

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Efeito de concentrações subinibitórias de vancomicina na formação de
biofilme do *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984**

JÉSSICA WEIS BONFANTI

PORTO ALEGRE, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Efeito de concentrações subinibitórias de vancomicina na formação de
biofilme do *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984**

Dissertação apresentada por **Jéssica Weis Bonfanti** para
obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Alexandre José Macedo

PORTO ALEGRE, 2015

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30.03.2015, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Afonso Luís Barth

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Ana Paula Guedes Frazzon

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Danielle da Silva Trentin

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Bonfanti, Jéssica Weis

Efeitos de concentrações subinibitórias de vancomicina na formação de biofilme do *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 / Jéssica Weis Bonfanti. -- 2015.

75 f.

Orientador: Alexandre José Macedo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Biofilme. 2. Vancomicina. 3. *Staphylococcus epidermidis*. I. Macedo, Alexandre José, orient. II. Título.

Agradecimentos à CAPES, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, e ao Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana da Faculdade de Farmácia da UFRGS que disponibilizou todos os equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente dissertação.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Alexandre por ter aceitado ser meu orientador, por me proporcionar participar deste grupo e conhecer pessoas tão queridas e competentes. Obrigada pelo apoio, pela confiança no meu trabalho, pelo incentivo, pelo otimismo que me transmitiu durante esta orientação e pelos momentos de descontração que foram importantes para eu conseguir dar seguimento aos meus estudos.

À Aninha por me incentivar a trabalhar com pesquisa, por me apresentar ao prof. Alexandre, por estar sempre ao meu lado, mas, principalmente, por ser um exemplo de profissional e que me ensinou que temos que fazer as coisas que nos propusermos com dedicação e alegria. Obrigada por ser este exemplo de profissional e de pessoa na minha vida.

Ao grupo do Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana, no qual eu não só encontrei colegas de trabalho, mas também amizades que pretendo levar para a minha vida. Obrigada pela ajuda, pelas discussões sobre nossos estudos, pela força nos momentos difíceis, pelos encontros fora do laboratório, enfim, vocês foram essenciais para mim durante esta etapa. Dani, obrigada por sempre tirar minhas dúvidas, saibas que sempre confiei muito no teu trabalho e te admiro muito por ser tão dedicada e competente. Karine, uma das melhores coisas que me aconteceu nesta etapa foi ter me tornado tua amiga, obrigada por me incentivar a fazer sempre o meu melhor, também és um exemplo de pessoa e profissional para mim.

Ao grupo do Laboratório de Parasitologia da prof^a. Tiana, que sempre nos ajudam quando precisamos, que fazem parte dos nossos momentos de descontração e que nos apoiam como um grande grupo. Em especial à Odelta, que participou de toda a saga dos qRT-PCRs comigo, aprendemos muito juntas e agradeço a toda ajuda e apoio que me deste.

Aos integrantes da banca, que aceitaram o convite prontamente e são profissionais que admiro muito.

A minha família e a minha mãe que sempre me incentivaram a estudar mais e que puderam me proporcionar esta oportunidade. Em especial a minha irmã, que se não bastasse toda a ajuda e compreensão de sempre, ajudou-me nas quantificações dos DNAs e RNAs no HCPA.

A todos os meus amigos que sempre estão ao meu lado me dando força, incentivando, alegrando, enfim, obrigada por entenderem as minhas faltas nos nossos eventos. Em especial à Lila que me ajudou com o ImageJ e que sem ela talvez eu não tivesse conseguido fazer tanta coisa interessante no meu trabalho.

E aos funcionários e seguranças da Faculdade de Farmácia que sempre foram muito prestativos e atenciosos, principalmente, quando eu precisava ir ao laboratório durante as noites e madrugadas.

“Experiência não é o que nos acontece; é o que fazemos com aquilo que nos acontece.”

Aldous Huxley

RESUMO

O *Staphylococcus epidermidis* tem sido considerado, um patógeno oportunista importante, pois representa o agente mais comum responsável por infecções em dispositivos médicos. Estas infecções ocorrem devido à capacidade que o micro-organismo possui de se aderir aos materiais poliméricos formando biofilme. Evidências recentes mostram que concentrações subinibitórias de vários antimicrobianos induzem um aumento do nível de persistência do biofilme em *S. epidermidis*, o que pode explicar, em parte, a resistência à terapia antimicrobiana. Os objetivos deste estudo foram a investigação do efeito de concentrações subinibitórias de vancomicina na formação de biofilme do *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 ao longo de um período de tempo de incubação e o estabelecimento de um protocolo de qRT-PCR. Para isto, foram utilizadas as técnicas de cristal violeta, microscopia eletrônica de varredura, microscopia confocal de varredura a laser e qRT-PCR. As concentrações utilizadas foram de 1,0 µg/mL ($\frac{1}{2}$ da CIM), 0,5 µg/mL ($\frac{1}{4}$ da CIM) e 0,25 µg/mL ($\frac{1}{8}$ da CIM) e os tempos de incubação foram de 3, 6, 12, 24, 36 e 48 h. Os resultados demonstraram que existem alterações na morfologia do biofilme do *S. epidermidis* quando submetido ao crescimento e formação de biofilme juntamente com concentrações subinibitórias de vancomicina. Estas alterações mostram-se mais evidentes nas amostras tratadas com concentrações de $\frac{1}{2}$ da CIM, a qual se destaca por apresentar um comportamento diferente de adesão e agregação em relação ao não tratado. Por outro lado, as concentrações de $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{8}$ da CIM apresentam-se muito similares e um tempo maior de incubação (24 h) é necessário para atingir o padrão de formação de biofilme encontrado na amostra não tratada, que já se estabelece como um biofilme frágil em 6 h. Além disso, o protocolo de qRT-PCR foi padronizado com sucesso. Portanto, é necessário buscar o entendimento sobre a formação de biofilme em condições de estresse, como na presença de antimicrobianos, já que a elucidação dos mecanismos envolvidos tanto na formação de biofilme quanto na resistência aos antimicrobianos pode auxiliar no desenvolvimento de novas e efetivas estratégias terapêuticas para o difícil tratamento de infecções relacionadas com este micro-organismo.

Palavras-chave: *Staphylococcus epidermidis*, biofilme, vancomicina.

ABSTRACT

Staphylococcus epidermidis has been currently considered an important opportunistic pathogen, as it represents the most common agent responsible for infections in medical device implants. These infections occur due to the ability of the microorganism to adhere to the polymer materials forming biofilms. Recent evidences show that several subinhibitory concentrations of antimicrobial induce an increase in the level of persistence of biofilm in *S. epidermidis*, which may explain, in part, the resistance to antimicrobial therapy. The objective of this study were to investigate the effect subinhibitory concentrations of vancomycin on biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 during a period of incubation and to determine a protocol for performing qRT-PCR analysis of genes involved in adhesion, biofilm formation and virulence of *S. epidermidis*. For this, the crystal violet technique, scanning electron microscopy, laser scanning confocal microscopy and qRT-PCR were employed. The concentrations used were 1.0 mg/mL ($\frac{1}{2}$ MIC), 0.5 mg/mL ($\frac{1}{4}$ MIC) and 0.25 mg/mL ($\frac{1}{8}$ MIC) and the incubation times were 3, 6 12, 24, 36 and 48 hours. The results showed that there are changes in the morphology of *S. epidermidis* biofilm when subjected to growth and biofilm formation with subinhibitory concentrations of vancomycin. However, these changes were more evident in the samples treated with $\frac{1}{2}$ MIC, which is highlighted by presenting a different adhesion and aggregation behavior in relation to the untreated sample. On the other hand, the $\frac{1}{4}$ and $\frac{1}{8}$ concentrations of CIM were very similar and took a longer time (24h) to achieve the standard of biofilm formation found in the untreated sample, which has settled down as a weak biofilm at 6h. Furthermore, the qRT-PCR protocol was successfully standardized. Therefore, it is necessary to seek the understanding of biofilm formation in conditions of stress, such as in the presence of antimicrobials, since the elucidation of the mechanisms involved in both biofilm formation and in antimicrobial resistance can support the development of new and effective therapeutic strategies to treat difficult infections related to this microorganism.

Key Words: *Staphylococcus epidermidis*, biofilm, vancomycin.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	21
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	25
3.1 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	27
3.2 Formação de biofilme.....	28
3.3 A vancomicina e a resistência dos biofilmes aos antimicrobianos.....	33
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	39
4.1 Cepa bacteriana e substrato para formação de biofilme.....	41
4.2 Ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	41
4.3 Ensaio de crescimento bacteriano e formação de biofilme com concentrações subinibitórias de vancomicina.....	41
4.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	42
4.5 Microscopia confocal de varredura a laser (MCVL).....	42
4.6. PCR em Tempo Real Quantitativa (qRT-PCR).....	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1. Influência da presença de vancomicina na estrutura do biofilme.....	47
5.2. Padronização da técnica de qRT-PCR para onze genes relacionados à formação de biofilme de <i>S. epidermidis</i>	55
6. CONCLUSÃO.....	61
7. PERSPECTIVAS.....	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

O *Staphylococcus epidermidis* é um micro-organismo comensal da microbiota da pele humana e geralmente não causa doença. No entanto, ele tem sido considerado um patógeno oportunista importante, pois representa o mais comum agente responsável por infecções em dispositivos médicos implantáveis. Devido ao fato de ser um colonizador frequente da pele humana, o *S. epidermidis* apresenta alta probabilidade de contaminar estes dispositivos durante sua inserção. Estas infecções ocorrem devido à capacidade que o micro-organismo possui de se aderir aos materiais poliméricos formando biofilme, sendo este considerado o fator determinante para a sua virulência (OTTO, 2009, 2012; BECKER *et al.*, 2014).

O biofilme é constituído de microcolônias microbianas envoltas em uma matriz polimérica altamente hidratada, possuindo lacunas intersticiais que possibilitam a circulação dos nutrientes entre suas células (PATEL, 2005). As células bacterianas em biofilme ficam protegidas da ação do sistema imunológico e dos antimicrobianos, sendo, estas, duas das principais características que dão relevância à formação de biofilme em relação às doenças infecciosas (GOMES *et al.*, 2014).

A vancomicina é um antimicrobiano glicopeptídico utilizado na terapia das infecções por estafilococos de próteses de articulações, de cateteres e endocardites, especialmente quando a resistência à meticilina é detectada (CARGILL e UPTON, 2009; BECKER *et al.*, 2014). No entanto, a formação de biofilme diminui significativamente a sua atividade, assim como a de outros antimicrobianos (OTTO, 2009).

O efeito de concentrações subinibitórias de antimicrobianos em biofilmes microbianos vem sendo estudado como um fator de interferência na formação de biofilme na tentativa de desvendar estes mecanismos, os quais parecem ser específicos para cada espécie de micro-organismo. Evidências recentes mostram que concentrações subinibitórias de vários antimicrobianos induzem um aumento no nível de persistência do biofilme em *S. epidermidis*, o que pode explicar, em parte, a resistência à terapia antimicrobiana (DUNNE, 1990; RUPP e HAMER, 1998; CERCA *et al.*, 2005; FRANK *et al.*, 2007; CROES *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2010; HESS *et al.*, 2011).

Portanto, buscar o entendimento sobre a formação de biofilme em condições de estresse, como na presença de antimicrobianos, pode contribuir com a elucidação dos mecanismos envolvidos tanto na formação de biofilme quanto na

resistência aos antimicrobianos. Conseqüentemente, novas estratégias terapêuticas poderão ser desenvolvidas para o tratamento de infecções relacionadas com o *S. epidermidis*.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O principal objetivo deste trabalho foi a investigação do efeito de concentrações subinibitórias de vancomicina na formação e desenvolvimento de biofilme do *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento e a formação de biofilme do *S. epidermidis* quando submetido a concentrações subinibitórias de vancomicina ao longo de diferentes tempos de incubação.
- Investigar a morfologia deste biofilme por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal de varredura a laser (MCVL).
- Estabelecer um protocolo para realização de qRT-PCR de genes envolvidos na adesão, formação de biofilme e na virulência do *S. epidermidis*.

3. Revisão da Literatura

3.1 *Staphylococcus epidermidis*

O gênero *Staphylococcus* é constituído por 47 espécies e 23 subespécies. Destas, 38 pertencem à categoria das espécies que não possuem a capacidade de produzir a enzima coagulase. Os estafilococos coagulase negativos (SCoN) são cocos Gram positivos, sem motilidade e não formadores de esporos. Eles normalmente são dispostos em pares ou tétrades, mas também ocorrem de forma isolada, ou em agregados irregulares (cachos de uva), ou em cadeias curtas de cerca de três ou quatro células (BECKER *et al.*, 2014).

Os SCoN fazem parte da microbiota da pele e mucosas de seres humanos e animais. O número de SCoN presentes na pele de adultos saudáveis varia de 10 a 10^5 UFC/cm², mas estes micro-organismos, geralmente, não causam doença e são considerados contaminantes de culturas microbiológicas (ROGERS *et al.*, 2009). No entanto, as mudanças no perfil da população sob cuidados médicos, como o aumento do número de recém-nascidos prematuros, de idosos, de pacientes com doenças crônicas e multimorbidades, de imunocomprometidos e da ampla utilização de dispositivos médicos, têm ocasionado o reconhecimento da grande variedade de infecções que podem ser causadas pelos SCoN (BECKER *et al.*, 2014).

Identificado pela primeira vez em culturas microbiológicas por Pasteur e Ogston, no ano de 1880, o *Staphylococcus epidermidis* é o micro-organismo mais comumente isolado entre os SCoN (ROGERS *et al.*, 2009). Esta bactéria coloniza a superfície corpórea e é, prevalentemente, encontrada em áreas úmidas, tais como: inguinal, perineal, axilar, nasal, conjuntival e interdigital (BECKER *et al.*, 2014). Atualmente, o *S. epidermidis* é visto como um patógeno oportunista importante, pois representa o mais comum agente responsável por infecções em dispositivos médicos implantáveis. Devido ao fato de ser um colonizador frequente da pele humana, o *S. epidermidis* apresenta alta probabilidade de contaminar estes dispositivos durante sua inserção. Estas infecções normalmente iniciam com a introdução de bactérias da pele do paciente ou da equipe de assistência médica quando é realizado o procedimento de inserção de dispositivos e têm crescido provavelmente devido ao aumento destes tipos de procedimentos cirúrgicos (OTTO, 2009, 2012; BECKER *et al.*, 2014). Válvulas cardíacas, próteses de articulações, cateteres intravenosos, cateteres peritoneais de diálise, marca-passos, lentes

intraoculares, implantes de mama, dentre outros, são dispositivos médicos que podem ocasionar infecções sistêmicas, uma vez que se tornam colonizados por bactérias que se aderem às suas superfícies (STOODLEY *et al.*, 2004; ROGERS *et al.*, 2009).

O *S. epidermidis* possui a capacidade de adesão a superfícies abióticas e também bióticas, ou seja, é capaz de produzir biofilme. A produção de biofilme é o fator de virulência determinante para esta bactéria, pois permite a proteção contra a ação do sistema imune do hospedeiro e a sobrevivência em um ambiente potencialmente hostil, como na presença de antimicrobianos. Esta capacidade é, indiscutivelmente, o mais importante mecanismo de resistência não específico desenvolvido por este micro-organismo (GOMES *et al.*, 2014).

3.2 Formação de biofilme

O biofilme é constituído de microcolônias microbianas envoltas em uma matriz polimérica altamente hidratada, possuindo lacunas intersticiais que possibilitam a circulação dos nutrientes entre suas células (Figura 1) (PATEL, 2005). As células bacterianas representam uma fração variável (normalmente, 5-35%) do total do volume do biofilme, sendo o seu restante formado por matriz extracelular, que é composta de exopolissacarídeos, bem como RNA, DNA, proteínas e lipídeos extracelulares (POZO e PATEL, 2007; SUN *et al.*, 2013). Em biofilme, os micro-organismos se desenvolvem em comunidades com estrutura e função heterogêneas organizadas, similares a organismos multicelulares (PATEL, 2005). O desenvolvimento do biofilme pode ser dividido em quatro etapas. A primeira etapa é a adesão inicial a uma superfície abiótica, como nos dispositivos médicos, ou biótica, como em tecidos humanos. Na segunda, acontece a multiplicação e a acumulação das células bacterianas em agregados dispostos em multicamadas, processo este, que requer a adesão intercelular. Durante a terceira etapa, o biofilme cresce e amadurece até atingir uma espessa e estruturada camada, que contém canais cheios de fluidos que asseguram a liberação de oxigênio e nutrientes para as células localizadas nas camadas mais profundas do biofilme. E, por último, ocorre a dispersão, na qual as células sozinhas ou em agregados dissociam-se do biofilme,

podendo se disseminar pela corrente sanguínea e começar uma colonização e formação de biofilme em um novo sítio (OTTO, 2012, 2013; BECKER *et al.*, 2014).

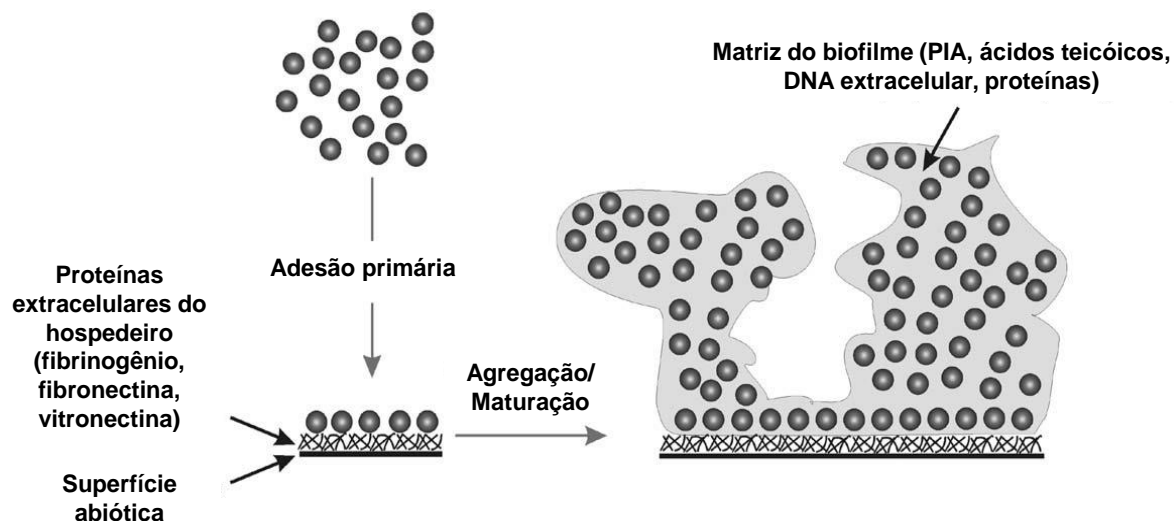


Figura 1: Representação esquemática da formação de biofilme de *S. epidermidis* (adaptado de Rohde *et al.*, 2010).

O estágio de adesão por si só é multifatorial, uma vez que depende das propriedades físico-químicas do material polimérico biomédico e da natureza da superfície da célula bacteriana (DONLAN e COSTERTON, 2002; STOODLEY *et al.*, 2004; PATEL, 2005). As interações hidrofóbicas e eletrostáticas entre o polímero e a superfície celular bacteriana são importantes na adesão inicial (STOODLEY *et al.*, 2004; OTTO, 2013). Os ácidos teicóicos presentes na parede celular dos estafilococos são fonte de carga polianiónica e por esta razão proporcionam a ligação desses micro-organismos à superfície dos biomateriais (FITZPATRICK *et al.*, 2005; LAVERTY *et al.*, 2013, OTTO, 2013). Estudos demonstram que os micro-organismos se aderem mais rapidamente a superfícies hidrofóbicas e apolares, como o Teflon e outros plásticos, do que a materiais hidrofílicos, como vidro e metais. Em geral, a aderência ocorre mais facilmente em superfícies que são ásperas, mais hidrofóbicas e que sejam revestidas por substâncias que facilitem a formação de biofilme (DONLAN, 2002). Os cateteres venosos centrais, por exemplo, por estarem em contato direto com a corrente sanguínea, ficam com a superfície revestida de plaquetas, plasma e proteínas teciduais, que agem como filmes condicionantes, auxiliando na formação de biofilme (DONLAN e COSTERTON,

2002; OTTO, 2013). Da mesma forma que o sangue, as secreções produzidas pelo hospedeiro como lágrimas, urina, saliva, fluido intervascular e secreções respiratórias facilitam a aderência das bactérias aos biomateriais (STOODLEY *et al.*, 2004).

Assim, o hospedeiro pode contribuir significativamente para a adesão das bactérias nas infecções relacionadas a dispositivos médicos, particularmente em estafilococos. Múltiplos receptores da superfície celular bacteriana, chamados adesinas, ligam-se a moléculas do hospedeiro. Algumas dessas proteínas pertencem a mesma família dos componentes da superfície microbiana, por isso, reconhecem as moléculas adesivas da matriz do biofilme e assim, contribuem para a adesão a vários tipos de células do hospedeiro. Desta forma, muitas bactérias possuem adesinas para a fibronectina, para o fibrinogênio, para a fibrina, para o colágeno, para a laminina e para a vitronectina. A fibronectina, que é uma proteína do hospedeiro frequentemente associada à aderência bacteriana às superfícies, também participa da adesão por meio de pontes com fibrina, colágeno, heparina e outros glicosaminoglicanos da superfície celular do hospedeiro (STOODLEY *et al.*, 2004; LAVERTY *et al.*, 2013; OTTO, 2013).

A aderência do *S. epidermidis* a superfícies hidrofóbicas, como o poliestireno, é mediada pela autolisina E (AtlE), sua principal autolisina. Esta proteína também medeia a ligação com a vitronectina, um componente da matriz extracelular do hospedeiro (STOODLEY *et al.*, 2004; OTTO, 2012). A AtlE também tem sido relacionada com a adesão inicial por contribuir indiretamente por meio de sua função enzimática, hidrolisando o peptidoglicano da parede celular e liberando DNA (BECKER *et al.*, 2014). Em biofilmes de *S. epidermidis*, o DNA extracelular (eDNA) atua como um componente estrutural, facilitando a agregação intercelular, sendo fonte de nutrientes e intercambiando informação genética entre a comunidade microbiana. Além disso, os mutantes de *S. epidermidis* que não possuem o gene *atlE* formam biofilmes com menor abundância de eDNA quando comparados ao tipo selvagem e apresentam uma redução significativa na capacidade de causar infecção *in vivo*, sugerindo que o eDNA pode contribuir para a sua patogênese (DOROSHENKO, *et al.*, 2014).

Outras proteínas da superfície bacteriana, como a proteína associada ao biofilme (Bap) e a proteína associada à acumulação (Aap), são importantes na

formação de biofilme (STOODLEY *et al.*, 2004), sendo que a Aap é a principal proteína envolvida na formação de biofilme independente da produção de adesina intercelular polissacarídica (FITZPATRICK *et al.*, 2005; LAVERTY *et al.*, 2013).

No *S. epidermidis*, a formação de múltiplas camadas celulares tem sido atribuída especificamente aos mecanismos de adesão célula-célula que são associados ao polissacarídeo beta-1,6-glicosaminoglicano conhecido como adesina intercelular polissacarídica (PIA) (STOODLEY *et al.*, 2004). As enzimas envolvidas na síntese da PIA são codificadas pelo *ica operon*, que compreende os genes *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*. Tem-se sugerido que a PIA é um importante fator de virulência do *S. epidermidis* e o *ica operon*, por sua vez, conhecido por ser muito difundido nos isolados causadores de infecções relacionadas a polímeros (RACHID *et al.*, 2000). Mutações nesses genes dificultam a formação do biofilme por romper a agregação e acumulação celular, no entanto, cepas que expressam o *ica* podem não formar biofilme se a aderência inicial for defeituosa (STOODLEY *et al.*, 2004).

A expressão de *icaA*, *icaD* e *icaC* é um requisito necessário para a produção de PIA. As proteínas IcaA e IcaD juntas formam a N-acetilglicosamina, que é transferida para a superfície da célula através da proteína IcaC. Após, há a desacetilação do polissacarídeo pela proteína IcaB, aumentando significativamente a imunogenicidade do polímero de PIA (OTTO, 2012; LAVERTY *et al.*, 2013). O gene *icaR*, que está localizado em uma sequência adjacente ao *icaADBC operon* tanto em *S. epidermidis* quanto em *S. aureus*, está relacionado com a regulação da expressão dos genes do *ica operon*. No entanto, a expressão do *icaR* é regulada negativamente pelo fator sigma B, que por sua vez, é regulado positivamente pela proteína RsbU, que sofre ativação por meio de estresses ambientais, tais como: aquecimento, acidez, concentração de sal e etanol (FITZPATRICK *et al.*, 2005; LAVERTY *et al.*, 2013).

Ainda não está bem esclarecido como o fator sigma B controla a transcrição do *ica operon*, uma hipótese seria o controle por meio da presença de genes que codificam a proteína SarA. Esta proteína regula positivamente a produção de PIA por meio de um mecanismo *icaR*-independente, podendo ser influenciada por fatores ambientais como etanol, sal e limitação de ferro. A SarA também é responsável pela produção da proteína de superfície estafilocócica Bap por meio da regulação positiva do seu gene associado *bap* (FITZPATRICK *et al.*, 2005; LAVERTY

et al., 2013). A SarA também afeta a expressão de mais de 100 genes, incluindo o sistema gene regulador acessório (*agr*) de estafilococos, que por sua vez controla a expressão de muitos fatores de virulência, podendo-se revelar um alvo potencial para os agentes antimicrobianos, pois a inibição da sua atividade controlaria simultaneamente a produção de toxinas extracelulares e a formação de biofilmes (FITZPATRICK *et al.*, 2005).

O *loci agr* e a SarA parecem possuir papéis contraditórios no desenvolvimento de biofilmes de estafilococos, já que a indução de *agr* reduz a formação de biofilme enquanto que a de SarA aumenta. Esta observação deve-se ao fato de que o *agr* induziria a produção de proteases e nucleases e de que a SarA, em sinergismo com o sistema de sinalização de dois componentes SaeRS, reprimiria a produção de proteases e nucleases, mecanismos que não estão totalmente elucidados (LAVERTY *et al.*, 2013). O *agr* faz parte do sistema de *quorum sensing* dos estafilococos, sistema que define os mecanismos de sobrevivência das bactérias, tais como: a simbiose, a produção de antibióticos, a formação de biofilme e outros fatores de virulência (FITZPATRICK *et al.*, 2005). A ativação do sistema *agr* acontece por meio da ativação do gene *agrA* por fosforilação/desfosforilação realizada por uma quinase codificada pelo gene *agrC*. A importância do sistema *agr* é maior na fase de dispersão final do biofilme, pois sua ativação pode contribuir com a dispersão das células do biofilme e disseminação metastática para novos sítios de infecção. A produção de fatores regulados por *agr*, tais como DNAases e proteases, também possuem importantes efeitos sobre o desenvolvimento de biofilmes em *Staphylococcus* sp., mas ainda precisam ser melhor estudados (Figura 2) (LAVERTY *et al.*, 2013; OTTO, 2013).

Fenotipicamente, a quantidade de biofilme produzida por cepas individuais de *S. epidermidis* é altamente variável e influenciada pelas mudanças das condições ambientais, que incluem: meio de crescimento, suplementação de carboidratos, oxigênio e dióxido de carbono contidos na atmosfera, concentração de ferro, concentrações subinibitórias de alguns antimicrobianos, osmolaridade e exposição a etanol (MACK *et al.*, 2006).

As características dos biofilmes que podem ser importantes em processos de doenças infecciosas incluem: a) a dispersão das células ou de agregados de biofilme que podem resultar em infecções disseminadas ou na produção de embolia;

b) células podem trocar plasmídeos de resistência por se encontrarem mais próximas nos biofilmes; c) células em biofilme possuem uma redução drástica na suscetibilidade aos agentes antimicrobianos; d) os biofilmes são resistentes à remoção pelo sistema imunológico do hospedeiro (DONLAN, 2002; OTTO, 2013).

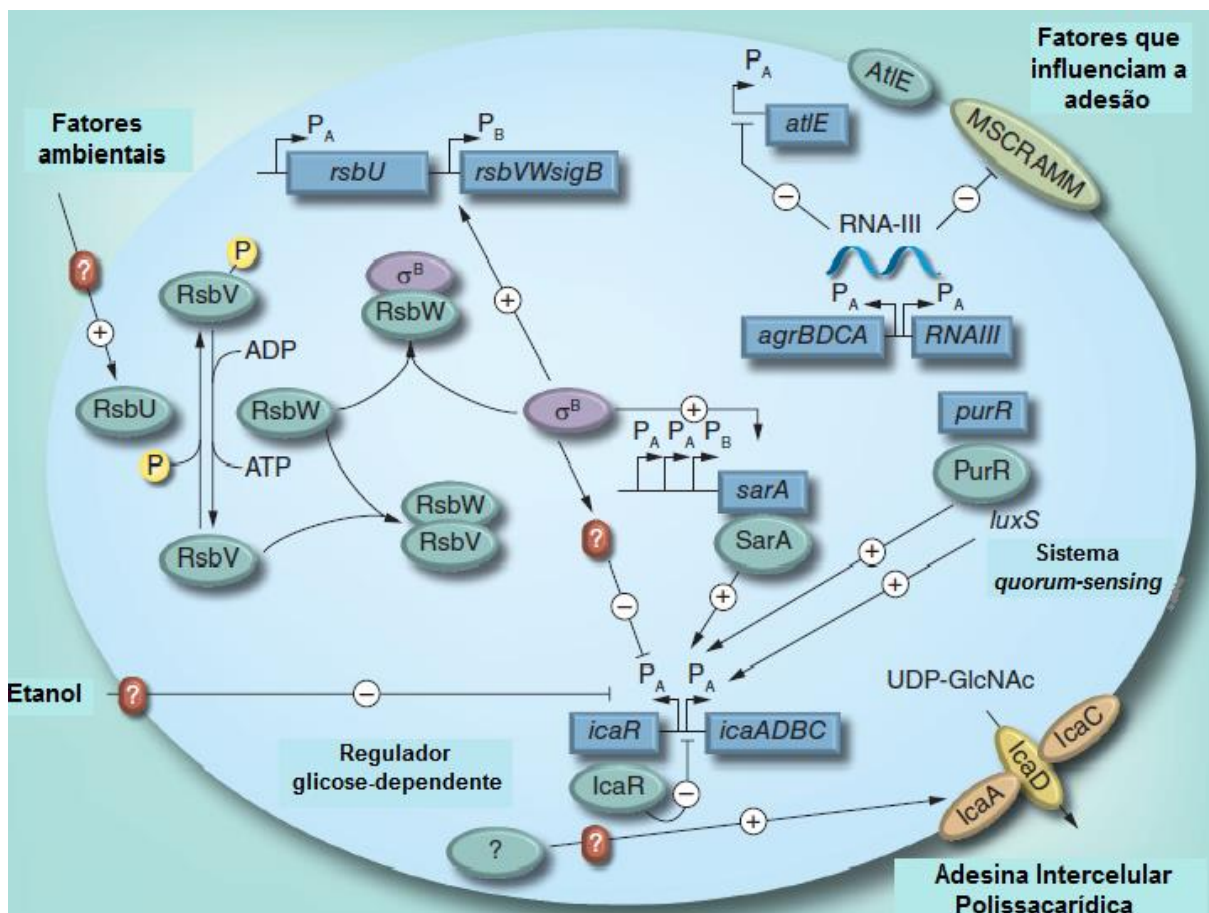


Figura 2: Modelo biomolecular básico de formação de biofilme em *Staphylococcus epidermidis* (adaptado de Laverty *et al.*, 2013).

3.3 A Vancomicina e a resistência dos biofilmes aos antimicrobianos

As opções terapêuticas para o tratamento de SCoN são limitadas já que a grande maioria dos isolados clínicos são resistentes à metilina. Assim, as infecções causadas por *S. epidermidis* necessitam de tratamento com um glicopeptídico, sendo a vancomicina o antimicrobiano de escolha empírica. A vancomicina é um dos principais antibióticos utilizados na terapia antimicrobiana em infecções estafilocócicas de próteses de articulações, de cateteres e endocardites, especialmente quando a resistência à metilina é detectada (CARGILL e UPTON,

2009; BECKER *et al.*, 2014). Este fármaco é um antimicrobiano glicopeptídico tricíclico complexo, com massa molecular de cerca de 1500 daltos (Figura 3), e age inibindo a síntese da parede celular de bactérias sensíveis, por meio de sua ligação de alta afinidade à extremidade terminal D-alanil-D-alanina de unidades precursoras da parede celular, sendo bactericida para micro-organismos em divisão (CHAMBERS, 2006). No entanto, a formação de biofilme diminui significativamente a sua atividade assim como a de outros antimicrobianos (OTTO, 2009).

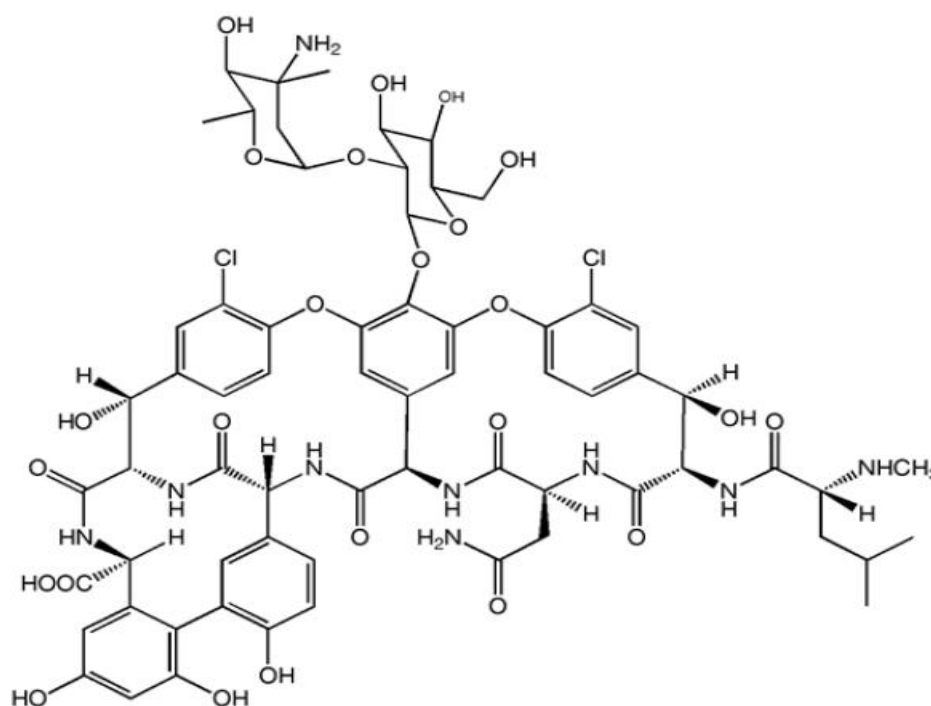


Figura 3: Fórmula estrutural da vancomicina.

A resistência aos antimicrobianos apresentada por bactérias que crescem na forma de biofilme pode ser 100 a 1000 vezes maior do que em células planctônicas (DONLAN e COSTERTON, 2002; CARGILL e UPTON, 2009). O biofilme de *S. epidermidis* é resistente à maioria dos agentes antimicrobianos de uso clínico. Esta resistência deve-se às características intrínsecas da sua estrutura como a impermeabilidade, a reduzida taxa metabólica das bactérias no interior do biofilme, a expressão de mecanismos de resistência específicos e a presença de subpopulações de bactérias *persisters* (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2007). As substâncias poliméricas extracelulares que constituem a matriz do biofilme

apresentam-se como uma barreira na difusão das moléculas antimicrobianas, reduzindo o ritmo de seu transporte para o interior do biofilme (DONLAN e COSTERTON, 2002). Os agentes antimicrobianos também podem ser capturados na matriz do biofilme e quelados por enzimas inativadoras, porém, a difusão limitada, por si só, não parece desempenhar um papel significativo na resistência (POZO e PATEL, 2007). A ação antimicrobiana no interior do biofilme também pode ser comprometida pelo aumento da densidade bacteriana, que resulta na acumulação de resíduos e apresenta uma alteração do microambiente como: baixo pH, baixa pO_2 , alta pCO_2 , baixa concentração de cátions divalentes e de pirimidina e baixo nível de hidratação (POZO e PATEL, 2007).

Outra proposta para o mecanismo de resistência do biofilme aos antimicrobianos é que as células associadas ao biofilme crescem mais lentamente do que as células planctônicas (DONLAN e COSTERTON, 2002). A diminuição de nutrientes, oxigênio e acumulação de produtos residuais no biofilme podem motivar algumas bactérias a entrarem em um estado estacionário de crescimento, no qual estão menos suscetíveis aos antimicrobianos, que dependem do crescimento bacteriano para agir (PATEL, 2005). Estas células têm sido referidas como *persisters* e podem estar presentes em números relativamente altos no interior do biofilme. O tratamento antimicrobiano pode conduzir à erradicação da maioria da população suscetível, mas esta fração de células *persisters* poderia sobreviver ao ataque e reconstituir o biofilme após a descontinuação da terapia (POZO e PATEL, 2007; OTTO, 2012). Os biofilmes podem, ainda, promover a disseminação de resistência antimicrobiana convencional por facilitar a transferência horizontal de genes (POZO e PATEL, 2007). Uma vez que os plasmídeos podem codificar a resistência para múltiplos agentes antimicrobianos, a associação em biofilme favorece a sua disseminação e o aparecimento de bactérias resistentes (DONLAN, 2002).

Estudos indicam que cepas de *Staphylococcus* sp. fortes produtoras de biofilme são mais resistentes ao efeito da vancomicina. Resultado este, que poderia ser explicado pela difusão lenta da vancomicina para as camadas mais profundas do biofilme, promovendo a resistência pela exposição gradual das células bacterianas a baixas concentrações ou devido à presença dessas células em fase estacionária, reduzindo a atividade da vancomicina *in vitro* devido à falta de células em crescimento ativo (RICE, 2006; TENOVER, 2006; LAPLANTE e MERMEL, 2007;

MUSTA *et al.*, 2009; ROSE e POPPENS, 2009; ANTUNES *et al.*, 2011). Outro ponto importante é que, em relação à eficácia bactericida, nenhum antimicrobiano, incluindo a vancomicina, é capaz de reduzir o crescimento bacteriano ou extingui-lo totalmente em isolados formadores de biofilme (FRANK *et al.*, 2007; PRESTERL *et al.*, 2009). Isto reforça a hipótese de que o biofilme deve, efetivamente, colaborar de forma bastante expressiva para a falha terapêutica.

Seguindo o contexto da resistência dos biofilmes aos antimicrobianos, muitos estudos têm demonstrado que concentrações subinibitórias de diversas classes de antimicrobianos podem interferir na formação de biofilme de *Staphylococcus* spp., tanto aumentando quanto diminuindo sua biomassa (DUNNE, 1990; RUPP e HAMER, 1998; CERCA *et al.*, 2005; FRANK *et al.*, 2007; CROES *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2010; HESS *et al.*, 2011). Para o *S. epidermidis*, os estudos ainda se mostram contraditórios. Rachid *et al.* (2000) e Frank *et al.* (2007) mostraram que concentrações subinibitórias de vancomicina tem pouco ou nenhum efeito sobre bactérias em biofilme, enquanto, Dunne (1990) e Cargill e Upton (2009) demonstraram que o aumento da formação de biofilme em concentrações subinibitórias de vancomicina pode acontecer em alguns isolados. Este resultado pode ser explicado pela regulação dos genes de resposta das bactérias em biofilme, que podem aumentar ou diminuir a produção ou liberação de alguns fatores de virulência (HADDADIN *et al.*, 2010) e também mudar para fenótipos mais resistentes em decorrência da exposição a ambientes de estresse (POZO e PATEL, 2007). Dessa forma, a ampla utilização de antimicrobianos para profilaxia de infecções associadas a dispositivos biomédicos pode estar contribuindo para esse processo (CERCA *et al.*, 2005).

Além disso, a exposição a concentrações subinibitórias de antimicrobianos é um problema clinicamente relevante, uma vez que alguns destes medicamentos, tal como a vancomicina, podem se ligar a proteínas do sangue, atingindo o local de infecção em concentrações inferiores às desejadas, podendo induzir a formação de biofilme e aumentar a tolerância aos antimicrobianos (DOROSHENKO, *et al.*, 2014).

As infecções relacionadas com a formação de biofilme são importantes e estão muito associadas à utilização de dispositivos médicos (SCHINABECK e GHANNOUM, 2006). Biofilmes relacionados com dispositivos médicos foram notados pela primeira vez no início dos anos 80 quando a microscopia eletrônica

revelou bactérias depositadas na superfície de cateteres intravenosos e marca-passos (STOODLEY *et al.*, 2004).

A capacidade do biofilme em evitar a resposta imune do hospedeiro e realçar o fenótipo resistente aos antimicrobianos torna as infecções relacionadas ao biofilme de dispositivos médicos implantáveis muito difíceis de serem tratadas (SCHINABECK e GHANNOUM, 2006). Muitas vezes, estas infecções levam mais tempo para apresentar sintomas evidentes e, apesar de raramente serem fatais, comprometem a qualidade de vida, uma vez que se caracterizam por serem infecções crônicas e recorrentes (SUN *et al.*, 2013). Frequentemente, o único tratamento seguro para infecções de dispositivos médicos implantáveis é a sua remoção. No entanto, este procedimento pode estar associado com o aumento de morbidade e mortalidade, prolongando a hospitalização e elevando os custos para o sistema de saúde (OTTO, 2012). Estima-se que o gasto para tratar essas infecções pode ser 5-7 vezes maior do que sem a sua retirada, pois os pacientes enfrentarão uma prolongada terapia antimicrobiana de prevenção a infecções sistêmicas recorrentes (SCHINABECK e GHANNOUM, 2006).

Considerando os fatores envolvidos na formação de biofilme, alguns autores têm estudado a influência de concentrações subinibitórias de antimicrobianos na expressão de fatores de virulência em micro-organismos formadores de biofilme (SAKOULAS *et al.*, 2002; HADDADIN *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2010; SUBRT *et al.*, 2011; NIELSEN *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2013). Estes estudos possuem grande relevância, pois a elucidação dos mecanismos envolvidos na formação de biofilme pode auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de combate à formação de biofilme e de tratamento de infecções relacionadas a biofilmes já estabelecidos. Portanto, torna-se essencial a ampliação do conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na formação de biofilme, na resistência antimicrobiana do biofilme e nos fatores de regulação dos genes envolvidos neste processo para que seja possível o desenvolvimento de novas e efetivas estratégias de tratamento para essas infecções.

4. Parte Experimental

4.1 Cepa bacteriana e substrato para formação de biofilme

A cepa bacteriana utilizada neste estudo foi a cepa padrão *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, conhecida pela produção de adesina polissacarídica. O substrato para a formação de biofilme foi a superfície de poliestireno, por meio de placas de poliestireno estéreis de 12 poços e com fundo chato (KASVI, Brasil).

4.2 Ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os testes de Concentração Inibitória Mínima foram realizados por meio do método de microdiluição em caldo estabelecido pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013). A CIM obtida para a vancomicina foi de 2,0 µg/mL.

4.3 Ensaios de crescimento bacteriano e formação de biofilme com concentrações subinibitórias de vancomicina

Os ensaios de crescimento bacteriano e formação de biofilme foram realizados utilizando uma versão modificada do método descrito por Dunne (1990). A cepa de *S. epidermidis* ATCC 35984 foi cultivada por 24h a 37°C em ágar Mueller-Hinton (Oxoid, Reino Unido) e, após, foi preparada uma suspensão das colônias bacterianas em solução salina 0,9% de turbidez equivalente a 0,5 na escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Para a preparação do inóculo, a suspensão bacteriana foi diluída a uma proporção 1:100 em Caldo Triptona de Soja (TSB, Oxoid, Reino Unido). A vancomicina (V2002, Sigma-Aldrich, EUA) foi diluída em TSB e em concentrações duas vezes maiores do que as desejadas (2,0; 1,0; 0,5 µg/mL). As placas foram preparadas da seguinte forma: 2 mL de inóculo foram adicionados aos poços, nos quais os tratados com antimicrobiano eram adicionados de 2 mL das soluções de vancomicina e os não tratados eram adicionados de 2 mL de TSB sem antimicrobiano. Como controle negativo foram utilizados 4 mL de TSB sem antimicrobiano. As concentrações finais de vancomicina por poço foram: 1,0 µg/mL ($\frac{1}{2}$ da CIM); 0,5 µg/mL ($\frac{1}{4}$ da CIM) e 0,25 µg/mL ($\frac{1}{8}$ da CIM). A concentração final de inóculo por poço foi de aproximadamente $7,5 \times 10^5$ UFC/mL. Então, as placas foram incubadas a 37°C durante os seguintes tempos: 3, 6, 12, 24, 36 e 48h.

Para o ensaio de crescimento bacteriano foram medidas as densidades óticas a 600 nm para os tempos inicial (antes da incubação) e final (após incubação). A diferença entre essas medidas foi considerada o crescimento bacteriano.

O método utilizado para determinar a formação de biofilme foi o do cristal violeta, conforme Stepanović *et al.* (2007). Assim, o conteúdo líquido foi removido dos poços após o tempo de incubação e o biofilme lavado três vezes com solução salina 0,9%. O biofilme foi, então, fixado com metanol por 20 min e corado com cristal violeta a 0,4% por 15 min. Após, as placas foram lavadas por imersão em água e o corante foi ressuspensão durante 30 min com etanol. Em seguida, foi realizada a medida da densidade óptica a 570 nm. Estes ensaios foram realizados em triplicata (n=3).

4.4 Microscopia eletrônica de varredura

Para a microscopia eletrônica de varredura (MEV), os ensaios foram realizados da forma descrita no item 4.3, porém, uma pequena lâmina de poliestireno (Permanox[®]) foi colada no fundo de cada poço e o biofilme foi formado nesta lâmina. Após o tempo de incubação, as amostras foram lavadas com solução salina 0,9%, fixadas em glutaraldeído a 2,5%, lavadas com tampão cacodilato de sódio 100 mM (pH 7,2) e desidratadas em gradiente de acetona (10%, 30%, 50%, 70%, 90% e 100%). Em seguida, as amostras foram dessecadas em aparelho de ponto crítico com CO₂ e metalizadas com ouro. A visualização foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS pelo Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM 6060. Estes experimentos foram realizados em duplicata (n=2).

4.5 Microscopia confocal de varredura a laser

Para a microscopia confocal de varredura a laser (MCVL), os ensaios foram realizados da forma descrita no item 4.3, porém utilizando placas para microscopia confocal (SPL Life Sciences, Coréia). Após o tempo de incubação, o conteúdo líquido foi retirado, o biofilme foi lavado cuidadosamente com salina 0,9% e, então, corado com o kit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability (Life Technologies, EUA) diluído a uma proporção 1:400 durante 30 minutos e na ausência de luz. Em seguida, o corante foi retirado e foi adicionada solução salina a 0,9% para a visualização das amostras. A observação das amostras foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS no Microscópio Confocal Espectral FV1000. A coloração vermelha dada pelo Iodeto de propídio indica as células com danificação

na membrana (mortas) e a coloração verde dada pelo SYTO 9 indica células com a membrana intacta (vivas). As imagens foram analisadas pelo software ImageJ. Estes experimentos foram realizados em duplicata (n=2).

4.6 PCR em Tempo Real Quantitativa (qRT-PCR)

A padronização da técnica de qRT-PCR foi realizada a partir do DNA genômico da cepa de *S. epidermidis* ATCC 35984, que foi extraído pelo Kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Alemanha). O DNA genômico foi escolhido para a padronização devido à utilização de um kit one-step para as reações de qRT-PCR. Os genes a serem estudados e seus respectivos oligonucleotídeos iniciadores estão relacionados na Tabela 1. O desenho dos oligonucleotídeos iniciadores foi realizado através do programa Primer3 para a obtenção de fragmentos entre 80 e 150 pares de bases e temperatura de *melting* em torno de 60°C.

A qRT-PCR foi feita no equipamento Rotor Gene Q (Qiagen, Alemanha), utilizando o Kit Rotor Gene SYBR Green RT-PCR (Qiagen, Alemanha) conforme as instruções do fabricante. As reações de qRT-PCR foram realizadas a 95°C por 10 min seguidas de 35 ciclos de amplificação de 95°C por 15 s e 62°C por 30 s. As curvas padrão foram preparadas em diluições de DNA múltiplas de dez (100 a 0,01 ng). As reações foram preparadas em triplicata e as curvas realizadas, no mínimo, por três vezes (n=3). Os genes *gyrB* e *rrsA* são constitutivos e utilizados para a normalização dos níveis de expressão entre as amostras.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a padronização da técnica de qRT-PCR.

Gene	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'- 3'	Amplicon
<i>atlE</i>	TACCAGGGTTTGCAGGATTC	GGCGCTAAATTCATTGGAAA	85 pb
<i>aap</i>	AGGCCGTACCAACAGTGAAT	ATGGGCAAACGTAGACAAGG	100 pb
<i>agrC</i>	TCATCAATATCGCATTTCATCG	CCTAAACCGCGATTATCACC	136 pb
<i>icaA</i>	TTATCAATGCCGCAGTTGTC	CCGTTGGATATTGCCTCTGT	104 pb
<i>leuA</i>	GATGATCTCGGAATGGCAGT	TGAGGCATTTCTGCTCTTT	108 pb
<i>saeR</i>	GCTAACACTGTCAATGTCCACA	AGGCCCCACACAGTTGTAAT	92 pb
<i>saeS</i>	GGCGTCAATTTGTTGTGCTA	AGGGCATAGGTATCGTTCCA	140 pb
<i>sarA</i>	TTTGCTTCTGTGATACGGTTGT	CGTAATGAACACGATGAAAGAACT	107 pb
<i>rsbU</i>	TCAAACGCTTCAAACCATCA	TGAGTTTTGCTGTGGCAGAC	126 pb
<i>gyrB</i>	ATCAACATCGGCATCAGTCA	GCATTTGGTACGGGTATTGG	87 pb
<i>rrsA</i>	AAGCAACGCGAAGAACCTTA	ATGCACCACCTGTCACTCTG	95 pb

pb, pares de base.

5. Resultados e Discussão

5.1 Influência da presença de vancomicina na estrutura do biofilme

O crescimento bacteriano na presença e ausência de vancomicina foi acompanhado ao longo dos tempos de incubação, mostrando que a amostra não tratada teve seu pico de crescimento em 24h e que as amostras tratadas com concentrações subinibitórias de vancomicina não sofreram inibição do crescimento, porém, pôde-se observar que a concentração de $\frac{1}{2}$ da CIM demorou mais tempo para crescer quando comparada com a não tratada (Figura 1).

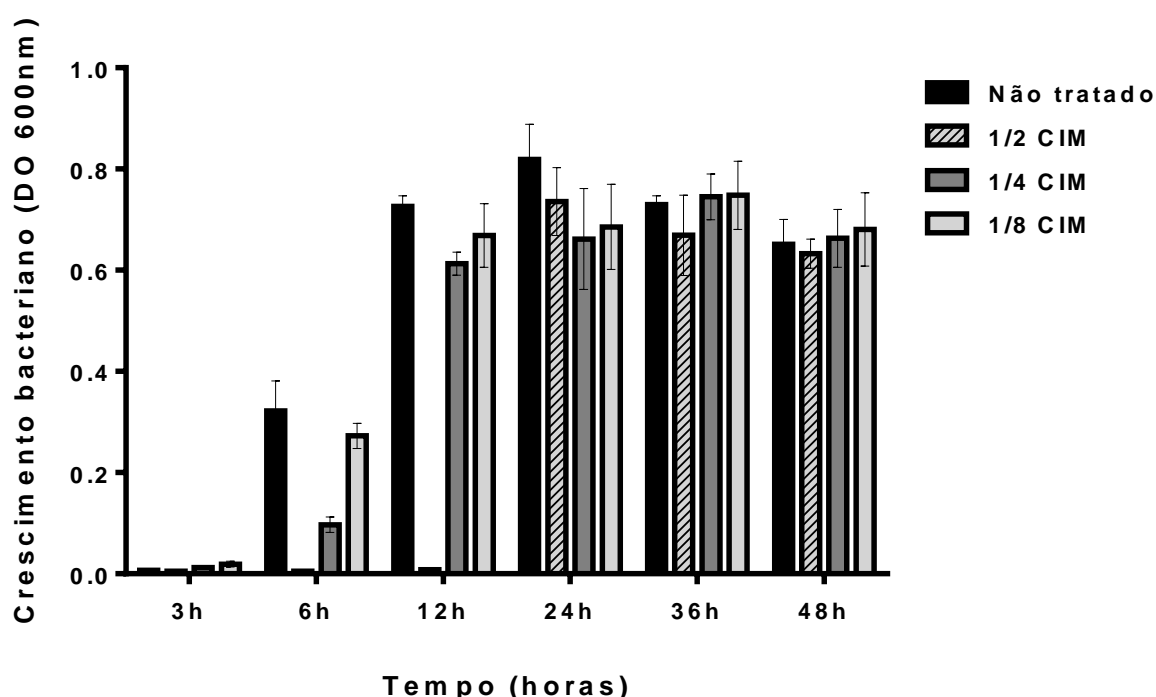


Figura 1: Crescimento bacteriano das amostras de *S. epidermidis* ATCC 35984 tratadas com $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{8}$ da CIM de vancomicina e da amostra não tratada, ao longo dos tempos de incubação. Os resultados representam a média da densidade óptica a 600 nm dos 3 experimentos realizados \pm desvio padrão.

O ensaio de formação de biofilme demonstrou que já há formação de biofilme do *S. epidermidis* ATCC 35984 em 6 h de incubação, conforme Figura 2. Os resultados mostram que, a partir do momento que há a formação de biofilme na amostra não tratada, uma alta densidade ótica é medida. Conseqüentemente, as diferenças mais sutis entre as amostras podem ter sido mascaradas por uma saturação na leitura da densidade ótica. Desta forma, não foi possível observar diferenças na formação de biofilme, principalmente em relação à biomassa, entre as amostras tratadas e não tratadas utilizando este método.

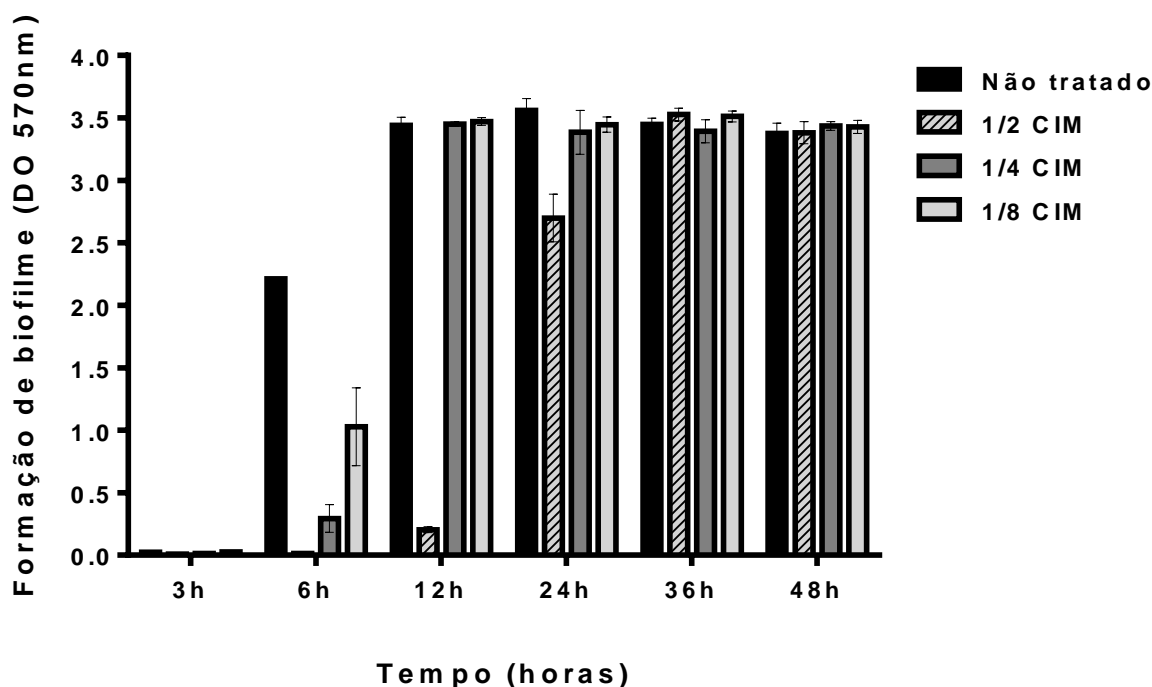


Figura 2: Formação de biofilme das amostras de *S. epidermidis* ATCC 35984 tratadas com $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{8}$ da CIM de vancomicina e da amostra não tratada, ao longo dos tempos de incubação. Os resultados representam a média da densidade óptica a 570 nm dos 3 experimentos realizados \pm desvio padrão.

Pode-se observar melhor este fenômeno ao visualizar o padrão macroscópico de formação de biofilme das amostras estudadas antes e depois da coloração com cristal violeta, conforme Figura 3.

Levando em consideração as amostras não tratadas, ainda não há formação de biofilme no tempo de 3 h de incubação. Em 6 h, ocorre o início da formação de biofilme com o surgimento de uma película frágil que facilmente se rompe. A partir de 12 h de incubação já há a formação de um biofilme bem fixado e não é mais possível perceber diferenças estruturais de formação a olho nu. Já nas amostras tratadas, a concentração de $\frac{1}{2}$ da CIM de vancomicina destaca-se por apresentar um comportamento diferente de adesão e agregação em relação ao não tratado, enquanto as concentrações de $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{8}$ da CIM apresentam-se muito similares (Figura 3).

Além desse início de formação de biofilme distinto dos demais, podemos perceber que a amostra tratada com $\frac{1}{2}$ da CIM necessita de um tempo maior de incubação (24 h) para atingir o padrão de formação de biofilme encontrado na amostra não tratada, que já se estabelece como um biofilme frágil em 6 h. Então,

com 12 h há a formação de alguns agregados bem fixados mas esparsos e, com 24 h, há a formação de um biofilme bem fixado e distribuído ao longo de todo o substrato.

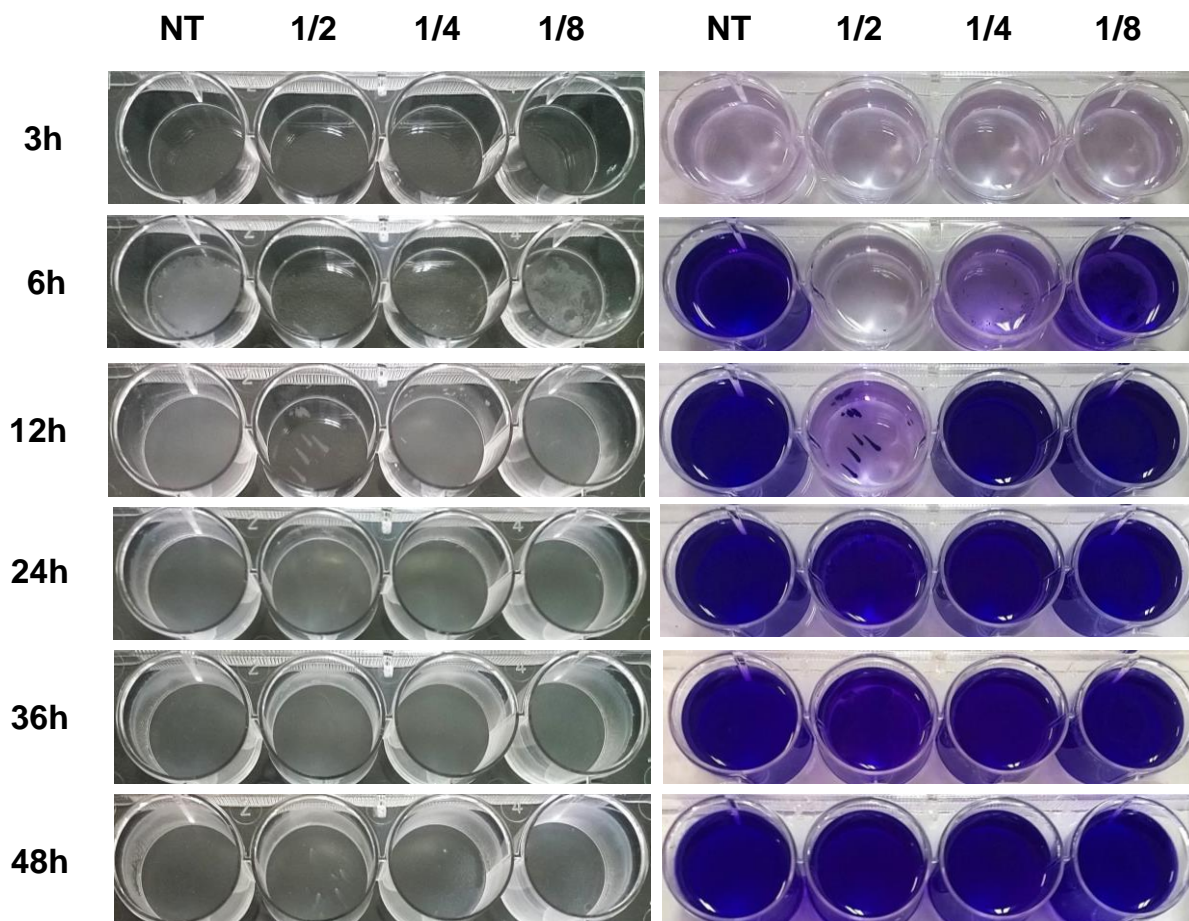


Figura 3: Padrão macroscópico da formação de biofilme das amostras de *S. epidermidis* ATCC 35984 tratadas com $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{8}$ da CIM de vancomicina e da amostra não tratada (NT), ao longo dos tempos de incubação antes (coluna da esquerda) e após (coluna da direita) a coloração com cristal violeta.

Os ensaios de microscopia eletrônica de varredura permitiram a visualização da diferença da estrutura do biofilme ao longo dos tempos de incubação e entre os tratamentos.

As imagens da MEV em aumento de 200 vezes (Figura 4) sugerem que as amostras tratadas com concentrações subinibitórias de vancomicina possuem menos camadas de biofilme em relação as não tratadas, apresentando uma estrutura com conformações diferentes, especialmente nas amostras tratadas com $\frac{1}{2}$ da CIM.

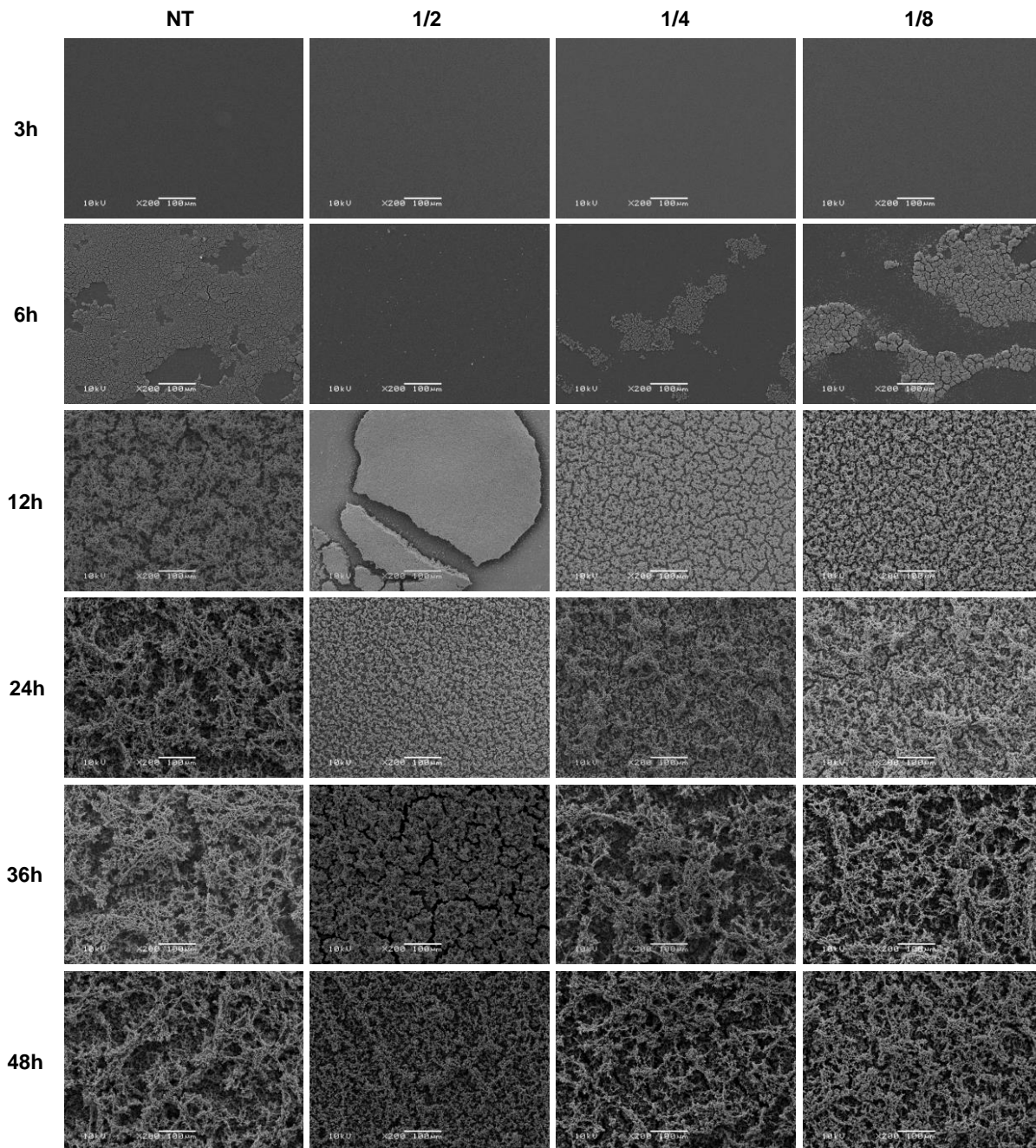


Figura 4: Microscopia eletrônica de varredura da formação de biofilme do *S. epidermidis* ATCC 35984 tratado com $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{8}$ da CIM de vancomicina e não tratado (NT), ao longo dos tempos de incubação de 3, 6, 12, 24, 36 e 48 h, em aumento de 200x (barras indicam 100 µm).

Analisando as imagens de microscopia eletrônica de varredura em aumentos maiores, de 5000 e 20000 vezes (Figuras 5 e 6), podemos observar o aumento da matriz polissacarídica extracelular ao longo do tempo e a semelhança morfológica entre os biofilmes não tratados e os tratados com $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{8}$ da CIM.

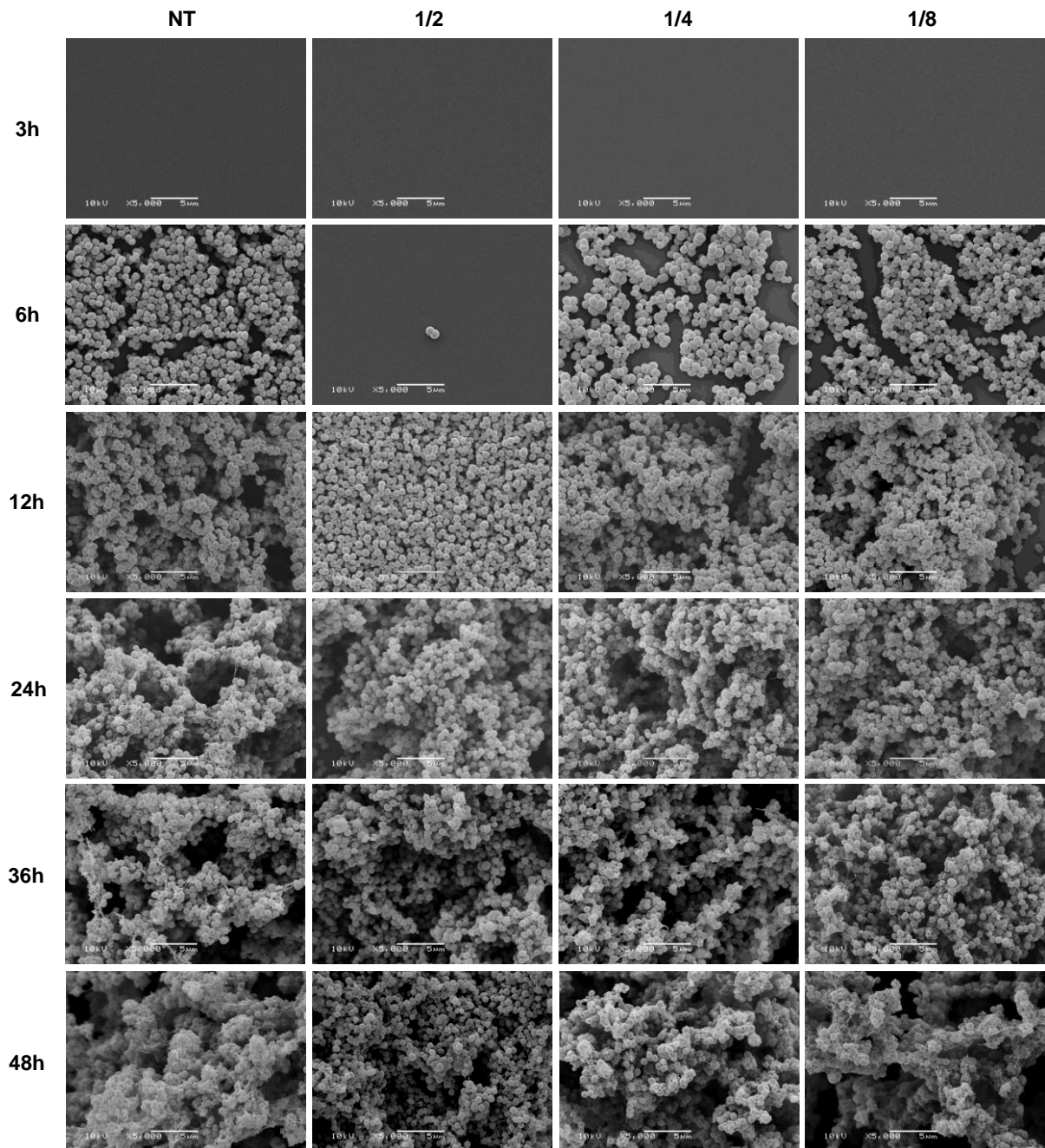


Figura 5: Microscopia eletrônica de varredura da formação de biofilme do *S. epidermidis* ATCC 35984 tratado com $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{8}$ da CIM de vancomicina e não tratado (NT), ao longo dos tempos de incubação de 3, 6, 12, 24, 36 e 48 h, em aumento de 5000x (barras indicam 5 μ m).

Os resultados apresentados até aqui podem ser corroborados pelos resultados encontrados pela Microscopia Confocal de Varredura a Laser, conforme as Figuras 7, 8 e 9.

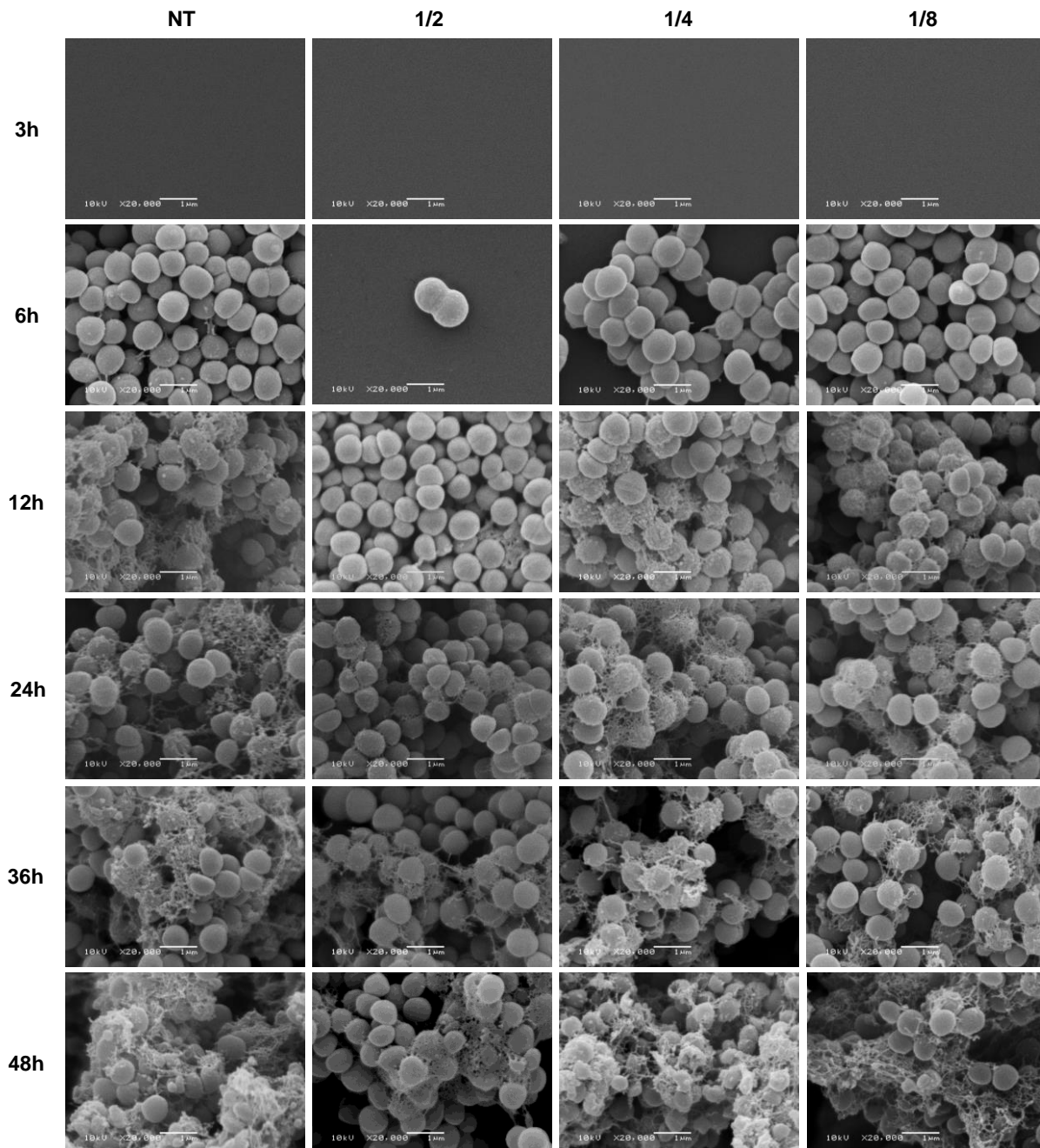


Figura 6: Microscopia eletrônica de varredura da formação de biofilme do *S. epidermidis* ATCC 35984 tratado com $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{8}$ da CIM de vancomicina e não tratado (NT), ao longo dos tempos de incubação de 3, 6, 12, 24, 36 e 48 h, em aumento de 20000x (barras indicam 1 μ m).

Primeiramente, a formação de biofilme apesar da morte de uma parte da população nas amostras tratadas pode ser evidenciada pela apresentação predominante da coloração verde, que representa as células bacterianas viáveis. Apesar de uma parcela da população bacteriana morrer em contato com a concentração de $\frac{1}{2}$ da CIM de vancomicina no tempo de incubação de 6 h, pode-se

perceber que as bactérias restantes se multiplicam e passam a formar biofilme nos tempos subsequentes.

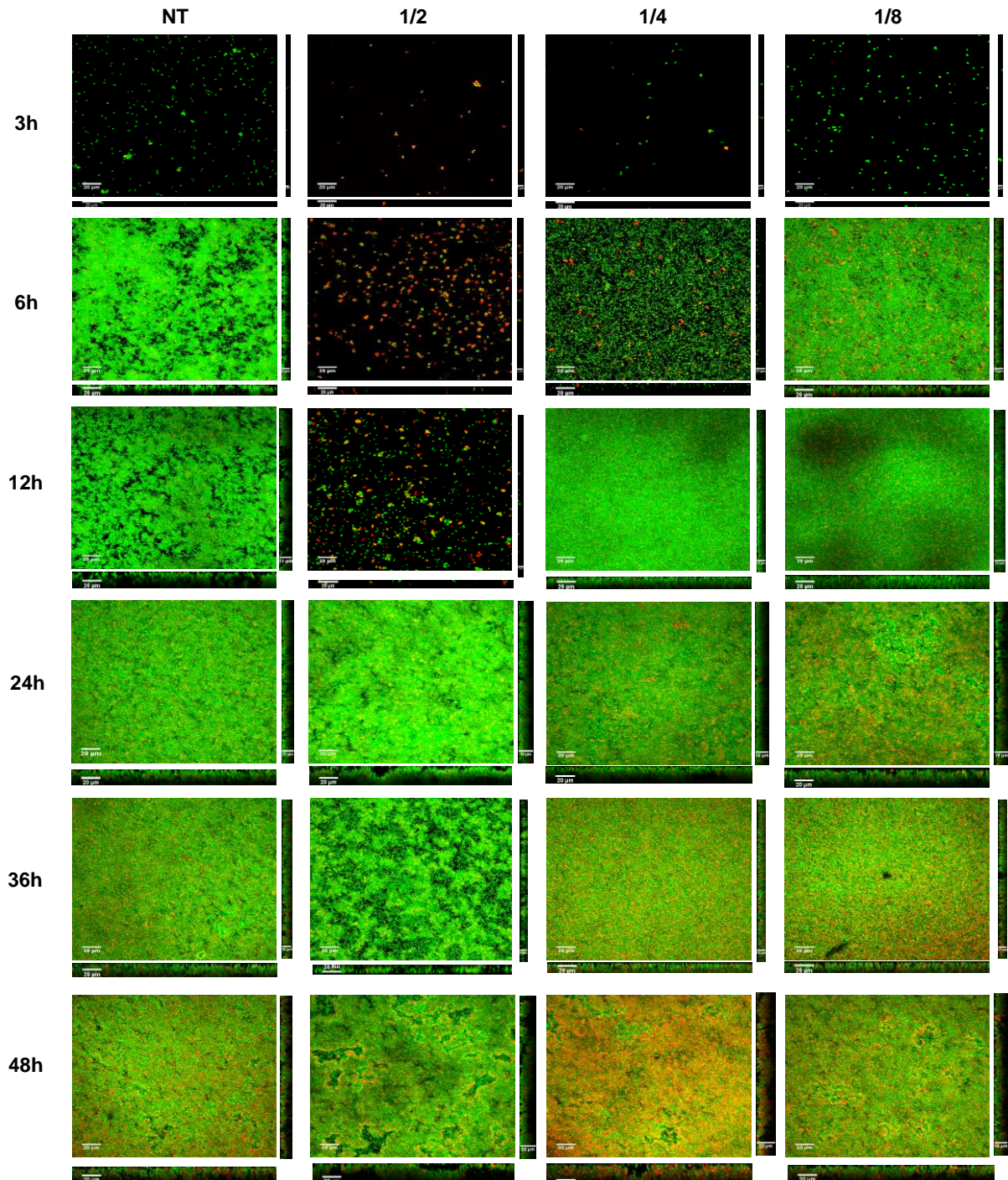


Figura 7: Microscopia confocal de varredura a laser da formação de biofilme do *S. epidermidis* ATCC 35984 tratado com $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{8}$ da CIM de vancomicina e não tratado (NT), ao longo dos tempos de incubação de 3, 6, 12, 24, 36 e 48 h, corado com Live/Dead. Imagem central, sobreposição dos cortes no eixo z, imagem inferior, eixos x e z, imagem lateral, eixos y e z do biofilme, obtidas pelo software ImageJ.

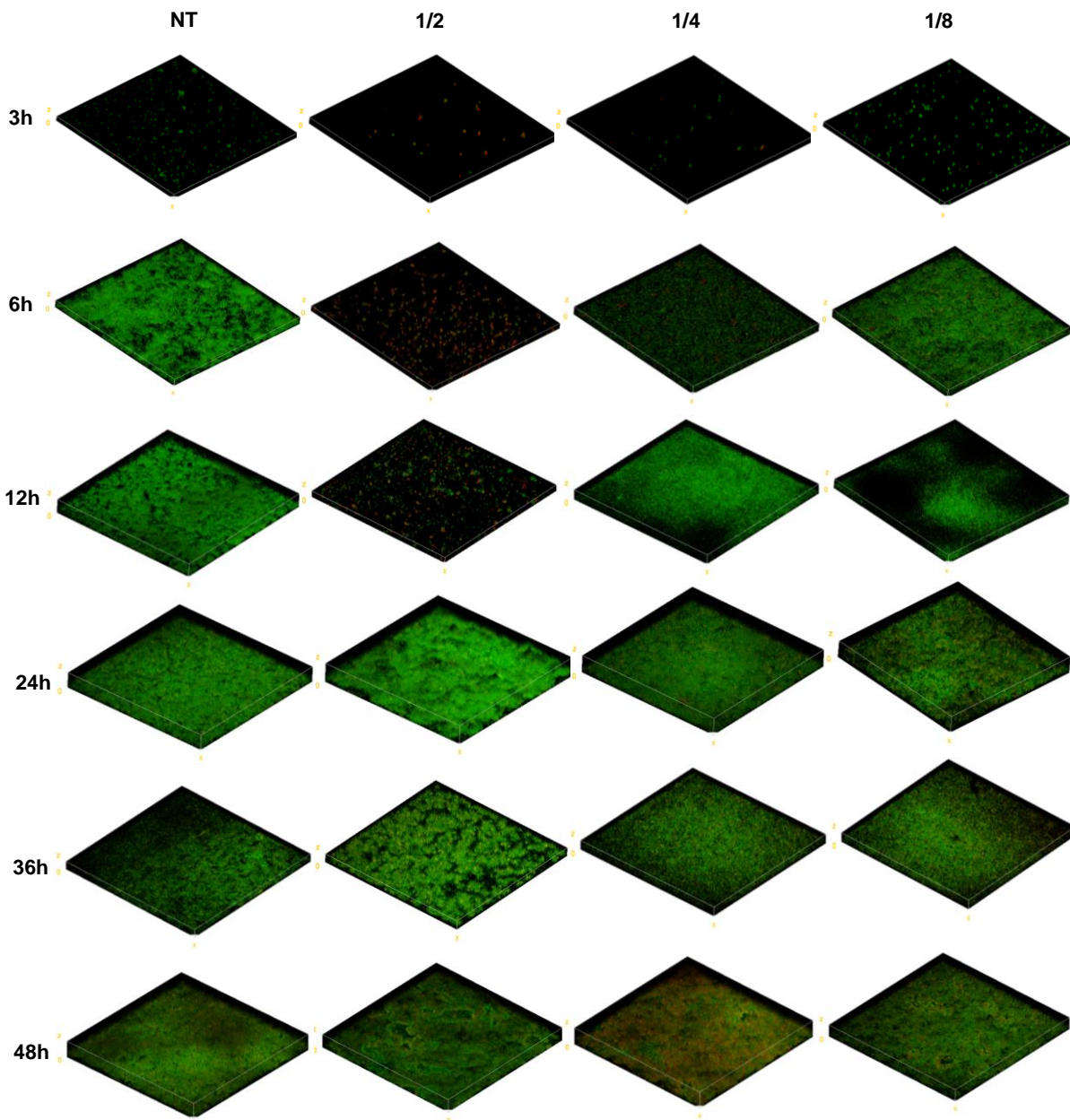


Figura 8: Microscopia confocal de varredura a laser da formação de biofilme do *S. epidermidis* ATCC 35984 tratado com $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{8}$ da CIM de vancomicina e não tratado (NT), ao longo dos tempos de incubação de 3, 6, 12, 24, 36 e 48 h, corado com Live/Dead. Imagem do volume do biofilme em formato 3D obtido pelo software ImageJ.

Assim como na MEV, não há formação de biofilme no tempo de 3 h de incubação nas amostras tratadas e não tratadas de MCVL. Aparecem apenas algumas bactérias planctônicas, devido ao experimento ser realizado com o biofilme “vivo”, sem estar fixado, e, por isso, as lavagens são extremamente cuidadosas para que não haja o rompimento do biofilme e, então, algumas bactérias planctônicas estão presentes neste ambiente. Estas bactérias podem ser facilmente identificadas

nas imagens que mostram o eixo z (Figura 7, barras laterais e inferiores) por não estarem fixadas na superfície.

Com o início da formação de biofilme em 6 h, podemos observar o aumento da espessura do biofilme ao longo do tempo por meio das imagens que mostram o eixo z (Figura 7) e das imagens que mostram o volume ocupado pelo biofilme (Figura 8). Conforme já apresentado pelas imagens da MEV, as imagens de MCVL confirmam que a concentração de $\frac{1}{2}$ da CIM de vancomicina leva um tempo maior (24 h) para atingir o padrão de formação de biofilme encontrado na amostra não tratada (6 h).

As imagens de MCVL que demonstram a textura das amostras (Figura 9) também contribuem para a visualização de que existem diferenças de conformação na superfície do biofilme, já que o seu relevo apresenta-se diferente para cada amostra em cada tempo. No entanto, a concentração de $\frac{1}{2}$ da CIM destaca-se mais uma vez, enquanto as concentrações de $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{8}$ da CIM exibem maior similaridade de relevo com a amostra não tratada.

Os biofilmes podem apresentar-se mais complexos, com estruturas que variam desde aglomerados desiguais até a elaboração de estruturas morfológicas tais como pilares ou cogumelos, com canais de água para a troca de materiais do interior do biofilme com o meio circundante. Porém, outros biofilmes são mais simples, com estruturas relativamente planas e compactas que recobrem toda a superfície disponível (SCHUSTER e MARKX, 2014). Os resultados aqui expostos sugerem que o biofilme de *S. epidermidis* possui uma estrutura muito simples e plana, sem traços característicos, ou seja, é constituído por agregados simples, que podem ter sido formados por processos de crescimento aleatório ou de agregação desordenada.

A adesão das células bacterianas à superfície durante as primeiras etapas do biofilme ocorrem devido a alterações fisiológicas e à produção da matriz polissacarídica extracelular, que funciona como um “aglutinante”, fixando as células à superfície e entre si. Após o processo de fixação inicial, as células dividem-se e formam microcolônias. Durante o processo de maturação, as células continuam a se dividir e produzir mais matriz. Nesta etapa, o biofilme pode se estender a partir da superfície e construir uma estrutura 3D. Após a maturação, as células podem se dispersar do biofilme e colonizar novas regiões (SCHUSTER e MARKX, 2014). Este

processo pode ser visualizado de forma bem clara pelos experimentos realizados neste estudo, demonstrando a formação de biofilme ao longo do tempo juntamente com a exposição a um ambiente de estresse.

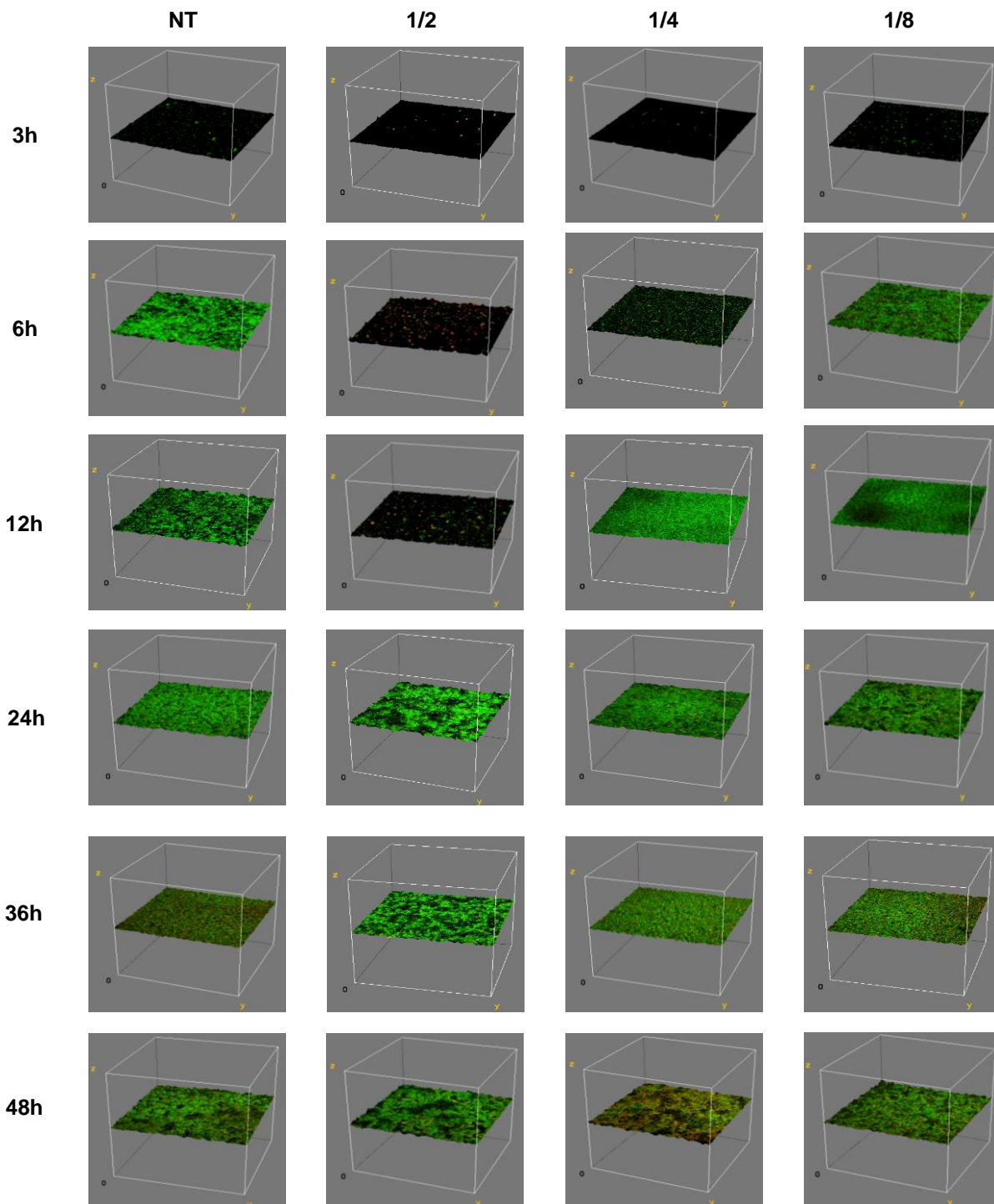


Figura 9: Microscopia confocal de varredura a laser da formação de biofilme do *S. epidermidis* ATCC 35984 tratado com $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{8}$ da CIM de vancomicina e não tratado (NT), ao longo dos tempos de incubação de 3, 6, 12, 24, 36 e 48 h, corado com Live/Dead. Imagem da textura do biofilme em formato 3D obtida pelo software ImageJ.

A estrutura do biofilme sofre mudanças ao longo do tempo, sendo determinada por vários fatores, entre eles incluem-se as propriedades da superfície e a distribuição inicial das células sobre a superfície, os micro-organismos envolvidos na formação do biofilme, a transcrição dos genes, e a interação intercelular, bem como as propriedades físicas e químicas do ambiente externo. A presença da matriz polissacarídica extracelular limita a transferência de massa e de nutrientes a partir do meio para as células, assim como a de substratos metabólicos, produtos e intermediários, de modo que a difusão é o único mecanismo de transferência em um biofilme.

Um dos motivos pelo qual o biofilme pode ser mais resistente aos estresses ambientais, deve-se ao fato de que as células presentes na sua superfície possuem acesso direto ao meio fresco, enquanto que as células mais agregadas ou que estão em camadas mais profundas no biofilme, não. Como consequência, as células podem crescer melhor em um lugar, ou mudar de posição para outra região, onde possam encontrar melhores condições ambientais. O ambiente onde o biofilme encontra-se e o seu metabolismo celular são fortemente relacionados e as células bacterianas vão se adaptar ao seu microambiente alterando suas atividades metabólicas, que por sua vez afeta os gradientes químicos. Outro mecanismo pelo qual o biofilme pode ser mais resistente aos estresses ambientais é simplesmente através da força em números. Por exemplo, uma única célula planctônica pode conter catalase para destruir o peróxido de hidrogênio, mas não ser efetiva o suficiente. No entanto, quando as células estão em um agregado ou em biofilme, a quantidade de catalase disponível em uma célula individual pode ser pequena, mas a quantidade total pode ser suficiente para degradar o peróxido antes das células serem mortas (SCHUSTER e MARKX, 2014).

Além disso, um estudo de Stewart e colaboradores (2013) demonstrou que a conectividade celular de *S. epidermidis* diminui quando há exposição a situações de estresse. Esta diferença de contato e conectividade celular poderia trazer implicações reológicas e nas propriedades de transporte, como na difusão de oxigênio, nutrientes, antimicrobianos e moléculas do *quorum sensing*. Por exemplo, as interações de contato bacterianas podem ser modificadas por meio de uma resposta rígida ou suave dependendo dos espaços e ângulos entre as bactérias. Dessa forma, podemos sugerir que há um comportamento diferente entre as

amostras tratadas e não tratadas com vancomicina, especialmente na concentração de ½ da CIM, que poderia ser explicado pela diferente conectividade entre as células do *S. epidermidis*. No entanto, ainda é necessário um maior entendimento de como as bactérias se organizam a nível intercelular durante o crescimento do biofilme tanto em condições normais quanto em condições de estresse.

5.2 Padronização da técnica de qRT-PCR para onze genes relacionados à formação de biofilme de *S. epidermidis*

Os resultados das curvas padrão estão resumidos na Tabela 1. O valor de Slope de uma curva padrão fornece o entendimento da eficiência de uma qRT-PCR. Um slope de -3,322 significa que a reação teve uma eficiência de 1, ou 100%, e a quantidade da duplicação dos produtos de PCR a cada ciclo. Desta forma, os valores encontrados para slope, eficiência e coeficiente de correlação estão em conformidade com os princípios conhecidos de estatística. A melhor temperatura de anelamento foi estabelecida a 62°C e a temperatura de *melting* variou de 76,2 a 82°C. As figuras 10, 11 e 12 demonstram os resultados e gráficos fornecidos pelo software do equipamento Rotor Gene Q.

De acordo com as perspectivas deste trabalho, onze oligonucleotídeos iniciadores de genes foram devidamente padronizados e estão prontos para a avaliação da expressão gênica do *S. epidermidis* nas condições de tratamento com concentrações subinibitórias de vancomicina.

Uma das principais dificuldades enfrentadas nesta etapa do trabalho foi a extração de RNA com qualidade suficiente para se realizar os ensaios de qRT-PCR. O objetivo era extrair RNA das bactérias planctônicas para que se pudesse traçar um perfil de expressão gênica de todas as amostras analisadas. Foram testados protocolos de extração pelo método do Trizol e pelo kit RNeasy Protect Bacteria (Qiagen, Alemanha) com diversos tipos de lise da parede celular e quantidade de amostra inicial, no entanto, além da pouquíssima quantidade obtida (aproximadamente 20 ng), o RNA continha um alto nível de contaminação, com valores de $A_{260/280} < 1,7$, que deveriam ser próximos de 2,0.

Entretanto, foi possível extrair um RNA de qualidade adequada para a execução dos experimentos, tanto com a extração com Trizol quanto pelo kit da

Qiagen, com amostras de bactérias em biofilme, redirecionando as perspectivas do estudo.

Tabela 1. Valores dos resultados das curvas padrão.

Gene	Função	Slope	E (%)	R²	Ta (°C)	Tm (°C)
<i>atIE</i>	Autolisina bifuncional	-3,299	101	0,984	62	78,5
<i>aap</i>	Proteína associada à acumulação	-3,284	102	0,991	62	76,2
<i>agrC</i>	Proteína C do gene regulador acessório	-3,398	97	0,980	62	77,5
<i>icaA</i>	Proteína A de adesão intercelular	-3,162	107	0,994	62	80,5
<i>leuA</i>	2-isopropilmalato sintase	-3,183	106	0,986	62	81,3
<i>saeR</i>	Regulador de resposta do DNA ligante	-3,566	91	0,993	62	77,5
<i>saeS</i>	Sensor da histidina quinase	-3,469	94	0,982	62	80,5
<i>sarA</i>	Regulador A acessório de estafilococos	-3,591	90	0,990	62	77,2
<i>rsbU</i>	Proteína reguladora do fator sigma B	-3,489	93	0,990	62	80,5
<i>gyrB</i>	DNA girase – subunidade B	-3,102	110	0,993	62	77,5
<i>rrsA</i>	RNA 16S ribossomal	-3,163	107	0,998	62	82,0

E, eficiência; R², coeficiente de correlação; Ta, temperatura de anelamento e Tm, temperatura de *melting*.

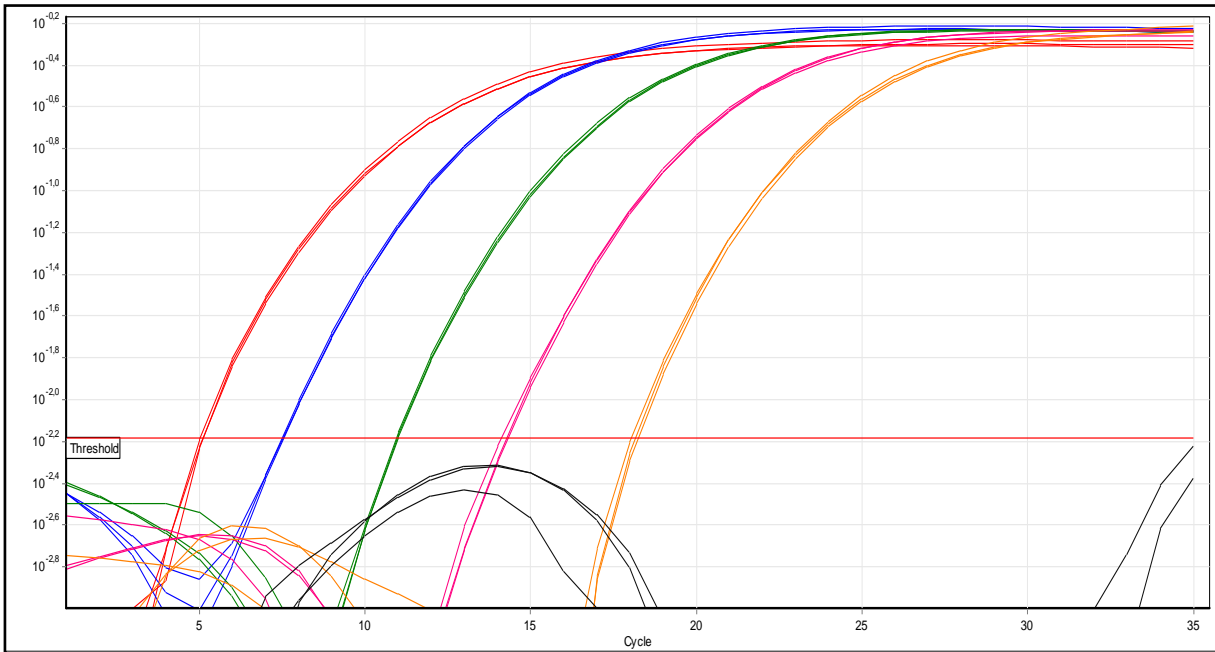


Figura 10. Análise quantitativa do gene *saeS* pelo software do Rotor Gene Q.

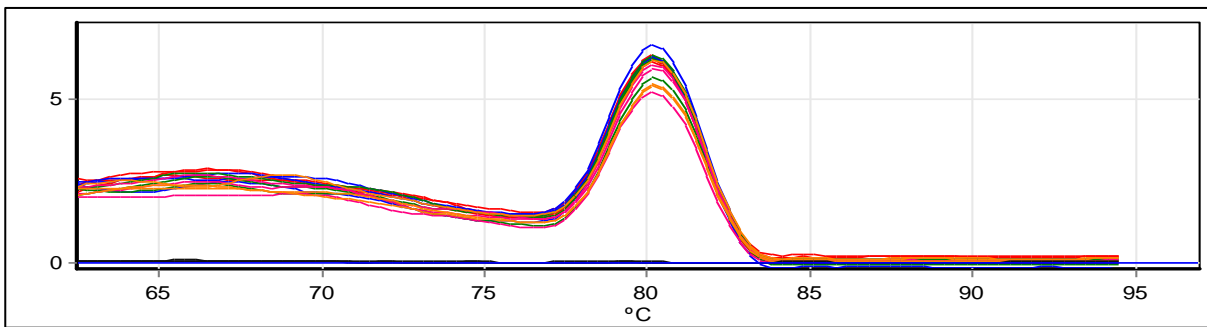


Figura 11. Análise da curva de *melt* do gene *saeS* pelo software do Rotor Gene Q.

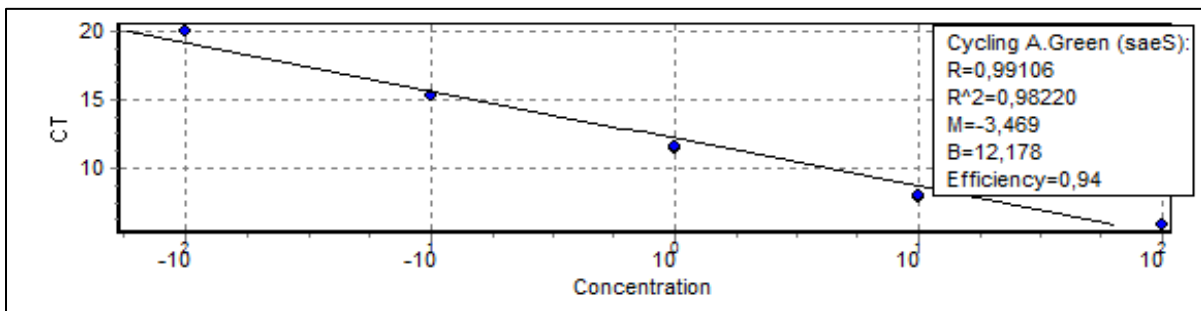


Figura 12. Curva padrão do gene *saeS* pelo software Rotor Gene Q.

6. Conclusões

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento desta dissertação permitem as seguintes conclusões:

- Existem alterações na morfologia do biofilme do *S. epidermidis* ATCC 35984 quando submetido ao crescimento e à formação de biofilme juntamente com concentrações subinibitórias de vancomicina.
- Estas alterações mostram-se mais evidentes nas amostras tratadas com $\frac{1}{2}$ da CIM, a qual necessita de um tempo maior para formar um biofilme com características diferentes dos demais tratamentos e da amostra não tratada.
- Este comportamento pôde ser demonstrado pela avaliação da formação de biofilme ao longo do tempo concomitantemente com a exposição a um ambiente de estresse.
- Um protocolo para a execução da qRT-PCR de onze oligonucleotídeos iniciadores de genes envolvidos na adesão, formação de biofilme e na virulência do *S. epidermidis* foi padronizado.

Portanto, é necessário buscar o entendimento sobre a formação de biofilme em condições de estresse, como na presença de antimicrobianos, já que a elucidação dos mecanismos envolvidos tanto na formação de biofilme quanto na resistência aos antimicrobianos pode auxiliar no desenvolvimento de novas e efetivas estratégias terapêuticas para o difícil tratamento de infecções relacionadas com o *S. epidermidis*.

Este trabalho ainda tem como perspectiva a investigação da expressão de nove genes relacionados à adesão, à formação de biofilme e à virulência do *S. epidermidis* ATCC 35984, nas condições aqui estudadas, na tentativa de elucidar os fenômenos moleculares envolvidos na variação fenotípica observada.

8. Referências Bibliográficas

ANTUNES, A. L. S.; BONFANTI, J. W.; PEREZ, L. R. R.; PINTO, C. C. F.; FREITAS, A. L. P.; MACEDO, A. J.; BARTH, A. L. High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.106, n.1, p.51-55, 2011.

BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. Coagulase-Negative Staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, v.27, n.4, p. 870–926, 2014.

CARGILL, J. S.; UPTON, M. Low concentrations of vancomycin stimulates biofilm formation in some clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Clinical Pathology*, v.62, p.1112–1116, 2009.

CERCA, N.; MARTINS, S.; SILLANKORVA, S.; JEFFERSON, K. K.; PIER, G. B.; OLIVEIRA, R.; AZEREDO, J. Effects of Growth in the Presence of Subinhibitory Concentrations of Dicloxacillin on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, v.71, n.12, p.8677–8682, 2005.

CHAMBERS, H. F. Inibidores da síntese de proteínas e agentes antibacterianos diversos. in: BRUNTON, L. L., LAZO, J. S., PARKER K. L. *Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 11ªed. Rio de Janeiro: Editora McGrawHill, 2006. p.1055-1081.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.

CROES, S.; BEISSER, P. S.; NEEF, C.; BRUGGEMAN, C. A.; STOBBERINGH, E. E. Unpredictable Effects of Rifampin as an Adjunctive Agent in Elimination of Rifampin-Susceptible and -Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Grown in Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.54, n.9, p. 3907-3912, 2010.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, v.8, n.9, p.881-889, 2002.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, v.15, n.2, p.167-193, 2002

DOROSHENKO, N.; TSENG, B. S.; HOWLIN, R. P.; DEACON, J.; WHARTON, J. A.; THURNER, P. J.; GILMORE, B. F.; PARSEK, M. R.; STOODLEY, P. 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.

DUNNE, W. M. Effects of Subinhibitory Concentrations of Vancomycin or Cefamandole on Biofilm Production by Coagulase-Negative Staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.34, n.3, p.390-393, 1990.

FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J. P. The genetics of staphylococcal biofilm formation - will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection? *Clinical Microbiology and Infection*, v.11, p.967-973, 2005.

FRANK, K. L.; REICHERT, E. J.; PIPER, K. E.; PATEL, R. In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.51, n.3, p.888-895, 2007.

GOMES, F.; TEIXEIRA, P.; OLIVEIRA, R. Mini-review: *Staphylococcus epidermidis* as the most frequent cause of nosocomial infections: old and new fighting strategies. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, v.30, n.2, p.131-141, 2014.

HADDADIN, R. N. S.; SALEH, S.; AL-ADHAM, I. S. I.; BUULTJENS, T. E. J.; COLLIER, P. J. The effect of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics on virulence factors expressed by *Staphylococcus aureus* biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, v.108, p.1281-1291, 2010.

HESS, D. J.; HENRY-STANLEY, M. J.; WELLS, C. L. Gentamicin promotes *Staphylococcus aureus* biofilms on silk suture. *Journal of Surgical Research*, v.170, n.2, p.302-308, 2011.

LAPLANTE, K. L.; MERMEL, L. A. In vitro activity of daptomycin and vancomycin lock solutions on staphylococcal biofilms in a central venous catheter model. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v.22, p.2239-2246, 2007.

LAVERTY, G.; GORMAN, S. P.; GILMORE, B. F. Biomolecular mechanisms of staphylococcal biofilm formation. *Future Microbiology*, v.8, n.4, p.509-524, 2013.

LIU, Z.; WANG, W.; ZHU, Y.; GONG, Q.; YU, W.; LU, X. Antibiotics at subinhibitory concentrations improve the quorum sensing behavior of *Chromobacterium violaceum*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 341, p.37-44, 2013.

MACK, D.; HORSTKOTTE, M. A.; ROHDE, H.; KNOBLOCH, J. K. –M. Coagulase-negative Staphylococci. in: PACE, J. L.; RUPP, M.; FINCH, R.G. *Biofilms, infection, and antimicrobial therapy*. U.S.A., CRC Press Taylor & Francis Group, 2006. p.109-132.

MUSTA, A.C.; RIEDERER, K.; SHEMES, S.; CHASE, P.; JOSE, J.; JOHNSON, L. B.; KHATIB, R. Vancomycin MIC plus heteroresistance and outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: Trends over 11 years. *Journal of Clinical Microbiology*, v.47, n.6, p.1640-1644, 2009.

NIELSEN, L. N.; ROGGENBUCK, M.; HAABER, J.; IFRAH, D.; INGMER, H. Diverse modulation of *spa* transcription by cell wall active antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *BMC Research Notes*, v.5, n.457, 2012.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* – the ‘accidental’ pathogen. *Nature Reviews*, v.7, p.555-567, 2009.

OTTO, M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Seminars in Immunopathology*, v.34, p.201-214, 2012.

OTTO, M. Staphylococcal Infections: Mechanisms of Biofilm Maturation and Detachment as Critical Determinants of Pathogenicity. *Annual Review of Medicine*, v.64, p.175-188, 2013.

PATEL, R. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, n.437, p.41-47, 2005.

POZO, J. L. del; PATEL, R. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clinical Pharmacology e Therapeutics*, v.82, n.2, p.204-209, 2007.

PRESTERL, E.; HADJU, S.; LASSNIGG, A. M.; HIRSCHL A. M.; HOLINKA, J.; GRANINGER, W. Effects of azytromycin in combination with vancomycin, daptomycin, fosfomicin, tigecycline, and ceftriaxone on *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.53, n.8, p.3205-3210, 2009.

RACHID, S.; OHLSEN, K.; WITTE, W.; HACKER, J.; ZIEBUHR, W. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.44, n.12, p.3357-3363, 2000.

RICE, L.B. Antimicrobial Resistance in Gram-Positive Bacteria. *The American Journal of Medicine*, v.119; p.S11-S19, 2006.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J. M.; BALLESTA, S.; GARCÍA, I.; CONEJO, M. C.; PASCUAL, A. Actividad y permeabilidad de linezolid y vancomicina en biocapas de *Staphylococcus epidermidis*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v.25, n.7, p.425-428, 2007.

ROGERS, K. L.; FEY, P. D.; RUPP, M. E. Coagulase-Negative Staphylococcal Infections. *Infectious Disease Clinics of North America*. v. 23, p. 73-98, 2009.

ROHDE, H.; FRANKENBERGER, S.; ZÄHRINGER, U.; MACK, D. 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, p.103–111, 2010.

ROSE, W. E.; POPPENS, P. T. Impact of biofilm on the *in vitro* activity of vancomycin alone and in combination with tigecycline and rifampicin against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.63, p.485-488, 2009.

RUPP, M. E. ; HAMER, K. E. Effect of subinhibitory concentrations of vancomycin, cefazolin, ofloxacin, L-ofloxacin and D-ofloxacin on adherence to intravascular catheters and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.41, p.155-161, 1998.

SADER, H.S. ; RHOMBERG P.R. ; JONES, R.N. Nine-hospital study comparing broth microdilution and Etest method results for vancomycin and daptomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.53, p.3162-3165, 2009.

SAKOULAS, G. ; ELIOPOULOS, G. M. ; MOELLERING, R. C. ; WENNERSTEN, C. ; VENKATARAMAN, L. ; NOVICK, R. P. ; GOLD, H. S. Accessory gene regulator (*agr*) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.46, n.5, p.1492-1502, 2002.

SCHINABECK, M. K.; GHANNOUM, M. A. Biofilm-related indwelling medical device infections. in: PACE, J. L.; RUPP, M.; FINCH, R.G. *Biofilms, infection, and antimicrobial therapy*. U.S.A., CRC Press Taylor & Francis Group, 2006. p.39-48.

SCHUSTER, J. J.; MARKX, G. H. Biofilm Architecture. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v.146, p.77–96, 2014.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G.; DJUKIĆ, S.; ĆIRKOVIĆ, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 115, p.891-899, 2007.

STEWART, E. J.; SATORIUS, A. E.; YOUNGER, J. G.; SOLOMON, M. J. Role of environmental and antibiotic stress on *Staphylococcus epidermidis* biofilm microstructure. *Langmuir*, v.29, p.7017–7024, 2013.

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

SUBRT, N.; MESAK, L. R.; DAVIES, J. Modulation of virulence gene expression by cell wall active antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.66, p.979-984, 2011.

SUN, F.; QU, F.; LING, Y.; MAO, P.; XIA, P.; CHEN, H.; ZHOU, D. Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategie. *Future Microbiology*, v.8, n.7, p.877–886, 2013.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*, v.119; p.S3-S10, 2006.

WANG, Q.; SUN, F-J.; LIU, Y.; XIONG, L-R.; XIE, L-L.; XIA, P-Y. Enhancement of biofilm formation by subinhibitory concentrations of macrolides in *icaADBC*-positive and -negative clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, n. 6, p.2707-2711, 2010.

WU, E.C.; KOWALSKI, R. P.; ROMANOWSKI, E. G.; MAH, F. S.; GORDON, Y. J.; SHANKS, R. M. Q. AzaSite ® Inhibits *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* biofilm formation in vitro. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, v.26, n.6, p.557-562, 2010.