

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**Pauline Cordenonsi Bonez**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIBIOFILME, CITO E  
GENOTÓXICA DO S-(3,4-DICLOROBENZIL) ISOTIOUREIA (A22)**

Santa Maria, RS  
2017

**Pauline Cordenonsi Bonez**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIBIOFILME, CITO E GENOTÓXICA DO S-(3,4-DICLOROBENZIL) ISOTIOUREIA (A22)**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Análises Clínicas e Toxicológicas: Desenvolvimento e Aplicação de Marcadores no Diagnóstico Laboratorial, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marli Matiko Anraku de Campos  
Coorientador: Prof. Dr. Roberto Christ Vianna Santos

Santa Maria, RS  
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bonez, Pauline Cordenonsi  
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIBIOFILME, CITO E  
GENOTÓXICA DO S-(3,4-DICLOROBENZIL) ISOTIOUREIA (A22) /  
Pauline Cordenonsi Bonez.- 2017.  
96 p.; 30 cm

Orientador: Marli Matiko Anraku de Campos  
Coorientador: Roberto Christ Vianna Santos  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2017


1. Biofilmes 2. Pseudomonas aeruginosa 3. A22 I.  
Anraku de Campos, Marli Matiko II. Christ Vianna Santos,  
Roberto III. Título.


Pauline Cordenonsi Bonez

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIBIOFILME, CITO E GENOTÓXICA DO S-(3,4-DICLOROBENZIL) ISOTIOUREIA (A22)**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Análises Clínicas e Toxicológicas: Desenvolvimento e Aplicação de Marcadores no Diagnóstico Laboratorial, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovada em 25 de agosto de 2017:

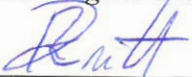
  
\_\_\_\_\_  
**Marli Matiko Anraku de Campos, Dra. (UFSM)**  
Presidente/Orientador

  
\_\_\_\_\_  
**Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UFSM)**  
Coorientador

  
\_\_\_\_\_  
**Sônia de Avila Botton, Dra. (UFSM)**

  
\_\_\_\_\_  
**Sydney Hartz Alves, Dr. (UFSM)**

  
\_\_\_\_\_  
**Paula Eliete Rodrigues Bitencourt, Dra. (URI)**

  
\_\_\_\_\_  
**Régis Adriel Zanette, Dr. (UFRGS) - Parecer**

Santa Maria, RS  
2017

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a minha família amada, minha mãe e meu irmão. Dedico também ao meu pai que infelizmente não está mais entre nós para presenciar esse momento, mas se faz necessário agradecer pelo legado que nos deixou, de amor e de luta pela educação e pela vida. Amo vocês!*

## AGRADECIMENTOS

*Antes de tudo, agradeço a Deus, pela minha vida, pela minha saúde e por sempre iluminar as minhas escolhas e guiar os meus passos.*

*Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste estudo, obrigada pelo auxílio, compreensão e dedicação. De uma maneira especial, agradeço:*

*- a Universidade Federal de Santa Maria, universidade pública e de qualidade, por me permitir desenvolver e concretizar este trabalho, tenho consciência de que muitos em nosso país não têm essa mesma oportunidade;*

*- aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) e do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT) por contribuírem de uma forma ou de outra pela conquista deste título;*

*- a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedidos;*

*- aos professores membros da banca, pela disposição e por avaliarem este trabalho. Vocês são exemplos de profissionais;*

*- a minha orientadora Marli Matiko Anraku de Campos pela oportunidade concedida, pela confiança a mim depositada desde a graduação e pela pessoa incentivadora e dedicada. Grata pela orientação e amizade;*

*- ao meu coorientador Roberto Christ Vianna Santos, pelo exemplo de educador, por todos os ensinamentos, apoio, incentivo e confiança. A você, minha admiração e gratidão.*

*- a minha mãe, Maria Izabel Cordenonsi Bonez, pelo amor maior, doação e exemplo de superação. Obrigada pela amizade, por me guiar, por me mostrar a importância do estudo e por me ajudar a ser quem sou hoje. Te amo incondicionalmente!*

*- ao meu pai Enio Bonez (saudades eternas...) pelo exemplo que nos deixou, de amor, de sabedoria e pela imensa preocupação com o nosso futuro e nossa educação. Sei que está feliz, onde quer que esteja. Te amo!*

*- ao meu irmão Mateus Cordenonsi Bonez, pela nossa história, pelo companheirismo, pelo amor, pelo apoio, pelo carinho e pela confiança. Te amo, irmão!*

*- ao meu namorado Mateus Lopes de Moraes, pelo amor, pelo carinho, pelas palavras de incentivo e pelo exemplo de determinação. Obrigada por me fazer mais feliz a cada dia e pela ajuda em todos os momentos durante essa caminhada. Te amo, meu bem!*

- à família do meu namorado, Dona Shirley Lopes, Sr Ailton de Moraes, Mariana Lopes e Arthur Klein, obrigada pelo carinho e por sempre me colocarem em suas orações;

- às minhas primas Sílvia Cordenonsi e Silvana Cordenonsi, obrigada pela ajuda e convívio, sei que posso contar sempre com vocês;

- a toda minha família, em especial à nona, por sempre rezar por mim. Obrigada tios e primos pela força e confiança depositadas em mim;

- ao meu pequeno amiguinho Shiva que sempre me acompanhou nos estudos, demonstrando o mais puro amor e carinho;

- às minhas amigas Laura Vargas, Paula Bitencourt e Márcia Prior, obrigada pelas palavras de incentivo, pela amizade e pelos momentos inesquecíveis. Sei que permaceremos unidas apesar da distância e do rumo que nossas vidas irão traçar. Amo vocês!

- aos meus queridos colegas e amigos do Labmyco (Laboratório de Micobacteriologia), Vanessa Agertt, Vanessa Flores, Caren Mizdal, Grazielle Rossi e Fallon Siqueira. Obrigada pelo convívio diário, pela amizade, pela parceria e pela ajuda. Espero encontrar pessoas como vocês em meu caminho. Contem sempre comigo.

- aos novos integrantes do Labmyco, Eloísa Dalla Nora, Viviane Somavilla, Kevim Guterres, Daniele Wille e Gabriela Vargas muito obrigada pelo convívio. Vocês são o início de uma nova fase no laboratório, confio em vocês. Podem contar comigo para o que precisarem.

- a todos os intergantes do Lapemicro (Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Oral), pela ajuda nos experimentos, ideias e discussões. Um agradecimento especial a Camilla Fillippi e a Márcia Ebling, que de colegas passaram a grandes amigas. Obrigada pelos encontros e pelas conversas de sempre gurias.

- a toda a equipe do Laboratório de Cultura Celular do Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), obrigada pela imensa ajuda e infraestrutura concedida. Meu agradecimento especial à professora Michele Sagrillo e aos alunos Kátia Nascimento, Andiara Ramos e Jardel Bandeira, sem vocês, parte desse trabalho não teria sido possível;

Por fim, a todos aqueles que fazem parte da minha vida e que são essenciais para eu ser, a cada dia, um ser humano melhor.

*E lembre-se, nunca abandone a esperança.  
A vida tem um jeito engraçado de se ajustar, espere e verá.*

*(A Casa das Orquídeas de Lucinda Riley)*



## RESUMO

### ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIBIOFILME, CITO E GENOTÓXICA DO S-(3,4-DICLOROBENZIL) ISOTIOUREIA (A22)

AUTOR: PAULINE CORDENONSI BONEZ  
ORIENTADOR: MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS  
COORIENTADOR: ROBERTO CHRIST VIANNA SANTOS

A formação de biofilmes causa grande preocupação para a saúde pública devido à baixa resposta aos tratamentos antimicrobianos e à colonização de superfícies como próteses e cateteres. Microrganismos patogênicos como *Pseudomonas aeruginosa* são capazes de formar biofilmes em dispositivos médico-hospitalares e tecidos vivos, podendo causar infecções crônicas graves em humanos. Deste modo, torna-se importante buscar alternativas eficazes contra a formação de biofilmes. O A22 inibe a proteína MreB do citoesqueleto bacteriano alterando o formato das células microbianas, o que pode afetar muitas propriedades, incluindo a motilidade e a formação de biofilmes. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar, pela primeira vez, a ação antibiofilme do A22 sobre isolados de *P. aeruginosa*, bem como os seus potenciais efeitos cito e genotóxicos. A atividade antibacteriana do A22 foi avaliada por métodos convencionais sobre cepas padrões e 28 isolados clínicos multirresistentes de *P. aeruginosa*. Os ensaios de cito e genotoxicidade foram realizados pelo teste do MTT e ensaio do Cometa, respectivamente. A capacidade de adesão dos isolados clínicos e da cepa padrão foi avaliada em placas de poliestireno. Fatores essenciais à fisiologia do biofilme de *P. aeruginosa* PAO1, como as motilidades dos tipos *swimming*, *swarming* e *twitching*, bem como a adesão às células HeLa e adesão a superfície de Polietileno de Alta Densidade (PEAD) foram avaliados na presença e na ausência do A22. A Microscopia de Força Atômica (MFA) foi utilizada para visualizar a adesão em PEAD. Este estudo ratificou a excelente atividade antimicrobiana do A22, principalmente em relação aos isolados multirresistentes. Da mesma forma, o A22 não apresentou efeitos citotóxicos sobre células mononucleares de sangue periférico humano em todos os tempos de exposição avaliados, exceto na concentração de 32µg/mL, e não demonstrou efeitos genotóxicos sobre as células após 24 e 48 horas. Os resultados mostraram um alto padrão de adesão em 14 isolados clínicos multiresistentes, sendo que o A22 inibiu a adesão de 9 destes microrganismos. O A22 conseguiu reduzir a adesão e formação de biofilmes da cepa *P. aeruginosa* PAO1 em placas de poliestireno, nas células HeLa e no PEAD. Do mesmo modo, as motilidades *swarming* e *twitching* foram significativamente diminuídas pela ação do A22 em concentrações subinibitórias. O impacto e contribuição científica deste trabalho estão alicerçados na descoberta de uma potencial nova possibilidade terapêutica contra infecções associadas a biofilmes de *P. aeruginosa*. O A22 apresentou-se como uma ferramenta útil e promissora para reduzir a adesão microbiana tanto em superfícies vivas quanto inertes, haja vista os seus baixos efeitos tóxicos. Os resultados desta tese estimulam o aprofundamento em metodologias que visem a inserção do A22 como um novo antibacteriano ou agente de revestimento de materiais médico-hospitalares.

**Palavras-chave:** A22. *Pseudomonas aeruginosa*. Motilidade. PEAD. Células HeLa. Adesão bacteriana. Biofilmes.

## ABSTRACT

### ANTIMICROBIAL, ANTIBIOFILM, CYTO AND GENOTOXIC ACTIVITIES OF S-(3,4-DICHLOROBENZYL) ISOTIOUREIA (A22)

AUTHOR: PAULINE CORDENONSI BONEZ  
ADVISER: MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS  
CO-ADVISER: ROBERTO CHRIST VIANNA SANTOS

Biofilm formation causes great public health concern due to the low response to antimicrobial treatments and the colonization of surfaces such as prostheses and catheters. Pathogenic microorganisms such as *Pseudomonas aeruginosa* are able to form biofilms in medical devices and living tissues, can cause severe chronic infections in humans. Thus, it is important to search effective alternatives against the formation of biofilms. A22 inhibits MreB protein from the bacterial cytoskeleton altering the microbial cells shape, which can affect many properties, including motility and biofilm formation. In this context, this work aimed to evaluate, for the first time, the antibiofilm action of A22 on *P. aeruginosa*, as well as their potential cyto and genotoxic effects. The antibacterial activity of A22 was evaluated by conventional methods on standard strains and 28 multiresistant clinical isolates of *P. aeruginosa*. The cyto and genotoxicity tests were performed by MTT test and Comet assay, respectively. The adhesion capacity of clinical isolates and standard strain was measured in polystyrene plates. Essential factors to the biofilm physiology of *P. aeruginosa*, such as *swimming*, *swarming* and *twitching* motility, as well as adhesion to HeLa cells and adhesion to High Density Polyethylene (HDPE) were evaluated in the presence and absence of A22. Atomic Force Microscopy (AFM) was used to visualize adhesion on HDPE substrate. This study confirmed the excellent antimicrobial activity of A22, especially in relation to multiresistant isolates. Likewise, A22 showed no cytotoxic effects on human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) at all exposure times, with exception of concentration of the 32µg/mL, and did not demonstrate genotoxic effects on the cells after 24 and 48 hours. In addition, the results showed a high adhesion pattern in 14 multiresistant clinical isolates, with inhibiting the adhesion of 9 of these microorganisms. A22 was able to decrease adhesion and biofilm formation of the *P. aeruginosa* PAO1 on polystyrene plates, HeLa cells and HDPE. Moreover, the *swarming* and *twitching* motilities were significantly decreased by A22 in subinhibitory concentrations. The impact and scientific contribution of this work are based on the discovery of a potential new therapeutic possibility against infections associated with biofilms of *P. aeruginosa*. The A22 presents as an useful and promising tool to decrease microbial adhesion in both living and inert surfaces, given its low toxic effects. However, this thesis results stimulate the deepening in methodologies that aim the insertion of A22 as a new antibacterial or coating agent on medical materials.

**Keywords:** A22. *Pseudomonas aeruginosa*. Motility. HDPE. HeLa cells. Bacterial adhesion. Biofilms.

## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO

Tabela 1 – Funções da matriz exopolissacarídica em biofilmes. ....	17
--	----

### ARTIGO 1

Table 1 – Antimicrobial activity of S-(3,4-diclorobenzil) isotiourea (A22) against strains standards.....	53
Table 2 – DNA migration in the comet assay for assessment of genotoxicity of S-(3,4-diclorobenzil) isotiourea (A22) exposition in peripheral blood mononuclear cell culture during 24, 48 and 72 hours.....	53

### ARTIGO 2

Table 1 – A22 against biofilm formation of multidrug-resistance clinical isolates of <i>P. aeruginosa</i> .....	72
Table 2 – Influence of S-(3,4-diclorobenzil) isotiourea (A22) on <i>P. aeruginosa</i> PAO1 motility.....	73

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO

Figura 1 – Biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . .....	16
Figura 2 – Estrutura do biofilme. ....	17
Figura 3 – Estágios de desenvolvimento do biofilme microbiano. ....	20
Figura 4 – Fatores que influenciam na adesão microbiana. ....	21
Figura 5 – Tipos de motilidade bacteriana. ....	22
Figura 6 – Atividade metabólica em uma microcolônia de biofilme. ....	28
Figura 7 – Estratégias antibiofilme. ....	30
Figura 8 – Proteínas do citoesqueleto e o formato celular bacteriano. ....	34
Figura 9 – Estrutura do S-(3,4-diclorobenzil) isotiourea (A22). ....	34
Figura 10 – Inibição reversível da proteína MreB pelo S-(3,4-diclorobenzil) isotiourea (A22). .....	35
Figura 11 – Efeito do S-(3,4-diclorobenzil) isotiourea (A22) sobre a célula bacteriana. ....	35

### ARTIGO 1

Fig 1 – Time-kill curve on <i>P. aeruginosa</i> PAO1 exposed to several concentrations of S-(3,4-diclorobenzil) isotiourea (A22) (based on MIC). ....	53
Fig 2 – Comparison of cytotoxicity evaluated by MTT reduction among human cells exposed to H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> and treated with S-(3,4-diclorobenzil) isotiourea (A22) in 24 hours (A), 48 hours and 72 hours (C) at different concentrations. ....	53

### ARTIGO 2

Fig 1 – Graphical representation of S-(3,4-diclorobenzil) isotiourea (A22) action on biofilm formation of <i>P. aeruginosa</i> PAO1. ....	72
Fig 2 – Atomic Force Microscopy (AFM) of biofilm in HDPE surface and biofilm inhibition by S-(3,4-diclorobenzil) isotiourea (A22). ....	73
Fig 3 – <i>P. aeruginosa</i> PAO1 bacilli adhered to HeLa cells. ....	73
Fig 4 – S-(3,4-diclorobenzil) isotiourea (A22) influence on <i>swimming</i> , <i>swarming</i> and <i>twitching</i> motility of <i>P. aeruginosa</i> PAO1. ....	74
Fig 5 – Illustration of S-(3,4-diclorobenzil) isotiourea (A22) influence on initial stage of biofilm formation. ....	75

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	12
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA .....	13
1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	14
1.3 BIOFILMES: CONCEITO, ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO .....	16
1.4 ETAPAS DA FORMAÇÃO DO BIOFILME .....	19
1.5 FATORES QUE INFLUENCIAM NA FORMAÇÃO DE BIOFILMES .....	20
<b>1.5.1 Regulação genética da formação de biofilmes em <i>P. aeruginosa</i></b> .....	23
1.5.1.1 <i>Regulação da formação de biofilme em P. aeruginosa via QS</i> .....	24
1.5.1.2 <i>Regulação da formação de biofilme em P. aeruginosa via c-di-GMP</i> .....	24
1.5.1.3 <i>Regulação da formação de biofilme em P. aeruginosa via sRNA</i> .....	25
1.6 PATOGÊNESE E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DOS BIOFILMES .....	25
1.7 ABORDAGENS TERAPÊUTICAS CONTRA BIOFILMES .....	29
<b>1.7.1 Inibição da formação do biofilme</b> .....	30
<b>1.7.2 Interferência na comunicação celular</b> .....	31
<b>1.7.3 Erradicação do biofilme formado</b> .....	32
1.8 A22 E O FORMATO DA CÉLULA BACTERIANA .....	33
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	37
2.1 OBJETIVO GERAL .....	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
<b>3 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS</b> .....	38
3.1 ARTIGO 1 .....	38
3.2 ARTIGO 2 .....	54
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	76
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	81
<b>6 PERSPECTIVAS</b> .....	82
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	83
<b>ANEXOS</b> .....	92
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (UFSM) .....	92
ANEXO B – AÇÃO DO COMPOSTO A22 SOBRE A CÉLULA BACTERIANA. ...	95

## APRESENTAÇÃO

A seção **INTRODUÇÃO** inclui uma apresentação sobre o assunto investigado e sua relevância, bem como, uma revisão bibliográfica sobre os temas discutidos nesta Tese. Os resultados encontram-se nos tópicos **ARTIGO 1** e **ARTIGO 2**, os quais englobam as seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências, representando a íntegra deste estudo. Ambos os trabalhos estão formatados de acordo com o periódico aos quais foram publicados e/ou submetidos.

Os tópicos **DISCUSSÃO**, **CONCLUSÕES** e **PERSPECTIVAS** apresentam interpretações e comentários gerais acerca do conteúdo abordado nesta tese, assim como sugestões de abordagens futuras. As **REFERÊNCIAS** remetem somente às citações que aparecem nos tópicos **INTRODUÇÃO** e **DISCUSSÃO**. Na seção **ANEXOS** encontram-se o parecer de aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e uma imagem adicional obtida neste trabalho.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

As doenças infecciosas, que no passado eram as principais causas de morte em humanos, foram aparentemente controladas com a descoberta dos agentes antimicrobianos. Contudo, durante várias décadas, os microrganismos foram adquirindo resistência a cada novo antimicrobiano descoberto, acarretando um grave problema para a saúde pública mundial (WOOLHOUSE; FARRAR, 2014).

Os microrganismos tornam-se resistentes por meio de mecanismos específicos, como a produção de enzimas que podem inativar o fármaco, alteração da permeabilidade ou absorção do medicamento, expressão de bombas de efluxo e redução do número ou afinidade aos locais de ligação do fármaco. Além disso, podem adquirir resistência pela transferência de plasmídeos (DNA extracromossômico) contendo genes de resistência e pela formação de biofilmes em superfícies (WOOLHOUSE; FARRAR, 2014; SINGH et al., 2017).

O uso abusivo e inadequado, bem como a prescrição desnecessária de antimicrobianos, contribuem de forma preponderante para o aumento da pressão seletiva sobre os microrganismos para que adquiram resistência. Além de constituir um enorme ônus financeiro aos serviços de saúde, a resistência antimicrobiana é responsável por milhares de mortes por infecções persistentes (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012).

O uso excessivo de antimicrobianos na pecuária também contribui para o aumento da resistência às infecções em humanos, pois contribui para a propagação de genes de resistência através do consumo de carne, leite ou água contaminadas (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2015). A colistina, por exemplo, é utilizada em animais e, apesar dos efeitos colaterais, é considerada um último recurso contra infecções em humanos. Descobriu-se recentemente que o gene *mcr-1*, que confere resistência à colistina, encontrado em bactérias isoladas de porcos na China, vem se espalhando rapidamente, tomando proporções intercontinentais (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016; NATURE NEWS, 2017). Ademais, o ritmo alarmante da disseminação de plasmídeos de resistência aos carbapenêmicos também exige vigilância, uma vez que as opções terapêuticas estão cada vez mais escassas (MELETIS, 2016).

Todos os anos, nos Estados Unidos, aproximadamente 2 milhões de pessoas apresentam infecções associadas a microrganismos resistentes aos antimicrobianos e pelo menos 23 mil indivíduos morrem como resultado direto destes processos (CENTER FOR

DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016). Estima-se que a taxa de mortalidade no mundo, associada à resistência antimicrobiana, chega a 700.000 mortes, podendo alcançar o número de 10 milhões, em 2050, se nenhuma medida for tomada (O'NEILL, 2016).

Entre os anos de 1983 e 1992, trinta novos antimicrobianos foram aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA), enquanto que entre os anos de 2003 e 2012, foram apenas sete (WOOLHOUSE; FARRAR, 2014). Desta forma, o aumento da resistência aos antimicrobianos, aliado à escassez de novos agentes, ameaça o tratamento de doenças infecciosas comuns como pneumonia e tuberculose tornando a era pós-antibiótico – em que infecções banais podem causar a morte – cada vez mais próxima. Neste contexto, a melhoria das condições de higiene e de saneamento básico para prevenir e evitar a propagação de infecções, a busca por diagnósticos rápidos para evitar a prescrição desnecessária de antimicrobianos, o uso de vacinas em humanos e animais e o investimento em novos fármacos são fundamentais para resolver esta problemática (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2015; O'NEILL, 2016).

Embora todos os microrganismos possam adquirir resistência, as bactérias resistentes são, atualmente, uma das maiores causas de preocupação (WOOLHOUSE; FARRAR, 2014). Neste contexto, incluem-se isolados de *P. aeruginosa*, os quais são considerados causas comuns de infecções em pacientes hospitalizados, principalmente em internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) (BĂLĂȘOIU et al., 2014). A formação de biofilmes apresenta-se, muitas vezes, como causa subjacente de uma variedade de infecções provocadas por esse microrganismo, sejam essas associadas aos tecidos vivos ou às superfícies inertes (DONLAN; COSTERTON, 2002; RYBTKE et al., 2015).

## 1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* é um bacilo Gram negativo, não fermentador, aeróbio estrito, reto ou levemente curvo que se comporta basicamente como um patógeno oportunista, pois acomete, principalmente, indivíduos imunocomprometidos (HIRSCH; TAM, 2010; BĂLĂȘOIU et al., 2014). No entanto, pessoas saudáveis também podem desenvolver doenças leves, como otites e erupções cutâneas mais generalizadas, especialmente após a exposição à água. Infecções oculares também podem ocorrer após uso prolongado de lentes de contato (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2014).

No ambiente hospitalar, *P. aeruginosa* pode causar infecções graves, incluindo pneumonia e infecções sanguíneas e pós-cirúrgicas que podem levar a sérias complicações e



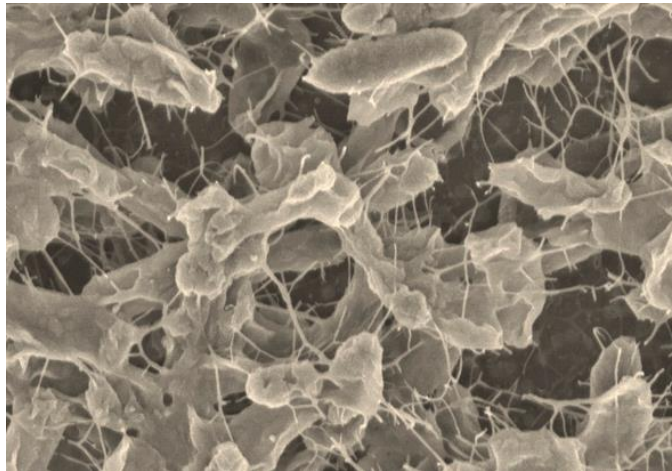
até à morte. Trata-se de uma das bactérias mais frequentemente isoladas no setor de bacteriologia de laboratórios clínicos, sendo apontada como a primeira causa de pneumonia nosocomial no Brasil (ROSSI, 2011). Nas UTIs brasileiras é o terceiro patógeno mais frequente, estando envolvido em 30% das infecções de corrente sanguínea relacionadas ao uso de cateteres e 36,6% apresentam resistência ao imipenem (IPM) (NEVES et al., 2011).

Estas infecções apresentam grande importância clínica, sobretudo, porque podem ser causadas por isolados bacterianos que englobam mais de um mecanismo de resistência atuando em conjunto, o que dificulta a escolha terapêutica e conseqüentemente a erradicação da doença, promovendo, invariavelmente, o aumento dos índices de morbimortalidade (MARQUES et al., 2015). Os principais mecanismos relacionados com fenótipos multirresistentes de *P. aeruginosa* nos hospitais brasileiros são a produção de metalobetalactamase do tipo SPM-1, a perda de porina OprD e a superexpressão de bombas de efluxo, o que pode explicar os altos índices de resistência a carbapenêmicos e aminoglicosídeos (NEVES et al., 2011). Neste contexto, estima-se que cerca de 51 mil casos de infecções provocadas por *P. aeruginosa* ocorrem nos Estados Unidos a cada ano, sendo 6.000 dessas, resistentes aos múltiplos fármacos, ocasionando, pelo menos, 400 mortes anuais (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2014).

Infecções agudas provocadas por *P. aeruginosa* estão associadas às células livres (plancetônicas) altamente virulentas enquanto que as infecções crônicas estão comumente associadas ao modo sésil de crescimento (biofilmes) (MAUNDERS; WELCH, 2017). A formação de biofilmes surge, por conseguinte, como um importante mecanismo utilizado por esses microrganismos para sobreviverem aos tratamentos.

Fibrose cística (FC), infecções de feridas crônicas, otites e prostatites são alguns exemplos de infecções teciduais associadas à formação de biofilmes por *P. aeruginosa* (DONLAN; COSTERTON, 2002). Além disso, os biofilmes foram encontrados em quase todos os tipos de implantes médico-hospitalares, principalmente em próteses valvares cardíacas, marca-passos, próteses articulares e cateteres intravenosos, evidenciando assim, outro importante mecanismo atribuído às infecções nosocomiais (RYBTKE et al., 2015). A Figura 1 apresenta um biofilme de *P. aeruginosa* capturado por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Figura 1 – Biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*.



Observa-se na imagem a produção de Substâncias Poliméricas Extracelulares (SPE) e o envolvimento das células bacterianas em meio a matriz produzida.

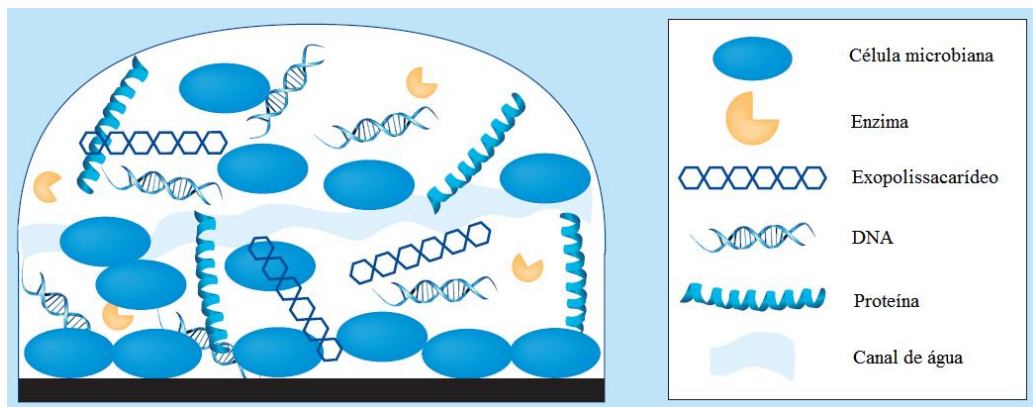
Fonte: Galeria de imagens da Escola de Saúde da Universidade de Petesburgo. Disponível em: <http://eyemicrobiology.upmc.com/PhotoGalleryBiofilms.html>.

### 1.3 BIOFILMES: CONCEITO, ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO

Os biofilmes são grupos de microrganismos cercados por um polímero autoproduzido, aderidos a uma superfície. São estruturas funcionais complexas que apresentam uma variável distribuição de células e agregados, permitindo a coexistência de diferentes microrganismos em sua estrutura, podendo ser de mesma espécie ou não. Trata-se de um modo protegido de crescimento que possibilita a sobrevivência dos microrganismos em ambientes hostis. Estima-se que mais de 90% dos microrganismos são capazes de viver sob a forma de biofilmes e, em tese, praticamente não existe superfície que não possa ser colonizada por microrganismos (seja ela natural ou sintética) (COSTERTON et al., 1999; HØIBY et al., 2011).

O biofilme é constituído, não somente por microrganismos, mas também pelas Substâncias Poliméricas Extracelulares (SPE) e por quaisquer outros resíduos do ambiente colonizado, como proteínas, lipídeos, DNA, enzimas, íons e água, que formam uma estrutura porosa e altamente hidratada (GUPTA et al., 2015). A Figura 2 mostra os principais constituintes estruturais do biofilme.

Figura 2 – Estrutura do biofilme.



Fonte: Adaptado de RABIN et al. (2015).

A matriz exopolissacarídica é o material extracelular - constituído por diferentes biopolímeros - produzida pelos próprios microrganismos aos quais o biofilme está incorporado (GARNETT; MATTHEWS, 2013). As SPE são responsáveis pela morfologia, estrutura, coesão e integridade funcional dos biofilmes e representam cerca de 90% da massa do biofilme. Do mesmo modo, sua composição determina a maioria das propriedades físico-químicas e biológicas, assim como condiciona a vasta gama de vantagens a este modo de vida (FLEMMING; WINGENDER, 2001; FLEMMING; WINGENDER, 2010). A Tabela 1 mostra didaticamente algumas das atribuições da matriz exopolissacarídica e a relevância sobre a consolidação do biofilme.

Tabela 1 – Funções da matriz exopolissacarídica em biofilmes.

<b>Função</b>	<b>Relevância</b>
Adesão	Permite a colonização e fixação das células planctônicas em superfícies bióticas e/ou abióticas.
Agregação celular	Comunicação celular: a imobilização temporária de populações bacterianas favorece o desenvolvimento de densidades celulares e reconhecimento célula-célula.
Coesão	Forma uma rede de polímero que estabiliza o biofilme e determina sua arquitetura, permitindo a comunicação célula a célula.
Retenção de água	Mantém um microambiente altamente hidratado dentro do biofilme, levando à tolerância em ambientes deficientes em água.

Barreira protetora	Confere resistência às defesas do hospedeiro durante infecções e tolerância a agentes antimicrobianos.
Atividade enzimática	Permite a digestão de macromoléculas exógenas para aquisição de nutriente e a degradação de SPE estruturais, permitindo a liberação de células do biofilme.
Fonte de nutrientes	Fornecer suprimento de carbono, nitrogênio e fósforo para utilização pelo biofilme.
Troca genética	Facilita a transferência horizontal de genes entre as células do biofilme.

Fonte: Adaptado de FLEMMING; WINGENDER (2010).

A matriz extracelular oferece um ambiente protetor às células microbianas, dificultando a atuação de agentes germicidas e agindo como uma barreira de filtragem, gerando uma penetração lenta ou reduzida dos agentes antimicrobianos em geral. A matriz também protege os microrganismos contra a dessecação, oxidação, radiação ultravioleta e defesa imunitária (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Esta forma de organização também favorece a captação de elementos necessários à sobrevivência, pois a sua estrutura permite a circulação de água, oxigênio e nutrientes. Devido à retenção de enzimas extracelulares, um sistema versátil é gerado, onde os nutrientes são captados e dissolvidos a partir da água existente, permitindo que sejam utilizados como fontes de energia (COSTERTON et al., 1999).

Além disso, a matriz exopolissacarídica também é responsável por manter as células bem próximas dentro da estrutura do biofilme, permitindo, por conseguinte, fortes interações intercelulares (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Este modo de organização é denominado de “*quorum sensing*” (QS), que pode ser entendido como um “sentido de grupo”. Ou seja, as células, dentro da estrutura do biofilme, se comunicam entre si por meio de moléculas químicas exibindo um modo de vida organizado onde se estabelecem atividades coordenadas (DONLAN, 2001). Esse comportamento somente é percebido quando os microrganismos atingem uma determinada densidade populacional limitante, do contrário, se comportam como simples organismos celulares (BHARDWAJ et al., 2013).

O QS é o exemplo mais bem caracterizado de comunicação química entre os microrganismos, sendo responsável por modular uma variedade de funções celulares, incluindo a formação do biofilme, a patogênese, a aquisição de nutrientes, a motilidade e a produção de metabólitos secundários (RENNER; WEIBEL, 2011). Os biofilmes são, portanto, comunidades microbianas espacialmente estruturadas, cuja função depende dessa complexa rede de interações simbióticas (JIANG; LI, 2013).

#### 1.4 ETAPAS DA FORMAÇÃO DO BIOFILME

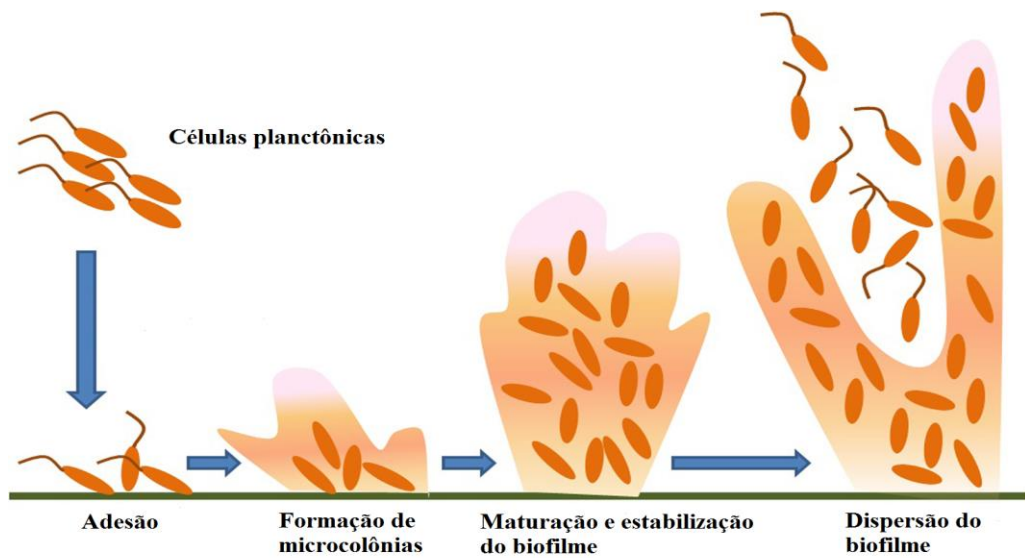
O crescimento do biofilme é orientado por uma série de processos físicos, químicos e biológicos. A adesão microbiana é o primeiro estágio até a formação do biofilme, sendo considerado um processo extremamente complexo. A adesão primária (reversível) é caracterizada pela aproximação aleatória das células planctônicas, através do movimento browniano e força gravitacional, ou de modo induzido, por meio da motilidade com o auxílio de pili e flagelos (CARPENTIER; CERF, 2003).

A determinação final do processo de adesão depende da soma de forças de atração ou repulsão geradas entre as duas superfícies. Portanto, esta fase é condicionada a interações físico-químicas não específicas entre o microrganismo e o material, incluindo forças hidrodinâmicas, interações eletrostáticas e hidrofóbicas e forças de van der Waals (GARRET et al., 2008). Na segunda fase, as células microbianas fracamente ligadas passam a produzir as SPE. À medida que os nutrientes se acumulam, microcolônias altamente coesas, de mesma espécie ou não, são originadas, tornando irreversível a formação do biofilme (GUPTA et al., 2015).

Após a adesão irreversível do microrganismo à superfície, inicia-se o processo de maturação do biofilme. Os microrganismos continuam secretando SPE e, com o auxílio de substâncias autoindutoras, estabilizam a rede de biofilme, formando, ao final desse estágio, uma estrutura de múltiplas camadas, semelhante a um cogumelo. Nesta etapa, o biofilme aumenta sua espessura em até 10 µm, constituindo uma estrutura permeada de canais de água que funcionam como um sistema circulatório de entrega de nutrientes e remoção de restos metabólicos (DONLAN, 2001).

Quando o biofilme atinge uma etapa de amadurecimento, a massa microbiana é liberada e os microrganismos desprendidos poderão colonizar novos ambientes e se tornarem fontes de contaminação (GARNETT; MATTHEWS, 2013). Nesta fase, há a produção de enzimas sacarolíticas que quebram os polissacarídeos estabilizadores do biofilme, provocando a liberação das células microbianas para que possam ocupar novas superfícies. *P. aeruginosa*, por exemplo, libera a enzima alginato-liase para a quebra do biofilme (SUTHERLAND, 1999). Ademais, os microrganismos aumentam a expressão de proteínas flagelares para que as células se movam até outros sítios. Essas ações destrutivas são importantes para o ciclo do biofilme de modo que colaboram para a propagação da infecção (OTTO, 2013). As etapas de desenvolvimento do biofilme podem ser visualizadas na Figura 3.

Figura 3 – Estágios de desenvolvimento do biofilme microbiano.



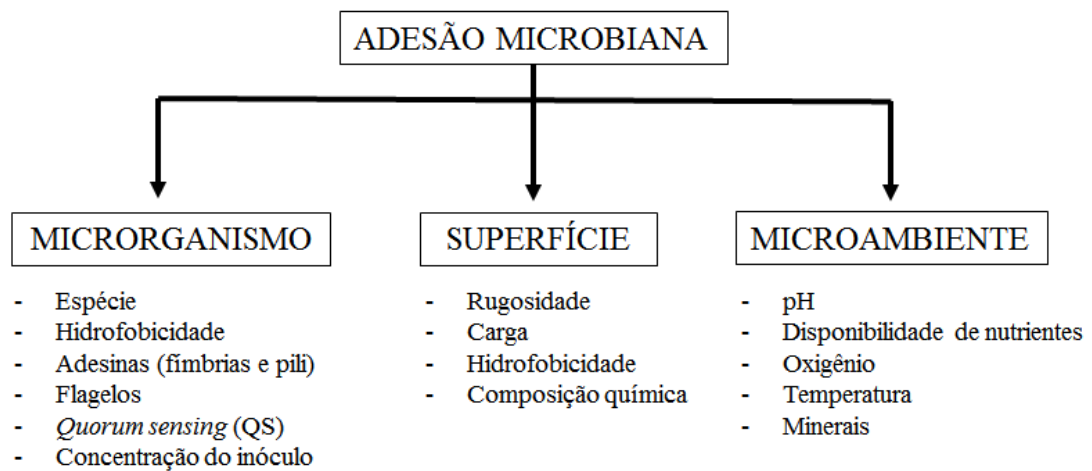
Primeiro ocorre a fase de adesão reversível a uma superfície e, após, os microrganismos começam a se dividir e a formar microcolônias, tornando irreversível a formação do biofilme. Por meio da produção de exopolissacarídeos inicia-se o processo de maturação e estabilização do biofilme. Por fim, ocorre o estágio de destruturação do biofilme e dispersão das células que darão início a novos biofilmes em outros sítios de adesão.

Fonte: Adaptado de GUPTA et al (2015).

### 1.5 FATORES QUE INFLUENCIAM NA FORMAÇÃO DE BIOFILMES

Um grande número de fatores contribui para a adesão de um microrganismo à determinada superfície. Dentre eles, incluem-se as características dos microrganismos - como espécie, concentração, capacidade de produção de SPE, hidrofobicidade, presença de flagelos e pili - as características do material aderente, como porosidade e aspereza, além de elementos como pH, temperatura, pressão e oxigênio (O'TOOLE; KOLTER, 1998; STEWART; COSTERTON, 2001). Na Figura 4, o fluxograma expõe alguns fatores essenciais para adesão microbiana e formação de biofilmes.

Figura 4 – Fatores que influenciam na adesão microbiana.



O fluxograma exemplifica alguns fatores relacionados ao microrganismo, à superfície de adesão e ao microambiente que estão relacionados com a maior propensão à formação de biofilmes.

Fonte: Adaptado de TRENTIN et al (2013).

A hidrofobicidade da superfície dos microrganismos é um fator que contribui para a sua aderência e colonização de superfícies, sejam inertes ou vivas. Em isolados de *S. aureus*, provenientes de cárie dentária, verificou-se que a maioria dos isolados apresentou comportamento hidrofílico, porém, os isolados considerados altamente hidrofóbicos, foram os que demonstraram maior capacidade de formar biofilmes em placas de poliestireno (KOUIDHI et al., 2010). Especula-se que as interações hidrofóbicas entre microrganismo e superfície diminuem as forças repulsivas e facilitam a adesão microbiana (GUPTA et al., 2015).

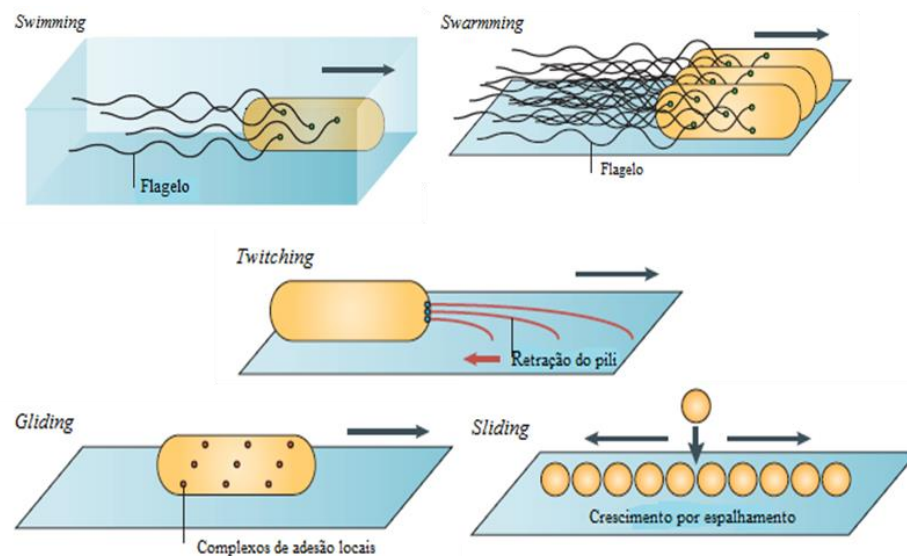
A composição química e a hidrofobicidade dos diferentes tipos de materiais utilizados na fabricação dos dispositivos médicos podem influenciar na adesão microbiana. De acordo com Darouiche (2001), o cloreto de polivinila (PVC) e o polietileno (PE) estão entre os materiais mais propensos à adesão microbiana. Além disso, superfícies irregulares e texturizadas favorecem ainda mais a adesão microbiana.

A presença de flagelos e/ou pili facilita a adesão dos microrganismos à superfície e, por conseguinte, a formação do biofilme. A motilidade pode ser necessária para permitir que o microrganismo alcance uma determinada superfície e também para que estes se movam dentro do biofilme maduro, fazendo com que haja a propagação e crescimento do mesmo. Do mesmo modo, a motilidade está envolvida na libertação das células microbianas a partir do biofilme maduro, facilitando a sua fragmentação e dispersão (VERSTRAETEN et al., 2008).

Existem diferentes modos de locomoção em procariotos, os quais incluem a motilidade *swarming*, o mecanismo de natação ou motilidade *swimming*, o mecanismo de

extensão e retração de pili ou motilidade *twitching* e os mecanismos de deslizamento *sliding* e *gliding* (JARRELL; MCBRIDE, 2008). Em circunstâncias adequadas, muitas espécies bacterianas têm a capacidade de desenvolver essas formas de movimento. Contudo, *P. aeruginosa*, desenvolve apenas os tipos de motilidade *swimming*, *swarming* e *twitching* (TREMBLAY; DÉZIEL, 2010). Os diferentes tipos de motilidade evidenciados pelas bactérias estão representados na Figura 5.

Figura 5 – Tipos de motilidade bacteriana.



Fonte: Adaptado de KEARNS (2010).

O tipo *swimming* de motilidade caracteriza-se pelo movimento aleatório e desorganizado de somente um microrganismo, provocado pela ação de um único flagelo em ambiente aquoso. Por outro lado, o tipo *swarming* de translocação diferencia-se por ser um padrão contínuo, regular, e altamente organizado, promovido por um grupo de microrganismos contendo múltiplos flagelos em ambiente sólido (HENRICHSEN, 1972). Além disso, esse tipo de movimento está associado à expressão de fatores de virulência e a um fenótipo mais resistente aos antimicrobianos (OURA et al., 2015).

Os flagelos são estruturas essenciais nesses dois tipos de motilidade e sua síntese - única ou múltipla - consiste em uma adaptação dependente do grau de viscosidade do ambiente (HENRICHSEN, 1972; JARELL; MCBRIDE, 2008). Neste contexto, a expressão de genes que codificam flagelos é essencial, uma vez que a supressão dos mesmos pode influenciar na motilidade e conseqüentemente no processo de adesão. Corroborando com essa



hipótese, o mel de Manuka (mel oriundo da flor de Manuka da Nova Zelândia) teve a habilidade de suprimir a expressão de alguns genes flagelares específicos (*fliA*, *fliC*, *fleN* e *fleR*) em *P. aeruginosa*, promovendo a inibição da motilidade *swimming* e *swarming* (ROBERTS et al., 2015). Da mesma forma, confirmou-se que o gene *flhF* é substancial para a motilidade flagelar em *P. aeruginosa* (MURRAY; KAZMIERCZAK, 2006).

O movimento *twitching* tem seu mecanismo pouco esclarecido, porém já foi observado que o pili tipo IV está associado na motilidade de algumas estirpes de *P. aeruginosa*. Esse tipo de translocação ocorre por meio da contração e a extensão do pili sobre a superfície, sucedendo preferencialmente com células bacterianas isoladas que possuem ou não flagelos (HENRICHSEN, 1972).

Além disso, minerais, como ferro e zinco, foram associados à formação de biofilmes de *Mycobacterium tuberculosis*. O ferro (Fe) e zinco (Zn) são cofatores metálicos de importantes enzimas envolvidas na geração e captura de CO<sub>2</sub>, bem como na síntese de ácidos micólicos, essenciais para a formação e maturação de biofilmes em *M. tuberculosis* (OJHA et al., 2008).

Determinadas condições ambientais e nutricionais como variações de pH, temperatura, meio de cultura e adição de íons e minerais, afetam significativamente a formação de biofilmes por alguns microrganismos. *Citrobacter werkmanii*, por exemplo, tem o seu crescimento planctônico em amplas faixas de pH, em contrapartida, a formação de biofilme é maior em valores de pH mais baixos (ZHOU et al., 2013). Dentre os demais microrganismos, contudo, a maioria é capaz de desenvolver biofilme somente em faixas neutras de pH (MACHADO, 2005). Verifica-se também, que um aumento na concentração de cátions como sódio, cálcio e íons férrico afetam a fixação de *P. fluorescens*, reduzindo as forças de repulsão entre a célula e a superfície, facilitando a formação de biofilme (KOKARE et al., 2009).

### **1.5.1 Regulação genética da formação de biofilmes em *P. aeruginosa***

A formação e a dispersão do biofilme são processos controlados a nível genético e por sinais do ambiente. Atualmente, *quorum sensing*, o c-di-GMP (diguanosina cíclica - 5 - monofosfato) e pequenas moléculas de RNA (“Small RNA”, sRNAs) aparecem como os principais reguladores em biofilmes bacterianos, principalmente em Gram negativos (FAZLI et al., 2014).

### 1.5.1.1 Regulação da formação de biofilme em *P. aeruginosa* via QS

A estrutura compacta do biofilme mantém as células bacterianas bem próximas, admitindo fortes interações intercelulares (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Esta aproximação permite que as células se comuniquem por uma espécie de “linguagem” especial. Este modo de organização é denominado de *quorum sensing* (QS) (FAZLI et al., 2014).

A comunicação intercelular dentro da estrutura do biofilme ocorre por meio de moléculas químicas denominadas autoindutoras, as quais são liberadas somente quando uma densidade bacteriana limite é atingida (DONLAN, 2001). Microrganismos oportunistas como *P. aeruginosa* adiam o seu fenótipo virulento até atingirem um determinado tamanho populacional que seja capaz de superar as defesas do hospedeiro (KALIA, 2013).

O mecanismo de comunicação intraespécie difere entre bactérias Gram positivas e Gram negativas. Em geral, as bactérias Gram positivas usam oligopeptídeos para se comunicarem e as bactérias Gram negativas utilizam moléculas autoindutoras derivadas de *N*-acil-homoserina lactonas (AHLs). A biosíntese de AHLs é controlada pelo gene *luxI*. No momento em que uma concentração crítica de moléculas sinalizadoras é atingida em resposta à densidade populacional, o autoindutor se liga à proteína LuxR e o complexo resultante ativa genes alvo que irão modular uma variedade de funções celulares, que vão desde a aquisição de nutrientes até a formação de biofilmes (MILLER; BASSLER, 2001; RENNER; WEIBEL, 2011).

Em *P. aeruginosa*, QS desempenha um papel muito importante no desenvolvimento tardio do biofilme e na sua dispersão, todavia, não atua na fase inicial de adesão. Isso ocorre porque a organização em QS controla a síntese de ramnolipídios que são essenciais no desenvolvimento do biofilme de *P. aeruginosa*, bem como na sua dispersão a partir da superfície (FAZLI et al., 2014; WOLSKA et al., 2015).

### 1.5.1.2 Regulação da formação de biofilme em *P. aeruginosa* via *c-di-GMP*

O *c-di-GMP* é considerado um complexo sistema secundário de sinalização entre bactérias, estando ausente em algumas bactérias e altamente expresso em outras. Esta molécula seria a chave para a transição entre o modo de vida planctônico e a vida em biofilme (SUPPIGER et al., 2013).

Alguns trabalhos abordaram a importância desta molécula na biologia do biofilme, onde níveis elevados de c-di-GMP intracelular promoveram uma maior formação de biofilme para microrganismos como *Bordetella bronchiseptica* e *P. aeruginosa* (SISTI et al., 2013; KIM; PARK, 2013). Em *P. aeruginosa*, c-di-GMP estimula a produção de alginato, sendo este, responsável pelo fenótipo mucóide, o qual é frequentemente observado em isolados de origem pulmonar de pacientes com FC crônica. Além disso, c-di-GMP regula fatores fundamentais para o desenvolvimento tridimensional da estrutura do biofilme, como síntese de exopolissacarídeos, pili e adesinas, sendo capaz de controlar a motilidade bacteriana e a morte celular (KIM; PARK, 2013; FAZLI et al., 2014; WOLSKA et al., 2015). Altos níveis de c-di-GMP estão associados, principalmente, à etapa inicial de formação de biofilme de *P. aeruginosa* (FAZLI et al., 2014).

A síntese e degradação do c-di-GMP ocorrem, respectivamente, através da atividade de diguanilato ciclases (DGCs) e de fosfodiesterases (PDEs). Estímulos ambientais regulam a atuação destas enzimas, por exemplo, escassez de oxigênio e nutrientes e presença de óxido nítrico estimulam as PDEs, promovendo a degradação de moléculas de c-di-GMP e a consequente dispersão do biofilme (FAZLI et al., 2014).

#### 1.5.1.3 Regulação da formação de biofilme em *P. aeruginosa* via sRNA

Embora menos esclarecido, pequenas moléculas de RNA ou *small RNAs* (sRNA) desempenham um importante papel na regulação da formação de biofilmes, especialmente sobre a motilidade bacteriana e inibição de exopolissacarídeos. Além disso, estão relacionados à regulação de genes envolvidos à adaptação ao estresse e à patogênese bacteriana (FAZLI et al., 2014; WOLSKA et al., 2015).

Em *P. aeruginosa*, os sRNA mais conhecidos são *rsmY* e *rsmZ*. O aumento na expressão dessas duas moléculas está associado a uma maior facilidade de adesão inicial a superfícies, entretanto, o desenvolvimento subsequente do biofilme é dificultado pelos altos níveis de sRNA (WOLSKA et al., 2015).

## 1.6 PATOGÊNESE E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DOS BIOFILMES

Além de representarem uma fonte potencial de contaminação em indústrias - obstruindo tubulações e precipitando a corrosão de equipamentos - os biofilmes têm grande

importância, sobretudo, para a saúde pública, pois causam infecções crônicas que perduram apesar do tratamento e da resposta do hospedeiro. Neste contexto, estima-se que cerca de 80% de todas as infecções microbianas em humanos estão relacionadas aos biofilmes e, em muitos casos, estão associadas aos implantes de dispositivos médico-hospitalares como cateteres e próteses (CORTES et al., 2011).

A persistência da infecção é caracterizada por uma grande resposta inflamatória local e pela resistência ao sistema imune do hospedeiro e aos antimicrobianos. Microrganismos que vivem em comunidades são cerca de 100 a 1000 vezes mais resistentes aos antimicrobianos e biocidas do que populações equivalentes de microrganismos livres (MAKI et al., 1991; DAVIES et al., 1998; DONLAN, 2001). Isso indica que os mecanismos envolvidos na resistência de biofilmes aos antimicrobianos diferem dos mecanismos responsáveis pela resistência em células planctônicas (TRENTIN et al., 2013).

Muitas infecções causadas por biofilmes estão associadas à utilização de implantes médicos invasivos como cateteres intravenosos e urinários, próteses ortopédicas e tubos endotraqueais. Com o aumento da expectativa de vida humana, a utilização de implantes biomédicos é uma necessidade crescente, uma vez que esses dispositivos são úteis no reparo e na manutenção de funções biológicas. Estima-se que a indústria de biomateriais movimente aproximadamente 28 bilhões de dólares todos os anos e, independentemente da tecnologia empregada nesses materiais, todos são suscetíveis à colonização microbiana e formação de biofilmes, devido, principalmente, ao déficit imunológico que ocorre na interface implante-hospedeiro (HOLZAPFEL et al., 2013).

Nesta conjuntura, associou-se a formação de biofilme em tubos endotraqueais ao desenvolvimento de pneumonia associada à ventilação, que ocorre em 9-27% dos pacientes intubados (HØIBY et al., 2014). Em pacientes utilizando cateteres urinários permanentes, mais de 50% são colonizados nos primeiros 10-14 dias de inserção. Os cateteres intravasculares estão associados a riscos elevados de infecção, tanto da pele, no local de inserção, quanto do ponto de vista da sepse, sendo que 60% acabam relacionados com a formação de biofilmes (STICKLER, 2008).

A dificuldade no tratamento de infecções relacionadas aos biofilmes em dispositivos médicos tem impacto direto sobre desfecho clínico, ocasionando maior tempo de internação e custos elevados com medicações. Muitas vezes, a retirada ou troca do dispositivo tem um gasto menor que o tratamento da infecção, sendo este, por conseguinte, o principal manejo realizado atualmente (TRENTIN et al., 2013).

Igualmente preocupante são as infecções provocadas pela formação de biofilme em tecidos vivos. Sabe-se que a formação de biofilme nos pulmões está relacionada com a piora e cronicidade da infecção em pacientes com FC (DONLAN; COSTERTON, 2002). Além disso, feridas são, frequentemente, colonizadas por biofilmes, o que provoca atraso cicatricial e contribui para o avanço crônico da mesma. Neste contexto, estima-se que 80% dos pacientes com FC no mundo e cerca de 60% das feridas crônicas envolvem biofilmes (HØIBY et al., 2014). Do mesmo modo, a adesão microbiana é uma preocupação para a odontologia, uma vez que a cárie dentária é mediada pela formação de biofilmes, resultando em desmineralização dentária (PITTS et al., 2017).

A diversidade de microrganismos capazes de formar biofilmes é bastante grande, incluindo bactérias Gram positivas, Gram negativas, fungos e leveduras, entre outros. Dentre os mais reportados, pode-se incluir *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* (CHEN et al., 2013; AGARWAL et al., 2010).

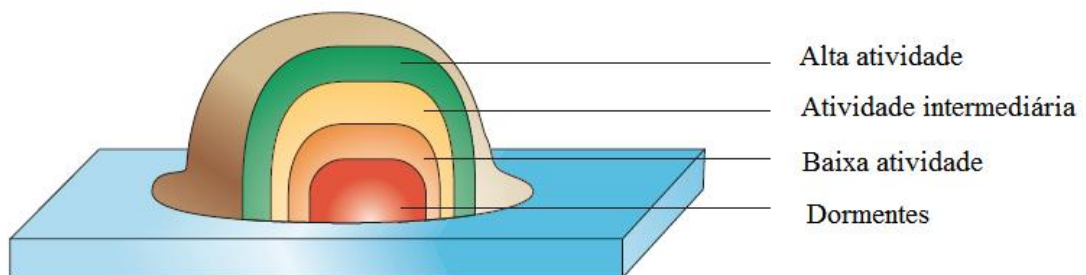
Múltiplos mecanismos atuando conjuntamente podem explicar a resistência de biofilmes frente a antimicrobianos e biocidas. Esses mecanismos incluem a baixa penetração de agentes químicos, crescimento lento das células dentro do biofilme, transferência de genes de resistência e falha na resposta imune humana (SINGH et al., 2017).

As SPE que constituem o biofilme retardam a difusão dos antimicrobianos e desinfetantes, impedindo a penetração destes nas camadas mais profundas e, conseqüentemente, sua ação sobre as células sésseis (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Do mesmo modo, as SPE podem interagir quimicamente com os antimicrobianos, sequestrando compostos hidrofílicos, tais como os aminoglicosídeos. Corroborando com a hipótese de que a matriz protege o biofilme, tem-se o fato de que as células sésseis, ao se dispersarem da estrutura do biofilme, tornam-se mais responsivas ao tratamento antimicrobiano (TRENTIN et al., 2013).

Além disso, a diminuição da atividade metabólica das células microbianas, provocada pela falta de nutrientes ou acúmulo de resíduos dentro da matriz exopolissacarídica, pode antagonizar os efeitos dos antimicrobianos, uma vez que estes tendem a atuar em células metabolicamente ativas (STEWART; COSTERTON, 2001). Deste modo, as células da superfície do biofilme são mais suscetíveis aos antimicrobianos do que as células residentes no interior da matriz, pois crescem mais facilmente e são mais metabolicamente ativas, devido, justamente, a esta heterogenicidade do biofilme que permite uma ampla variação na taxa de crescimento de acordo com a disponibilidade de nutrientes (SINGH et al., 2017;

RIDENHOUR et al., 2017). As células depositadas na base do biofilme permanecem dormentes devido, principalmente, ao escasso aporte de oxigênio. O baixo metabolismo dessas células faz com que persistam após o tratamento antimicrobiano, caracterizando-se por serem um núcleo de recuperação do biofilme (DAVIES, 2003). A Figura 6 demonstra esquematicamente a heterogeneidade populacional dentro do biofilme.

Figura 6 – Atividade metabólica em uma microcolônia de biofilme.



A atividade metabólica dentro do biofilme varia em função da disponibilidade de nutrientes que é maior nas camadas mais superficiais. As células residentes no topo da microcolônia são mais ativas, enquanto que as mais profundas podem permanecer latentes e fornecem um núcleo de regeneração após o tratamento antimicrobiano. Fonte: Adaptado de DAVIES (2003).

Os microrganismos também podem tornar-se resistentes aos antimicrobianos por mutação espontânea ou através de aquisição de informação genética de outros microrganismos através da troca de plasmídeos por conjugação no interior do biofilme (DAVEY; O'TOOLE, 2000). A transferência de plasmídeos contendo genes de resistência ocorre mais facilmente entre as células em biofilmes do que entre as planctônicas devido a maior proximidade física entre as células (DONLAN, 2001; COSTERTON et al., 1999). Além disso, os biofilmes retêm plasmídeos multirresistentes de maneira mais eficiente do que as células planctônicas, levando à hipótese de que esta manutenção na diversidade genética possa facilitar a ocorrência de surtos de patógenos resistentes aos múltiplos antimicrobianos (RIDENHOUR et al., 2017).

O comportamento multicelular da vida em biofilme é um dos principais mecanismos moduladores da resistência aos fármacos e biocidas. QS, através de moléculas sinalizadoras, permite que os microrganismos - ao atingirem uma concentração limite - expressem genes de diferentes fenótipos, essencialmente os que atribuem resistência (KALIA, 2013). Na literatura, a influência de QS sobre a virulência de alguns microrganismos quando em

biofilme é frequentemente relatada. *Burkholderia cepacia*, *P. aeruginosa* e *Staphylococcus* sp. são somente alguns exemplos de patógenos que têm sua tolerância aos antimicrobianos associada a este complexo sistema (DENG et al., 2013).

Outro fator responsável pela resistência aos antimicrobianos em estruturas de biofilmes é a expressão de bombas de efluxo por alguns microrganismos (SOTO, 2013). Trata-se de um mecanismo que permite que o ambiente interno das células microbianas seja regulado através da remoção de substâncias tóxicas, incluindo agentes antimicrobianos (OLIVARES et al., 2013; SOTO, 2013). Supõe-se que este mecanismo possa influenciar na regulação exercida por QS e, por conseguinte, acarretar em alterações na biologia do biofilme. O sistema de efluxo seria necessário para que as moléculas se difundissem através da membrana celular, aumentando a sinalização e, conseqüentemente, a expressão de genes de resistência. Ao mesmo tempo, pode estar relacionado com a extrusão dessas moléculas (SOTO, 2013). Em estirpes do complexo *Burkholderia*, por exemplo, a formação de biofilme demonstrou ser dependente de bombas de efluxo do tipo BpeAB - Opr-B (CHAN; CHUA, 2005). As bombas de efluxo são, portanto, altamente ativas em biofilmes, tornando-se um alvo atraente para medidas antibiofilme (BAUGH et al., 2012).

Instiga-se, também, que muitos microrganismos possam adquirir resistência a antissépticos e desinfetantes por adaptar-se a uma variedade de condições ambientais (MURTOUGH et al., 2001). A teoria de adaptação a biocidas foi comprovada pela atividade de concentrações subinibitórias de cloreto de benzalcônio, que mantiveram ativos ou selecionaram microrganismos adaptados ao ambiente natural (MC CAY et al., 2010). Deste modo, além dos conhecidos mecanismos envolvidos na resistência de biofilmes a antimicrobianos - matriz exopolissacarídea, sinalização célula-célula, diversidade genética - pode-se sugerir que o uso contínuo e inadequado dos desinfetantes pode estar relacionado aos índices de resistência.

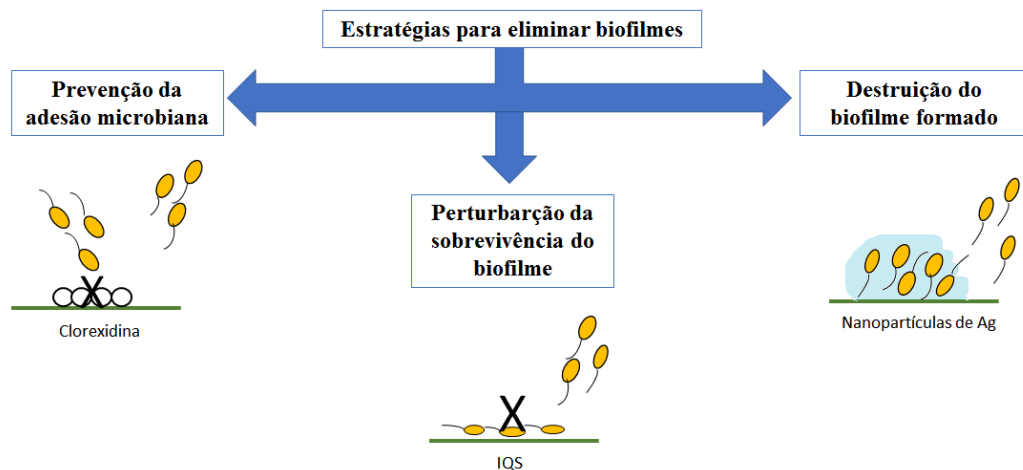
## 1.7 ABORDAGENS TERAPÊUTICAS CONTRA BIOFILMES

Os antimicrobianos convencionais - devido ao seu uso indiscriminado e à estrutura complexa dos biofilmes - na maioria das vezes, não são efetivos frente a biofilmes. Além disso, a terapia antimicrobiana contra biofilmes ainda é baseada nos testes de suscetibilidade de microrganismos planctônicos, o que ocasiona falhas no tratamento e recorrência da infecção. Testes de suscetibilidade específicos para biofilmes já foram projetados e

executados, porém, não apresentaram resultados confiáveis até o momento (HØIBY et al., 2014).

Desta maneira, estratégias alternativas têm sido estudadas e utilizadas para prevenir a adesão microbiana, retardar a formação de biofilmes e eliminar ou pelo menos reduzir a sua acumulação (MARCINKIEWICZ et al., 2013; MARTINEZ-GUTIERREZ et al., 2013). A Figura 7 representa esquematicamente algumas etapas da formação do biofilme que podem ser afetadas para eliminar os biofilmes.

Figura 7 – Estratégias antibiofilme.



A ilustração exemplifica alguns estágios do desenvolvimento do biofilme que podem ser afetados para sua eliminação. Uso de agentes de revestimento para inibir a fixação microbiana na superfície (clorexidina). Uso de substâncias capazes de interromper a sobrevivência das bactérias (IQS). Uso de compostos que destroem o biofilme formado (Nanopartículas de Prata (Ag)).

Fonte: Adaptado de GUPTA et al (2015).

### 1.7.1 Inibição da formação do biofilme

A inibição da formação de biofilmes pode ser obtida através do impedimento da adesão microbiana a uma superfície ou por meio do impedimento da sinalização celular. Neste sentido, substâncias que possam revestir materiais têm sido objeto de estudos com o propósito de modificar superfícies de dispositivos médicos e dificultar a adesão microbiana (MARCINKIEWICZ et al., 2013). Formulações adesivas de clorexidina com liberação sustentada têm sido utilizadas no ponto de inserção de cateteres para prevenir a entrada de microrganismos e a formação de biofilmes. Essa formulação apresentou excelente atividade antibiofilme contra *P. aeruginosa* isolada de cateter urinário (SHAPUR et al., 2012). Do



mesmo modo, há evidências de que próteses ortopédicas impregnadas com gentamicina reduzem a incidência de infecções associadas aos biofilmes (JOHANNSSON et al., 2010).

Outra possibilidade concernente à inibição de biofilmes é utilizar a motilidade e os apêndices bacterianos como alvo de ação, uma vez que muitos microrganismos dependem de flagelos e pili para acessar e se aderir às superfícies. Evidenciou-se, neste contexto, que nanopartículas de *M. alternifolia* são capazes de interferir significativamente na motilidade de *P. aeruginosa* PAO1 e, conseqüentemente, na formação do biofilme por essa cepa (COMIN et al., 2016).

Neste mesmo cenário, incluem-se os compostos sulfatiazol e extrato de gengibre, os quais são capazes de interferir na produção do segundo mensageiro c-di-GMP ou facilitar sua degradação. O c-di-GMP está relacionado com a motilidade e a produção de adesinas e, uma vez inibido, afeta diretamente a adesão microbiana, demonstrando outra possível categoria de inibidores de biofilme (FAZLI et al., 2014).

### **1.7.2 Interferência na comunicação celular**

A descoberta de compostos capazes de inibir a ação de moléculas sinalizadoras de QS parece ser uma estratégia promissora para controlar a formação e virulência dos biofilmes. Diversos Inibidores de *quorum sensing* (IQS) foram descritos, os quais incluem, por exemplo, furanonas, triclosan, macrolídeos e ciprofloxacino (KALIA, 2013; MARCINKIEWICZ et al., 2013). Estes compostos impedem a comunicação celular dos microrganismos previamente aderidos ou não, impossibilitando a continuidade nas etapas de formação do biofilme (MARCINKIEWICZ et al., 2013). Alguns IQS têm sido isolados a partir de plantas medicinais como a alga marinha *Delisea pulchra* que produz furanonas halogenadas capazes de inibir QS e, conseqüentemente, protegê-la da colonização microbiana. O extrato de alho tem atividade semelhante à furanona e reduz a formação de biofilme por *P. aeruginosa* pela inibição de QS (KIM; PARK, 2013).

Ainda neste contexto, encontra-se a relação existente entre Inibidores de Bombas de Efluxo (IBE) e a formação de biofilmes (KOURTESI et al., 2013). Algumas publicações têm comprovado que os IBEs são potenciais agentes capazes de inibir a formação de biofilmes, assim como os IQS. A atuação de IBE sobre biofilme de *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* e *P. putida* evidenciaram diminuição e, até mesmo, erradicação das películas formadas (KVIST et al., 2008; BAUGH et al., 2012). Da mesma forma, o verapamil - conhecido IBE - desempenhou excelente atividade antibiofilme sobre *C. albicans*. Neste

mesmo estudo, o verapamil, quando em combinação com fluconazol, demonstrou efeito sinérgico contra o biofilme (YU et al., 2013).

### 1.7.3 Erradicação do biofilme formado

Dada a importância da matriz exopolissacarídica para a resistência dos biofilmes, é interessante direcionar estudos de moléculas ou compostos que atuem diretamente sobre seus componentes. As SPE são atraentes alvos para a ruptura de biofilmes, deixando o microrganismo vulnerável ao tratamento antimicrobiano (MAUNDERS; WELCH, 2017). Neste contexto, a enzima dispersina B foi documentada como opção terapêutica para a eliminação de biofilmes, pois é capaz de promover a dispersão das células sésseis a partir da matriz do biofilme (KIM; PARK, 2013).

A utilização de bacteriófagos - vírus específicos que infectam bactérias - também pode ser um tratamento promissor contra os biofilmes. Os bacteriófagos poderiam atuar na degradação de exopolissacarídeos da matriz extracelular que compõe o biofilme e, assim, destruí-los (SHARMA et al., 2013). Processos físicos como a terapia fotodinâmica também têm sido estudados. Tratam-se de lasers de baixa potência que combatem os microrganismos tratados com fármacos fotossintetizantes. Nas leveduras *C. albicans*, *C. glabrata* e *Streptococcus mutans* a utilização desta terapia mostrou-se bastante promissora, uma vez que reduziu significativamente a atividade metabólica do biofilme quando comparado ao grupo controle (QUISHIDA et al., 2013).

Nos últimos anos, a aplicação de nanopartículas se expandiu consideravelmente (MARTINEZ-GUTIERREZ et al., 2013). As nanopartículas de prata possuem excelente eficácia na prevenção da formação e na erradicação de biofilmes estabelecidos por isolados de *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a meticiclina) e *S. mutans* (BARBOUR et al., 2013). Da mesma forma, nanopartículas de *Melaleuca alternifolia* inibiram a formação de biofilme de diferentes espécies de *Candida* (SOUZA et al., 2017).

Ademais, terapias antimicrobianas combinadas têm representado uma promissora opção para o tratamento de infecções crônicas persistentes causadas por biofilmes. Neste sentido, a associação entre antimicrobianos e terapia fotodinâmica também tem sido relatada para o combate de biofilmes em feridas crônicas (HØIBY et al., 2014). A associação de fosfomicina e claritromicina demonstrou ser uma terapia útil frente a biofilme formado por *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticiclina (DICICCO et al., 2014). Da mesma

maneira, foi documentado que biofilmes formados por *P. aeruginosa* PACI22 em modelo experimental foram completamente erradicados pela combinação entre claritromicina e ciprofloxacina, demonstrando substancial sinergismo (ELKHATIB; NOREDDIN, 2014).

## 1.8 A22 E O FORMATO DA CÉLULA BACTERIANA

As formas das células bacterianas (cocoides, bacilares ou espirais) são biologicamente importantes e desempenham um papel crucial na sobrevivência dos microrganismos. À medida que as condições ambientais se tornam desfavoráveis, as bactérias podem, evolutivamente, alterar sua forma (YOUNG, 2006). A morfologia celular está interligada com a aquisição de nutrientes, divisão celular, fixação em superfícies, motilidade e patogênese (YOUNG, 2007). Deste modo, aumenta-se o interesse por conhecer os mecanismos envolvidos na construção e manutenção da estrutura das células bacterianas.

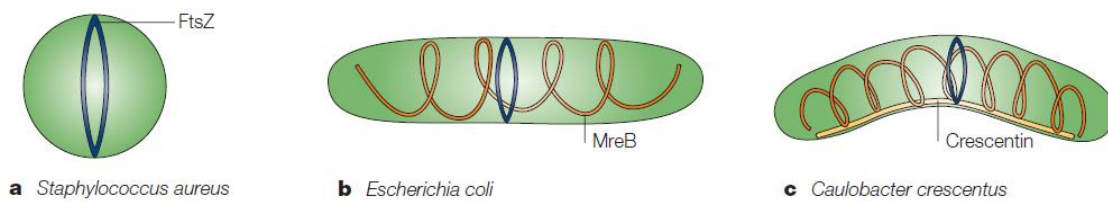
Sabe-se que a célula bacteriana é essencialmente composta por duas estruturas moleculares, a parede celular e o citoesqueleto. A parede celular é responsável por manter a estrutura celular da maioria das bactérias e tem, como constituinte principal, o peptidoglicano (PG). A camada de PG está situada externamente à membrana plasmática, garantindo à célula uma pressão osmótica interna estável. Mutações em genes envolvidos na síntese do PG ou a interferência química sobre as enzimas que participam da via de síntese podem levar a alterações significativas na forma da célula, podendo haver a perda de sua viabilidade (SCHEFFERS; PINHO, 2005).

O citoesqueleto bacteriano é constituído por homólogos eucarióticos, sendo encontrados no citoplasma da célula, que ajudam na manutenção da forma e integridade das células, além de participarem de muitas funções celulares, incluindo motilidade, segregação cromossômica e transdução de sinais (CABEEN; JACOBS-WAGNER, 2005). Tratam-se das proteínas CreS (crescentina), FtsZ e MreB, semelhantes aos filamentos intermediários, à tubulina e à actina, respectivamente (DYE et al., 2011). A Figura 8 mostra a atuação de cada uma dessas proteínas.

A CreS é responsável pela manutenção da forma filamentosa e quando suprimida, as células tornam-se curvas (CELLER et al., 2013). A FtsZ forma uma espécie de “cinta” interna na bactéria no momento de sua divisão celular, sem a atuação desta proteína, a bactéria cresceria indefinidamente, sem dividir, até estourar. A MreB está envolvida no alongamento celular em forma de bastonete. Para assumir o formato de haste, os bacilos precisam da inserção de PG ao longo de comprimento que é feita pela MreB. Deste modo, a deleção desta

proteína resulta em microrganismos esféricos e irregulares. Quando esse estágio acaba, a FtsZ atua para formar novas extremidades e dividir a célula bacteriana (CALLAWAY, 2008). Além disso, alguns estudos reportam a relação direta entre MreB e motilidade bacteriana (MAURIELLO et al., 2010; BULMER et al., 2012).

Figura 8 – Proteínas do citoesqueleto e o formato celular bacteriano.

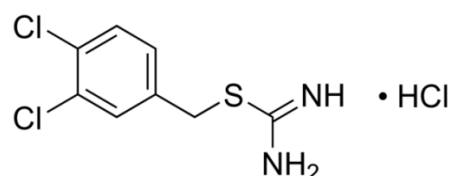


Bactérias como *S. aureus* têm a divisão celular mediada pela FtsZ, a qual forma um anel (azul) durante a divisão celular (a). *E. coli* assume formato de bacilo, pois possui a proteína MreB, a qual aparece como uma estrutura helicoidal ao longo da célula (vermelho) quando vista por microscopia de fluorescência (b). As células de *Caulobacter crescentus* contêm CreS, além de MreB durante o alongamento celular e FtsZ durante a divisão células (c).

Fonte: Adaptado de CABEEN; JACOBS-WAGNER (2005).

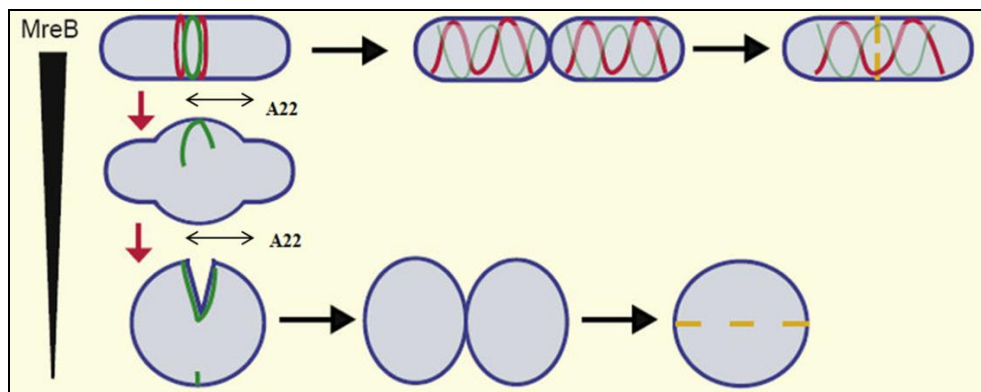
O composto A22 encontra-se, neste contexto, como um inibidor competitivo reversível da ligação ATP - MreB, capaz de induzir a remodelação da parede celular, resultando em alterações no formato da célula. Trata-se de uma molécula pequena, derivada do S-benzilisotiureia, constituída de uma parte polar e uma apolar, sendo solúvel em água apenas em baixas concentrações (HOCKENHULL; SHI, 2006). A estrutura do A22 e seu mecanismo de ação estão representados nas Figuras 9 e 10, respectivamente.

Figura 9 – Estrutura do S-(3,4-diclorobenzil) isotiureia (A22).



Fonte: IWAI et al. (2002).

Figura 10 – Inibição reversível da proteína MreB pelo S-(3,4-diclorobenzil) isotiourea (A22).

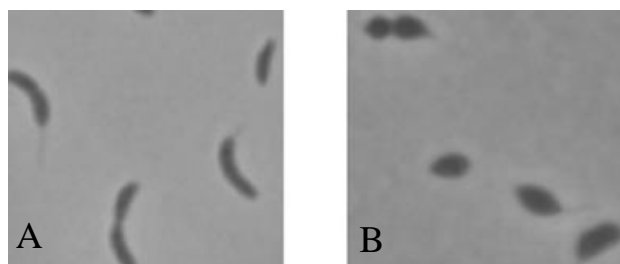


Em verde está representada a proteína FtsZ e o amarelo representa o local de divisão celular. Nota-se que após a atuação do A22 e supressão da MreB (vermelho), a célula bacteriana adota um padrão esférico.

Fonte: Adaptado de MARGOLIN (2009).

O A22 foi primeiramente descrito por induzir a forma esférica em isolados de *E. coli*, tornando o microrganismo mais favorável à fagocitose e à liberação de endotoxinas (IWAI et al., 2002). Além disso, demonstrou alterar a morfologia celular normal da cianobactéria *Anabaena* sp., enquanto que para uma estirpe mutante, resistente ao A22, a forma bacilar se manteve (WU et al., 2011). A Figura 11 demonstra o efeito da ação do A22 sobre a célula bacteriana.

Figura 11 – Efeito do S-(3,4-diclorobenzil) isotiourea (A22) sobre a célula bacteriana.



A imagem de microscopia óptica mostra a célula bacilar normal de *Caulobacter crescentus* (A) e a alteração neste formato após a exposição por 6 horas ao A22 na concentração 2,5 µg/mL (B).

Fonte: Adaptado de HOCKENHULL; SHI (2006).

O A22 atua sobre o crescimento bacteriano, pois exibe atividade antibacteriana contra diversas bactérias Gram negativas e efeito bacteriostático contra *E. coli* e *Shigella flexneri* (HOCKENHULL; SHI, 2006; NOGUCHI et al., 2008; YAMACHIKA et al., 2012). Além

disso, foi documentado que a despolimerização da proteína MreB provocada pelo A22, resulta em defeitos na divisão e segregação irregular de cromossomos em *E. coli* e *Caulobacter crescentus* (IWAI et al., 2002; GITAI et al., 2005; BEAN et al., 2009).

Neste contexto, tem-se direcionado a atividade do A22 à combinação com outros fármacos, de modo a potencializar sua atividade. Da mesma forma, compostos estruturalmente relacionados, assim como modificações químicas têm sido realizadas em sua estrutura com a finalidade de aumentar o arsenal de adjuvantes antimicrobianos e inserir a proteína MreB como um novo alvo terapêutico (NICHOLSON et al., 2012).

Considerando que pouco se sabe sobre o citoesqueleto bacteriano e as interações moleculares existentes entre as proteínas supracitadas, o A22 aparece, na maioria das vezes, como uma ferramenta útil na elucidação dos mecanismos envolvidos no estabelecimento do formato bacteriano (CABEEN; JACOBS-WAGNER, 2005). O baixo número de publicações relacionadas ao A22 evidencia que esta molécula deve ser mais explorada, principalmente porque atua sobre o citoesqueleto bacteriano, alvo de nenhum antimicrobiano anteriormente reportado (CALLAWAY, 2008). Do mesmo modo, o A22 possui um grande potencial antibiofilme, visto que o processo de adesão é dependente da integridade conformacional do microrganismo (FLEMMING; WINGENDER 2010).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana, antibiofilme, cito e genotóxica do S-(3,4-diclorobenzil) isotiourea (A22) sobre cepas padrões e isolados clínicos multirresistentes de *P. aeruginosa* provenientes do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do composto A22 frente a cepas padrões e isolados clínicos de *P. aeruginosa*;
- 2.2.2 Investigar os potenciais efeitos cito e genotóxicos do A22 em células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs);
- 2.2.3 Caracterizar fenotipicamente os biofilmes através dos testes de motilidade, agregação às células HeLa e adesão à superfície de Polietileno de Alta Densidade (PEAD);
- 2.2.4 Avaliar a capacidade de inibição do composto A22 sobre a formação de biofilmes e sobre os parâmetros fenotípicos previamente caracterizados;
- 2.2.5 Analisar microscopicamente o biofilme, formado na ausência e na presença do composto A22 em superfície de PEAD;

### 3 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

As publicações científicas incluem dois artigos publicados no periódico *Microbial Pathogenesis* e estão formatadas de acordo com as normas exigidas pelo mesmo, acessadas no site: <https://www.elsevier.com/journals/microbial-pathogenesis/0882-4010/guide-for-authors>.

#### 3.1 ARTIGO 1

**Título: Antibacterial, cyto and genotoxic activities of A22 compound ((S-3,4 dichlorobenzyl) isothiourea hydrochloride)**

Autores: Pauline Cordenonsi Bonez, Andiará Ramos, Kátia Nascimento, Priscila Copetti, Márcia Ebling de Souza, Grazielle Guidolin Rossi, Vanessa Albertina Agertt, Michele Sagrilo, Roberto Christ Vianna Santos, Marli Matiko Anraku de Campos.

Artigo publicado no periódico *Microbial Pathogenesis* (Fator de impacto: 2,009, Qualis B2) (*Microbial Pathogenesis*, n. 99, p. 14-18, 2016) Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.07.007>



## Antibacterial, cyto and genotoxic activities of A22 compound ((S-3, 4 - dichlorobenzyl) isothiourea hydrochloride)

Bonez, P C <sup>a</sup>, Ramos, A P <sup>b</sup>, Nascimento, K <sup>b</sup>, Copetti, P M <sup>b</sup>, Souza, M E <sup>c</sup>, Rossi, G G <sup>a</sup>, Agertt, V A <sup>a</sup>, Sagrillo, M R <sup>b</sup>, Santos, R C V <sup>a</sup>, Campos, M M A <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil.

<sup>b</sup> Cell Culture Laboratory, Centro Universitário Franciscano, Brazil.

<sup>c</sup> Laboratory of Microbiological Research, Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, Brazil

### ABSTRACT

The A22 is a chemical compound that acts as a reversible inhibitor of a bacterial cell wall protein MreB leading the rods to the coccoid form. Thus, by changing the bacterial form, many properties can be affected, as the acquisition of nutrients, cell division, the clamping surfaces, motility and pathogenesis. Infections caused by strains of *Pseudomonas aeruginosa* have great clinical importance because these microorganisms can include more than one resistance mechanism acting together, limiting treatment options. Thus, it is important to investigate the action of A22 against *P. aeruginosa*, once there are urgent needs for new antimicrobial compounds for increase the arsenal therapeutic to treat diseases caused by this microorganism. Therefore, this study investigated for the first time the antimicrobial activity of A22 against seven standard strains of Gram negative microorganisms and twenty-eight clinical isolates of *P. aeruginosa*. This study performed an additional investigation to analyze the cyto and genotoxic potential effects from A22 on human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The antibacterial activity of A22 was studied by broth microdilution method and time-kill assay. The cytotoxicity was evaluated by MTT assay at 24, 48 and 72 hours of exposure to A22 and the genotoxicity was evaluated by the Comet assay. The susceptibility tests showed A22 has a relevant antibacterial activity against *P. aeruginosa*, including multidrug-resistant (MDR) clinical isolates. The A22 treatment not showed genotoxic effects against PBMCs in almost all concentrations tested at 24 and 48 hours of exposure. Only for concentration of 32 µg/mL (highest tested) the damage index was significantly higher in all moments. The MTT assay demonstrated that A22 was able to maintain cell viability in all exposure times. In summary, the A22 demonstrated important anti-*Pseudomonas* activity and showed no cyto and genotoxic significant effect. These results need to be considered in future *in vitro* and *in vivo* studies in order to introduce the A22 as a possible therapeutic option.

**Key-words:** *P. aeruginosa*, A22, cytotoxicity, genotoxicity.

## 1. Introduction

Antimicrobial resistance is a significant concern for the global healthcare community [1]. Treatment of Gram-negative bacterial infections is increasingly challenging due to absence of new agents in the pharmaceutical pipeline and global spread of resistance. In this context, *P. aeruginosa* is among the most frequently isolated microorganisms in clinical laboratories, being reported as one of the main pathogens responsible for infections of the respiratory and urinary tract, as well as bloodstream infections [2]. *Pseudomonas* infection can be treated with a combination of an anti-*Pseudomonas* beta-lactam, as carbapenems, and an aminoglycoside, as ciprofloxacin [3].

However, *P. aeruginosa* has developed resistance to nearly every classes of antimicrobials available as aminoglycosides, quinolones and carbapenems [3]. These microorganisms become resistant through specific mechanisms such as induction of alternative enzymes which can inactivate the drug, alterations in the permeability or uptake of the drug, expression of efflux pumps, reduction in the number or affinity to the drug-binding sites and biofilm formation [4]. Infections caused by these strains may include more than one resistance mechanism acting together what makes it difficult to choose treatment and eradication of the disease promoting the increase in morbidity and mortality [5]. In this context, it is evident the need for research to advance the search for new compounds able to combat MDR microorganisms.

The compound A22 is a reversible, competitive inhibitor of the actin-like protein MreB, able to induce changes in cell shape, division defects and irregular segregation of chromosome in *Escherichia coli* and *Caulobacter crescentus* [6, 7, 8]. The A22 was first described to induce spherical cell in *E. coli* [6]. In addition, the A22 showed antibacterial activity against *P. aeruginosa* strains and present bacteriostatic effect against *E. coli* and *Shigella flexneri* [9, 10, 11]. On the other hand, the A22 is used as tool in studies involving bacterial cytoskeleton and its protein structures [12].

Thus, becomes promising to investigate the action of A22 compound, once it alters the structural conformation of the microorganism. Besides, could be inserted as a new therapeutic option in the future, being used alone or in combination with other antimicrobial drugs. However, it will be important to determine the range of concentrations that do not present toxic effects on cells. For this reason, were performed some complementary investigations to evaluate if A22 compound present some cyto and genotoxic effect using human PBMCs, such as an *in vitro* experimental model.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Microorganisms

Were used in this study the standard strains of *P. aeruginosa* PAO1, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *K. pneumoniae* ATCC 1705, *Escherichia coli* ATCC 35218, *E. coli* ATCC 8739 and *E. coli* ATCC 25922. Besides, were used 28 multidrug-resistant (MDR) clinical isolates of *P. aeruginosa* from the Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. The isolates were classified as MDR according to the results of susceptibility tests conducted in the Clinical Analysis Laboratory (CAL) of HUSM and definitions established by Magiorakos et al. [13].

This work was conducted with authorization of Research Ethics Committee (CEP) of the UFSM and approved by CAAE (Certificate Presentation for Ethics Assessment) number 12114713.1.0000.5346.

### 2.2 Compound

The compound A22 was purchased from Sigma-Aldrich (Product n° SML0471,  $\geq 95\%$  purity (HPLC), St. Louis, MO, USA), was diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and evaluated against to microorganisms at concentrations ranging from 0.25 to 128  $\mu\text{g/mL}$  according to the Clinical Laboratory Standards Institute guidelines CLSI M100-S23 [14].

In cyto and genotoxicity assays, the concentrations ranging from 0.25 to 32  $\mu\text{g/mL}$ . These concentrations were established from the drug molecular weight in relation to volume of well culture plate so as not to saturate the middle of the cell and do not alter the pH. The calculations of the concentrations were made from a mother concentration of 512  $\mu\text{g/mL}$ . It was taken into consideration the total volume of well of 250  $\mu\text{L}$  and standardized treatment volume of 20  $\mu\text{L}$  to each well.

## 2.3 Antibacterial assays

### 2.3.1 Preparation of inoculums

The inoculums sizes were standardized according to CLSI guidelines [14]. Isolated colonies were grown for 18–24 h in Muller Hinton Ágar (Difco) and the suspension were prepared in saline solution (NaCl 0,85%).

### 2.3.2 Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

The antibacterial activity of A22 was evaluated by broth microdilution method. The MIC of A22 were determined in 96-well microtitre plates using Mueller–Hinton broth (Difco). The A22 was diluted twofold serially ranging from 0.25 to 128  $\mu\text{g/mL}$ . The plates were incubated at 37°C and the MICs were recorded after 24 h of incubation. The MIC was defined as the lowest concentration of compound that inhibits bacterial visible growth. This test was performed in triplicate and the 2, 3, 5 -triphenyltetrazolium chloride was used as an indicator of microbial growth [14].

### 2.3.3 Time kill assay

The *in vitro* time kill assay was performed by diluting an overnight culture of *P. aeruginosa* PAO1 in Muller Hinton broth (Difco) to reach the final concentration of  $1 \times 10^5$  CFU/ml. The A22 was added according to their MICs ( $\frac{1}{2}$  MIC, MIC, 2 and  $4 \times$  the MIC). Samples were removed for colony counts at various time intervals (3, 6, 9, 12, and 24 h). Drug free inoculated medium was plated as a growth control. Plates were incubated at 37°C for 24 h. The inhibitory effect was calculated based on the CFU (colony forming units). [15] The bactericidal activity was defined as a 3-log reduction of viable counts in culture treated with the A22 compared with that of the untreated control at a specific time point [16]. The procedure was repeated three times.

## 2.4 Evaluation of toxicity

### 2.4.1 Cell culture

The PBMCs derived from blood discard samples of healthy adults from the Analysis Clinics Laboratory of Centro Universitário Franciscano (LEAC-UNIFRA). Blood specimens were subjected to the procedure of separation of its constituents by density gradient using Ficoll Histopaque-1077<sup>®</sup> reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) followed by centrifugation for 30 min. The PBMCs were plated in 6-well plates containing RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) culture with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin and streptomycin. The cells were cultured at an initial density of  $2 \times 10^5$  cells mL<sup>-1</sup> of material [17]. The use of cells was approved by the ethics committee in research with human beings of the UNIFRA by CAAE number: 31211214.4.0000.5306.

### 2.4.2 Cytotoxicity evaluation

The cytotoxicity evaluation was performed by MTT assay (tetrazolium colorimetric assay). This technique is based on the reduction of MTT bromide salt {[3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]} (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) by viable cells, producing a product called formazan in the mitochondria [18]. This test was performed according Denizot; Lang [19] with some modifications. The cell culture exposed to different concentrations of A22 (0.25 µg/mL until 32 µg/mL) were incubated for 24, 48 and 72 h at 37°C. After, 20 µL of MTT (5 mg mL<sup>-1</sup> diluted in phosphate buffer pH 7.4) were added to plates and incubated for 4h at 37°C. The supernatant was removed and the formazan was dissolved in 200 µL of DMSO, such that the formazan crystals were released into the extracellular medium. Viable cells with active metabolism convert MTT into a purple colored formazan, when cells die, they lose the ability to convert MTT into formazan, thus color formation serves as an useful and convenient marker of only the viable cells. The test was performed in triplicate and the absorbance was measured colorimetrically by spectrophotometry at a wavelength of 570 nm. It has made a positive control for cell death using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and a negative control containing the cell culture only.

### 2.4.3 Genotoxicity evaluation

The genotoxicity evaluation was performed by Comet assay. This analysis was adapted following the protocol described by Garcia et al. [20]. The cells treated with different concentrations (0.25 µg/mL until 32 µg/mL) of A22 were suspended in low-melting agarose point (deposited in glass slide precoated with a layer of 1.5% agarose). The material was immersed in lysis solution (lysis solution of 89–10 mL of dimethyl sulfoxide and 1 mL of Triton X-100) for the removal of membranes and cytoplasm. Subsequently, the slides were incubated in alkaline electrophoresis buffer at pH 13 (300 mmol L<sup>-1</sup> NaOH and 1 mmol L<sup>-1</sup> EDTA in distilled water) and subjected to electrophoresis for 30 min at 25 V and 300 mA. Then, the processes of neutralization (neutralizing buffer pH 7.5), fixation (15% trichloroacetic acid) and coloration (acridine orange) were performed, so the genetic material could be analysed. One hundred cells were analysed in an optical microscope and were classified according to their tail length. The cells received scores from 0 (no damage) to 4 (maximum damage). The test was performed in triplicate, and the data were transformed into a damage index to be submitted to statistical analysis [21]. The genotoxic potential was measured at 24, 48 and 72 hours after exposure to A22 and was considered genotoxic, the concentrations that resulted in a damage index higher than 0.1.

### 2.5 Statistical analysis

All tests were performed in 3 replicates and the results were expressed on Average ± Standard deviation. The time-kill curve was performed using GraphPad Prism<sup>®</sup> 5. The Statistical analysis for geno and cytotoxicity were performed using SPSS<sup>®</sup> software, version 19.0. Analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey *post hoc* test was applied for statistical analysis with the level of significance at  $p < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1 Antibacterial assays

##### 3.1.1 Determination of MIC

Inhibitory activity of A22 was observed on *Escherichia coli* and *P. aeruginosa* strains. The MIC values of strains standards are described in table 1. The A22 showed high inhibitory activity against isolates of *P. aeruginosa*, once inhibited visible growth at low concentrations. The MIC values of isolates range between 0.25 µg/mL and 16 µg/mL. 25% of the isolates obtained value of 4 µg/mL, 28.5% of 2 µg/mL, 25% resulted in MIC of 1 µg/mL, 14,2% of 0.5 µg/mL and 7% include the values of 0.25 µg/mL and 16 µg/mL.

##### 3.1.2 Time-kill assay

After identification of susceptible microorganisms to A22, a death time curve for *P. aeruginosa* PAO1 was performed using the following concentrations of A22 treatment: ½ MIC (0.5 µg/mL), MIC (1 µg/mL), and 2 x MIC (2 µg/mL) and 4 x MIC (4 µg/mL). As figure 1 shows, the concentration of MIC, 2 x MIC and 4 x MIC present significant activity against the growth of *P. aeruginosa* PAO1, however, only the concentration of 2 x MIC and 4 x MIC were able to zero growth on the plates. The A22 began to decrease the growth after 12 hours of exposure to 2 x MIC and 4 x MIC of A22 and 3-log reduction was seen after 24 hours.

#### 3.2 Cytotoxicity evaluation

As expected, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (death control) decreased significantly cell viability when compared to control. As seen in figure 2, the A22 was able to maintain cell viability in almost all concentrations in all times of exposure. There was a decrease in cell viability only the concentration of 32 µg/mL, however, this decrease was smaller than that observed in death control.

### 3.3 Genotoxicity evaluation

The results obtained in genotoxicity assay are shown in table 2. The damage index was low in most concentrations of A22 when compared to control, being dependent on concentration and exposition time. The A22 treatment no showed genotoxic effects against PBMCs in almost all concentrations tested at 24 and 48 hours of exposure. However, for the concentration 32 $\mu$ g/mL, the damage index was significantly higher in all the times.

## 4. Discussion

The results reported here are the first to evaluate the activity of A22 against clinical isolates of *P. aeruginosa* and the first study to check the cyto and genotoxicity effects of A22. The broth microdilution assay and time-kill assay demonstrate that compound A22 is a promising agent against *P. aeruginosa*, because the MIC values were significantly lower, corroborating with previous studies in standards strains of *P. aeruginosa*, *E. coli* and *Shigella flexneri* [9, 10, 11]. In addition, the MIC values found can be compared to reported for antimicrobials already used in anti-*Pseudomonas* therapy such as meropenem,  $\beta$ -lactam that as A22, acts on the bacterial cell wall [14].

The good performance of the A22 is due to probably, its inhibition of binding ATP – MreB, leading to diffuse distribution MreB in the cytoplasm and loss of cell morphology and viability [8]. This happens because the MreB protein is responsible for keeping the organization of lipids and membrane proteins. Therefore, the MreB inhibition by A22 prevents the synthesis of cell wall by the inability to recruit the necessary proteins to the site of synthesis [22]. Thus, by changing the shape of the bacterial cell, many properties are affected as acquisition of nutrients, cell division, fixing surfaces, motility and pathogenesis [23]. Besides, the A22 makes the microorganisms more favorable to phagocytosis and the release of endotoxins [6].

The time-kill assay confirmed the broth microdilution method. The kill curve demonstrated low survivability of *P. aeruginosa* strain PAO1 when exposed to A22, mainly, because it had no growth in time of 24 hours in concentrations of 2 x MIC (2  $\mu$ g/mL) and 4 x MIC (4  $\mu$ g/mL). As can be seen in figure 1, the MIC concentration did not reduce significantly the growth on the plates at all times evaluated and the growth obtained on plates containing 1/2 MIC was similar to the positive growth control. Thus, suggest that the action of A22 is dose-dependent. Moreover, the A22 had fast onset of action with a large decrease in



growth in 12 hours, keeping until the time of 24 hours when there was no growth. These results were similar to that obtained against the ciprofloxacin under the same testing conditions, where there was low growth for 12 hours and sterilization in 24 hours [24].

The A22 is used as a tool to understand mechanisms of action of other antimicrobial and the complexity around the organization of membrane bacterial cell [7, 12]. Other studies, investigating the action of compound A22 and the modification of its structure with the purpose to discover antimicrobial analogue [6, 9, 10, 11, 25]. However, no were studies reported about the cyto and genotoxic effects.

The MTT assay evaluates cell viability from the sample, and the level of mitochondrial metabolic activity of viable cells. The main advantage of this colorimetric assay is the speed with which samples can be processed, besides showing high degree of accuracy [18]. In the present study, the A22 was able to maintain cell viability in all exposure times. As seen in figure 2, A22 presented a good protective effect in low concentrations except in concentration of 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (highest tested). Our results are similar to those found by Sueke et al. [26], which assessed the cytotoxicity of meropenem. Thus, the cytotoxicity of A22 can be compared to cytotoxicity presented by this extensively used carbapenem. After adding the DMSO, there was the formation of purple crystals formazan, showing that the cells remained were alive and metabolically active, even after long period of exposure to the A22. The results were also apparent visually through the purple color formed (data not show) and the amount of formazan generated was directly proportional to the viable cell number, characterizing another advantage of this method.

The Comet assay is a standard method for evaluating DNA damage, of simple execution and is highly sensitive method to detect low levels of DNA damage. It is an ultrasensitive, simple, fast and accurate test [20]. In addition, it can be applied in different cells kind: PBMCs, bucal epithelial cells, nasal epithelial cells, lens epithelium, tear duct epithelial cells, sperms as well as biopsy tissues. So, the Comet assay is a versatile and potential tool of choice to assess the DNA damage and repair efficiency [27]. The A22 treatment not showed genotoxic effects against PBMCs in almost all concentrations tested at 24 and 48 hours of exposure, some genotoxic damage was observed in all concentrations in time of 72 hours. Only for concentration of 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$  the index damage was significantly higher in all the times. Comparing these results with those obtained for ciprofloxacin performed by Itoh et al. [28], A22 was less genotoxic. Although the concentrations evaluated vary according to the antibacterial activity of each compound, this is an important result.

The biological activity of S-benzylisothiurea derivatives has not described in detail yet. There are reports that some acylisothiurea derivatives inhibit aldehyde dehydrogenase *in vivo* and derivatives S-benzylisothiurea were toxic in rats [6, 29]. However, is no report about the cyto and genotoxic potential of the A22 specifically. Thus, the results obtained in this study are encouraging, once the range of concentrations tested in cyto and genotoxicity assays are not harmful to the cells and to DNA and comprises the MICs obtained for all tested microorganisms.

## 5. Conclusion

In summary, the results showed that changing the structural conformation of the bacterial cell, through inhibition of protein MreB by the A22, obtained highly effective anti-*Pseudomonas*. Considering that the isolates of this study are resistant to multiple classes of drugs, these results can have impactful because the A22 can be confirmed as a new antimicrobial agent, besides to insert MreB protein as a new therapeutic target. The low toxicity of A22 revealed in cyto and genotoxicity assays, makes promising invest in more research *in vitro* and *in vivo* for the purpose to insert it as a new antimicrobial and increase the therapeutic arsenal against MDR microorganisms.

## References

- [1] M. Martins, M. P. McCusker, M. Viveiros, I. Couto, S. Fanning, J. M. Pagès, L. Amaral. A simple method for assessment of MDR bacteria for over-expressed efflux pumps. *The Open Microbiology Journal*. 7 (2013) 72-82, <http://dx.doi.org/10.2174/1874285801307010072>.
- [2] E. B. Hirsch; V. H. Tam. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert review of pharmacoeconomics & outcomes research*. 10 (2010) 441-451, <http://dx.doi.org/10.1586/erp.10.49>.
- [3] CDC. Antibiotic resistance threats in the united states, 2013. centers for disease control and prevention. Available at <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>.
- [4] M. Woolhouse; J. Farrar. Policy: An intergovernmental panel on antimicrobial resistance. *Nature*. 509 (2014) 555-557.
- [5] J. B. Marques, P. C. Bonez, V. A. Agertt, V. C. Flores, T. V. Dalmolin, G. G. Rossi, N. L. F. Dal Forno, B. V. Bianchini, C. R. Mizdal, F. S. Siqueira, R. A. Righi, B. H. Meneghetti, P. A. Trindade, R. C. V. Santos, M. M. A. Campos. Molecular characterization of Enterobacteriaceae resistant to carbapenem antimicrobials. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 51 (2015) 162-165.

- [6] N. Iwai; K. Nagai, M. Wachi. Novel S-benzylisothiourea compound that induces spherical cells in *escherichia coli* probably by acting on a rod-shape-determining protein(s) other than penicillin-binding protein 2. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 66 (2002) 2658-2662, <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.66.2658>.
- [7] Z. Gitai, N. A. Dye, A. Reisenauer, M. Wachi, L. Shapiro. MreB Actin-mediated segregation of a specific region of a bacterial chromosome. *Cell*. 120 (2005) 329-341, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.007>.
- [8] G. J. Bean, S. T. Flickinger, W. M. Westler, M. E. McCully, D. Sept, D. B. Weibel, K. J. Amann. A22 Disrupts the bacterial actin cytoskeleton by directly binding and inducing a low-affinity state in MreB. *Biochemistry*. 48 (2009), <http://dx.doi.org/10.1021/bi900014d>.
- [9] N. Noguchi, K. Yanagimoto, H. Nakaminami, M. Wakabayashi, N. Iwai, M. Wachi, M. Sasatsu. Anti-infectious effect of s-benzylisothiourea compound a22, which inhibits the actin-like protein, mreB, in *Shigella flexneri*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 31 (2008) 1327-1332.
- [10] A. Nicholson, J. D. Perry, A. L. James, S. P. Stanforth, S. Carnell, K. Wilkinson, C. M. Anjam Khan, A. De Soyza, F. K. Gould. In vitro activity of S-(3, 4-dichlorobenzyl) isothiourea hydrochloride and novel structurally related compounds against multidrug-resistant bacteria, including *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* complex. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 39 (2012) 27-32, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.08.015>.
- [11] S. Yamachika, C. Sugihara, H. Tsuji, Y. Muramatsu, Y. Kamai, M. Yamashita. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* compound, 1, 2, 3, 4-tetrahydro-1,3,5-triazine derivative, exerts its action by primarily targeting MreB. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 35 (2012) 1740-1744.
- [12] E. M. Mauriello, F. Mouhamar, B. Nan, A. Ducret, D. Dai, D. R. Zusman, T. Mignot. Bacterial motility complexes require the actin-like protein, MreB and the Ras homologue MglA. *The EMBO Journal*. 29 (2010) 315-326, <http://dx.doi.org/doi:10.1038/emboj.2009.356>.
- [13] A. P. Magiorakos, A. Srinivasan, R. B. Carey, Y. Carmeli, M. E. Falagas, C. G. Giske, S. Harbarth, J. F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D. L. Paterson, L. B. Rice, J. Stelling, M. J. Struelens, A. Vatopoulos, J. T. Weber, D. L. Monnet. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. 18 (2012) 168-281, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.
- [14] CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing, 22th informational supplement. M100 - S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2013.
- [15] G. Meiyazhagan, R. Raju, S. B. Winfred, B. Mannivanan, H. Bhoopalan, V. Shankar, S. Sekar, D. P. Venkatachalam, R. Pitani, V. Nagendrababu, M. Thaiman, K. Devivanayagam, J. Jayaraman, R. Ragavachary, G. Venkatraman. Bioactivity studies of  $\beta$ -lactam derived polycyclic fused pyrroli-dine/pyrrolizidine derivatives in dentistry: in vitro, in vivo and in silico studies. *PlosOne*. 10 (2015), <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0131433>.

- [16] T. T. Aung , J. K. Yam, S. Lin, S. M. Salleh, M. Givskov, S. Liu, N. C. Lwin N. C. Yang , R. W. Beuerman. Biofilms of pathogenic nontuberculous mycobacteria targeted by new therapeutic approaches. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 60 (2016) 24-35, <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01509-15>.
- [17] G. Botton , C. W. Pires, F. C. Cadoná , A. K. Machado , V. F. Azzoli, I. B. Cruz, M. R. Sagrillo, J. R. Praetzel . Toxicity of irrigating solutions and pharmacological associations used in pulpectomy of primary teeth. *International Endodontic Journal* (2015) 1-9, <http://dx.doi.org/10.1111/iej.12509>.
- [18] T. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65 (1983) 55-63.
- [19] F. Denizot; R. Lang. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*. 89 (1986) 271-277.
- [20] O. García, T. Mandina, A. I. Lamadrid, A. Diaz , A. Remigio, Y. Gonzalez, J. Piloto, J. E. Gonzalez, A. Alvarez . Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay. Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. *Mutation Research*. 556 (2004) 25-34, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.06.035>.
- [21] G. F. dos Santos Montagner , M. Sagrillo, M. M. Machado, R. C. Almeida, C. P. Mostardeiro, M. M. Duarte, I. B. da Cruz. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. *Toxicology In Vitro*. 24 (2010) 1410-6, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2010.04.010>.
- [22] H. Strahl, F. Burmann, L.W. Hamoen. The actin homologue MreB organizes the bacterial cell membrane. *Nature Communications* (2014) 1-11, <http://dx.doi.org/doi:10.1038/ncomms4442>.
- [23] K. D. Young. Bacterial morphology: why have different shapes? *Current Opinion in Microbiology*. 10 (2007) 596-600, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.009>.
- [24] H. C. Su , K. Ramkisson, J. Doolittle, M. Clark, J. Khatun, A. Secrest, M. C. Wolfgang, M. C. Giddings. The development of ciprofloxacin resistance in *pseudomonas aeruginosa* involves multiple response stages and multiple proteins. 54 (2010) 4626-4635, <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00762-10>.
- [25] X. Wu, N. Iwai, W. L. Chen. Effects of S-(3,4-dichlorobenzyl) isothiourea on different cellular events in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Research in Microbiology* 162 (2011) 375-381, <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2011.02.001>.
- [26] H. Sueke, S. Kaye, M. C. Wilkinson, S. Kennedy, V. Kearns, Y. Zheng, P. Roberts, S. Tuft, T. Neal. Pharmacokinetics of Meropenem for Use in Bacterial Keratitis. *Investigative ophthalmology & visual science* 56 (2015) 5731-5738, <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.15-17077>.

- [27] V. Gunasekarana, G. Victor raj, P. A. Chand. Comprehensive review on clinical applications of comet assay. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 9 (2015) GE01-GE05. [http://dx.doi.org/ 10.7860/JCDR/2015/12062.5622](http://dx.doi.org/10.7860/JCDR/2015/12062.5622).
- [28] T. Itoh, K. Mitsumori, S. Kawaguchi, Y. F. Sasaki. Genotoxic potential of quinolone antimicrobials in the in vitro comet assay and micronucleus test 603 (2006) 135–144. [http://dx.doi.org/ 10.1016/j.mrgentox.2005.11.003](http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.11.003).
- [29] F. N. Shirota, J. M. Stevens-Johnk, E. G. DeMaster, H. T. Nagasawa HT. Novel prodrugs of cyanamide that inhibit aldehyde dehydrogenase in vivo. *Journal of Medicinal Chemistry* 40 (1997) 1870-1875, [http://dx.doi.org/ 10.1021/jm9606296](http://dx.doi.org/10.1021/jm9606296).

**Table 1**

Antimicrobial activity of S-(3,4-diclorobenzil) isotiourea (A22) against strains standards.

Strains standards	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	128
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 1705	128
<i>E. coli</i> ATCC 35218	2
<i>E. coli</i> ATCC 8739	1
<i>E. coli</i> ATCC 25922	128
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	1
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	32

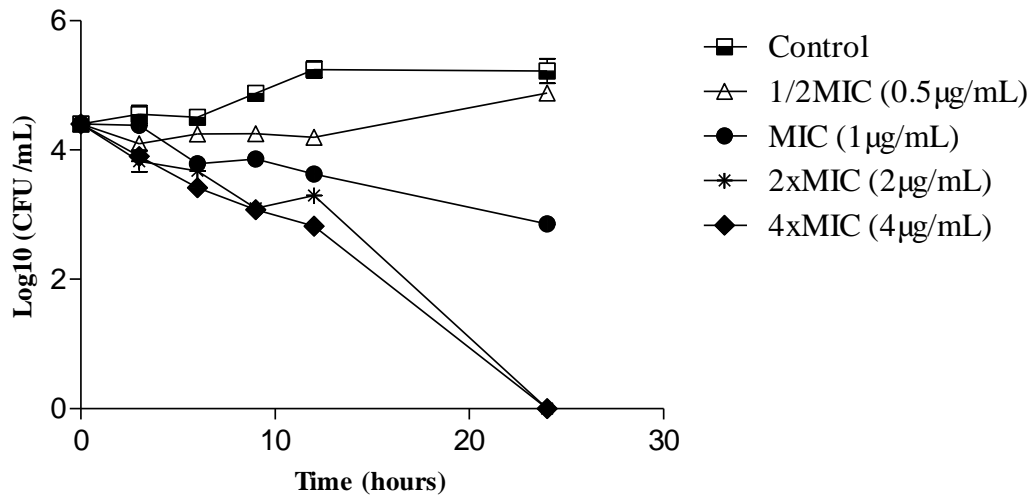
MIC: Minimal Inhibitory Concentration  
 ATCC: American Type Culture Collection

**Table 2**

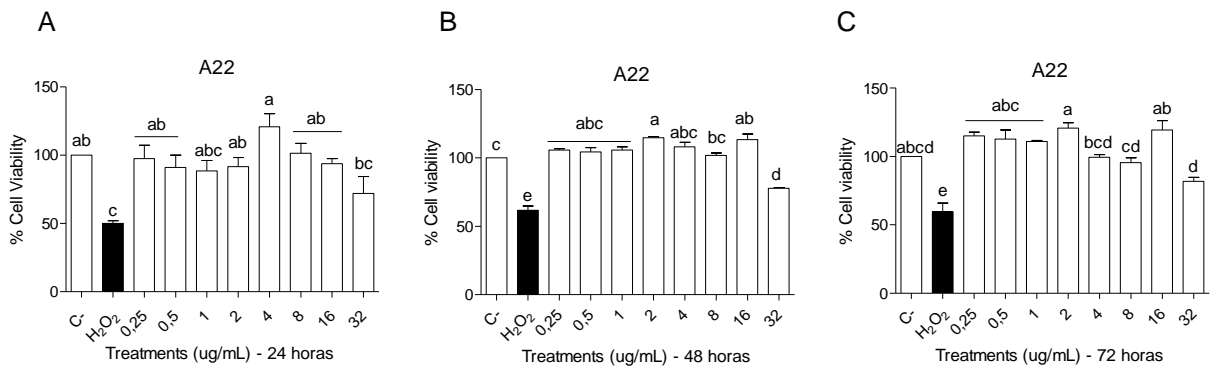
DNA migration in the comet assay for assessment of genotoxicity of S-(3,4-diclorobenzil) isotiourea (A22) exposition in peripheral blood mononuclear cell culture during 24, 48 and 72 hours.

<i>Index damage</i>			
Based in comet frequency (per 100 nuclei analyzed)			
Treatments A22 ( $\mu\text{g/mL}$ )	24 hours	48 hours	72 hours
<b>Negative control</b>	—	—	0.05
<b>Positive control</b>	0.5	0.7	0.7
<b>0.25</b>	—	—	0.05
<b>0.5</b>	—	—	0.05
<b>1</b>	—	—	0.06
<b>2</b>	—	—	0.08
<b>4</b>	—	—	0.08
<b>8</b>	—	—	0.08
<b>16</b>	—	—	0.1
<b>32</b>	0.13	0.23	0.38

### Time-kill kinetic of A22 on *Pseudomonas aeruginosa* PAO1



**Fig 1.** Time-kill curve on *P. aeruginosa* PAO1 exposed to several concentrations of S-(3,4-dichlorobenzil) isotiourea (A22) (based on MIC).



**Fig 2.** Comparison of cytotoxicity evaluated by MTT reduction among human cells exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and treated with S-(3,4-dichlorobenzil) isotiourea (A22) in 24 hours (A), 48 hours and 72 hours (C) at different concentrations. Values are mean  $\pm$  SE. Different letters within treatment indicate

### 3.2 ARTIGO 2

**Título: Anti-biofilm activity of A22 ((S-3,4-dichlorobenzyl) isothiourea hydrochloride) against *Pseudomonas aeruginosa*: influence on biofilm formation, motility and bioadhesion**

Autores: Pauline Cordenonsi Bonez, Grazielle Guidolin Rossi, Jardel Rodrigo Bandeir, Andiara Prates Ramos, Caren Rigon Mizdal, Vanessa Albertina Agertt, Eloísa Salete Segatto Dalla Nora, Márcia Ebling de Souza, Camilla Fillippi dos Santos Alve, Fallon Siqueira dos Santos, Rodrigo de Almeida Vaucher, Roberto Christ Vianna Santos, Marli Matiko Anraku de Campos.

Manuscrito submetido em 26 de abril de 2017 para o periódico *Microbial Pathogenesis* (Fator de impacto: 2,009, Qualis: B2).



## Anti-biofilm activity of A22 ((S-3,4-dichlorobenzyl) isothiourea hydrochloride) against *Pseudomonas aeruginosa*: influence on biofilm formation, motility and bioadhesion

Pauline Cordenosi Bonez <sup>a</sup>, Grazielle Guidolin Rossi <sup>a</sup>, Jardel Rodrigo Bandeira <sup>b</sup>, Andriara Prates Ramos <sup>b</sup>, Caren Rigon Mizdal <sup>a</sup>, Vanessa Albertina Agertt <sup>a</sup>, Eloísa Salette Segatto Dalla Nora <sup>a</sup>, Márcia Ebling de Souza <sup>c</sup>, Camilla Fillippi dos Santos Alves <sup>a</sup>, Fallon Siqueira dos Santos <sup>a</sup>, Rodrigo de Almeida Vaucher <sup>d</sup>, Roberto Christ Vianna Santos <sup>a</sup>, Marli Matiko Anraku de Campos <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal de Santa Maria, Avenue Roraima 1000, zip code: 97105-900, Santa Maria, Brazil.

<sup>b</sup> Cell Culture Laboratory, Centro Universitário Franciscano, Rua dos Andradas 1614, zip code: 97010-032, Santa Maria, Brazil.

<sup>c</sup> Oral, Universidade Federal de Santa Maria, Avenue Roraima 1000, zip code: 97105-900, Santa Maria, Brazil.

<sup>d</sup> Microbiology Research Laboratory, Universidade Federal de Pelotas, Rua Gomes Carneiro, 1, zip code: 96010-610, Pelotas, Brazil.

### ABSTRACT

Bacterial biofilms are involved in various medical infections and for this reason it is essential understanding adhesion mechanisms of microorganisms to develop new strategies of prevention and control. Different approaches have been used for preventing biofilm related infections in health care settings, such as use of surface coatings agents in medical implants. In this context, is necessary to explore new compounds with anti-biofilm activity. Thus, this study evaluated for the first time the action of A22 against biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain and multi-resistant clinical isolates on biotic and abiotic surfaces. A22 acts as inhibitor of the MreB protein of the bacterial cell wall, causing the rods to change shape to the coccoid form. In this work, A22 at subinhibitory concentrations was able to prevent biofilm formation, and atomic force microscopy images showed that A22 was highly effective in inhibiting adhesion on polyethylene surfaces. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 exhibited a strong ability to adhere to HeLa cells, and A22 inhibited the aggregation after 4 h of exposure. *Swarming* and *twitching* motilities were significantly altered by A22 at subinhibitory concentrations. Thus, by changing the shape of the bacterial cell, many properties can be affected, such as motility, surface adhesion and biofilm formation. This work presents A22 as a promising novel antibacterial or surface coating agent of medical materials.

**Keywords:** A22; adhesion; bacterial motility; biofilms; *Pseudomonas aeruginosa*; surfaces.

## 1. Introduction

Microorganisms can migrate from their planktonic state to a sessile state. They grow and spread throughout the environment, where they can adhere to a surface and form into groups and cellular aggregates, ultimately forming complex communities called biofilms. Microbial adhesion and biofilm formation can occur on biotic or abiotic surfaces in natural and industrial environments [1, 2].

Biofilm formation is a public health concern. Pathogenic microorganisms can colonise the surfaces of medical implants and surgical instruments as well as living tissues, such as lungs, wounds and bones [3, 4]. In addition, infections caused by microorganisms in biofilms are serious and persistent because antimicrobials and biocides face difficulties penetrating into the compact and dense structure of the biofilm to exert their action [5].

*Pseudomonas aeruginosa* is among the microorganisms most frequently associated with biofilm formation in medical devices of permanent use, causing hospital infections that persist after antimicrobial treatment [6]. *Pseudomonas aeruginosa* is among the bacteria most isolated from clinical laboratories, being responsible for respiratory and urinary tract infections as well as bloodstream infections [7].

Treatment of infections associated with biofilm formation is difficult. Therefore, it is important to find alternatives capable of preventing and combating the adhesion and formation of biofilms on surfaces. In this context, the compound A22 could be of use. A22 is a competitive and reversible inhibitor of the MreB protein present in the cell wall of Gram-negative bacteria that is capable of inducing changes in bacterial form and defects in cell division [8, 9, 10]. A22 was first described by its ability to induce spherical cells in *Escherichia coli*, and A22 has been shown to demonstrate excellent antibacterial activity against clinical isolates of *P. aeruginosa* and bacteriostatic effects against *E. coli* and *Shigella flexneri* [11, 12, 13]. In addition, A22 does not present significant cytotoxic and genotoxic effects against human mononuclear cells [13].

In summary, the anti-biofilm activity evaluation of the A22 compound appears to be a promising approach, since many antimicrobials and sanitizers have been shown to be ineffective against the growth of microbial resistance, especially in the case of biofilms. It is suggested that the change in the structural conformation of the microbial cell caused by A22 can alter parameters essential for biofilm formation, such as motility and adhesion capacity. Therefore, the goal of the present work was to evaluate, for the first time, the influence

exerted by A22 on the ability of bacterial adhesion on inert and living surfaces. Likewise, the influence of A22 on bacterial motility was also evaluated in order to present it as a possible new antimicrobial or surface coating agent.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microorganisms

In this study, the standard strain *P. aeruginosa* PAO1 was used in all assays. In addition, 28 multidrug-resistant (MDR) clinical isolates of *P. aeruginosa* from the Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil were used, collected during a 12-month period between 2015 and 2016. The isolates were classified as MDR according to the results of susceptibility tests conducted in the Clinical Analysis Laboratory of HUSM and the definitions established by Magiorakos et al. [14].

This work was conducted with authorisation from the Research Ethics Committee of the UFSM (Universidade Federal de Santa Maria) and approved by the Certificate Presentation for Ethics Assessment, number 12114713.1.0000.5346.

### 2.2. Compound

The compound A22 was purchased from Sigma-Aldrich (Product n° SML0471,  $\geq 95\%$  purity (HPLC - High Performance Liquid Chromatography), St. Louis, MO, USA) and diluted in dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich) for a stock solution with a concentration of  $20 \text{ mg ml}^{-1}$ . The concentrations of compound A22 used in all tests were based on the results of the susceptibility, genotoxicity and cytotoxicity tests performed by Bonez et al. [13]. The concentrations tested in all assays did not present genotoxic or cytotoxic effects to human mononuclear cells.

### 2.3. Biofilm formation in polystyrene plates: semi-quantitative assay

This assay used conventional 96-well polystyrene plates as an adhesion material, following the protocol described by Bonez et al. [15]. As a positive control for biofilm formation, the *P. aeruginosa* PAO1 standard strain was used. Likewise, the MDR clinical isolates were subjected to the assay to evaluate their adhesion abilities. Bacterial suspensions

were prepared in Mueller Hinton broth (Himedia<sup>®</sup>, Mumbai, Índia), adjusted to the 0.5 McFarland scale and incubated for 24 h at 37 °C to promote adhesion.

The biofilm formed was revealed using the crystal violet technique. After incubation, successive washes were performed with physiological solution to remove the weakly adhered cells. Then, 200 µl of 0.1% crystal violet suspension were added to the wells and allowed to stand for 10 min. The plates were subsequently washed again, and 200 µl of 95% ethanol were added for 15 min. Finally, the ethanol was transferred to another plate for reading the optical density (OD) at 570 nm using a TP – Reader<sup>®</sup> (ThermoPlate, Inc, Ohio, USA) (Bonez et al. [15]).

Based on the absorbances, each microorganism was classified by its adhesion capacity in polystyrene. Microorganisms were classified as being non-adhesive when  $OD \leq OD_{nc}$  as well as having weak adhesion when  $OD_{nc} < OD < 2 \times OD_{nc}$ , moderate adhesion when  $2 \times OD_{nc} < OD < 4 \times OD_{nc}$  and strong adhesion when  $4 \times OD_{nc} \leq OD$ , where ‘nc’ denotes the absorbance of the negative control [16]. The highly adhesive microorganisms were subjected to the assay to determine their minimum concentration of biofilm inhibition (MCBI).

#### 2.4. Determination of the MCBI

In this technique, the standard strain and the highly adhesive clinical isolates in the semi-quantitative assay were subjected to the A22 susceptibility test using subinhibitory concentrations in order to determine the MCBI. The subinhibitory concentrations were based on the minimum inhibitory concentration (MIC) values previously published by Bonez et al. [13]. Plates were subjected to the semi-quantitative as previously described by Bonez et al. [15].

#### 2.5. Bioadhesion assays

##### 2.5.1. Biofilm formation on the surface of high density polyethylene (HDPE)

In this assay, small HDPE surfaces (Braskem, São Paulo, Brazil) of 1 cm<sup>2</sup> each were inoculated into 12-well plates containing 1 ml of brain heart infusion broth and 100 µl of suspension of *P. aeruginosa* PAO1 on the 0.5 McFarland scale per well. The substrates (HDPE surfaces) were inoculated in the absence or presence of A22 at the MIC (1 µg ml<sup>-1</sup>) and at the highest concentration capable of inhibiting biofilms in the semi-quantitative assay

[13]. After 24 h of incubation at 37 °C, the surfaces were fixed in absolute methanol for 1 min and then analysed via atomic force microscopy (AFM) to visualise the three-dimensional structure of the biofilm [17].

### 2.5.2. *Biofilm observation by AFM*

The three-dimensional analysis of the biofilm structure was performed by AFM according to the methodology described by Quatrin et al. [17], with some modifications. Images of the biofilms formed on the HDPE substrates, with and without A22, were captured using an Agilent Technologies 5500 microscope (California, USA). The images (1  $\mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ ) were collected in non-contact mode using PPP-NCL tips (Nanosensors, Neuchatel, Switzerland; force constant = 48 N m<sup>-1</sup>) and were analysed using PicoView software (Keysight Technologies, São Paulo, Brazil).

### 2.5.3. *Bacterial adhesion assay to HeLa cells*

The assay to verify the adhesion of microorganisms to human cells was based on the methodology proposed by Castro et al. [18], with some modifications. This methodology was performed with the HeLa human cell line, which is widely used in research. HeLa cells were cultured in RPMI 1640 media (Vitrocell Embriolife, Campinas, Brazil) supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum and antimicrobials (ciprofloxacin and amphotericin B) until a high degree of confluence ( $\pm 90\%$ ) was reached. The cells were then trypsinised, resuspended and centrifuged, after which they were ready for use. The suspension of the *P. aeruginosa* PAO1 strain was prepared from its cultivation on Muller–Hinton agar at a 0.5 McFarland density.

The bioadhesion assay was performed in 12-well plates containing 18-mm-diameter circular coverslips. Cells were added onto the coverslips at a concentration of  $2 \times 10^5$  cells per well and incubated at 37 °C until approximately 50 to 70% confluency was reached. After this period, the cells were washed with phosphate buffered saline (PBS), and 100  $\mu\text{l}$  of bacterial suspension were added to the coverslips with replacement of the RPMI media, without antimicrobials. Positive controls for adhesion consisted of wells containing only bacterial and cell cultures. This same process was also performed in the presence of A22 at concentrations of the MIC (1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), MIC/2 (0.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) and MIC/4 (0.25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). The readings were performed after 4 and 8 h of incubation. Longer time intervals were not evaluated because the

cells lost their viability by acidifying the media over time. The plates were incubated at 37 °C in a CO<sub>2</sub> atmosphere. The wells were washed with PBS and the coverslips subjected to Papanicolaou staining. The reading was obtained by visualising and counting the bacilli adhered to the cells using an optical microscope.

## 2.6. Motility assay

The evaluation of bacterial motility was performed based on the protocol described by Déziel et al. [19], with some modifications. *Swimming*, *swarming* and *twitching* motilities were analysed by inoculating 4 µl of bacterial suspension of the *P. aeruginosa* PAO1 standard strain onto the centre of the plates containing culture media specific for each type of motility. After 24 h of incubation at 37 °C, motility was evaluated by analysing the circular area formed by bacterial cells migrating away from the inoculation site. The halos formed were measured and subjected to statistical analysis.

The motility assay was performed on the culture media without treatment and on the media containing the subinhibitory concentration of 0.5 µg ml<sup>-1</sup> of A22. The interpretation was performed by observing the variation in the colony growth (in mm) from the inoculation point, comparing the cultures on the plates with and without the compound.

## 2.7. Statistical analysis

All tests were performed in three replicates, and the results were expressed as the average ± standard deviation. The optical density results obtained from the biofilm formation tests on polystyrene plates, the adhesion to HeLa cells and the averages of the halos corresponding to the motility test were subjected to the Student *t* test, considering statistical differences when  $p < 0.05$ . GraphPad Prism<sup>®</sup> 5 software (São Paulo, Brazil) was used to construct the graphs.

### 3. Results

#### 3.1. Biofilm formation in polystyrene plates: semi-quantitative assay and determination of the MCBI

In the biofilm formation test on the polystyrene surface, as verified in Table 1, 14 of the 28 clinical isolates evaluated were classified as highly adhesive to this material and were subjected to the A22 inhibition test. By analysing the absorbance obtained (Table 1) for each isolate, it was verified that A22 was able to inhibit the biofilm formation of six clinical isolates at all the subinhibitory concentrations tested. Likewise, A22 was able to inhibit the formation of biofilms of three other isolates, even though it did not show efficiency at all the subinhibitory concentrations tested. For only five isolates, A22 was not effective. A careful analysis of the data in Table 1 also allows definition of the MCBI for each isolate.

Figure 1 graphically represents the performance of A22 on the *P. aeruginosa* PAO1 strain. It can be observed that subinhibitory concentrations were highly effective in preventing the biofilm formation of this microorganism on polystyrene plates. The minimum concentration needed to inhibit the biofilm formation (MCBI) was only  $0.0625 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

#### 3.2. Bioadhesion assays

##### 3.2.1. Biofilm formation on HDPE and biofilm visualisation by AFM

Figure 2 shows the AFM results of the HDPE substrates not treated with the A22 compound and other substrates treated at the MIC ( $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) and concentration of  $128 \mu\text{g ml}^{-1}$  for *P. aeruginosa* PAO1 strain (highest concentration tested). The image shows the negative control (A) and the positive control (B) for biofilm formation; there is considerable variation in the values of the peaks of the wavelengths produced. While the biofilm produced a peak of 200 nm, the absence of adhesion reached only 13 nm. This difference is better displayed by comparing the three-dimensional images, in which the mass and density of the biofilm formed can be visualised, which were considerably smaller in the negative control (A).

Images in panels C and D demonstrate the action of A22 on biofilm formation. Although the three-dimensional structure in image C shows some dense and higher peaks, the activity of A22 at  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  (MIC) was effective, since it produced its highest peak wavelength at 40 nm, which was substantially less than the highest peak found in the positive control (200

nm). The same occurs in the image D analysis, which represents the A22 activity at  $128 \mu\text{g ml}^{-1}$ , where the maximum peak was only 60 nm. The three-dimensional image analysis shows how the A22 compound is effective against the formation of the biofilm at a concentration of  $128 \mu\text{g ml}^{-1}$ . At this concentration, there are few peaks, and little biofilm mass has formed; the colouration of the image is darker, covering a range of low values at the wavelengths produced, as well as the image of the negative control.

### 3.2.2. Bacterial adhesion assay to HeLa cells

The results of the bacterial adhesion assay to HeLa cells are shown in Figure 3. The analysis of graphic A (Figure 3) shows that A22 is able to reduce the adhesion potential of bacilli to HeLa cells at all subinhibitory concentrations tested compared to the control adhesion after 4 h of exposure. After 8 h of incubation (data not shown), only the MIC ( $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) was effective at inhibiting the bacterial cell adhesion to HeLa cells. Image B (Figure 3) elucidates the adhesion pattern established between the bacterial cells and human cells after 4 h of exposure, allowing the conclusion that a visible decrease in the number of bacterial cells adhered to HeLa cells occurred.

### 3.3. Motility assay

The influence of the subinhibitory concentration of  $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  of the A22 compound on the *swimming*, *swarming* and *twitching* motility of *P. aeruginosa* PAO1 strain can be visualised from Figure 4 and Table 2. The results show that there was a slight decrease (2.4 mm) in the diameter of the halo in the presence of A22 in terms of *swimming* motility. However, regarding the *swarming* and *twitching* motilities, there was a statistically significant reduction in the colony growth on the plate containing A22, with reductions of 14.3 mm and 17.4 mm, respectively.

## 4. Discussion

The capability to form biofilms is closely associated with a microorganism's ability to cause infection. As such, this capability should be a public health concern and object of investigation in scientific research [3, 20]. In this sense, the semi-quantitative biofilm



formation method in the present study demonstrates the great capacity that MDR clinical isolates have to adhere to abiotic surfaces. In the same way, the use of the *P. aeruginosa* PAO1 strain as a standard strain for the formation of biofilms is justified since the absorbance values were high, evidencing the formation of a dense biofilm. The importance of these results lies in the fact that these microorganisms isolated from the hospital environment can colonise and adhere to surfaces of medical instruments and implants. In addition, because they are already resistant to multiple drugs, the adhesion capability can effectively reduce the antimicrobial options and further aggravate the infectious condition. In this study, the data in Table 1 and Figure 1 demonstrate the anti-biofilm activity exerted by compound A22, which was able to prevent biofilm formation at concentrations below the MIC for the *P. aeruginosa* PAO1 strain and for nine clinical isolates classified, which are highly adhesive.

However, A22 did not exert anti-biofilm activity against all MDR isolates, which may be justified by the possible existence of more than one mechanism of resistance acting together, such as expression of efflux pumps and change in membrane permeability [21]. Likewise, compound A22 was not effective in destroying biofilms already formed (data not shown). Therefore, it may be assumed that compound A22 acts at the initial stages of adhesion, influencing fundamental parameters at this stage of biofilm development, such as bacterial motility.

Bacterial motility is a very important feature, as it is intertwined with biological functions essential for bacterial survival, such as nutrient acquisition, expression of virulence and biofilm formation [22, 23, 24]. In biofilm formation, the motility appears as a predominant factor in the initial process of adhesion, since bacterial cells approach the surfaces to be colonised [25]. In the present study, A22 was shown to have a considerable influence on the bacterial locomotion, especially the *swarming* and *twitching* motility.

There are different modes of locomotion in prokaryotes, including *swarming* motility, *swimming* motility and *twitching* motility as well as extension and retraction mechanisms and *sliding* and *gliding* mechanisms [26]. In appropriate circumstances, many bacterial species have the capability of developing these forms of movement. However, *P. aeruginosa* only develops three types of motility: *swimming*, *swarming* and *twitching* [27].

The *swimming* type of motility is characterised by the random and disorganised movement of only one microorganism, caused by the action of a single flagellum. On the other hand, the *swarming* type of translocation is described by a continuous and regular highly organised pattern promoted by a group of microorganisms containing multiple flagella

[28]. Moreover, this type of movement is associated with the expression of virulence factors and phenotypes that are more resistant to antimicrobial compounds [24].

The mechanism of *twitching* movement is less clear. However, it has been observed that type IV pili are associated with the motility of some strains of *P. aeruginosa*. This type of translocation occurs through the contraction and extension of pili on the surface, preferentially occurring with isolated bacterial cells with or without flagella [28].

Since compound A22 acts on the MreB protein of the bacterial cell wall by de-structuring the bacillary form, it can be assumed that components such as flagella and fimbriae have been destabilised or have disintegrated, influencing the locomotion ability of the bacteria. In addition, it is suspected that the MreB protein may be required for the three types of motility for *P. aeruginosa* PAO1, since Mauriello et al. [22] have shown, by means of the action of compound A22, that the MreB protein is essential for gliding motility in *Myxococcus xanthus*. In this same study, it was proposed that the MreB protein may be involved in the positioning of several protein structures associated with bacterial cell motility. Thus, continuing to explore the influence of this chemical molecule on this important parameter is a successful alternative for the understanding of bacterial physiology, and the inhibition of the MreB protein might be seen as a new therapeutic targeting option.

In addition, it is speculated that A22 may influence bacterial cell signalling performed by the secondary messenger c-di-GMP (cyclic diguanosine-5-monophosphate). Some studies have approached the importance of this molecule in biofilm biology, in that high levels of intracellular c-di-GMP have been shown to promote more biofilm formation for microorganisms such as *Bordetella bronchiseptica* and *P. aeruginosa* [29, 30]. The c-di-GMP molecule regulates fundamental factors involved in the three-dimensional development of the biofilm structure, such as synthesis of exopolysaccharides, pili and adhesins; ability to control bacterial motility; and cell death (29, 31, 32]. High levels of c-di-GMP are mainly associated with the initial stage of biofilm formation of *P. aeruginosa* [31]. Considering that A22 appears to act during the initial phases of adhesion and that high levels of c-di-GMP are found during these phases, it is assumed that the mechanism by which A22 prevents bacterial adhesion and bacterial locomotion may be specifically due to suppression of this molecule.

Although less work has been done in this area, it is known that small molecules of RNA (sRNAs) play an important role in regulating the formation of biofilms, especially on the bacterial motility and inhibition of exopolysaccharides [31, 32]. In *P. aeruginosa*, the most well known sRNAs are rsmY and rsmZ. The increased expression of these two molecules is associated with greater initial adhesion to surfaces; however, subsequent biofilm

development is difficult when high levels of sRNAs are present [32]. Thus, the hypothesis that the A22 can suppress these molecules and prevent bacterial motility, initial adhesion and consequent biofilm formation can be considered.

Another assumption could be that communication between bacterial cells, called 'quorum sensing' (QS), could be prevented by A22. However, QS plays a very important role during the late development of biofilms and in their dispersion, not during the initial adhesion phase, during which A22 seems to act more substantially. If the A22 compound was able to inhibit the signalling molecules of QS, it would probably be effective at destroying or attenuating pre-existing biofilms, which was not proven in this study [31, 33]. In this context, Figure 5 compares the formation of biofilm (A) and the action of A22 against the bacterial bacillary cell and the possible mechanisms that make this compound an effective inhibitor of biofilm formation (B).

Biofilm structure can be evaluated using different microscopy techniques. However, some of these techniques, such as scanning electron microscopy, do not allow careful evaluation of the entire structural architecture of a biofilm. A more efficient alternative for this type of analysis is AFM. AFM requires pre-treatment during sample preparation, but AFM is able to capture images of liquid samples in their physiological state. This microscopy technique is based on the variation of the force exerted between the tip of the probe and the surface of the sample [34]. The images obtained by AFM, shown in Figure 2, confirm the use of this method as a tool for visualisation of the biofilm. The images clearly show the action of compound A22, proving the low absorbance obtained in the semi-quantitative assay for the *P. aeruginosa* PAO1 standard strain.

A large number of studies have explored the use of bioactive materials (ie surfaces containing coating compounds able to prevent and control biofilm formation). In this sense, it was shown that fibrinolytic agents prevented the adhesion of *Staphylococcus aureus*, both *in vitro* and *in vivo* [35]. Similarly, zinc and silver nanoparticles also have been demonstrated to control bacterial adhesion to medical device materials [36, 37]. Some formulations, such as the coating of catheters containing the synergistic combination of chlorhexidine and sulfadiazine, are already used in clinical practice. Moreover, the combination of triclosan and dispersin showed a broad-spectrum synergistic effect, preventing biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus* and *E. coli* in catheters [38].

The abiotic surface adhesion tests performed in this study on polystyrene boards and polyethylene surfaces are important because they reproduce the formation of biofilms on devices used in the hospital environment. The promising performance of A22 on biofilm

formation on these surfaces allows consideration of its use as a possible coating agent for these materials. Since A22 appears to act during the early stages of bacterial adhesion, it can prevent aggregation and irreversible adhesion of bacterial cells. Beyond that, these results could lead to studies that associate A22 with antimicrobials to obtain new formulations for coating surfaces to serve as a prophylactic for bacterial adhesion.

The *in vitro* assay of adhesion to HeLa cells proved to be easy to standardise, and the assay was reproducible. Although the assay did not allow the evaluation of the compound for a longer time period, due to acidification of the medium and the loss of cell viability, it was possible to verify the high adhesion capacity of *P. aeruginosa* PAO1 strain on human cells. In the same way, this study points to the use of A22 as an inhibitor of bacterial adhesion on living tissues, since this compound was able to decrease bacterial adhesion to HeLa cells. Considering that diseases such as cystic fibrosis, endocarditis, periodontitis and osteomyelitis are closely linked to biofilm formation in human tissue, these results reinforce the importance of analysing the ability of microorganisms to adhere to human cells, especially those microorganisms capable of causing serious diseases [36]. Furthermore, A22 has no genotoxicity or cytotoxicity effects across a broad range of concentrations, encouraging even more the advancement of *in vitro* and *in vivo* studies that aim at using A22 on living tissues [13].

## 5. Conclusion

The present work evaluated for the first time the efficacy of the A22 compound against biofilm formation by *P. aeruginosa* PAO1 and MDR clinical isolates. Through assays and microscopy, it was possible to prove that A22, by the inhibition of the MreB protein in the cell wall, was able to inhibit biofilm formation and to influence essential parameters for its formation, such as bacterial motility. Considering that the clinical isolates used in this study are resistant to multiple drug classes, these results may impact the possible use of A22 as a novel antimicrobial agent or coating agent for medical instrument surfaces. However, more detailed research is needed to clarify the mechanisms by which A22 acts on the genetic and physiological factors associated with biofilm formation.

## References

- [1] D. G. Davies, M. R. Parsek, J. P. Pearson, B. H. Iglewski, J. W. Costerton, E. P. Greenberg, The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* (1998) 280: 295-257.
- [2] I. Behlau, M. Gilmore, Microbial biofilms in ophthalmology and infectious disease. *Arch Ophthalmol* (2008) 12:61572-1581, DOI: 10.1001/archophth.126.11.1572
- [3] J. W. Costerton, P.S. Stewart, E. P. Greenberg, Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections, *Science* (1999) 284: 1318-1322.
- [4] N. Hoiby, O. Ciofu, H. K. Johansen, Z. J. Song, C. Moser, P. Ø. Jensen, S. Molin, M. Givskov, T. Tolker-Nielsen, T. Bjarnsholt, The clinical impact of bacterial biofilms, *Int J Oral Sci* (2011) 3: 55-65, DOI: 10.4248/IJOS11026
- [5] P. S. Stewart, J. W. Costerton, Antibiotic resistance of bacteria in biofilms, *Lancet* (2001) 358: 135-138.
- [6] M. Rybtke, L. D. Hultqvist, M. Givskov, T. Tolker-Nielsen, *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: community structure, antimicrobial tolerance and immune response, *J Mol Biol* (2015) 3: 1-18, DOI: 10.1016/j.jmb.2015.08.016
- [7] E.B. Hirsch, V. H. Tam, Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes, *Exp Rev Pharmacoecon Outcomes Res* (2010) 10: 441-451, DOI:10.1586/erp.10.49
- [8] N. Noguchi, K. Yanagimoto, H. Nakaminami, M. Wakabayashi, N. Iwai, M. Wachi, M. Sasatsu, Anti-infectious Effect of S-Benzylisothiourea Compound A22, Which Inhibits the Actin-Like Protein, MreB, in *Shigella flexneri*, *Biol Pharm Bull* (2008) 31: 1327-1332.
- [9] G.J. Bean, S.T. Flickinger, W.M. Westler, M.E. McCully, D. Sept, D.B. Weibel, K.J. Amann, A22 Disrupts the bacterial actin cytoskeleton by directly binding and inducing a low-affinity state in MreB, *Biochemistry* (2009) 48:4852-4857, DOI:10.1021/bi900014d
- [10] A. Nicholson, J. D. Perry, A. L. James, S. P. Stanforth, S. Carnell, K. Wilkinson, C. M. Anjam Khan, A. De Soyza, F. K. Gould, In vitro activity of S-(3, 4-dichlorobenzyl) isothiourea hydrochloride and novel structurally related compounds against multidrug-resistant bacteria, including *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* complex, *Int J Antimicrob Agents* (2012) 39: 27-32, DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2011.08.015
- [11] N. Iwai, K. Nagai, M. Wachi, Novel S-Benzylisothiourea Compound That Induces Spherical Cells in *Escherichia coli* Probably by Acting on a Rod-shape-determining Protein(s) Other Than Penicillin-binding Protein 2, *Biosci, Biotechnol and Biochem* (2002) 66: 2658-2662, DOI: 10.1271/bbb.66.2658

- [12] S. Yamachika, C. Sugihara, H. Tsuji, Y. Muramatsu, Y. Kamai, M. Yamashita, Anti *Pseudomonas aeruginosa* compound, 1,2,3,4-tetrahydro-1,3,5-triazine derivative, exerts its action by primarily targeting MreB, *Biol Pharm Bull* (2012) 35: 1740-1744.
- [13] P.C. Bonez, A. P. Ramos, K. Nascimento, P.M. Copetti, M.E. Souza, G. G. Rossi, V.A. Agertt, M.R. Sagrillo, R.C.V. Santos, M.M.A. Campos, Antibacterial, cyto and genotoxic activities of A22 compound ((S-3, 4-dichlorobenzyl) isothiourea hydrochloride), *Microb Pathog* (2016) 14 -18, DOI: 10.1016/j.micpath.2016.07.007
- [14] A. P. Magiorakos, A. Srinivasan, R. B. Carey, Y. Carmeli, M. E. Falagas, C. G. Giske, S. Harbarth, J. F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D. L. Paterson, L. B. Rice, J. Stelling, M. J. Struelens, A. Vatopoulos, J. T. Weber, D. L. Monnet, Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance, *Clin Microbiol Infect* (2012) 18: 168-281, DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
- [15] P.C. Bonez , C.F. Dos Santos Alves , T.V. Dalmolin , V.A. Agertt , C.R. Mizdal, V.C. Flores, J.B. Marques, R.C.V. Santos, M.M.A. Campos, Chlorhexidine activity against bacterial biofilms, *Am J of Infect Control* (2013) 41: 119-122, DOI: 10.1016/j.ajic.2013.05.002
- [16] S. Stepanovic's, D. Vukovic, I. Dakic, B. Savic, M. Svabic-Vlahovic, A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation, *J Microbiol Methods* (2000) 40: 175-179.
- [17] P. M. Quatrin, V. M. Comim, L. Q. S. Lopes, A. Gündel, R. A. Vaucher, R. C. V. Santos, Evaluation of different substrates for in vitro biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*, *Disciplinarum Scientia. Série: Ciências da Saúde* (2015) 16: 191-203.
- [18] J. Castro, A. Henriques, A. Machado, M. Henriques, K. K. Jefferson, N. Cerca, Reciprocal interference between *Lactobacillus* spp. and *Gardnerella vaginalis* on initial adherence to epithelial cells, *Int J Med Sci* (2013) 10: 1193-1198, DOI: 10.7150/ijms.6304
- [19] E. Déziel, Y. Comeau, R. Villemur, Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in *Swimming*, *Swarming*, and *Twitching* motilities, *J Bacteriol* (2001) 183: 1195-1204, DOI: 10.1128/JB.183.4.1195-1204.2001
- [20] G. A. O'Toole, R. Kolter, Flagellar and *twitching* motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *Mol Microbiol* (1998) 30: 295-304.
- [21] Y. Cag, H. Caskurlu, Y. Fan, B. Cao, H. Vahaboglu, Resistance mechanisms, *Ann Transl Med* (2016) 4: 326, DOI: 10.21037/atm.2016.09.14
- [22] E. M. Mauriello, F. Mouhamar, B. Nan, A. Ducret, D. Dai, D. R. Zusman, T. Mignot. Bacterial motility complexes require the actin-like protein, MreB and the Ras homologue MglA, *EMBO J* (2010) 29: 315-326, DOI: 10.1038/emboj.2009.356
- [23] J. H. Lee, H. S. Cho, S. W. Joo, S. Chandra Regmi, J. A. Kim, C. M. Ryu, S. Y. Ryu, M. H. Cho, J. Lee, Diverse plant extracts and trans-resveratrol inhibit biofilm formation and

swarming of *Escherichia coli* O157:H7, Biofouling (2013), DOI: 10.1080/08927014.2013.832223

[24] H. Oura, Y. Tashiro, M. Toyofuku, K. Ueda, T. Kiyokawa, S. Ito, Y. Takahashi, S. Lee, H. Nojiri, T. Nakajima-Kambe, H. Uchiyama, H. Futamata, N. Nomura, Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility through 1-naphthol and other bicyclic compounds bearing hydroxyl groups, Environ Appl Microbiol (2015) v. 81: 2808-2818, DOI: 10.1128/AEM.04220-14

[25] N. Verstraeten, K. Braeken, B. Debkumari, M. Fauvart, J. Fransaer, J. Vermant, J. Michiels, living on a surface: swarming and biofilm formation, Trends Microbiol (2008) 16: 496-50, DOI: 10.1016/j.tim.2008.07.004

[26] K. F. Jarrell, M. J. McBride, The surprisingly diverse ways that prokaryotes move, Nature (2008) 6: 466-476, DOI: 10.1038/nrmicro1900

[27] J. Tremblay, E. Déziel, Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility, BMC Genomics (2010) 11: 1-15, DOI: 10.1186/1471-2164-11-587

[28] J. Henrichsen, Bacterial surface translocation: a survey and a classification, Bacteriol Rev (1972) 36: 478-503.

[29] H-S. Kim, H-D. Park, Ginger Extract Inhibits Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14, Plos One (2013) 8: 1-16, DOI: 10.1371/journal.pone.0076106

[30] F. Sisti, D. G. Ha, G. A. O'Toole, D. Hozbor, J. Fernández, Cyclic-di-GMP signalling regulates motility and biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*, Microbiology (2013)159: 869-879, DOI: 10.1099/mic.0.064345-0

[31] M. Fazli, H. Almblad, M.L. Rybtke, M. Givskov, L. Eberl, T. Tolker-Nielsen, Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species, Environ Microbiol (2014)16: 1961-1981, DOI:10.1111/1462-2920.12448

[32] K. I. Wolska, A. M. Grudniak, Z. Rudnicka, K. Markowska, Genetic control of bacterial biofilms. J Appl Gen (2015) 57: 225-38, DOI: 10.1007/s13353-015-0309-2

[33] V. C. Kalia, *Quorum sensing* inhibitors: An overview, Biotechnol Adv (2013) 31: 224-245, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2012.10.004

[34] S. Chatterjee, N. Biswas, A. Datta, R. Dey, P. Maiti, Atomic force microscopy in biofilm study, Microscopy (2014) 63: 269-278, DOI: 10.1093/jmicro/dfu013

[35] J. Kwiecinski, M. Na, A. Jarneborn, G. Jacobsson, M. Peetermans, P. Verhamme, T. Jin, Tissue Plasminogen Activator Coating on Implant Surfaces Reduces *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation, Appl Environ Microbiol (2016) 82: 394-401, DOI:10.1128/AEM.02803-15

[36] P. Gupta, S. Sarkar, B. Das, S. Bhattacharjee, P. Tribedi, Biofilm, pathogenesis and prevention a journey to break the wall: a review, Arch Microbiol (2015) 198:1-15, DOI: 10.1007/s00203-015-1148-6

[37] M. J. McGuffie, J. Hong, J. H. Bahng, E. Glynos, P. F. Green, N. A. Kotov, J.G. Younger, S. VanEpps, Zinc oxide nanoparticle suspensions and layer-by-layer coatings inhibit staphylococcal growth, *Nanomedicine: NBM* (2016)12: 33-42, DOI: 10.1016/j.nano.2015.10.002

[38] R. O. Darouiche, M.D. Mansouri, P. V. Gawande, S. Madhyastha, Antimicrobial and antibiofilm efficacy of triclosan and DispersinB<sup>®</sup> combination. *JAntimicrob Chemother* (2009) 64: 88-93, DOI: 10.1093/jac/dkp158



**Table 1**

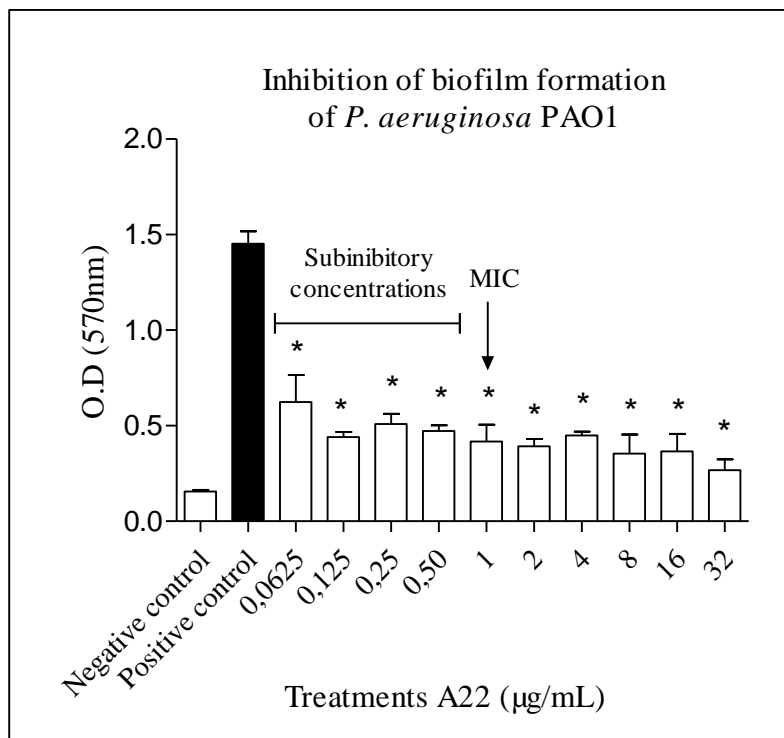
A22 against biofilm formation of multidrug-resistance clinical isolates of *P. aeruginosa*. Action of A22 on the inhibition of biofilm formation of highly adhesive clinical isolates of *P. aeruginosa*. The results show the mean absorbance obtained at subinhibitory concentrations for each isolate. 'a' Indicates significant difference between the controls, and 'b' indicates the difference between the concentrations tested and the positive control.

Isolates	OD ± SD						
	Positive control	Negative control	Biofilm inhibition by subinhibitory concentrations of A22				
			2 µg/mL	1 µg/mL	0,5 µg/mL	0,25 µg/mL	0,125 µg/mL
1	0.59 ± 0.017 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.00 <sup>a</sup>	<b>0.21 ± 0.00<sup>b</sup></b>	<b>0.10 ± 0.00<sup>b</sup></b>	<b>0.10 ± 0.00<sup>b</sup></b>	<b>0.09 ± 0.01<sup>b</sup></b>	<b>0.07 ± 0.00<sup>b</sup></b>
3	0.40 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.00 <sup>a</sup>	-	-	<b>0.15 ± 0.01<sup>b</sup></b>	<b>0.13 ± 0.02<sup>b</sup></b>	<b>0.09 ± 0.01<sup>b</sup></b>
4	0.45 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.08 ± 0.01 <sup>a</sup>	-	<b>0.30 ± 0.01<sup>b</sup></b>	<b>0.27 ± 0.02<sup>b</sup></b>	0.37 ± 0.04	0.36 ± 0.03
5	0.29 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.01 <sup>a</sup>	<b>0.11 ± 0.01<sup>b</sup></b>	0.18 ± 0.04	0.17 ± 0.05	0.21 ± 0.04	0.19 ± 0.04
7	0.32 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>a</sup>	-	-	<b>0.17 ± 0.00<sup>b</sup></b>	<b>0.17 ± 0.00<sup>b</sup></b>	<b>0.26 ± 0.00<sup>b</sup></b>
15	0.36 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.06 ± 0.00 <sup>a</sup>	-	-	0.32 ± 0.03	0.39 ± 0.03	0.38 ± 0.04
16	0.42 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>a</sup>	-	<b>0.14 ± 0.01<sup>b</sup></b>	<b>0.14 ± 0.01<sup>b</sup></b>	<b>0.17 ± 0.02<sup>b</sup></b>	<b>0.35 ± 0.03<sup>b</sup></b>
17	0.30 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>a</sup>	-	0.28 ± 0.01	0.37 ± 0.06	0.32 ± 0.01	0.3 ± 0.01
19	0.50 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.10 ± 0.01 <sup>a</sup>	-	<b>0.42 ± 0.01<sup>b</sup></b>	<b>0.34 ± 0.00<sup>b</sup></b>	<b>0.32 ± 0.00<sup>b</sup></b>	<b>0.39 ± 0.00<sup>b</sup></b>
20	0.33 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.10 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.01	0.40 ± 0.00	0.37 ± 0.02	0.34 ± 0.03	0.38 ± 0.02
22	0.48 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.00 <sup>a</sup>	<b>0.26 ± 0.04<sup>b</sup></b>	<b>0.29 ± 0.02<sup>b</sup></b>	<b>0.29 ± 0.03<sup>b</sup></b>	<b>0.28 ± 0.01<sup>b</sup></b>	<b>0.22 ± 0.04<sup>b</sup></b>
24	0.35 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.30 ± 0.011	0.32 ± 0.02	0.34 ± 0.04	0.34 ± 0.01	0.33 ± 0.02
25	0.30 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.06 ± 0.00 <sup>a</sup>	-	-	-	0.20 ± 0.05	0.27 ± 0.03
26	0.32 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.03 ± 0.00 <sup>a</sup>	-	<b>0.25 ± 0.01<sup>b</sup></b>	<b>0.24 ± 0.02<sup>b</sup></b>	0.29 ± 0.04	0.29 ± 0.04

**Table 2**

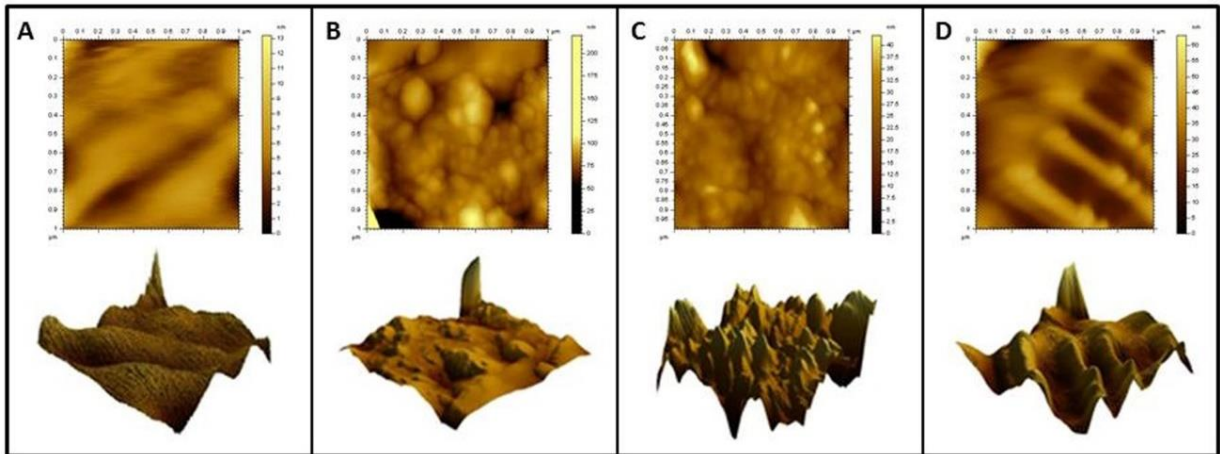
Influence of S-(3,4-diclorobenzil) isotioureia (A22) on *P. aeruginosa* PAO1 motility. Mean values of colony growth sizes of *P. aeruginosa* PAO1 in the presence and absence of a subinhibitory concentration ( $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) of A22. \* Indicates significant difference between halo sizes with and without A22.

Type of motility	Colony growth (in mm) without the A22	Colony growth (in mm) with the A22
<i>Swimming</i>	19mm	16.6mm
<i>Swarming</i>	16.6mm	2.3mm*
<i>Twitching</i>	20mm	2.6mm*

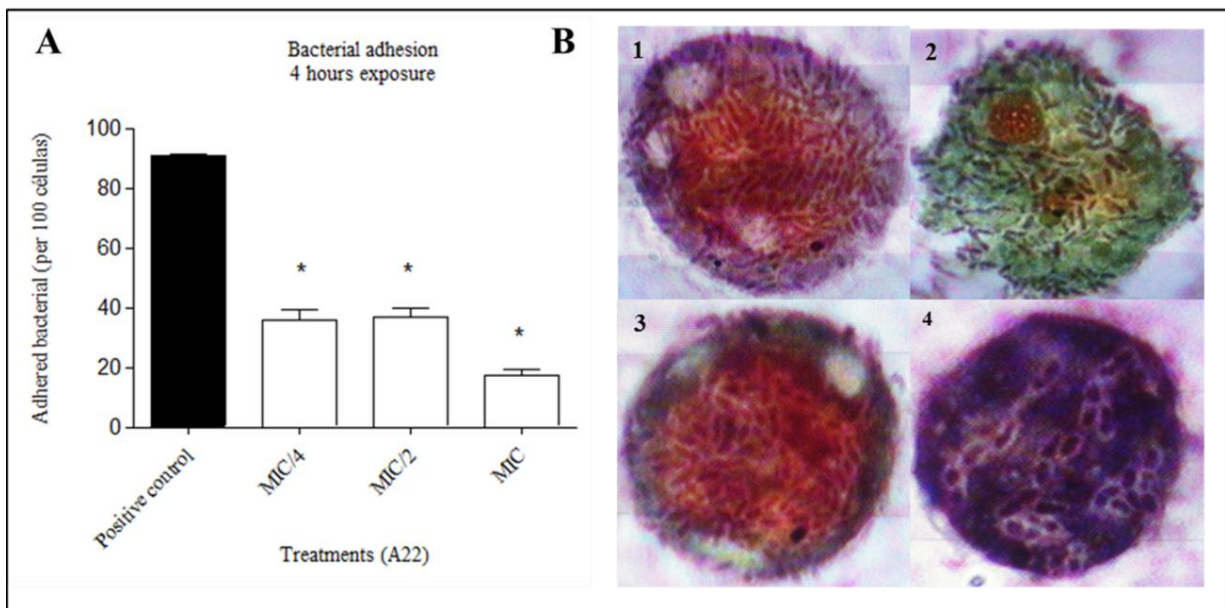


**Fig 1.** Graphical representation of S-(3,4-diclorobenzil) isotioureia (A22) action on biofilm formation of *P. aeruginosa* PAO1.

\* Indicates significant difference between concentrations tested and the positive control.

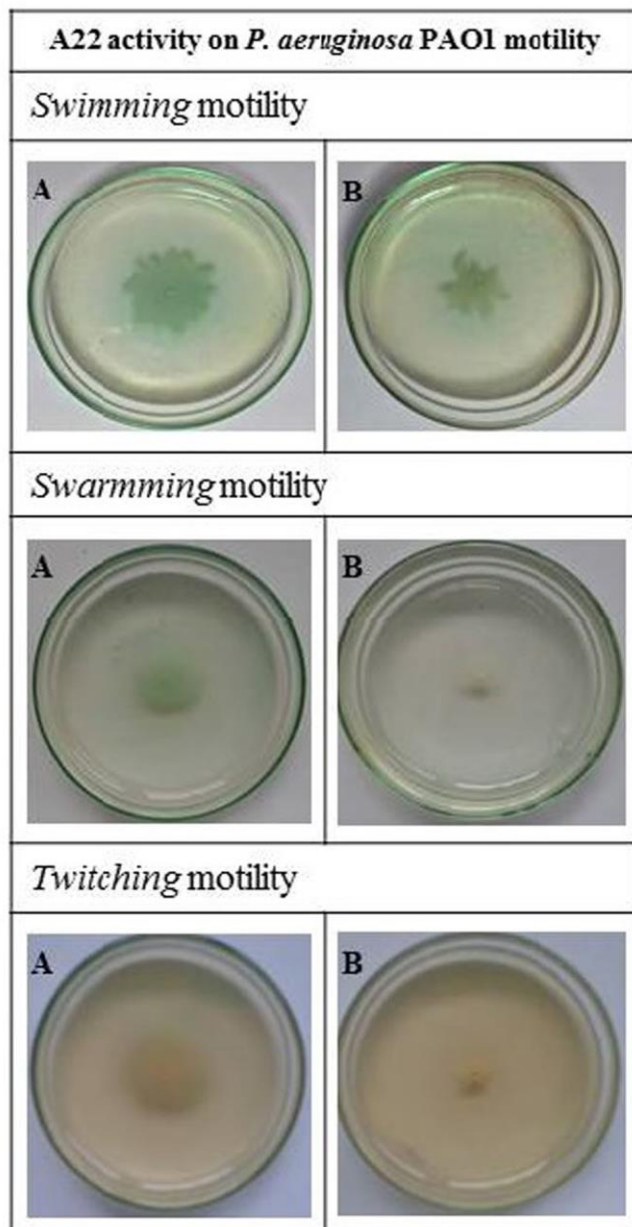


**Fig 2.** Atomic Force Microscopy (AFM) of biofilm in HDPE surface and biofilm inhibition by S-(3,4-diclorobenzil) isotioureia (A22). Comparative images among the negative control (A), biofilm (B) and inhibition of biofilm formation by A22 at concentrations of  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  (C) and  $128 \mu\text{g ml}^{-1}$  (D).

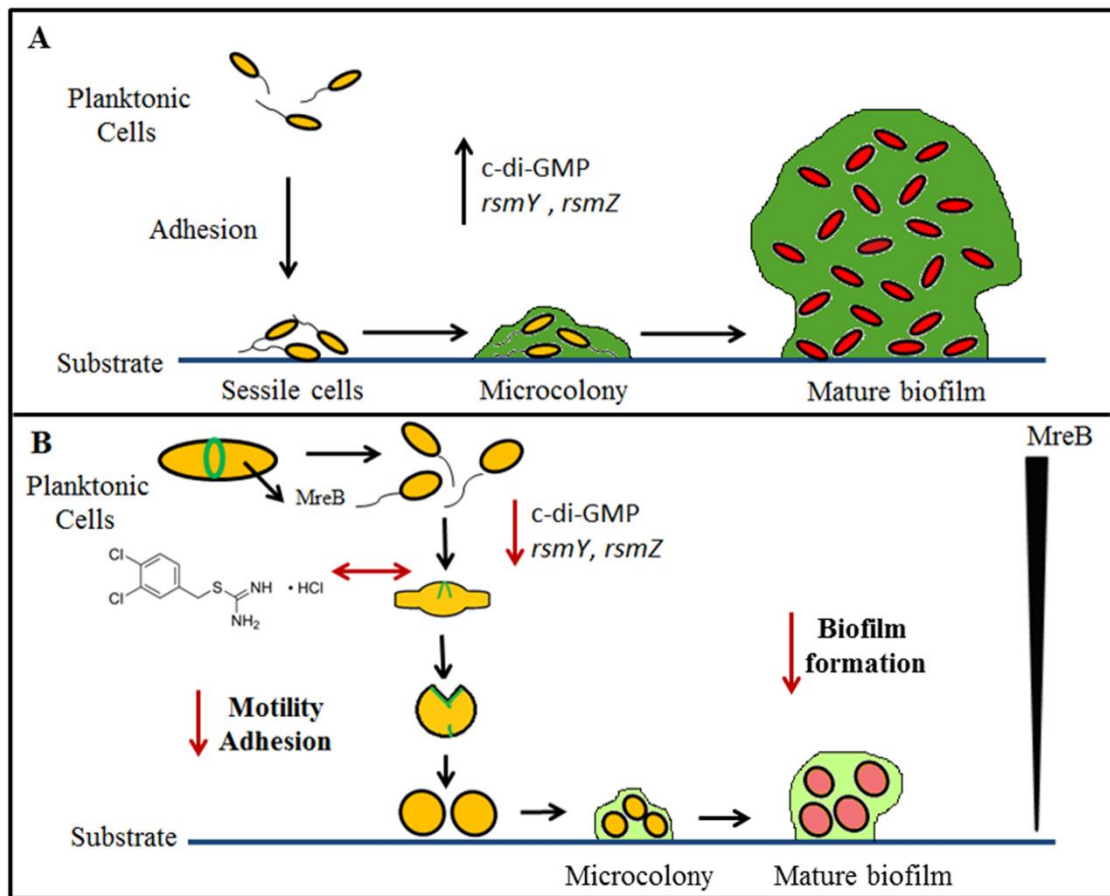


**Fig 3.** *P. aeruginosa* PAO1 bacilli adhered to HeLa cells.

(A) Number of *P. aeruginosa* PAO1 bacilli adhered to 100 HeLa cells after 4 h of exposure to S-(3,4-diclorobenzil) isotioureia (A22) at the MIC ( $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), MIC/2 ( $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) and MIC/4 ( $0.25 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). \* Indicates significant difference between the treatments and the positive control adhesion. (B) HeLa cells with *P. aeruginosa* PAO1 bacilli adhered after 4 h of exposure. Positive control for adherence (1), acting at concentrations of  $0.25 \mu\text{g ml}^{-1}$  (2),  $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  (3) and  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  (4) of A22.



**Fig 4.** S-(3,4-diclorobenzil) isotiourea (A22) influence on *swimming*, *swarming* and *twitching* motility of *P. aeruginosa* PAO1. *Swimming*, *swarming* and *twitching* motility of *P. aeruginosa* PAO1 without A22 (A) and with A22 (B) at a subinhibitory concentration of 0.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Growth halos were measured and subjected to the statistical *t test*.



**Fig 5.** Illustration of S-(3,4-diclorobenzil) isothioureia (A22) influence on initial stage of biofilm formation. Schematic reproduction of the steps of biofilm formation (A) and reversible inhibition of the MreB protein (green) by the A22 compound and the resultant inhibition of biofilm formation.

Fonte: Próprio autor.

## 4 DISCUSSÃO

Anualmente as infecções hospitalares afetam milhões de pacientes em todo o mundo, resultando em um aumento da morbidade e mortalidade e em perdas financeiras substanciais para os sistemas de saúde. As infecções sanguíneas, do trato urinário e as pneumonias adquiridas no ambiente hospitalar estão, na maioria dos casos, associadas ao uso de dispositivos médicos como cateteres urinários e tubos traqueais (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011). Os microrganismos se aderem a esses materiais organizando-se em comunidades multicelulares chamadas de biofilmes e provocam infecções que persistem e progridem, apesar do tratamento e da resposta do hospedeiro. Desta forma, a formação de biofilmes é considerada um importante fator de virulência apresentado por alguns patógenos (DAVIES, 2003).

Os hospitais utilizam uma grande quantidade de biocidas para eliminar microrganismos tanto da pele humana como de superfícies inanimadas (NUÑEZ; MORETTON, 2007). Neste contexto, a resistência dos biofilmes a estes produtos tem sido alvo de estudos, sendo que alguns desses concluíram que biofilmes de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* podem tolerar a ação da clorexidina e *S. epidermidis*, os efeitos de isopropanol e cloreto de benzalcônio (CHAIEB et al., 2010; BONEZ et al., 2013). Do mesmo modo, biofilme de *P. aeruginosa* formado na superfície de endoscópios demonstraram resistência ao ácido peracético, utilizado na desinfecção deste material (AKINBOBOLA et al., 2017).

Diante do exposto, fica evidente a necessidade do monitoramento da atividade antimicrobiana de desinfetantes e fármacos utilizados no âmbito hospitalar, assim como o avanço de pesquisas em busca de novos compostos capazes de interferir no desenvolvimento do biofilme. A tendência atual é a utilização de pequenas moléculas que possam interferir no QS e o uso de nanopartículas, principalmente, no revestimento de materiais médicos. Neste sentido, cateteres centrais revestidos com Xilitol, Triclosan - um IQS - e Polihexametileno reduziram significativamente a adesão de *S. aureus* em um modelo *in vivo* (SILVA PAES LEME et al., 2015). Do mesmo modo, discos de titânio, utilizados em implantes dentários, impregnados com nanopartículas de prata (Ag), foram capazes de barrar a colonização bacteriana e impedir a formação de biofilme, reduzindo as chances de infecções peri-implantares (POKROWIECK et al., 2017).

Outras abordagens incluem a utilização de moléculas de baixo peso molecular capazes de atuarem como IQS, combinação de antimicrobianos, utilização de produtos naturais e inibidores de bombas de efluxo (MARCINKIEWICZ et al., 2013). Entretanto, foi

demonstrado que a formação de biofilme por *P. aeruginosa* e *S. aureus* possa ocorrer independentemente da modulação via QS (TRENTIN et al., 2013). Isso atesta que, embora existam muitas explicações e comprovações acerca dos mecanismos envolvidos na resistência dos biofilmes aos antimicrobianos, trata-se de um processo complexo e multifatorial tornando, portanto, necessário e estimulante abordar novos sítios de ação para tentar combater estas estruturas.

Desta maneira, avaliar a ação antibiofilme do A22 configurou uma importante estratégia, pois esta molécula atua diretamente sobre a proteína MreB do citoesqueleto bacteriano, desestruturando o formato bacilar. Suspeitou-se que o A22, ao mudar a conformação estrutural da célula microbiana, poderia alterar alguns parâmetros essenciais para a formação do biofilme, como a motilidade e a capacidade de adesão.

A primeira parte deste trabalho centrou na avaliação antimicrobiana, cito e genotóxica do A22. Considerando que o A22 atua sobre células bacilares, optou-se por trabalhar somente com bacilos Gram negativos. Haja vista a ascendência de surtos de infecções relacionados com a resistência antimicrobiana por esses microrganismos tornou-se ainda mais pertinente esta investigação (KELLY et al., 2017).

Os resultados publicados evidenciaram a significativa atividade antibacteriana do A22 frente às cepas Gram negativas e 28 isolados multirresistentes de *P. aeruginosa* oriundos de ambiente hospitalar. Esses achados são comparáveis aos encontrados por outros autores, que demonstraram a alta suscetibilidade de *P. aeruginosa* a baixas concentrações de A22 (NOGUCHI et al., 2008; NICHOLSON et al., 2012).

O ensaio de curva de viabilidade celular bacteriana demonstrou que somente concentrações acima da CIM são capazes de exercer atividade bactericida, porém, estas concentrações não provocaram efeitos cito e genotóxicos sobre as PBMCs. Desta forma, este artigo ampliou as expectativas iniciais de explorar o A22 somente enquanto agente de revestimento ou desinfetante ambiental, mas também apresentou o A22 como uma alternativa para futuros ensaios *in vivo*. Por conseguinte, o bom desfecho deste estudo incentivou o avanço para metodologias (trabalhadas posteriormente no segundo artigo) que pudessem englobar a atividade do A22 sobre os processos de adesão e formação de biofilme de *P. aeruginosa*, tanto sobre superfícies inertes quanto vivas.

Além disso, o A22 tem sido mais explorado somente como agente indutor da alteração celular em estudos que visam aprofundar o entendimento sobre as proteínas e mecanismos envolvidos na manutenção da forma celular bacteriana e não como um potencial agente antimicrobiano. Tendo em vista que se trata de uma molécula pequena, o A22 poderia

transpor a barreira imposta pela matriz exopolissacarídica e atingir as células sésseis mais facilmente.

Neste contexto, os resultados do manuscrito demonstraram a alta capacidade de formação de biofilme por 14 dos isolados clínicos em superfície de poliestireno, mostrando que além da resistência aos múltiplos fármacos por mecanismos conhecidos, esses microrganismos também encontram na formação de biofilmes, uma estratégia contra a ação antimicrobiana. Contudo, o A22 inibiu a adesão desses microrganismos em concentrações subinibitórias, corroborando com a hipótese de que a alteração do formato da célula é possível em baixas concentrações, prejudicando funções vitais para a adesão bacteriana. Segundo Gitai et al., 2005, altas concentrações de A22 não afetam a morfologia da célula bacteriana porque as células são mortas antes da molécula exercer sua ação, indicando que o A22 possa ter outro alvo de ação além da MreB. Este achado é muito relevante, visto que concentrações subinibitórias do A22, pertencentes a uma faixa não tóxica, podem não selecionar microrganismos resistentes e ainda exercer atividade anti-adesiva. Isso caracteriza uma abordagem atual na busca por novos antimicrobianos, onde a tendência é optar por substâncias capazes de impedir o crescimento bacteriano ou a formação de biofilmes sem que as células morram, de modo que não haja estímulo para a adaptação dos microrganismos (O'NEILL, 2016).

No entanto, o A22 não foi eficiente em destruir o biofilme previamente formado pela cepa padrão *P. aeruginosa* PAO1, sugerindo, por consequência, que o A22 influencie em propriedades determinantes na etapa inicial de desenvolvimento do biofilme e não nos estágios avançados de maturação. Dentre esses fatores, pode-se incluir a capacidade de locomoção e fixação do microrganismo, bem como a expressão do segundo mensageiro c-di-GMP que atua preferencialmente nesta etapa, sendo responsável pela transição entre o modo de vida planctônico e o modo sésil (FAZLI et al., 2014).

A inibição da motilidade pelo A22 sugere que a mudança conformacional provocada pela inibição da MreB tenha impacto sobre a manutenção dos apêndices como pili e flagelos, impedindo que a bactéria se mova e, conseqüentemente, alcance e se fixe em uma superfície. Esta hipótese está sustentada no fato de que alguns estudos relatam a relação entre a motilidade e a maior capacidade de adesão. Pequenos peptídeos catiônicos são capazes de inibir a formação de biofilme por isolados de *P. aeruginosa* pela supressão da motilidade *swimming* e *swarming* (FUENTE-NÚÑEZ et al., 2012). Igualmente, foi documentado que cepas mutantes de *Clostridium difficile*, desprovidas de pili VI, formaram um biofilme de massa significativamente reduzida em comparação com o tipo selvagem (MALDARELLI et



al., 2016). Em contrapartida, o composto 1-naftol inibiu a motilidade *swarming* em *P. aeruginosa*, porém a biomassa do biofilme se manteve intacta (OURA et al., 2015). Deste modo, mesmo que exista uma relação controversa entre a motilidade e a maior capacidade de adesão, é pertinente e de grande interesse científico avaliar a influência de novos compostos, como o A22, sobre a locomoção bacteriana e seus apêndices.

A inibição da motilidade pelo A22 propõe que a proteína MreB pode estar envolvida no posicionamento de proteínas essenciais para a motilidade bacteriana (CALLAWAY, 2008). Do mesmo modo, a motilidade pode ter sido inibida pela supressão do segundo mensageiro c-di-GMP que regula a motilidade e a adesão inicial bacteriana. Especula-se que o A22 não exerça atividade como IQS, pois não foi efetivo contra o biofilme maduro, onde as moléculas sinalizadoras do QS são mais atuantes.

Diferentes materiais são utilizados na confecção de dispositivos médicos, como por exemplo, o polipropileno (PP) que é utilizado em uma variedade de cateteres, exceto em cateteres urinários e o PEAD que é comumente encontrado na constituição de próteses ortopédicas. Os microrganismos modulam sua expressão genética para a formação de biofilme de acordo com as diferenças nas propriedades dos substratos, ou seja, o mecanismo de interação é diferente para distintas combinações de microrganismos e biomateriais (SINHA et al, 2017). Deste modo, no segundo ensaio de bioadesão, utilizou-se o PEAD como substrato para a formação de biofilme e observou-se que a cepa padrão foi capaz de formar um biofilme altamente denso neste material, tendo em vista os altos picos atingidos na MFA em relação ao controle negativo. Ao mesmo tempo, o A22 limitou a adesão microbiana na concentração da CIM e na maior concentração testada. Por não necessitar de tratamento prévio e pelas imagens capturadas, a MFA demonstrou ser uma ferramenta útil na visualização da estrutura tridimensional do biofilme, bem como para avaliar a efetividade do A22 contra biofilmes (CHATTERJEE et al., 2014). Este resultado enfatiza o possível uso do A22 como agente de revestimento de materiais médicos, esta molécula serviria como uma barreira à adesão inicial das células planctônicas e a consequente formação do biofilme.

O estabelecimento bem-sucedido da infecção por populações bacterianas requer adesão às células hospedeiras, colonização do tecido e invasão celular (PIZARRO-CERDÁ; COSSART, 2006). O ensaio de adesão às células HeLa foi realizado com a intenção de avaliar a eficiência de ligação dos bacilos às células humanas e a atuação do A22 frente a esta adesão. O resultado revelou uma alta habilidade de aderência por partes dos bacilos às células, bem como evidenciou que os microrganismos apresentaram dificuldade em se aderir às células humanas quando expostos a concentrações subinibitórias de A22. Como neste

trabalho, MERGHNI et al (2015) constataram o potencial adesivo e invasivo de células de *S. aureus* em células HeLa.

O pili tipo IV está interligado não só com a motilidade do tipo *twitching* em *P. aeruginosa*, mas também com a adesão, fornecendo a estas estirpes, uma ferramenta potente para aumentar o contato com as superfícies alvo (PIZARRO-CERDÁ; COSSART, 2006). Pressupõe-se que o A22 tenha desestruturado ou suprimido o pili tipo IV e dificultado a aderência dos bacilos às células epiteliais humanas. Este achado é de suma importância, pois associado aos baixos efeitos cito e genotóxicos do A22, apresenta esta molécula como potencial novo agente antimicrobiano. Além disso, nenhum antimicrobiano previamente descoberto atua sobre o citoesqueleto bacteriano, revelando a MreB como um possível novo alvo de ação antimicrobiana (CALLAWAY, 2008).

Embora nos últimos anos muitos estudos tenham sido publicados na tentativa de elucidar alternativas eficientes e prósperas para combater a formação de biofilmes, existem ainda, muitas dificuldades a serem superadas, principalmente no que norteia o diagnóstico das infecções provocadas por biofilmes. Por isso, HØIBY et al (2014) elaboraram um guia de orientações para microbiologistas clínicos e especialistas em doenças infecciosas para atualizá-los sobre o diagnóstico e a terapia de biofilmes. Os autores salientam que é fundamental padronizar e viabilizar testes de suscetibilidade para biofilmes, assim como aprimorar diagnósticos não invasivos (exames de imagem, por exemplo) para a detecção de infecções *in vivo* em pacientes. É oportuno também pesquisar marcadores específicos que indiquem o risco de infecção por biofilme, bem como estabelecer modelos animais que reflitam realisticamente infecções por biofilmes em humanos. Do mesmo modo, é importante investir em abordagens anti-inflamatórias, uma vez que grande parte do dano tecidual provocado pelas infecções associadas a biofilmes é devido à resposta inflamatória do hospedeiro.

Por fim, mesmo que este estudo não tenha conseguido comprovar por métodos experimentais algumas teorias defendidas, os resultados aqui expostos e discutidos são de interesse suficiente para dar continuidade às investigações, principalmente no que diz respeito à elucidação do mecanismo de ação antibiofilme do A22. Além disso, tornou-se evidente a necessidade de abordar ensaios que permitam esclarecer ainda mais sobre a diversidade genética do biofilme para que se possa compreender o seu potencial patogênico e, por conseguinte, encontrar as alternativas adequadas para o seu combate.

## 5 CONCLUSÃO

Considerando os objetivos propostos neste trabalho e os resultados experimentais obtidos, pode-se concluir que:

- o S-(3,4-diclorobenzil) isotioureia (A22) foi capaz de inibir o crescimento bacteriano visível de isolados multirresistentes de *P. aeruginosa* e da cepa padrão *P. aeruginosa* PAO1 em concentrações baixas e satisfatórias;

- o ensaio de curva de morte confirmou a baixa capacidade de sobrevivência de *P. aeruginosa* PAO1 quando a bactéria foi exposta às concentrações superiores à CIM de A22;

- o A22 foi capaz de manter a viabilidade celular em todos os tempos de exposição avaliados (24, 48 e 72 horas), excetuando-se na concentração de 32µg/mL (maior concentração testada);

- o composto A22 não demonstrou efeitos genotóxicos sobre as PBMCs após 24 e 48 horas, exceto na concentração de 32 µg/mL, onde o índice de dano foi significativamente maior em todos os tempos de exposição;

- o ensaio semi-quantitativo utilizando cristal violeta revelou que 14 dos 28 dos isolados clínicos multirresistentes de *P. aeruginosa*, assim como a cepa padrão *P. aeruginosa* PAO1 foram capazes de formar um biofilme fortemente aderido;

- a atividade antibiofilme do A22 foi confirmada no ensaio semi-quantitativo, onde o mesmo foi efetivo em inibir a formação de biofilme da maioria dos isolados multirresistentes de *P. aeruginosa* e também da cepa padrão *P. aeruginosa* PAO1. Contudo, não demonstrou habilidade em destruir o biofilme previamente formado pela cepa padrão *P. aeruginosa* PAO1;

- o A22 prejudicou significativamente, em concentrações subinibitórias, as motilidades dos tipos *swarming* e *twitching*, as quais são essenciais para a locomoção, adesão e patogênese de isolados de *P. aeruginosa*;

- concentrações subinibitórias do composto A22 impediram a adesão dos bacilos de *P. aeruginosa* PAO1 às células HeLa;

- as imagens capturadas por MFA mostraram a alta capacidade de formação de biofilme por *P. aeruginosa* PAO1 em superfícies de PEAD e, do mesmo modo, demonstraram a efetividade do A22 em prejudicar a formação de biofilmes sobre este substrato.

## 6 PERSPECTIVAS

Os resultados encontrados nesta tese e publicados comprovaram, através dos ensaios e pela microscopia, que o A22 inibe, em concentrações subinibitórias, a formação do biofilme de *P. aeruginosa* e influencia em parâmetros essenciais para sua formação, como a motilidade bacteriana. Além disso, o A22 foi capaz de prejudicar a adesão dos bacilos Gram negativos em células humanas e em superfície de PEAD. Entretanto, os resultados até aqui observados permitiram um entendimento preliminar sobre a atuação do A22 no combate de biofilmes, uma vez que muitos questionamentos surgiram e novos ensaios se tornaram pertinentes, incluindo sugestões apresentadas pelos *referees* do periódico de referência da área, a revista *Biofouling*. Desta maneira, é imprescindível que estudos complementares sejam realizados, visando um melhor entendimento sobre a formação de biofilmes, bem como elucidar os mecanismos envolvidos na ação do A22 sobre essas complexas estruturas.

Propõe-se avaliar a influência do A22 na sinalização celular bacteriana realizada pelo c-di-GMP. Uma vez que a literatura evidencia que altos níveis do segundo mensageiro c-di-GMP são encontrados na fase inicial da formação do biofilme e o A22 demonstrou atuar nesta etapa, torna-se importante esclarecer a relação entre essas duas moléculas. Pressupõe-se que o mecanismo pelo qual o A22 impede a adesão e a locomoção bacteriana, possa ser, justamente, a supressão desta molécula.

Considerando que o A22 prejudicou consideravelmente a motilidade bacteriana, acredita-se que componentes como flagelos e pili tenham sido desestabilizados ou até mesmo desintegrados pela ação do A22 sobre a proteína MreB, desestruturando a forma bacilar e influenciando, conseqüentemente, na capacidade de locomoção da bactéria. Deste modo, torna-se instigante avaliar a influência do A22 sobre a expressão de genes flagelares e codificadores de pili.

Além disso, pode-se expandir a avaliação da atividade do A22 sobre microrganismos formadores de biofilme em modelos *in vivo* e *in situ*. Nossos resultados prévios encorajam o uso do A22 como um possível agente antimicrobiano, uma vez que não foram verificados efeitos citotóxicos e genotóxicos nas concentrações utilizadas nos ensaios. Neste sentido, deve-se avançar também em ensaios que avaliem a toxicidade do A22. Do mesmo modo, propõe-se estudar, *in vitro*, combinações do A22 com antimicrobianos de diferentes classes, buscando-se detectar ações sinérgicas. Considerando as frequentes falhas terapêuticas, bem como as elevadas taxas de mortalidade associadas a biofilmes, é pertinente que novas possibilidades terapêuticas sejam investigadas.

## REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; SINGH, K. P.; JAIN, A. Medical significance and management of staphylococcal biofilm. **FEMS Immunology and Medical Microbiol.** v. 58, p. 147-160, 2010.
- AKINBOBOLA, A. et al. Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in in vitro biofilms to high level peracetic acid. **The Journal of Hospital Infection.** p. 1-18, 2017.
- BĂLĂȘOIU, M. et al. *Pseudomonas aeruginosa* resistance phenotypes and phenotypic highlighting methods. **Current Health Sciences Journal.** v. 40, n. 2, p. 85-92, 2014.
- BARBOUR, M. et al. Synthesis, characterization, and efficacy of antimicrobial chlorhexidine hexametaphosphate nanoparticles for applications in biomedical materials and consumer products. **International Journal of Nanomedicine.** v. 8, p. 3507-3519, 2013.
- BAUGH, S. et al. Loss of or inhibition of all multidrug resistance efflux pumps of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium results in impaired ability to form a biofilm. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v. 67, p. 2409-2417, 2012.
- BEAN, G. J. et al. A22 Disrupts the bacterial actin cytoskeleton by directly binding and inducing a low-affinity state in MreB. **Biochemistry.** 2009.
- BHARDWAJ, A. K.; VINOTHKUMAR, K.; RAJPARA, N. Bacterial Quorum Sensing Inhibitors: Attractive Alternatives for Control of Infectious Pathogens Showing Multiple Drug Resistance. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery.** v. 8, p. 68-83, 2013.
- BONEZ, P. C. et al. Chlorhexidine activity against bacterial biofilms. **American Journal of Infection Control.** v. 41, p. 119-122, 2013.
- BULMER, D. M. et al. The bacterial cytoskeleton modulates motility, Type 3 secretion, and colonization in *Salmonella*. **PLoS Pathogens.** v. 8, n. 1, 2012.
- CABEEN, M. T.; JACOBS-WAGNER, C. Bacterial cell shape. **Nature Reviews Microbiology.** v. 3, p. 601-610, 2005.
- CALLAWAY, E. Bacteria's new bones. **Nature.** v. 451, n. 10, p: 124-126, 2008.
- CARPENTIER, B.; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal of Applied Bacteriology.** v. 75, p. 499-511, 2003.
- CELLER, K. et al. Multidimensional view of the bacterial cytoskeleton. **Journal of Bacteriology.** v. 195, n. 8, p. 1627, 2013.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Pseudomonas aeruginosa* in Healthcare Settings. Georgia, 2014. Disponível em: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html>. Acesso em: 15 jun. 2017.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **About Antimicrobial Resistance**. Georgia, 2015. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>. Acesso em: 15 jun. 2017.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Newly Reported Gene, *mcr -1*, Threatens Last-Resort Antibiotics**. Georgia, 2016. Disponível em: [https://www.cdc.gov/drugresistance/mcr1.html?s\\_cid=dhqp\\_011](https://www.cdc.gov/drugresistance/mcr1.html?s_cid=dhqp_011). Acesso em: 15 jun. 2017.

CHAIIEB, K. et al. XTT assay for evaluating the effect of alcohols, hydrogen peroxide and benzalkonium chloride on biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. **Microbial Pathogenesis**. v. 50, p. 1-5, 2010.

CHAN, Y. Y.; CHUA, K. L. The *Burkholderia pseudomallei* BpeAB-OprB Efflux Pump: Expression and Impact on Quorum Sensing and Virulence. **Journal of Bacteriology**. v. 187, n.14, p. 4707-4719, 2005.

CHATTERJEE, S. et al. Atomic force microscopy in biofilm study. **Microscopy**. 2014.

CHEN, M.; YU, Q.; SUN, H. Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm related infections. **International Journal of Molecular Science**. v. 14, p. 18488-18501, 2013.

COMIN, V. M. et al. Influence of *Melaleuca alternifolia* oil nanoparticles on aspects of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **Microbial Pathogenesis**. n.93, p. 120-125, 2016.

CORTES, M. E.; CONSUEGRA, J.; SINISTERRA, R. D. Biofilm formation, control and novel strategies for eradication. **Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**. p. 896-905, 2011.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**. v. 284, p. 1318-1322, 1999.

DAROUICHE, R. Device-associated infections: a macroproblem that starts with a microadherence. **Clinical Infectious Disease**. v. 33, p. 1567-1572, 2001.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. Microbial Biofilms: from ecology to molecular genetics. **American Society for Microbiology**. v. 64, n. 4, p. 847-867, 2000.

DAVIES, D. G. et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**. v. 280, p. 295-257, 1998.

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

DENG, Y. et al. Cis-2-dodecenoic acid signal modulates virulence of *Pseudomonas aeruginosa* through interference with quorum sensing systems and T3SS. **BMC Microbiology**. v. 13, p. 1-11, 2013.

- DICICCO, M. et al. In vitro synergism of fosfomycin and clarithromycin antimicrobials against methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **BMC Microbiology**. v. 14, n. 129, p. 1-9, 2014.
- DONLAN, R. M. Biofilm Formation: A clinically relevant microbiological process. **Healthcare Epidemiology**. v. 33, p. 1387-1392, 2001.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology**. v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.
- DYE, N. A. et al. Mutations in the nucleotide binding pocket of MreB can alter cell curvature and polar morphology in *Caulobacter*. **Molecular Microbiology**. v. 81, n. 2, p. 368-394, 2011.
- ELKHATIB, W.; NOREDDIN, A. Efficacy of ciprofloxacin-clarithromycin combination against drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mature biofilm using *in vitro* experimental model. **Microbial Drug Resistance**. p. 1-8, 2014.
- FAZLI, M. et al. Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. **Environmental Microbiology**. v. 16, n. 7, p. 1961-1981, 2014.
- FLEMMING, H-C.; WINGENDER, J. Extracellular Polymeric Substances (EPS): the biofilm construction material. **Water Science Technology**. v. 43, n. 6, p. 1-8, 2001.
- FLEMMING, H-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature**. v. 8, p. 623-633, 2010.
- FUENTE-NÚÑEZ, C. et al. Inhibition of bacterial biofilm formation and *swarming* motility by a small synthetic cationic peptide. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 56, n. 5, p. 2696-2704, 2012.
- GARNETT, J. A.; MATTHEWS, S. Interactions in bacterial biofilm development: A structural perspective. **Current Protein and Peptide Science**. v. 13, p.739-755, 2013.
- GARRETT, T. R., BHAKOO, M., ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, n. 9, p. 1049-1056, 2008.
- GITAI, G. et al. MreB Actin-mediated segregation of a specific region of a bacterial chromosome. **Cell**. v. 120, n.3, p. 329-341, 2005.
- GUPTA, P. et al. Biofilm, pathogenesis and prevention-a journey to break the wall: a review. **Archives Microbiology**. p. 1-15, 2015.
- HENRICHSEN, J. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. **Bacteriological Reviews**. v. 36, n. 4, p. 478-503, 1972.

HIRSCH, E. B.; TAM, V. H. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. **Expert review of pharmacoeconomics & outcomes research**. v. 10, n. 4, p. 441-451, 2010.

HOCKENHULL, S.; SHI, W. Characterization of a novel antibacterial compound A22. **Molecular biology**. 2006.

HØIBY, N. et al. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. **Clinical and Microbiology Infection**. p. 1-25, 2014.

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

HOLZAPFEL, B. M. et al. How smart do materials need to be? a translational science and clinical point of view. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 64, n. 4, 2013.

IWAI, N.; NAGAI, K.; WACHI, M. Novel S-Benzylisothioureia Compound That Induces Spherical Cells in *Escherichia coli* Probably by Acting on a Rod-shape-determining Protein(s) Other Than Penicillin-binding Protein 2. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. v. 66, n. 12, p. 2658-2662, 2002.

JARRELL, K. F.; MCBRIDE, M. J. The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. **Nature**. v. 6, p. 466-476, 2008.

JIANG, T.; LI, M. Quorum sensing inhibitors: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**. v. 23, n. 7, p. 867-94, 2013.

JOHANNSSON, B. et al. Treatment approaches to prosthetic joint infections: results of an Emerging Infections Network survey. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, n. 66, p.16-23, 2010.

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

KEARNS, D. B. A field guide to bacterial *swarming* motility. **Nature Reviews Microbiology**. v. 8, n. 9, p. 634-644, 2010.

KELLY, A. M., MATHEMA, B., LARSON, E. L. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the community: a scoping review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, p. 1-37, 2017.

KIM, H-S.; PARK, H-D. Ginger Extract Inhibits Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. **Plos One**. v. 8, n. 9, p. 1-16, 2013.

KOKARE, C. R. et al. Biofilm: Importance and applications. **Indian Journal of Biotechnology**. v. 8, p. 159-168, 2009.

KOUIDHI, B. et al. Cell surface hydrophobicity, biofilm formation, adhesives properties and molecular detection of adhesins genes in *Staphylococcus aureus* associated to dental caries. **Microbial Pathogenesis**. v. 49, p. 14-22, 2010.



KOURTESI, C. et al. Microbial Efflux Systems and Inhibitors: Approaches to Drug Discovery and the Challenge of Clinical Implementation. **The Open Microbiology Journal**. v. 7, p. 34-52, 2013.

KVIST, M.; HANCOCK, V.; KLEMM, P. Inactivation of Efflux Pumps Abolishes Bacterial Biofilm Formation. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 74, n. 23, p. 7376-7382, 2008.

MACHADO, S. M. O. **Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de benzalcônio no controlo da formação de biofilmes indesejáveis**. 2005. Dissertação. (Mestrado em Tecnologia do Ambiente). Universidade do Minho, Braga, 2005.

MAKI, D. G.; RINGER, M.; ALVARADO, C. J. Prospective randomized trial of povidone-iodine, alcohol, and chlorhexidine for prevention of infection associated with central venous and arterial catheters. **The Lancet**. v. 338, p. 339-43, 1991.

MALDARELLI, G. A. et al. Type IV pili promote early biofilm formation by *Clostridium difficile*. **Pathogens and Disease**, v. 74, n. 6, 2016.

MARCINKIEWICZ, J.; STRUS, M.; PASICH, E. Antibiotic resistance: a “dark side” of biofilm-associated chronic infections. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej**. v. 123, n. 6, p. 309-312, 2013.

MARGOLIN, W. Sculpting the bacterial cell. **Current Biology**. v. 19, n. 17, p. R812-R822, 2009.

MARQUES, J. B. et al. Molecular characterization of *Enterobacteriaceae* resistant to carbapenem antimicrobials. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 51, n. 3, p. 162-165, 2015.

MARTINEZ-GUTIERREZ, F. et al. Anti-biofilm activity of silver nanoparticles against different microorganisms. **Biofouling**. v. 29, n. 6, p. 651-60, 2013.

MAUNDERS, E.; WELCH, M. Matrix exopolysaccharides: The sticky side of biofilm formation. **FEMS Microbiology Letters**. p. 1-20, 2017.

MAURIELLO, E. M. F. et al. Bacterial motility complexes require the actin-like protein, MreB and the Ras homologue MglA. **The EMBO Journal**. v. 29, p. 315-326, 2010.

MC CAY, P. H.; OCAMPO-SOSA, A. A.; FLEMING, G. T. A. Effect of subinhibitory concentrations of benzalkonium chloride on the competitiveness of *Pseudomonas aeruginosa* grown in continuous culture. **Microbiology**. v. 156, p. 30-38, 2010.

MELETIS, G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. **Therapeutic advances in infectious disease**. v. 3, n. 1, 2016.

MERGHNI, A. et al. High potential of adhesion to biotic and abiotic surfaces by opportunistic *Staphylococcus aureus* strains isolated from orthodontic appliances. **Microbial pathogenesis**. p. 1-23, 2015.

- MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. *Quorum sensing* in bacteria. **Annual Review Microbiology**. v. 55, p. 165-199, 2001.
- MURRAY, T. S.; KAZMIERCZAK, B. I. FlhF is required for *swimming* and *swarming* in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**. v. 188, n. 19, p. 6995-7004, 2006.
- MURTOUGH, S. M. et al. Biocide rotation in the healthcare setting: is there a case for policy implementation? **Journal of Hospital Infection**. v. 8, p. 1-6, 2001.
- NATURE NEWS. **Resistance to last-ditch antibiotic has spread farther than anticipated**. Disponível em: [http://www.nature.com/news/resistance-to-last-ditch-antibiotic-has-spread-farther-than-anticipated.1.22140?WT.mc\\_id=FBK\\_NA\\_1706\\_FHNEWSCOLISTINRESISTANCE\\_PORTFOLIO](http://www.nature.com/news/resistance-to-last-ditch-antibiotic-has-spread-farther-than-anticipated.1.22140?WT.mc_id=FBK_NA_1706_FHNEWSCOLISTINRESISTANCE_PORTFOLIO). Acesso em: 9 jun 2017.
- NEVES, P. R. et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: an endemic problem in Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 47, n. 4, p. 409-420, 2011.
- NICHOLSON, A. et al. In vitro activity of S-(3, 4-dichlorobenzyl) isothioureia hydrochloride and novel structurally related compounds against multidrug-resistant bacteria, including *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* complex. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 39, p. 27-32, 2012.
- NOGUCHI, N. et al. Anti-infectious Effect of S-Benzylisothioureia Compound A22, Which Inhibits the Actin-Like Protein, MreB, in *Shigella flexneri*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 31, n. 7, p. 1327-1332, 2008.
- NUÑEZ, L.; MORETTON, J. Disinfectant-resistant bacteria in Buenos Aires city hospital wastewater. **Brazilian Journal of Microbiol.** v. 38, n. 38, p. 644-648, 2007.
- O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendation. **Review on antimicrobial resistance**. p. 1-79, 2016.
- O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Flagellar and *twitching* motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**. v. 30, n. 2, p. 295-304, 1998.
- OJHA, A. H. et al. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. **Molecular Microbiology**. v. 69, n. 1, p. 164-174, 2008.
- OLIVARES, J. et al. The intrinsic resistome of bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**. v. 4, n.103, p. 1-15, 2013.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **A crescente ameaça da resistência antimicrobiana: opções de ação**. p. 1-14, 2012. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75389/3/OMS\\_IER\\_PSP\\_2012.2\\_por.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75389/3/OMS_IER_PSP_2012.2_por.pdf?ua=1). Acesso em: 28 de maio de 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Report on the Burden of Endemic HealthCare-Associated Infection Worldwide**. p. 1-40, 2011. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/80135/1/9789241501507\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/80135/1/9789241501507_eng.pdf). Acesso em: 8 de abril de 2017.

OTTO, M. *Staphylococcal* infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. **Annual Reviews**, n. 64, p.175-188, 2013.

OURA, H. et al. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility through 1-naphthol and other bicyclic compounds bearing hydroxyl groups. **Environmental Applied and Microbiology**. v. 81, p. 2808-2818, 2015.

PITTS, N. B. et al. Dental caries. **Nature Reviews Disease Primers**. v. 3, n. 1730, p. 1-17, 2017.

PIZARRO-CERDÁ, J; COSSART, P. Bacterial Adhesion and Entry into Host Cells. **Cell**. v. 124, p. 715–727, 2006.

POKROWIECKI, R. et al. *In vitro* studies of nanosilver-doped titanium implants for oral and maxillofacial surgery. **International Journal of Nanomedicine**. v. 12, p. 4285-4297, 2017.

QUISHIDA, C. C. C. et al. Susceptibility of multispecies biofilm to photodynamic therapy using Photodithazine®. **Lasers Medical Science**, 2013.

RABIN, N. et al. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agentes. **Future Medicinal Chemistry**. v. 7, n. 4, p. 493-512, 2015.

RENNER, L. D.; WEIBEL, D. B. Physicochemical regulation of biofilm formation. **MRS Bulletin**. v. 36, n. 5, p. 347-355, 2011.

RIDENHOUR, B. J. et al. Persistence of antibiotic resistance plasmids in bacterial biofilms. **Evolutionary Applications**. v. 10, p. 640-647, 2017.

ROBERTS, A. E. L.; MADDOCKS, S. E.; COOPER, R. A. Manuka honey reduces the motility of *Pseudomonas aeruginosa* by suppression of flagella-associated genes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 70, p. 716-725, 2015.

ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Antimicrobial Resistance**. v. 52, n. 1, p. 1138-1143, 2011.

RYBTKE, M. et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: community structure, antimicrobial tolerance and immune response. **Journal of Molecular Biology**. v. 3, n.7, p. 1-18, 2015.

SCHEFFERS, D. J.; PINHO, M. G. Bacterial cell wall synthesis: new Insights from Localization Studies. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 69, n. 4, p. 585-607, 2005.

SHAPUR, N. K. et al. Sustained release varnish containing chlorhexidine for prevention of biofilm formation on urinary catheter surface: in vitro study. **Journal of Endourology**. v. 26, n. 1, p. 26-31, 2012.

SHARMA, G. et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets. **Biologicals**. v. 13, p. 1045-1056, 2013.

SILVA PAES LEME, A. F. et al. An effective and biocompatible antibiofilm coating for central venous catheter. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 61, n. 5, p. 357-65, 2015.

SINGH, S. et al. Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. **The Open Microbiology Journal**. v. 11, p. 53-62, 2017.

SINHA, S. D. et al. Evaluation of the role of substrate and albumin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm morphology through FESEM and FTIR studies on polymeric biomaterials. **Progress in Biomaterials**. v. 6, p. 27-38, 2017.

SISTI, F. et al. Cyclic-di-GMP signalling regulates motility and biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. **Microbiology**. v. 159, p. 869-879, 2013.

SOTO, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. **Virulence**. v. 4, n. 3, p. 223-229, 2013.

SOUZA, M. E. et al. *Melaleuca alternifolia* nanoparticles against *Candida* species biofilms. **Microbial Pathogenesis**. v. 104, p. 125-132, 2017.

STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **The Lancet**. v. 358, n. 14, p. 135-138, 2001.

STICKLER, D. J. Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. **Nature Clinical Practice Urology**. n. 5, p. 5:598-608, 2008.

SUPPIGER, A. et al. Two quorum sensing systems control biofilm formation and virulence in members of the *Burkholderia cepacia* complex. **Virulence**. v. 4, n. 5, p. 400-409, 2013.

SUTHERLAND, I. W. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. **Carbohydrate Polymers**. v. 38, n. 4, p. 319-328, 1999.

TREMBLAY, J.; DÉZIEL, E. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility. **BMC Genomics**. v. 11, n. 587, p. 1-15, 2010.

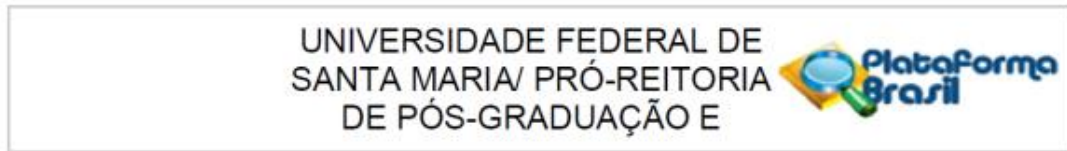
TRENTIN, D. S., GIORDANI, R. B., MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**. v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

UNIVERSITY OF PITTSBURG SCHOOLS OF THE HEALTH SCIENCES (UPMC). **Photo Galleries**. Disponível em: <http://eyemicrobiology.upmc.com/PhotoGalleryBiofilms.html>  
Acesso em: 28 de maio de 2017.

- VERSTRAETEN, N. et al. Living on a surface: *swarming* and biofilm formation. **Trends in Microbiology**. v.16, n.10, p. 496-506, 2008.
- WOLSKA, K. I. et al. Genetic control of bacterial biofilms. **Journal Applied Genetics**, 2015.
- WOOLHOUSE, M.; FARRAR, J. Policy: An intergovernmental panel on antimicrobial resistance. **Nature**. v. 509, p. 555-557, 2014.
- WU, X. et al. Effects of S-(3,4-dichlorobenzyl) isothiourea on different cellular events in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. **Research in Microbiology**. v. 162, p. 375-381, 2011.
- YAMACHIKA, S. et al. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* compound, 1,2,3,4-tetrahydro-1,3,5-triazine derivative, exerts its action by primarily targeting MreB. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 35, n. 10, p. 1740-1744, 2012.
- YOUNG, K. D. Bacterial morphology: why have different shapes? **Current Opinion in Microbiology**. v. 10, p. 596-600, 2007.
- YOUNG, K. D. The Selective Value of Bacterial Shape. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 70, n. 3, p. 660-703, 2006.
- YU, Q. et al. *In vitro* activity of verapamil alone and in combination with fluconazole or tunicamycin against *Candida albicans* biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 41, p. 179-182, 2013.
- ZHOU, G. et al. Effects of nutritional and environmental conditions on planktonic growth and biofilm formation of *Citrobacter werkmanii* BF-6. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 23, n. 12, p. 1673-82, 2013.

## ANEXOS

### ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (UFSM)



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Pesquisa de compostos que atuam sobre biofilmes microbianos

**Pesquisador:** MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 12114713.1.0000.5346

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 203.802

**Data da Relatoria:** 19/02/2013

##### Apresentação do Projeto:

A deposição de microrganismos em determinadas superfícies e a consequente formação de biofilmes são fenômenos que ocorrem naturalmente, mas, também, são estratégias desenvolvidas pelos microrganismos para se protegerem de fatores agressivos externos. Os microrganismos, quando em biofilme, tornam-se alvo de preocupação na área clínica devido à baixa resposta aos tratamentos antimicrobianos e à facilidade de colonização de superfícies como próteses, cateteres e instrumentos cirúrgicos. Vários estudos demonstram que antimicrobianos e biocidas têm sua eficácia diminuída frente à biofilmes. Deste modo, este trabalho tem como objetivo principal avaliar a capacidade de inibição da formação de biofilmes de isolados clínicos de cateteres, frente a novos compostos sintetizados e a biocidas frequentemente utilizados no ambiente hospitalar. Para avaliar o grau de inibição da formação do biofilme serão utilizadas microplacas e através da leitura das absorbâncias será possível verificar a atividade dos compostos.

##### Objetivo da Pesquisa:

**Geral:** Avaliar a atividade de novos compostos sintetizados e biocidas sobre biofilmes microbianos.

**Específicos:**

- Determinar, através de disco-difusão, a atividade antimicrobiana dos compostos frente aos microrganismos testados;
- Verificar, através da técnica de microdiluição, as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) dos compostos frente a diferentes microrganismos;

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar

**Bairro:** Cidade Universitária - Camobi **CEP:** 97.105-900

**UF:** RS **Município:** SANTA MARIA

**Telefone:** (55)3220-9362

**E-mail:** cep.ufsm@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



- Determinar, através do ensaio de microtitulação em placa, a Concentração Mínima de Inibição de Biofilme (CMIB);
- Determinar o Índice de Concentração Inibitória Fracional (FICI) de associações de desinfetantes frente aos biofilmes microbianos;
- Determinar o Índice de Concentração Inibitória Fracional (FICI) de associações de sulfametoxazol com metais e trimetropim frente aos biofilmes microbianos;

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

A pesquisa não trará risco de ordem física ou psicológica, nem benefícios diretos ao paciente, pois estes não serão envolvidos diretamente na pesquisa. Os testes in vitro serão realizados com material já coletado e processado não havendo intervenção dos pesquisadores na coleta e diagnóstico do paciente. Os prontuários também não serão consultados.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa será conduzida por pesquisadores com experiência na área. Os resultados esperados terão importância prática e científica. A justificativa é contundente e a revisão bibliográfica adequada.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os pesquisadores solicitaram a dispensa do TCLE, já que os pacientes não serão abordados. Além disso, os prontuários também não serão consultados.

Para os ensaios, será utilizada amostra de conveniência de cerca de 120 isolados clínicos de cateteres coletados no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria (LAC-HUSM) no período de 12 meses.

Projeto aprovado pela DEPE.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Como o material utilizado será coletado e processado sem que haja intervenção dos pesquisadores na coleta e diagnóstico do paciente, o projeto não precisaria de aprovação deste Comitê.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar  
**Bairro:** Cidade Universitária - Camobi **CEP:** 97.105-900  
**UF:** RS **Município:** SANTA MARIA  
**Telefone:** (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



SANTA MARIA, 23 de Fevereiro de 2013

---

**Assinador por:**

**Félix Alexandre Antunes Soares**  
(Coordenador)

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar

**Bairro:** Cidade Universitária - Camobi **CEP:** 97.105-900

**UF:** RS **Município:** SANTA MARIA

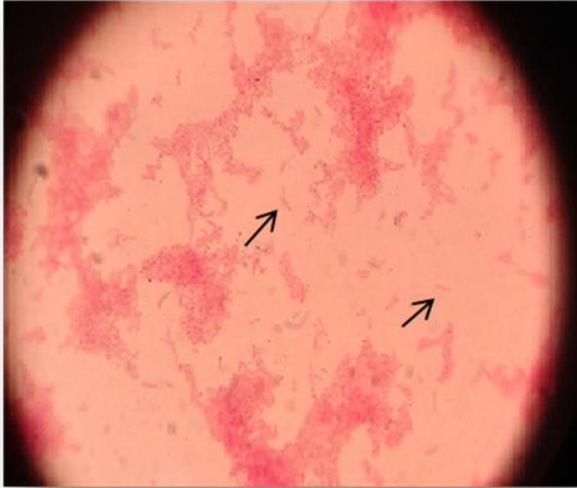
**Telefone:** (55)3220-9362

**E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



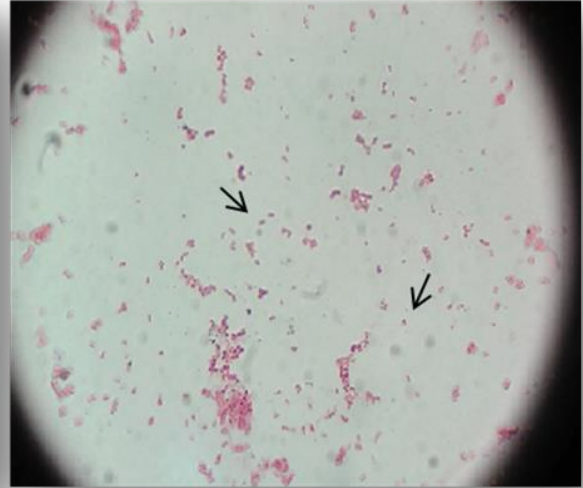
## ANEXO B – AÇÃO DO COMPOSTO A22 SOBRE A CÉLULA BACTERIANA.

A



Morfologia bacilar da cepa *P. aeruginosa* PAO1

B



Alteração na forma bacilar da cepa *P. aeruginosa* PAO1 pelo composto A22

Imagem representativa da ação da concentração subinibitória de 1  $\mu\text{g/mL}$  do composto A22 sobre a forma bacilar da cepa *P. aeruginosa* PAO1. As setas indicam bacilos (A) e cocos (B).  
Fonte: Resultado do próprio autor.