

OS BIOFILMES MICROBIANOS COMO AGENTES CAUSAIS DE DOENÇAS HUMANAS



Teresa Nascimento e Nuno Taveira*

Instituto Superior de Ciências da Saúde- Sul
Quinta da Granja, Travessa da Granja
Monte de Caparica
*ntaveira@mail.telepac.pt

Editado por Jorge Vítor, Universidade de Lisboa

Em 1800s Robert Koch formulou os conhecidos *postulados de Koch* que foram muito úteis para provar que uma bactéria seria o agente causal de uma determinada doença. Estes postulados basearam-se no paradigma uma-doença/uma-bactéria, e requeriam o isolamento em cultura pura da bactéria supostamente patogénica. Este conceito da etiologia mono-microbiana das doenças infecciosas, ajudou a sedimentar a noção de que cada espécie bacteriana se comportaria como uma entidade isolada tanto no homem como na natureza. Estudos efectuados a partir de década de setenta têm, no entanto, vindo a demonstrar que no homem e na natureza os microrganismos existem muitas vezes integradas em comunidades mistas que aderem a superfícies ou interfaces, e são envolvidas caracteristicamente por uma densa matriz exo-polissacarídica (Figura 1) (1). Estas comunidades complexas e dinâmicas designam-se de **biofilmes**, e podem incluir bactérias, fungos filamentosos, leveduras e protozoários (2, 3).

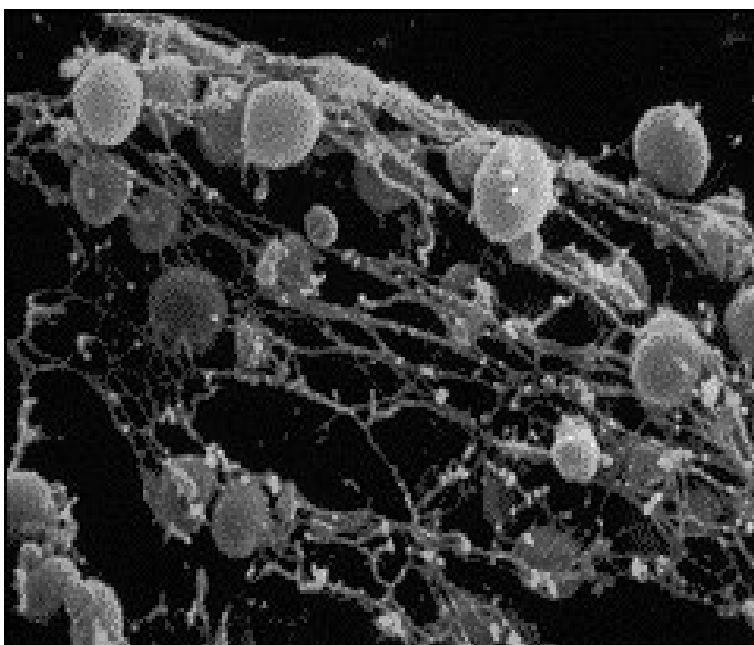


Figura 1 - Biofilme num catéter vascular observado em microscopia electrónica de varrimento.

Na década de 90, demonstrou-se que as bactérias em biofilme são metabólicas e morfológicamente diferentes das bactérias em suspensão, isoladas em cultura pura, e possuem normalmente maior resistência aos antibióticos e desinfetantes. Em meios industriais a formação de biofilmes pode levar, por exemplo, à corrosão e obstrução de tubagens e à contaminação de produtos alimentares (2). Em medicina humana, biofilmes formados em dispositivos médicos implantados no homem (ex. catéteres vasculares) têm sido associados a numerosas infecções (2,4). Nos últimos anos, constatou-se que os biofilmes têm também um papel preponderante na patogénese de numerosas infecções que não envolvem bio-materiais. De facto, cerca de 65% das infecções humanas de etiologia bacteriana poderão envolver biofilmes (4,5). Estas infecções podem afectar a cavidade oral (dentes e gengivas), o tracto urogenital e o tracto respiratório inferior.

Normalmente as infecções causadas por biofilmes microbianos caracterizam-se pela sua cronicidade, o que torna o diagnóstico microbiológico difícil, e pela elevada resistência ao tratamento antibiótico (6). Os biofilmes que se formam no corpo humano adquirem geralmente, em comparação com os biofilmes formados sobre superfícies e sistemas inertes, uma estrutura mais complexa. Isto é devido à acção da fibronectina do hospedeiro, aos glóbulos vermelhos e a outros materiais que, em conjunto com os exopolissacáridos bacterianos, também participam na formação do biofilme (7).

Biofilmes constituídos por uma flora microbiana mista formam-se em regiões de grande carga e diversidade microbiana e são responsáveis, por exemplo, por doenças da cavidade oral como a placa e cárie dentárias (Figura 2). Podem também ocorrer como consequência da implantação não cirúrgica de dispositivos médicos em regiões anatómicas que possuam uma flora microbiana mista. Os biofilmes que se formam vão sempre reflectir a flora autóctone da zona que lhes está associada.



Figura 2 - Placa dentária: exemplo de biofilme associado a doença.

Os biofilmes responsáveis por infecções de regiões anatómicas estéreis são normalmente constituídos por uma única espécie bacteriana ou fúngica (Tabela 1) (7).

Tabela 1- Exemplos de biofilmes envolvidos em infecções humanas

Infecção ou doença	Espécies bacterianas envolvidas
Cárie dentária	<i>Streptococcus mutans</i> , <i>Lactobacillus</i> spp.
Periodontite	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i>
Otite média	Estirpes não tipificáveis de <i>Haemophilus influenzae</i>
Infecções musculoesqueléticas	Cocos Gram (+) (<i>Staphylococcus</i> sp.)
Fascite necrosante	Estreptococos do grupo A
Infecções do tracto biliar	Bactérias entéricas (ex. <i>Escherichia coli</i>)
Osteomielite	Várias espécies de bactérias e fungos (geralmente misto)
Prostatite bacteriana	<i>E. coli</i> e outros bacilos Gram (-)
Endocardite subaguda bacteriana	Estreptococos do grupo <i>viridans</i>
Pneumonia da fibrose quística	<i>P. aeruginosa</i> e <i>Burkholderia cepacia</i>
Melioidose	<i>Burkholderia pseudomallei</i>
Infecções nosocomiais:	
• pneumonia	Bacilos Gram (-)
• suturas	<i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>S. aureus</i>
• <i>shunt</i> arteriovenoso	<i>S. epidermidis</i> e <i>S. aureus</i>
• cistite dos catéteres urinários	<i>E. coli</i> e outros bacilos Gram (-)
• peritonite dos dializados	Variedade de bactérias e fungos
• tubos endotraqueais	Variedade de bactérias e fungos
• catéteres venosos centrais	<i>S. epidermidis</i> e outros
• válvulas mecânicas do coração	<i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>
• grafos vasculares	Cocos Gram (+)
• aparelhos ortopédicos	<i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>
• próteses do pénis	<i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>

(adaptado de Costerton *et al.*, 1999)

Nos pulmões de doentes com Fibrose Quística são frequentemente detectados biofilmes bacterianos, sendo que em cerca de 80 a 90% destes doentes os biofilmes são constituídos

unicamente por *Pseudomonas aeruginosa* (8). Estes biofilmes, altamente resistentes aos antibióticos, produzem grandes quantidades de um polissacárido extracelular que contribui de forma determinante para a morte destes pacientes por insuficiência respiratória.

Os biofilmes de *Mycobacterium tuberculosis* podem ser elementos importantes na patogénese da tuberculose. Amostras de expectoração de doentes na última fase de tuberculose pulmonar, evidenciam a presença de conglomerados de *Mycobacterium tuberculosis*, semelhantes aos de *Pseudomonas aeruginosa* encontrados em doentes com fibrose quística (9). Os biofilmes formados por *Haemophilus influenzae* podem ser responsáveis por várias situações clínicas, como pedras renais infectadas ou otites (4).

A *Candida albicans* é uma levedura oportunista que pode provocar micoses superficiais e profundas com maior incidência em hospedeiros imunocomprometidos. É também um importante agente de infecções nosocomiais. A maioria das septicémias nosocomiais por *Candida* spp. resultam da formação de biofilmes em catéteres intravasculares (10). Estes biofilmes, tal como os homólogos bacterianos, são altamente resistentes ao tratamento com agentes antifúngicos.

Apesar das diferentes etiologias, as infecções por biofilmes partilham de algumas características comuns, que incluem: 1) O desenvolvimento preferencial em superfícies inertes, tecidos mortos e instrumentos médicos; 2) O crescimento lento; 3) A libertação de antigénios que levam à produção de anticorpos específicos e formação de imunocomplexos que podem provocar lesões nos tecidos adjacentes; 4) Serem agentes causais de infecções graves em indivíduos imunocomprometidos; 5) Os antibióticos eliminam os sintomas da infecção provocada pelos biofilmes mas não o próprio biofilme, levando ao aparecimento de infecções recorrentes. Torna-se necessário recorrer a procedimentos mecânicos para remover o biofilme (ex. extracção cirúrgica do implante); 6) As células bacterianas podem separar-se da estrutura do biofilme em qualquer fase da infecção e estabelecer uma nova infecção aguda (4, 11).

O estudo sistemático dos biofilmes com agentes causais de doenças humanas é recente. Só agora se começa a perceber os mecanismos moleculares do contacto entre bactérias (12), o papel da matriz exopolissacarídica na formação e manutenção dos biofilmes e a influência dos sinais ambientais na formação e dissolução dos biofilmes. Teremos, por isso, de aguardar mais algum tempo até que haja metodologias mais eficazes de prevenção e controlo dos biofilmes humanos. A implicação talvez mais importante dos biofilmes é a descoberta de que as bactérias podem organizar-se e funcionar como os organismos multicelulares, o que acrescenta um grau de

complexidade ainda maior ao seu estudo. Quando deixarão os microorganismos de nos surpreender?

Bibliografia:

- 1- Alexander M. Microbial communities and interactions: a prelude. In: Manual of Environmental Microbiology (Eds. Hurst C.J., Knudsen G.R., McInerney M.J., Stetzenbach L.D. and Walter M.V.) American Society for Microbiology Press, 1997 pp:5-13.
- 2- Costerton J.W., Z. Lewandowski, D.E. Caldwell, D.R. Korber and H.M. Lappin-Scott (1995). Microbial biofilms. Annu. Rev. Microbiol. 49: 711-745.
- 3- Costerton, J.W. and Z. Lewandowski (1997). The biofilm lifestyle. Adv.Dent.Res 11: 192-195.
- 4- Costerton, J.W., P.S.Stewart and E.P. Greenberg (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284: 1318-1322.
- 5- Potera, C. (1999). Forging a link between biofilms and disease. Science 283: 1837-1839.
- 6- Roberts S.K., Lappin-Scott H., and Leeming K. The control of bacterial-fungal biofilms. In Biofilms: the Good, the Bad and the Ugly (Eds. Wimpenny, J.W.T., Gilbert, P., Walker, J., Brading, M., Bayston, R.) Cardiff: BioLine, 1999 pp: 93-104.
- 7- Bayston, R. Biofilms in medicine and disease: an overview. In Biofilms: the Good, the Bad and the Ugly (Eds. Wimpenny, J.W.T., Gilbert, P., Walker, J., Brading, M., Bayston, R.) Cardiff: BioLine, 1999 pp:1-6.
- 8- Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO and Welsh MJ (2000). Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. Nature 407: 762-764.
- 9- Hall-Stoodley L., and Lappin-Scott H. (1998). Biofilm formation by the rapidly growing mycobacterial species, *Mycobacterium fortuitum*. FEMS Microbiol. Lett. 168: 77-84.
- 10- Baillie G., and Douglas J. *Candida* biofilms and their susceptibility to antifungal agents. In Methods in Enzymology Vol.310 Biofilms, (Editor Doyle, R.J.) Academic Press. 1999 pp: 644-656.
- 11- Yasuda, H., Y. Ajiki, J. Aoyama and T. Yokota (1994). Interaction between human polymorphonuclear leucocytes and bacteria released from in-vitro bacterial biofilm models. J. Med. Microbiol. 41: 359-367.
- 12- Pratt L.A. and Kolter R. (1999). Genetic analyses of bacterial biofilm formation. Curr. Opin. Microb. 2: 598-603.

Glossário

Fibronectina - É uma glicoproteína extracelular com alto peso molecular, que existe de forma abundante nos fluidos corporais e numa forma insolúvel na matriz extracelular. A fibronectina tem um papel fundamental em muitos processos fisiológicos importantes, tais como a embriogênese, cicatrização, hemostase e trombose. É uma proteína de adesão de alta afinidade que se liga a numerosas macromoléculas da matrix extracelular incluindo o colagénio ou gelatina, fibrina (fibrinogénio), heparina e outros glucosaminoglicanos, bem como a receptores de superfície celular.

Infecções nosocomiais - Infecções adquiridas em ambiente hospitalar.

Matriz exopolissacarídica (EPS) - Densa matriz de polímeros com várias composições químicas excretados para fora da célula que asseguram o esqueleto orgânico do biofilme. A matriz é muitas vezes referida como **glicocálix**. É um componente integral da estrutura dos biofilmes, não só porque permite a ligação a novas superfícies, como também facilita o arranjo espacial das diferentes espécies presentes no biofilme.

Os EPS associados com os biofilmes variam muito na sua composição e estrutura. Alguns são macromoléculas neutras, que devido à sua estrutura e configuração terciária, são muito pouco solúveis. É o caso dos mutanos sintetizados pelos *Streptococcus mutans* e outros estreptococos orais na presença de sucrose. A maioria dos EPS associados a biofilmes são, no entanto, de natureza polianiónica, devido à presença de compostos orgânicos e inorgânicos. Aqui estão incluídos os resíduos dos ácidos urónicos, piruvato, succinato, sulfatos ou fosfatos. Estes componentes vão fornecer sítios de ligação e pontes para catiões.

As funções dos EPS são essencialmente de protecção. A natureza polianiónica da matriz do glicocálix, pode contribuir significativamente para aumentar a resistência do biofilme. O glicocálix pode funcionar como barreira para a difusão de compostos catiónicos como por exemplo os antibióticos aminoglicósidos, pode ter importância no mecanismo de adesão bacteriana., como por exemplo, os alginatos sintetizados pela *P. aeruginosa*, e ainda, como barreira à fagocitose.