e as ocilases, que hidrolisam a ponte amida entre a cadeia de ácido graxo e a molécula de homosiderina lactona (Lin *et al.*, 2003). Os inibidores de quórum sensing podem ser de ordem natural, que engloba tanto substâncias produzidas tanto por eucariotos, quanto por procaríotos, ou de ordem sintética, que são moléculas análogas produzidas em laboratório (Kalia & Purohit, 2011).



Figura 5: Mecanismos de inibição do quórum sensing, onde (A) utilizando um autoindutor inespecífico que se ligaria a proteína R, mas não a ativaria e (B) interrompendo as reações biológicas de síntese de autoindutores através do uso de análogos de precursores dessas moléculas. Adaptado de: Antunes, 2003.

Romero *et al.*, (2011), mostra que há compostos naturais que imitam a estrutura do QS, proporcionando um efeito antagonista ou até mesmo reduzindo a expressão de genes. Alguns de fontes naturais, como o extrato de alho (S-acil-cisteína) que tem uma estrutura semelhante a uma parte da molécula de AHL

(Steggles, 2011). Outro composto (piericidin A1) produzido por bactérias do solo *Kitasatospora* sp, tem uma atividade inibidora competitiva em AHL's. Outros antagonistas são obtidos de forma química, todos lembrando a molécula de QS. Com base nisso, algumas empresas tem como projeto o lançamento de pomadas antibióticas tópicas baseadas na inibição do *quórum sensing* (Pechere, 2004).

Os dados apresentados são o resultado da compilação dos dados de várias publicações que tiveram por objetivo explicar os mecanismos que possam contribuir para a formação e desenvolvimento do biofilme, bem como, estabelecer a relação existente entre biofilmes bacterianos, *quorum sensing*, infecções e resistência a antibióticos.

CONCLUSÃO

É sabido que a concentração das moléculas de sinalização (QS) é proporcional à população bacteriana. Logo, é inegável que no biofilme a troca de moléculas sinalizadoras é intensa. Quando o limiar de concentração é atingido as bactérias expressam determinados genes, aos quais codificam fatores de virulência e propriedades que induzem o desenvolvimento do biofilme. O biofilme por sua vez, induz e/ou agrava à algumas patologias e infecções hospitalares, tais, difíceis de serem controladas devido à complexidade do biofilme em sua estrutura e fisiologia de formação. há alguns mecanismos que evitam o *quórum sensing*, tanto por degradação enzimática de sinais de AHL, quanto por uso de antagonistas, os quais, imitam a estrutura da molécula. Devido à complexidade em que o biofilme é constituído, não há um mecanismo que seja menos importante a ser explorado que outro, entretanto, a base do biofilme, que é a matriz EPS e o *quórum sensing*, são notoriamente os fatores influenciam na característica principal do biofilme, que é a resistência.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antunes, LCM. A linguagem das bactérias. *Ciência hoje*, São Paulo, [online], v. 33, n. 193, 2003.

Lerich V, Sibille P, Carpentier B. Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:1851–6.

Donlan RM. Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO J* 2000;46:S47–S52.

Lewandowski Z. Structure and function of biofilms. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 2000. p. 1–17

James GA, Beaudette L, Costerton JW. Interspecies bacterial interactions in biofilms. *Journal of Industrial Microbiology* 1995;15:257–62..

Donlan RM. Biofilm control in industrial water systems: approaching na old problem in new ways. In: Evans LV, editor. *Biofilms: recent advances in their study and control*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 2000. p. 333–60.

Tiba, MR, Nogueira, GP, Leite, DS. Estudo dos fatores de virulência associados à formação de biofilme e agrupamento filogenético em *Eschirichia coli* isolados de pacientes com cistite. *Rev. Med. Tropical*, 42 (1); 58-62, Jan-Fev, 2009.

Bezerra, TFP, Pádua, FGM, Ogawa, AI, Gibrim, EMMS, Saldiva, PHM, Voegels, RL. Biofilme em rinossinusite crônica com polipose nasossinusal; estudo piloto. *Braz. Journal Otorhinolaryngol.* 75(6):788-93, 2009.

Donlan, RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emer. Infect. Dis.* 8 (9): 881 –890. 2002.

Costerton, JW, Stewart, PS, Greenberg, EP .Bacterial Biofilms: a common cause pf persistent infections. *Science* 284: 1318 -1322. 1999.

Romero, M, Acuña, L, Otero A. Patents on quórum sensing: Interfering witch bacterial communication as strategy to fight infections. *Recent Patents on Biotechnology* 2012, 6, 2-12. 2011.

Ghigo, JM. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature.* 412: 442 –445. 2001.

Hausner M, Wuertz S. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Appl Environ Microbiol*;65:3710–13. 1999.

Zhang RG, Pappas T, Brace JL, Miller PC, Oulmassov T, Molyneaux JM, et al. Structure of a bacterial quorum-sensing transcription factor complexed with pheromone and DNA. *Nature* 2002;417:971–4.

Kalia VC, Raju SC, Purohit HJ. Genomic analysis reveals versatile organisms for quórum quenching enzymes: acyl-homoserine lactone-acylase and -lactonase. *OpenMicrobiol J* 2011;5:1-13.

Lin YH, Xu JL, Hu J, Wang LH, Ong SL, Leadbetter JR, et al. Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol Microbiol* 2003;47:849–60.

Rutherford, ST, Bassler, BL. Control Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012.

Kievit, TR, Iglewski, BH. Relationships Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic. *Infect. Immun.* 2000.

Pearson, JP, Pesci, EC, Iglewski, BH. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl and rhamnolipid biosynthesis genes quorum-sensing systems in control of elastase. *J. Bacteriol.* 1997, 179(18):5756.

SOLA, MC. Mecanismos de quórum sensing e sua relevância na microbiologia de alimentos. UFG, Goiânia, 2011.

Pechere JC, Van Delden C, Menekse O. Therapeutic process for *P.aeruginosa* infections using macrolide antibiotics. US2004197341A1, 2004.

Steggles RS. Composition comprising garlic extract and an antibiotic and/or antiseptic for use in the treatment of a multispecies bacterial infection. GB2472315A, 2011.

Raut, N, Pasini, P, Daunert, S. Deciphering bacterial universal language by detecting the quorum sensing signal, autoinducer-2, with a whole-cell sensing system. *Anal. Chem.* 2013, 85, 9604–9609.