

## ASPECTOS GERAIS E MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*<sup>1</sup>

### *GENERAL ASPECTS AND MOLECULAR MECHANISMS INVOLVED IN THE FORMATION OF BIOFILMS BY PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Hanan Jumah Eid Ahmah Laila<sup>2</sup> e Roberto Christ Vianna Santos<sup>3</sup>

#### RESUMO

A *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo envolvido em infecções oportunistas e com notória capacidade de formação de biofilmes em dispositivos médicos como a persistência da infecção em pacientes portadores de Fibrose Cística. Assim, esta revisão de literatura objetiva demonstrar os principais mecanismos moleculares envolvidos na formação de biofilmes de *P. aeruginosa*, através de um levantamento bibliográfico nos principais periódicos. A síntese de biofilmes por *P. aeruginosa* é fundamentalmente determinada pela codificação de um grande número de genes que proporcionam a formação de um ambiente ideal para maturação e sobrevivência do biofilme, incluindo-se neste contexto a síntese de fatores de virulência e alteração na suscetibilidade aos antimicrobianos, tornando os biofilmes altamente resistentes aos mesmos. Desse modo, um profundo entendimento destes mecanismos moleculares pode representar um importante progresso na erradicação e prevenção de biofilmes de *P. aeruginosa*.

**Palavras-chave:** bactéria; gram-negativo; *quorum sensing*.

#### ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa* is a gram-negative bacillus that can cause opportunistic infections, with notorious capacity to form biofilms in medical devices such as the persistence of infection in patients with Cystic Fibrosis (CF). Therefore, this literature review aims to demonstrate the main molecular mechanisms involved in the formation of biofilms by *P. aeruginosa* by means of bibliographical research in specialized journals. The *P. aeruginosa* biofilm synthesis is fundamentally determined by the coding of a great number of genes that provide the formation of an ideal environment for the maturation and survival of the biofilm, including the synthesis of virulence factors and variations in the susceptibility to antimicrobial agents, thus making the biofilms highly resistant to them. It was concluded that a systematic understanding of these molecular mechanisms may represent an important progress in the eradication and prevention of *P. aeruginosa* biofilms.

**Keywords:** bacteria; gram-negative; *quorum sensing*.

---

<sup>1</sup> Revisão de literatura.

<sup>2</sup> Aluna do Curso de Especialização em Análises Clínicas - Centro Universitário Franciscano. E-mail: hananlaila\_87@hotmail.com

<sup>3</sup> Orientador - Centro Universitário Franciscano. E-mail: robertochrist@gmail.com

## INTRODUÇÃO

Os biofilmes são comunidades compostas por microrganismos aderidos a uma superfície biótica ou abiótica envolvida por uma matriz de exopolissacarídeo (EPS), cuja função é garantir a proteção dos microrganismos existentes em seu interior contra agressões do meio externo. Desta forma, os biofilmes frequentemente estão associados a maior resistência aos antimicrobianos quando em comparação à forma planctônica e ainda auxiliam na evasão da resposta imune do hospedeiro, tornando difícil sua erradicação (COSTA et al., 2014). Sua síntese é um processo complexo e caracterizado por várias etapas distintas, que vão desde a adesão inicial até a dispersão final, sendo fundamental o entendimento desta última fase, visto que a mesma promove a colonização de outras superfícies, reiniciando o ciclo (HUYNH et al., 2012).

Os biofilmes constituídos por bactérias patogênicas oportunistas representam um importante desafio na medicina devido à sua capacidade de causar infecções crônicas graves e, ainda, por estarem associados a infecções causadas pela sua habilidade de se desenvolverem em dispositivos médicos artificiais (CHIANG et al., 2013). Neste contexto podem-se citar infecções causadas por biofilmes de *P. aeruginosa* no tecido pulmonar de pacientes portadores de fibrose cística (WILLIAMSON et al., 2012), no qual ocorre uma degradação contínua do epitélio pulmonar e a persistência da infecção mesmo com a administração de terapia intensiva com antimicrobianos, o que culmina em aumentos claros na mortalidade dos pacientes acometidos por este agente bacteriano (BURMØLLE et al., 2010).

A *P. aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo envolvido em doenças oportunistas, particularmente em imunocomprometidos, podendo causar dermatites, infecções urinárias e uma grande variedade de infecções sistêmicas, principalmente em ambientes hospitalares (PEDROSA et al., 2014). Sua patogenicidade é resultado de sua capacidade de adaptação fenotípica e seu elevado grau de flexibilidade genômica. Este microrganismo aumenta sua patogenicidade e síntese de fatores de virulência quando exposto a condições de estresse ou ainda quando altera seu modo de crescimento, gerando biofilmes (RODRIGUES, 2014). Assim, ao promoverem o crescimento de populações bacterianas de forma coletiva, os biofilmes fornecem à espécie mecanismos adicionais de adaptação, como a capacidade de sintetizar substâncias sinalizadoras que medeiam o comportamento do biofilme bem como a síntese de determinantes de virulência (HAÜSSLER; BECKER, 2008).

As elevadas taxas de infecções oportunistas causadas por *P. aeruginosa* bem como sua notória capacidade de formação de biofilmes, torna este microrganismo de grande relevância clínica, sendo esta revisão de literatura de vital importância a fim de elucidar os principais mecanismos moleculares envolvidos na formação de biofilmes por este agente bacteriano.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Realizou-se um levantamento bibliográfico em periódicos nas bases de dados: Science Direct, Pubmed, Bibliografia Médica (MEDLINE) e Scielo. As principais buscas foram com os descritores: biofilme, *Pseudomonas aeruginosa*, mecanismos moleculares, resistência e *Quorum Sensing*. Foram avaliadas publicações entre os anos de 2000 e 2014.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **BIOFILMES: DEFINIÇÃO E COMPOSIÇÃO**

Os biofilmes são comunidades compostas por microrganismos organizados em estruturas tridimensionais desempenhando interações altamente complexas entre si (BARBOSA, 2014). Podem ser constituídos pelos mais variados tipos de microrganismos, como fungos, algas, protozoários e, particularmente, por uma ou mais espécies bacterianas, os quais se organizam em várias camadas aderidos de modo irreversível em uma superfície biótica ou abiótica e incorporados em uma matriz polimérica extracelular (MOREIRA, 2011).

A organização dos microrganismos em biofilmes constitui uma forma de proteção, promovendo seu crescimento e sobrevivência em ambientes considerados hostis (KASNOWSKI et al., 2010). Apresentam como vantagem a elevada concentração de nutrientes, facilidade na troca de material genético, proteção contra a ação das células do sistema imune, maior capacidade de suportar alterações de pH, depreciação de nutrientes e também elevadas concentrações de antimicrobianos, de modo que os biofilmes podem ser de 10 a 100 vezes mais resistentes aos antimicrobianos que as células planctônicas (MEDEIROS, 2011), resistência garantida, particularmente, pela matriz exopolissacarídea (EPS).

No que diz respeito a sua composição, os biofilmes são constituídos por partículas de proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos, sais minerais e vitaminas envoltos em uma matriz (PEREIRA, 2014). A água é o maior componente da massa total do biofilme, podendo variar entre 70% a 95% e, referente à massa orgânica, 70% a 95% é representada pelo EPS, sendo o restante constituído por substâncias poliméricas e, em menor quantidade, pelo microrganismo. A matriz de exopolissacarídeo, além de componente estrutural, garante a coesão e integridade funcional do biofilme (OLIVEIRA, 2011), visto que é capaz de protegê-lo contra a penetração de antimicrobianos e fagócitos no biofilme (CASSANEGO et al., 2013).

### **FORMAÇÃO DE BIOFILMES**

Os biofilmes surgem de forma gradual em um processo dinâmico, envolvendo etapas de adesão, produção de EPS, crescimento e desprendimento (MOREIRA, 2011). Este processo é afetado

por um grande número de fatores, entre eles, podem-se citar aqueles associados ao microrganismo como: hidrofobicidade da parede celular, presença de pili, fimbrias e flagelos, produção de EPS e de moléculas sinalizadoras (OLIVEIRA, 2011), espécie e cepa, sistema *Quorum Sensing* (TRENTIN et al., 2013), fatores genéticos, virulência e resistência do microrganismo (KASNOWSKI et al., 2010). Fatores ligados à superfície de adesão, como textura, hidrofobicidade, características químicas da superfície, carga elétrica e filme condicionante. E fatores ligados ao microambiente: velocidade de fluxo, pH, temperatura, presença de cátions e de antimicrobianos, além da disponibilidade de oxigênio, nutrientes e metabólicos provenientes do microrganismo (MEDEIROS, 2011).

De acordo com Oliveira (2011), o desenvolvimento de biofilmes *in vitro* envolve as seguintes etapas: (a) adesão reversível da bactéria à superfície; (b) adesão irreversível através da produção de EPS; (c) origem de microcolônias e início da maturação do biofilme; (d) formação de biofilme maduro constituído de canais por onde circulam a água, nutrientes e produtos do metabolismo celular; e (e) desprendimento e dispersão das células, com consequente formação de um novo biofilme.

Segundo Medeiros (2011), a formação do biofilme inicia-se com o desenvolvimento de um filme condicionante, este por sua vez é constituído pela população bacteriana e moléculas orgânicas e inorgânicas, favorecendo a formação de um ambiente rico em nutrientes. Posteriormente, tem início a fase de adesão, influenciada pela interação dos microrganismos, da superfície e do microambiente no qual eles se encontram (TRENTIN et al., 2013).

Os microrganismos aderem-se a uma superfície biótica, mediada por mecanismos moleculares do tipo receptor-ligante através de lectinas, ligandos ou adesinas, ou em substratos abióticos, através de interações físico-químicas não específicas como forças hidrofóbicas (KASNOWSKI et al., 2010). Nesta fase, ligação primária do microrganismo ao substrato é dita reversível, uma vez que os microrganismos podem ser facilmente removidos (PEREIRA, 2014).

A adesão bacteriana ocorre de forma aleatória ou ainda através de mecanismos de quimiotaxia ou de mobilidade (KASNOWSKI et al., 2010) e, uma vez aderida, se multiplicam em uma taxa logarítmica, originando microcolônias com consequente excreção de uma matriz rica em EPS (MOREIRA, 2011), tendo como função atuar como suporte para a adesão do peptidoglicano de bactérias Gram-positivas e a parte externa da membrana externa das Gram-negativas (KASNOWSKI et al., 2010). Assim, tem-se início a segunda etapa da adesão bacteriana caracterizada pela ligação irreversível dos microrganismos com a superfície, mediada pelo EPS. À medida que esse polissacarídeo extracelular é sintetizado pelas microcolônias, as mesmas passam a atuar como substrato para adesão de outros microrganismos, denominados colonizadores secundários (KASNOWSKI et al., 2010), estes sendo capazes de se ligar a células da mesma ou de espécies diferentes, tendo como resultado agregados firmemente ligados à superfície (TRENTIN et al., 2013).

Conforme aumenta a população bacteriana, acredita-se que as mesmas passem a sintetizar e liberar moléculas sinalizadoras autoindutoras que regulam a formação do biofilme, através da trans-

criação de gentes específicos. Esse mecanismo regulatório é encontrado em inúmeras bactérias patogênicas e é referido como *Quorum Sensing* (QS) (TRENTIN et al., 2013), o qual coordena o comportamento bacteriano de acordo com as condições ambientais, favorecendo a adaptação à disponibilidade de nutrientes, defesa contra a ação de outros microrganismos ou contra exposição de agentes tóxicos, síntese de fatores de virulência, produção de antimicrobianos (MOREIRA, 2011) e, também, regulando a formação de canais que asseguram a entrada de nutrientes (MEDEIROS, 2011).

Conforme Kasnowski et al. (2010), a maturação do biofilme ocorre logo após a adesão irreversível, no qual esta estrutura altamente hidratada é constituída pela EPS e por canais por onde circulam água e nutrientes e por onde são removidos os restos metabólitos. Quando o biofilme atinge uma espessura final específica e o equilíbrio dinâmico é alcançado, ocorre o despreendimento das camadas mais externas do biofilme, dispersando bactérias em seu estado planctônico que podem colonizar novas superfícies, formando novos biofilmes.

## IMPORTÂNCIA CLÍNICA DOS BIOFILMES

O uso de dispositivos biomédicos tem se tornado indispensável em praticamente todas as áreas da medicina, devido à necessidade de substituição e reparação das funções biológicas. Embora sejam sofisticados, estes dispositivos estão sujeitos à colonização por microrganismos e ao desenvolvimento de biofilmes com conseqüente infecção (TRENTIN et al., 2013). Assim, o impacto da formação de biofilmes em implantes médicos é muito significativo, uma vez que os mesmos causam traumas para os pacientes, aumentam os custos do tratamento e, ainda, aumentam o risco de morbidade e mortalidade (MEDEIROS, 2011).

Os principais dispositivos biomédicos nos quais os biofilmes desenvolvem-se são os cateteres venosos centrais, válvulas cardíacas, dispositivos de assistência ventricular, endoproteses coronarianas, implantes de estimulação neurológica, próteses articulares e os dispositivos para fixação de fraturas (CRESPO; FERNÁNDEZ, 2014).

Além disso, uma ampla variedade de infecções humanas é causada pela capacidade que os biofilmes têm de se formarem em tecidos vivos, sendo, nestes casos, comumente conhecidos como biofilmes de mucosa. Exemplos clássicos de biofilmes de mucosas são as otites e rinossinusites crônicas, uretrite, cistite, vaginite e, principalmente, infecção pulmonar crônica por *P. aeruginosa*, que em geral atinge pacientes com fibrose cística. Os critérios clínicos de infecções por biofilmes de mucosas incluem: sinais e sintomas de infecção com cultura negativa, cronicidade ou recorrência periódica com exacerbações e remissões clínicas e, ainda, resistência aos antimicrobianos (MOREIRA, 2011).

Diminuir ou evitar a formação de biofilmes em materiais biológicos é praticamente impossível, devendo-se restringir ao mínimo seu uso ou, ainda, por um tempo limitado. Entretanto, estudos vêm sendo realizados a fim de se desenvolverem métodos que reduzam ou impeçam a formação de

biofilmes em implantes biomédicos. Já se demonstrou que cateteres revestidos de antimicrobianos não previnem a formação de biofilmes, contudo possuem uma ação limitada sobre os mesmos, e o uso de correntes elétricas em baixas intensidades aumenta a sensibilidade aos antibióticos em modelos experimentais (PASTERNAK, 2009). A detecção de cepas produtoras de biofilmes também se torna de grande relevância clínica, uma vez que torna possível estabelecer políticas de controle que permitam evitar a formação destas estruturas bacterianas (CASSANEGO et al., 2013).

### *P. AERUGINOSA*: IDENTIFICAÇÃO

*A. P. aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo pertencente à família *Pseudomonadaceae*. Trata-se de uma bactéria aeróbica, não fermentadora da glicose (com metabolismo oxidativo) e móvel através de uma flagelação polar. Sua temperatura ótima de crescimento varia entre 37°C e 42°C e, em meios de cultura, produzem os pigmentos pioverdina, piocinina, piorrubina e piomelanina (FERREIRA, 2009).

A associação dos pigmentos piocianina com o pioverdina resulta na coloração esverdeada, característica comum à maioria das cepas de *P. aeruginosa*. É um microrganismo indol-fenol oxidase, arginina di-hidrolase e catalase positivas e lisina e ornitina descarboxilase negativas (BERNARDO, 2009).

### IMPORTÂNCIA CLÍNICA DE *P. AERUGINOSA*

Encontrada em diversos ambientes, como plantas, solo, água e, inclusive, em seres humanos, se comporta como patógeno oportunista ou como sendo parte da microbiota normal de indivíduos saudáveis (FERREIRA, 2009). Contudo é considerada de grande relevância clínica, uma vez que é dos principais agentes envolvidos em infecções nosocomiais, particularmente em imunocomprometidos, tendo como sítios de infecção o trato respiratório, urinário, podendo inclusive causar bacteremias, bem como elevadas taxas de morbimortalidade em pacientes portadores de fibrose cística (FC) (OCHOA et al., 2013). Nestes pacientes a infecção por este microrganismo frequentemente adquire caráter de cronicidade, devido a uma alteração fenotípica pela produção do polissacarídeo alginato, o qual provoca uma intensa resposta inflamatória levando a uma aceleração da perda funcional pulmonar (SILVA FILHO et al., 2013).

A persistência de *P. aeruginosa* em FC está associada a uma diversificação genética em fenótipos especializados devido às condições hostis impostas a este agente bacteriano nas vias respiratórias, como competição entre espécies, estresse oxidativo, ação do sistema imunológico, tratamento com antimicrobianos, entre outros, levando à formação de isolados mucoides e altamente resistentes aos antibióticos (SOUSA; PEREIRA, 2014).

Quando analisada a patogenicidade da *P. aeruginosa*, a produção de fatores de virulência como proteases, adesinas, flagelo, formação de biofilmes e fenótipo mucóide, associados à sua elevada taxa

de resistência aos antimicrobianos, estão entre os principais fatores que dificultam a erradicação deste patógeno nos tecidos infectados, culminando em altos índices de mortalidade (BERNARDO, 2009).

## MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE *P. AERUGINOSA*

As infecções fatais por *P. aeruginosa* têm sido relacionadas à capacidade deste microrganismo de formar biofilmes, através da colonização crônica, onde ocorre a conversão do fenótipo não mucoide para o mucoide, sendo este capaz de secretar uma grande quantidade de exopolissacarídeo altamente viscoso, composto, particularmente por alginato, ácidos nucleicos e proteínas (PINTO, 2011). Por serem bactérias ubíquas são facilmente encontradas em quase todos os ambientes e apresentam grande capacidade de formação de biofilmes, particularmente em ambientes úmidos (FREITAS et al., 2010).

Desta forma, a *P. aeruginosa* é capaz de formar monocamadas de células em superfícies bióticas ou abióticas após 4 horas de contato (CAIXETA et al., 2012), sendo este mecanismo mediado pela co-difusão de genes localizados em três operons independentes: *psl*, *pel* e *algU* (OCHOA et al., 2013), este último o principal regulador positivo da síntese do alginato e referido com o principal componente da matriz extracelular de biofilmes (FRIEDMAN; KOLTER, 2004). A regulação de genes envolvidos na síntese do alginato depende de inúmeros fatores ambientais, podendo-se citar: concentração elevada de oxigênio, alta osmolaridade, presença de etanol, entre outros (LAVERTY et al., 2014).

O gene *pel* codifica a produção de um polissacarídeo rico em glicose, denominado Pel polissacarídeo, enquanto o gene *psl* tem a função de codificar um polissacarídeo rico em manose, chamado Psl polissacarídeo, ambos necessários para a formação do biofilme. Além disso, acredita-se que moléculas de DNA extracelular (eDNA) também estariam envolvidas na ligação bacteriana, interconexão entre células e na formação de macrocolonias durante o desenvolvimento de biofilmes de *P. aeruginosa* (YANG et al., 2011).

AlgU, um antifator para o gene *mucA* atua em conjunto com proteínas mucóides MucA e MucB, as quais formam um complexo e alteram o sinal de transcrição de *algU*, mantendo baixa a atividade transcricional do mesmo. Desta forma, enquanto o gene *algU* é regulador positivo na produção de alginato, as proteínas MucA e MucB inibem a produção de biofilmes ao controlarem a transcrição e síntese dos componentes do alginato (PULCRANO et al., 2012), dentre eles pode-se citar os genes *algK* e *algL* (McINTYRE-SMITH et al., 2010).

Ainda de acordo com este autor, mutações ou inativações no gene *mucA* resultariam na formação de colônias fenotipicamente com características mucoides em agar, posteriormente observado por Pucrano et al. (2012), ao analisar amostras de pacientes com fibrose cística, relataram que a maior parte das cepas mucoides coletadas apresentavam mutações neste gene e culminaram com aumentos claros nos níveis de transcrição do gene *algU*.

O gene *algL* é responsável pela síntese de Alginato ligase (AlgL), cuja função é romper o exopolissacarídeo, clivando as ligações entre os resíduos do uronato no polímero. Alguns estudos sugerem que a administração de AlgL em biofilmes de *P. aeruginosa* resultaria na despolimerização do alginato e uma redução da integridade do biofilme. Assim, um *knockout* no gene *algL* seria responsável pela perda do fenótipo mucóide de *Pseudomonas aeruginosa*, o qual está associado com uma alta produção de alginato (McINTYRE-SMITH et al., 2010).

Neste sentido, inúmeros estudos foram realizados a fim de observar a importância do alginato em biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*. McIntyre-Smith et al. (2010), ao buscar avaliar a necessidade do alginato como fator para produção de biofilmes de *P. aeruginosa*, promoveram mutações nos genes *algU* e *algL* e compararam a capacidade de desenvolvimento do biofilme em relação à cepa padrão do tipo selvagem PA01. Os autores observaram que ambas as cepas mutantes apresentaram desenvolvimento de biofilmes, mas a um ritmo mais lento do que a cepa selvagem PA01, demonstrando, desta forma, que a síntese de alginato não seria um atributo necessário para a formação de biofilmes de *P. aeruginosa*. Contudo, os menores níveis de crescimento da cepa mutante *algU* podem ser explicados pela descoberta de que a cepa exibe uma redução na capacidade de fixação e o biofilme apresenta uma estabilidade prejudicada em relação à cepa padrão, cuja redução não é devido à sua ação sobre o alginato, mas pela regulação da produção Psl, também componente integral do biofilme de *P. aeruginosa*, o qual promove a integração célula a célula e a formação de uma matriz na qual as bactérias se aderem ao biofilme. Assim, mutações no gene *algU* demonstraram reduzir a produção de EPS, bem como a expressão de *Psl* e mRNA (McINTYRE-SMITH et al., 2010).

Embora aja como componente estrutural de biofilmes, alguns estudos têm buscado averiguar se este componente está envolvido na patogênese de *P. aeruginosa*, ou seja, se Psl é capaz de induzir ou inibir a resposta imunológica no hospedeiro. Com este propósito, Byrd et al. (2010), ao suporem que a Psl seria capaz de proteger o microrganismo do ataque pelas células do hospedeiro, observaram que o Psl promove a fixação inicial da bactéria e aumenta as interações entre as células epiteliais e da bactéria durante a infecção e, desta maneira, medeia a inflamação através da flagelina, esta sendo caracterizada por uma subunidade flagelar que, além de promover a motilidade bacteriana, também induz a sinalização de substâncias pró-inflamatórias, resultando na síntese de NF- $\kappa$ B, o que causa a inflamação. Isso porque os receptores *Toll-like* (TLR) encontrados em células de mamíferos reconhecem a flagelina e ao se ligarem aos mesmos promovem sua ativação, mobilizando o fator nuclear NF- $\kappa$ B e estimula a produção do  $\alpha$ -TNF (HAYASHI et al., 2001).

Em relação ao gene *algL*, os autores relataram que um *knockouts* na mesma promoveu aumentos claros do conteúdo do biofilme, incitando, assim, sua síntese ao longo de 3 dias na cepa mutante *algL*. Isso pode ser explicado por experimentos que sugeriram que a alginato liase é utilizada para remover o excesso de alginato periplasmático que não conseguiu ser exportado para o meio extracelular (McINTYRE-SMITH et al., 2010). Assim, McIntyre-Smith et al. (2010) supõem que um excesso de



alginato produzido poderia eventualmente ser exportado para a matriz extracelular, aumentando sua disponibilidade e incitando o aumento da síntese do biofilme na cepa mutante *algL* ao longo de 3 dias.

A *P. aeruginosa* produz um tipo particular de flagelo denominado pili do tipo IV (T4P), que são estruturas filamentosas localizadas nos polos da bactéria, que através de movimentos de relaxamento e contração promovem o deslocamento da bactéria em uma superfície sólida, sendo este movimento chamado de *twitching motility* (McINTYRE-SMITH et al., 2010). Assim, essa motilidade através de espasmos, mediada por esta estrutura, é o meio utilizado pela bactéria para promover a transição da adesão reversível para irreversível durante a produção de biofilmes (BIERHALS, 2010). Além disso, a importância do T4P se deve ao fato de os mesmos estarem envolvidos em outros mecanismos no processo de formação de biofilmes, como formação de microcolônias, agregação bacteriana, receptor de fagos, evasão da resposta imune e sinalização celular (OCHOA et al., 2013).

Em pacientes com fibrose cística, as cepas de *P. aeruginosa* inicialmente apresentam fenótipo móvel, cujos flagelos desempenham papel fundamental no estabelecimento da infecção ao promoverem a adesão ao epitélio pulmonar. Todavia, à medida que a doença progride, ocorre conversão para o fenótipo não-móvel e mucoide, demonstrando que a perda do flagelo está relacionada à produção excessiva de alginato, isso porque a biossíntese do flagelo, mediada pelo gene *fleQ*, é inversamente regulada pelo fator *algU* (TART et al., 2005). Essa afirmação foi corroborada por Pulcrano et al. (2012) ao observarem redução da motilidade em cepas mucoides que apresentaram mutações no gene *mucA*, o que conduziu a uma desregulação de *algU*, com consequente aumento da síntese de alginato.

Além da repressão de genes flagelares, foram identificados uma grande variedade de fatores envolvidos na transcrição e síntese de biofilmes, tais como genes reguladores da resposta ao estresse, como *rpoS*, hiper-expressão de genes para proteínas ribossomiais, além de funções relacionadas ao metabolismo e transporte (SOUSA; PEREIRA, 2014).

### *QUORUM SENSING EM P. AERUGINOSA*

Outro fator que medeia a produção de biofilmes é o *Quorum Sensing* (QS), caracterizado por um sistema de comunicação que associa o crescimento populacional bacteriano com a liberação de moléculas sinalizadoras autoindutoras, ou seja, à medida que ocorre aumento da densidade bacteriana mais moléculas autoindutoras são produzidas, as quais induzem a expressão de genes específicos envolvidos na formação do biofilme, como motilidade, virulência, produção do EPS (TRENTIN et al., 2013).

Em *P. aeruginosa*, a principal molécula sinalizadora autoindutora é a *N*-acil-homoserina-lactona (HSL), sendo que a mesma medeia dois sistemas distintos de QS encontrados neste microrganismo, denominados Las e Rhl, cuja organização é hierarquizada onde o QS Las controla o QS Rhl (CHRISTENSEN et al., 2007).

Ambos os sistemas são compostos por uma proteína reguladora transcricional: LasR e RhlR, as quais controlam a transcrição de inúmeros genes; e, por uma enzima sintetase auto-indutora: LasI e RhlI, que sintetizam, respectivamente, as moléculas auto-indutoras *N*- (3-oxododecanoyl)- 1 -homo-serina lactona (3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL) e *N*-butiril-1 -homo-serina lactona (C4-HSL) (MÚH et al., 2006). O aumento da densidade populacional bacteriana é diretamente proporcional à síntese de 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL, também conhecido como autoindutor III, assim, quando este atinge um limiar de concentração, o mesmo se liga à sua proteína alvo específica LasR, desencadeando a expressão de vários fatores de virulência, controlados pelo sistema QS Las. Estes genes incluem os responsáveis pela produção de inúmeras enzimas como a exotoxina A (*toxA*) elastase (*lasB*), protease LasA (*lasA*) e a protease alcalina (*aprA*). A ativação do sistema Las também resulta na ativação do QS Rhl, levando à produção de uma segunda molécula autoindutora, já descrita anteriormente como C4-HSL (LAVERTY et al., 2014).

O sistema Rhl é responsável pela produção de biossurfactantes anfifílicos, conhecidos como rhamnolipídeos, que nos últimos estágios do desenvolvimento de biofilmes, auxilia na manutenção de macrocolonias. A via Rhl é responsável, ainda, pela síntese de enzimas extracelulares e metabólitos secundários tais como piocianina, pioverdina e cianeto de hidrogênio (LAVERTY et al., 2014). Embora os sistemas Las e Rhl sejam regulados por fatores de transcrição diferentes, ambos, aparentemente, não possuem funções independentes. Isso porque tem se demonstrado que ambos os sistemas controlam a transcrição de *lasB*, gene que codifica o principal fator de virulência, uma elastase denominada LasB (McKNIGHT et al., 2000).

A elastase LasB desempenha um importante papel na patogênese de *P. aeruginosa* ao promover a destruição do tecido pulmonar através do aumento da permeabilidade paracelular, com consequente ruptura da barreira epitelial (NOMURA et al., 2014). Também é capaz de inativar a resposta imunológica do hospedeiro, ao degradar vários componentes da resposta inata ou adaptativa como citocinas, quimiocinas, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL 8, peptídeos com atividade antibacteriana e SP-A. Este último é relatado como componente importante do sistema inato pulmonar, que promove a ativação de células fagocíticas e regula positivamente a síntese de receptores de superfície celular envolvidos com o reconhecimento do antígeno (KUANG et al., 2011).

A *P. aeruginosa* é capaz ainda de produzir uma terceira molécula de sinalização, 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona, chamada de Sinal de Quinolonas produzidas por *Pseudomonas* (SQP) (KIEVIT, 2009). Esta molécula estabelece uma importante relação com os demais sistemas de QS descritos anteriormente, uma vez que a produção deste sinal intercelular ocorre apenas na presença de LasR e é capaz de induzir à transcrição de *lasB* em *P. aeruginosa*. Todavia, demonstrou-se que a produção de SQP é independente da densidade populacional bacteriana, uma vez que sua síntese foi máxima durante a fase estacionária tardia (McKNIGHT et al., 2000).

Apresentando uma resposta imunomoduladora, a molécula 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL demonstrou induzir a apoptose de neutrófilos, inibir a liberação da citocina IL-12 e produção do Fator  $\alpha$  de Necrose Tumoral

( $\alpha$ -TNF), além de suprimir a proliferação de linfócitos T, função esta também desempenhada por SQP. Assim, ambas as moléculas atuam como fatores de virulência ao reduzir a ação de sistema imunológico do hospedeiro (CHRISTENSEN et al., 2007).

Estudos têm mostrado que QS defeituosos comprometem a formação de biofilmes por *P. aeruginosa*, o que implicou a utilização de substâncias denominadas Inibidores de *Quorum Sensing* (QSI) e que poderiam ser administrados em combinação com antimicrobianos, reduzindo, desta maneira, a resistência observada em biofilmes (CADY et al., 2012). Com este propósito, Müh et al. (2006), ao utilizarem antagonistas de 3-oxo-C12-HSL, observaram que os mesmos promoveram a inibição do QS, afetando a expressão da maioria dos genes dependentes de LasR, inclusive inibiram a produção de fatores de virulência como elastase e piocianina. Posteriormente, Brackman et al. (2011) testaram a suscetibilidade de biofilmes de *P. aeruginosa in vitro* através da co-administração de antibióticos e QSI, sugerindo que, embora este não tenha ação bactericida, ou bacteriostática, os QSI influenciaram na formação do biofilme ou de sua matriz, o que pode explicar o aumento da suscetibilidade observada nos biofilmes testados.

Hentzer et al. (2003) testaram a eficácia de furanona C-30 frente aos biofilmes de *P. aeruginosa*, observando que, embora a transcrição dos genes *lasR-lasI* e *rlhR-rlhI* não tenha sido significativamente afetada pela C-30, ocorreu a supressão parcial ou total de vários genes que expressam os fatores de virulência extracelulares controlados pelos QS. Dentre estes genes incluem-se: o *lasB*, gene que codifica a elastase, *lasA*, que codifica protease, o *rhlAB* para a produção ramnolipídio, o *phzA-G*, que codifica a biossíntese do fenazino, o *hcnABC* para a produção de cianeto de hidrogênio e o *chiC*, gene que codifica a atividade de quitinase. Ainda neste contexto, os autores testaram o sinergismo entre a furanona C-30 com a tobramicina, um aminoglicosídeo utilizado no tratamento de pacientes com fibrose cística, demonstrando um aumento significativo da sensibilidade do antimicrobiano quando em comparação ao grupo controle não tratado com C-30.

O'Loughlin et al. (2013) também observaram a supressão da expressão de genes que codificam fatores de virulência, bem como a formação de biofilmes e proteção do epitélio pulmonar contra a ação de *P. aeruginosa*, através do uso de substâncias anti-QS, neste caso a meta-bromo-tiolactona (mBTL). Ainda relataram a inibição parcial dos receptores do QS LasR e RhlR, sendo o primeiro de grande relevância clínica pois é o que desencadeia a cascata do QS.

De modo geral, a expressão gênica é diferenciada de acordo com o tipo de célula (planctônica ou sésil) e de acordo com a fase de crescimento (exponencial ou estacionária). Assim, o conjunto de genes expressados na fase estacionária de células planctônicas e em culturas de biofilmes relaciona-se ao metabolismo e tradução, e apresentam uma baixa regulação, correspondendo a um baixo crescimento populacional. Os genes envolvidos na síntese de flagelos (como *flg*, *fli*) e o pili tipo IV que media a motilidade (*pil*, *fim*) e fatores de virulência dependentes do QS, como elastase (*lasA* e *lasB*) e ramnolipídeos (*rhlAB*) e *rhlC*), são regulados nas fases estacionárias de ambos tipos celulares.

Uma possível explicação para essa regulação dos genes ocorrer nestas etapas pode ser resultado do efeito combinado do QS com a deficiência nutricional. Os genes que codificam a produção dos principais componentes da matriz EPS, Psl e alginato, são regulados nas etapas estacionárias de células planctônicas e no biofilme. Em contraste, entre os genes encontrados especificamente em biofilmes está o *pel*, além dos genes envolvidos na adaptação ao crescimento em ambientes de microaerofilia e no sistema de secreção do tipo III (T3SS), o qual medeia a citotoxicidade através da translocação de exotoxinas para as células hospedeiras (DÖTSCH et al., 2012).

## MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM BIOFILMES DE *P. AERUGINOSA*

A elevada resistência observada em biofilmes é de origem multifatorial natural, resultado da combinação de diversos mecanismos, incluindo restrição na penetração de antimicrobianos garantida pela matriz EPS, baixo crescimento bacteriano no interior do biofilme causado pela restrição nutricional e deficiência de oxigênio, acúmulo de resíduos metabólicos e pelo sistema QS (SOUSA; PEREIRA, 2014).

Embora o alginato seja um componente essencial para garantir a integridade do biofilme (DIAZ et al., 2011), estudos, como o de McIntyre-Smith et al. (2010), comprovaram que o mesmo não é um atributo necessário para a formação de biofilmes de *P. aeruginosa*. Entretanto, acredita-se que o alginato seja o responsável pela resistência aos antimicrobianos observada em biofilmes, particularmente de *P. aeruginosa*. Isso porque, ao ser carregado negativamente, o mesmo acaba sequestrando ou neutralizando o efeito de antimicrobianos carregados positivamente. Em contrapartida, antimicrobianos destituídos de carga elétrica, não sofrem os efeitos neutralizantes do alginato, podendo ser por esta razão que o ciprofloxacino apresente menor resistência clínica quando comparado à gentamicina (AITKEN et al., 2011).

Semelhantemente, o eDNA, componente já descrito e que atua na estrutura dos biofilmes, também age promovendo maior tolerância aos biofilmes frente aos antimicrobianos. Isso porque também neutraliza os efeitos de antimicrobianos carregados positivamente, como os aminoglicosídeos, atuando como um escudo e impedindo a ação direta dos mesmos sobre os biofilmes, garantindo, portanto, sua proteção (CHIANG et al., 2013).

Já Cotton et al. (2011) demonstraram que administração da enzima alginato ligase (AlgL) em biofilmes de *P. aeruginosa* PA01 resultou na redução da sobrevivência de células quando expostas à gentamicina, estabelecendo, deste modo, uma importante relação entre o EPS com o perfil de resistência ao antimicrobiano. Isto porque esta enzima é capaz de romper o EPS, clivando as ligações entre os resíduos do uronato no polímero, causando a despolimerização do alginato e uma redução da integridade do biofilme e, em contrapartida, um *knockout* no gene *algL* (gene que codifica a síntese desta enzima) é responsável por aumentos claros do conteúdo do biofilme,

ao incitar um aumento da síntese de alginato e por consequência promover a formação do biofilme de *P. aeruginosa* (McINTYRE-SMITH et al., 2010).

Vale ressaltar que biofilmes de *P. aeruginosa* têm demonstrado elevados níveis de resistência intrínseca e adquirida a diversas substâncias com atividade antimicrobiana. Dentre os mecanismos pelos quais a *P. aeruginosa* pode tornar-se resistente aos antimicrobianos pode-se citar: síntese de  $\beta$ -Lactamases de espectro ampliado e Metallo-  $\beta$ -Lactamases, alteração das Proteínas Ligadoras de Penicilina (PBP), mutação de porinas, bombas de efluxo, mutação das DNA-girase (OCHOA et al., 2013).

As Beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) são caracterizadas como enzimas de resistência que apresentam ação sobre os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, sendo, de maneira geral, capazes de hidrolisar e inativar uma ampla variedade de antimicrobianos, entre eles: penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta geração e o monobactâmico aztreonam (SILVA JÚNIOR, 2014). Não obstante, bactérias produtoras de ESBL exibem co-resistência a outras classes de antimicrobianos, limitando ainda mais as opções terapêuticas disponíveis (SHAIKH et al., 2015). Desta maneira, a expressão de múltipla resistência a antibacterianos por *P. aeruginosa* torna difícil sua erradicação, culminando, conseqüentemente, com elevados índices de morbidade e mortalidade (NEVES et al., 2011).

Outros fatores que podem contribuir para a elevada resistência é o fato de que em biofilmes de *P. aeruginosa* encontram-se subpopulações com perfis metabólicos ativos e inativos. Essa perspectiva fornece evidências de que as bactérias ali existentes apresentem padrões fenotípicos distintos de susceptibilidade frente aos diversos antimicrobianos. Considerando que a subpopulação ativa exibe sensibilidade aos compostos antimicrobianos convencionais, como ciprofloxacino, tetraciclina e tobramicina, a subpopulação inativa sobrevive a este tratamento. O fato de os antimicrobianos convencionais interferirem em etapas vitais bacterianas, como replicação, transdução e transcrição, pode explicar por que eles preferencialmente agem sobre microorganismos metabolicamente ativos (CHIANG et al., 2012). Contrariamente, foi constatada tolerância à colistina unicamente entre a subpopulação de células metabolicamente ativas devido à expressão dos genes *pmr* e *mexAB-oprM*, que codificam a síntese do sistema LPS-modificado e a bomba de efluxo de antimicrobianos, respectivamente. O sistema LPS-modificado consiste de alterações na matriz de lipopolissacarídeo que diminuem a carga global negativa da superfície exterior bacteriana e, conseqüentemente, a interação com colistina, através da adição de aminoarabinose ao lípido A, o que reduz a permeabilidade da membrana externa. Em contraste, a subpopulação bacteriana inativa, que não é capaz de induzir a expressão de genes, foi morta pela colistina, demonstrando, desta forma que diferentes determinantes genéticos interferem diretamente no potencial de resistência aos antimicrobianos em biofilmes de *P. aeruginosa* (PAMP et al., 2008).

Embora a base de resistência a antimicrobianos ainda não esteja totalmente esclarecida, é provável que vários mecanismos operem simultaneamente em biofilmes para contribuir para sua resistência aos mesmos (MULCAHY et al., 2008).

## CONCLUSÃO

Este estudo proporcionou um grande conhecimento a respeito dos mecanismos moleculares que regulam a formação de biofilmes por *P. aeruginosa*. Foi verificado que a síntese do mesmo é um processo complexo que envolve a codificação de inúmeros genes, os quais culminam com a formação de compostos, proteínas e ainda fatores de virulência que garantem um maior potencial de patogenicidade ao biofilme.

Deste modo, um profundo entendimento dos mecanismos moleculares é fundamental para criar formas que bloqueiem a codificação dos referidos genes ou ainda pode ser utilizada para desenvolver compostos antagônicos que mimetizem a ação dos fatores de virulência, causando alterações na estabilidade dos biofilmes. Isso pode representar um importante progresso na erradicação e prevenção de biofilmes ao elucidar formas de torná-los mais suscetíveis tanto à ação do sistema imune quanto pela redução da tolerância aos antimicrobianos convencionais.

## REFERÊNCIAS

AITKEN, E. et al. Different compositions of biofilm extracellular polymeric substance reveals contrasting antibiotic resistance profiles in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology**, v. 15, p. 79-83, 2011.

BARBOSA, J. O. **Avaliação dos efeitos de *Streptococcus mutans* sobre formação de biofilme e morfogênese de *Candida albicans* in vitro e estudo experimental em *Galleria mellonella***. 2014. 84f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, Área Microbiologia/Imunologia, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2014.

BERNARDO, S. P. C. **Avaliação da Suscetibilidade a Antimicrobianos e Formação de Biofilmes em *Pseudomonas aeruginosa* Isoladas de água Mineral**. 2009. 70f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2009.

BIERHALS, C. G. **Análise da formação de biofilmes por isolados clínicos e caracterização do gene *wspR* de *Acinetobacter* spp.** 2010. 52f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Farmácia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

BRACKMAN, G. et al. Quorum Sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics *in vitro* and *in vivo*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 2655-2661, 2011.

BURMØLLE, M. et al. Biofilms in chronic infections - a matter of opportunity - monospecies biofilms in multispecies infections. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v. 59, p. 324-336, 2010.

BYRD, M. S. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharide Psl facilitates surface adherence and NF- $\kappa$ B activation in A549 cells. **mBio American Society Microbiology Journal**, v. 1, n. 3, p. 1-4, 2010.

CADY, N. C. et al. Inhibition of biofilm formation, quorum sensing and infection in *Pseudomonas aeruginosa* by natural products-inspired organosulfur compounds. **PLOS ONE Journal Information**, v.7, n. 6, p. 1-12, 2012.

CAIXETA, D. S. et al. Chemical sanitizers to control biofilms formed by two *Pseudomonas* species on stainless steel surface. **Ciência. Tecnologia dos Alimentos**, v. 32, n. 1, p. 142-150, 2012.

CASSANEGO, A. P. et al. Virulência e formação de biofilme microbiano por *Enterococcus faecalis* isolados de swabs cloacais de frangos de corte infectados com *Eimeria* spp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 1433-1440, 2013.

CHIANG, W. C. et al. Extracellular DNA Shields against Aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2352-2361, 2013.

CHIANG, W. C. et al. The metabolically active subpopulation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms survives exposure to membrane-targeting antimicrobials via distinct molecular mechanisms. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v. 65, p. 245-256, 2012.

CHRISTENSEN, L. D. et al. Impact of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing on biofilm persistence in an in vivo intraperitoneal foreign-body infection model. **Microbiology**, v. 153, p. 2312-2320, 2007.

COSTA, J. C. M. et al. Increase in biofilm formation by *Escherichia coli* under conditions that mimic the mastitic mammary gland. **Ciência Rural**, v. 44, n. 4, p. 666-671, 2014.

COTTON, L. A.; GRAHAM, R. J.; LEE, R. J. The role of alginate in *P. aeruginosa* PAO1 biofilm structural resistance to gentamicin and ciprofloxacin. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology**, v. 13, p. 58-62, 2009.

CRESPO, J. M. C.; FERNÁNDEZ, C. R. Nueva formulación de antibióticos nanoencapsulados para la eliminación de biofilmes en clínica. **Reduca**, v. 6, n. 1, p. 293-299, 2014.

DIAZ, E. et al. Role of alginate in gentamicin antibiotic susceptibility during the Early stages of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm establishment. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology**, v. 15, p. 71-78, 2011.

DÖTSCH, A. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* transcriptome in planktonic cultures and static biofilms using RNA sequencing. **PLOS ONE Journal Information**, v. 7, n. 6, p. 1-11, 2012.

FERREIRA, J. A. B. **Diversidade genética, perfil de resistência aos antimicrobianos e produção de biofilme de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas da água utilizada em unidades de terapia renal substitutiva**. 2009. 63f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2009.

FREITAS, V. R.; SAND, S. T. V.; SIMONETTI, A. B. Formação in vitro de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na superfície de canetas odontológicas de alta rotação. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 39, n. 4, p. 193-200, 2010.

FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 675-690, 2004.

HAÜSSLER, S.; BECKER, T. The *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS) balances life and death in *Pseudomonas aeruginosa* populations. **PLOS Pathogens Journal Information**, v. 4, n. 9, p. 1-8, 2008.

HAYASHI, F. et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. **Nature**, v. 410, n. 6832, p. 1099-10103, 2001.

HENTZER, M. et al. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v. 22, n. 15, p. 3803-3815, 2003.

HUYNH, T. T. et al. Glucose starvation-induced dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is cAMP and energy dependent. **PLOS ONE Journal Information**, v. 7, n. 8, p. 1-14, 2012.

KASNOWSKI, M. C. et al. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 8, n. 15, p. 1-23, 2010.



KIEVIT, T. R. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 279-288, 2009.

KUANG, Z. et al. *Pseudomonas aeruginosa* elastase provides an escape from phagocytosis by degrading the pulmonary surfactant protein-A. **PLOS ONE Journal Information**, v. 6, n. 11, p. 1-14, 2011.

LAVERTY, G.; GORMAN, S. P.; GILMORE, B. F. Biomolecular mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilm formation. **Pathogens**, v. 3, p. 596-632, 2014.

McINTYRE-SMITH, A.; SCHNEIDERMAN, J.; ZHOU, K. Alginate does not appear to be essential for biofilm production by PAO1 *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology**, v. 14, p. 63-68, 2010.

McKNIGHT, S. L.; IGLEWSKI, B. H.; PESCI, E. C. The *Pseudomonas* Quinolone Signal regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 10, p. 2702-2708, 2000.

MEDEIROS, A. W. **Avaliação dos fatores de virulência e capacidade de formação de biofilme *in vitro* em isolados alimentares e clínicos de *Enterococcus* sp e utilização de PCR-RFLP para a identificação de *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus gallinarum***. 2011. 116f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

MOREIRA, C. A. **Atividade *in vitro* de agentes antimicrobianos contra biofilmes de *Staphylococcus* spp. de otite canina**. 2011. 103f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) - Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

MÜH, E. et al. Novel *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing inhibitors identified in an ultra-high-throughput screen. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 11, p. 3674-3679, 2006.

MULCAHY, H.; CHARRON-MAZENOD, L.; LEWENZA, S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **PLOS Pathogens Journal Information**, v. 4, n. 11, p. 1-12, 2008.

NEVES, P. R. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 409-420, 2011.

NOMURA, K. et al. *Pseudomonas aeruginosa* elastase causes transient disruption of tight junctions and downregulation of PAR-2 in human nasal epithelial cells. **Respiratory Research**, v. 15, n. 21, p. 1-15, 2014.

O'LOUGHLIN, C. T. et al. A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 44, p. 17981-17986, 2013.

OCHOA, S. A. et al. Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. **Boletín Médico del Hospital Infantil de México**, v. 70, n. 2, p. 138-150, 2013.

OLIVEIRA, M. M. M. de. **Óleos essenciais no controle de biofilmes bacterianos: Listeria monocytogenes e Escherichia coli enteropatogênica**. 2011. 138p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

PAMP, S. J. et al. Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the *pmr* and *mexAB-oprM* genes. **Molecular Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 223-240, 2008.

PASTERNAK, J. Biofilmes: um inimigo (in)visível. **Revista Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação**, p. 36-39, 2009.

PEDROSA, A. P. et al. Pesquisa de fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de águas minerais naturais. **Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 9, n. 2, p. 313-324, 2014.

PEREIRA, A. de A. **Estudo da atividade bactericida de óleos essenciais sobre células planctônicas e sésseis de Salmonella spp.** 2014. 94p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

PINTO, C. C. F. **Avaliação da penetração de agentes antimicrobianos em biofilme de *Staphylococcus* spp. e *Pseudomonas aeruginosa***: considerações físico-químicas. 2011. 87f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

PULCRANO, G. et al. Different mutations in *mucA* gene of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid strains in cystic fibrosis patients and their effect on *algU* gene expression. **New Microbiologica**, v. 35, p. 295-305, 2012.

RODRIGUES, A. V. F. **Phenotypic profiling of several strains of *Pseudomonas aeruginosa***: identification of potential virulence determinants. Braga, Portugal, 2014. 76 p. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica) - Escola de Engenharia, Universidade do Minho.

SHAIKH, S. et al. Prevalence of multidrug resistant and extended spectrum beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, p. 62-64, 2015.

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

SILVA JÚNIOR, V. V. **Detecção molecular de beta-lactamases de espectro estendido em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de hospital público de Pernambuco**. 2014. 67p. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

SOUSA, A. M.; PEREIRA, M. O. *Pseudomonas aeruginosa* diversification during infection development in cystic fibrosis lungs - A review. **Pathogens**, v. 3, p. 680-703, 2014.

TART, A.; WOLFGANG, M. C.; WOZNIAK, D. J. The alternative sigma factor AlgT represses *Pseudomonas aeruginosa* flagellum biosynthesis by inhibiting expression of *fleQ*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 23, p. 7955-7962, 2005.

TRENTIN, D. da S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 213-238, 2013.

WILLIAMSON, K. et al. Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms includes expression of ribosome hibernation factors in the antibiotic-tolerant subpopulation and hypoxia-induced stress response in the metabolically active population. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 8, p. 2062-2073, 2012.

YANG, L. et al. Distinct roles of extracellular polymeric substances during *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 7, p. 1705-1717, 2011.