



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Sofia Carvalho Oliveira

**A influência do plasma humano na
formação de biofilme e virulência de
*Staphylococcus epidermidis***

Dissertação de mestrado
Mestrado em Biotecnologia

Trabalho realizado sob a orientação de
Dr. Nuno Cerca
Dr. Ângela França

Outubro de 2017

DECLARAÇÃO

Nome: Sofia Carvalho Oliveira

Endereço eletrónico: oliveira.sofia@hotmail.com

Cartão do Cidadão: 14416234

Título da dissertação: A influência do plasma humano na formação de biofilme e virulência de *Staphylococcus epidermidis*

Orientadores:

Doutor Nuno Miguel Cerca Dias

Doutora Ângela França

Ano de conclusão: 2017

Designação do Mestrado:

Mestrado em Biotecnologia

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, 10/2017

Assinatura: _____

*“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar
novas paisagens, mas em ter novos olhos.”*

Marcel Proust

AGRADECIMENTOS

É com muita satisfação que concluo mais uma etapa da minha vida, cujo percurso embora, por vezes, sinuoso revelou ser extremamente estimulante e gratificante. A realização desta dissertação de mestrado contou com importantes apoios e incentivos sem os quais não se teria tornado uma realidade e aos quais estarei sempre grata.

Ao meu orientador, professor Nuno Cerca, gostaria de lhe deixar um especial agradecimento pela oportunidade de participar neste projeto e por todo o conhecimento que me transmitiu ao longo deste percurso. Quero também referir que ficarei sempre grata pelo nível de exigência constante que, tendo sido fundamental para a minha evolução académica e científica, contribuiu substancialmente para o meu crescimento pessoal.

À minha co-orientadora Ângela França, pelo seu incansável apoio, expresso o meu mais profundo agradecimento pela orientação e suporte incondicionais que muito elevaram os meus conhecimentos e tornaram possível a concretização desta etapa.

A todos os elementos pertencentes ao grupo de investigação do professor Nuno Cerca, gostaria de agradecer pela integração e o carinho, a disponibilidade e apoio prestados. Em especial, quero agradecer ao Fernando Oliveira toda a dedicação e disponibilidade, pelo incentivo e ajuda cruciais no início do projeto, por toda a paciência e boa disposição. Da mesma forma, gostaria de reconhecer toda a ajuda, troca de ideias e partilha de conhecimentos cedidos pela Vânia Gaio, que se mostrou sempre disponível para me auxiliar.

Aos amigos que o mestrado me trouxe, àqueles que já faziam parte de mim, e ao meu melhor amigo João deixo um sincero obrigada, cujos momentos de descontração e ternura foram essenciais para ultrapassar os momentos mais difíceis, tornando esta jornada tão inesquecível. Por fim, deixo o agradecimento mais carinhoso à minha mãe, sem ela nada seria possível, aos meus irmãos e a toda a família que me apoiou ao longo desta trajetória.

O trabalho apresentado nesta tese foi apoiado pela Fundação Portuguesa para a Ciência e Tecnologia (FCT) no âmbito do financiamento estratégico da unidade UID/BIO/04469/2013, COMPETE 2020 (POCI-01-0145-FEDER-006684) e operação BioTecNorte (NORTE-01-0145-FEDER-000004) financiada pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional no âmbito do Norte 2020 - Programa Operacional Regional do Norte.

Cofinanciado por:



RESUMO

Staphylococcus epidermidis é um colonizador comensal da pele e mucosas humanas, que devido à sua capacidade para formar biofilmes em superfícies abióticas, é considerado um dos principais agentes causadores de infecções associadas ao uso de dispositivos médicos invasivos. Nos últimos anos, a virulência desta espécie tem sido extensamente estudada. Porém, a maioria destes estudos foram realizados *in vitro*, utilizando meios ricos e na ausência de fatores do hospedeiro, e, por isso, em condições muito diferentes do ambiente *in vivo*. Assim, o principal objetivo desta dissertação foi o estudo da influência do plasma humano no crescimento de *S. epidermidis*, de forma a melhor simular as condições *in vivo*. Dessa forma, foi avaliado o efeito de diferentes percentagens de plasma no crescimento planctônico, capacidade de formação de biofilme, estrutura do biofilme, cultivabilidade e viabilidade das células dos biofilmes, suscetibilidade aos antibióticos e alteração da expressão dos genes de virulência. Neste estudo não foram usadas concentrações de plasma acima dos 20% devido ao efeito inibitório que o nosso plasma comercial mono-dador apresentou. Apesar disso, é de salientar que 20% de plasma foi o suficiente para alterar significativamente o efeito da tolerância a certos antibióticos, reduzindo o efeito da vancomicina e tetraciclina e potenciando o efeito da rifampicina. Aparentemente, o plasma ligou-se às moléculas de tetraciclina, diminuindo a sua disponibilidade e, conseqüentemente, interferindo com a sua eficácia. Curiosamente, diferentes resultados foram obtidos utilizando meios de cultura de diferentes marcas, bem como diferentes concentrações iniciais de células. As imagens obtidas por CLSM conjugadas com uma avaliação macroscópica dos biofilmes, permitiram inferir que o plasma interferiu com a interação entre as células, diminuindo a coesão dos biofilmes formados na sua presença. Por fim, verificou-se uma tendência de redução da expressão dos genes *icaA*, *dltA* e *sepA*, associados à proteção da bactéria contra fatores imunitários, assim como do gene *srdG*, envolvido na adesão a proteínas humanas, na presença de plasma. Concluindo, os nossos resultados destacam a importância da inclusão de fatores do hospedeiro nos ensaios *in vitro*, a fim de mimetizar as condições *in vivo*, e, por conseguinte, aumentar o significado clínico dos resultados obtidos.

ABSTRACT

Staphylococcus epidermidis, a commensal colonizer of healthy human skin and mucosae, is one of the most common etiological agents of medical device-related infections. Hence, several efforts have been made to identify *S. epidermidis* virulence determinants. However, the great majority of these studies were performed using artificial rich media, in the absence of host factors, which composition does not reflect *in vivo* environment. Thus, the aim of this thesis was to evaluate the influence of human plasma on *S. epidermidis* virulence by including host factors in the *in vitro* model used to better mimic *in vivo* conditions. For this, it was assessed the effect of different plasma concentrations on planktonic growth, biofilm formation capacity, biofilm structure, biofilm cells culturability and viability, susceptibility to antibiotics and alteration of virulence gene expression. Due to the inhibitory effect that our commercial plasma from a single donor presented, plasma concentrations above 20% were not used in this study. Despite this, it should be noted that 20% of plasma was enough to significantly alter the tolerance effect to some antibiotics, reducing the effect of vancomycin and tetracycline and enhancing the effect of rifampicin. Apparently, plasma bound to tetracycline molecules, decreasing their availability and, therefore, interfering with their efficacy. Interestingly, different results were obtained using culture media from different brands, as well as different initial cells concentrations. CLSM data combined with a macroscopic assessment of biofilms showed that human plasma interfered with intracellular bonds, leading to the formation of poorly cohesive biofilms. Finally, there was a trend of decreased expression of *icaA*, *dltA* and *sepA* genes, associated with bacteria protection against immune factors, and *srdG* gene, involved in the adhesion to human proteins, in the presence of plasma. Overall, our results highlight the importance of introducing host factors in *in vitro* assays in order to better mimic *in vivo* conditions consequently increasing the clinical relevance of the results obtained.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS	xiii
LISTA DE PUBLICAÇÕES DERIVADAS DESTA TESE	xvii
LISTA DE FIGURAS	xviii
LISTA DE TABELAS	xxii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Evolução do comportamento unicelular para o comportamento multicelular em bactérias	1
1.2 Formação de biofilmes	1
1.3 <i>Quorum sensing</i>	3
1.4 Relevância clínica dos biofilmes	3
1.5 Tolerância e resistência das células dos biofilmes a antibióticos.....	8
1.6 Evasão dos biofilmes à resposta imunitária do hospedeiro	11
1.7 Modelos <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i>	12
1.7.1 Plasma humano	16
1.8 Objetivos.....	17
2. MEIOS QUIMICAMENTE DEFINIDOS PARA O ESTUDO DE STAPHYLOCOCCUS SPP.	19
2.1 Meios de cultura complexos e meios quimicamente definidos	19
2.2 Pesquisa bibliográfica sobre utilização de meios quimicamente definidos.....	20
2.3 Análise comparativa de meios quimicamente definidos relevantes para este estudo ..	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Plasma humano.....	27
3.2 Bactéria e condições de crescimento	27
3.3 Influência do plasma no crescimento planctônico de <i>S. epidermidis</i>	27
3.4 Influência do plasma na formação de biofilme de <i>S. epidermidis</i>	28
3.4.1 Formação de biofilme.....	28
3.4.2 Quantificação da biomassa.....	28

3.4.3	Quantificação do número de células viáveis e cultiváveis.....	29
3.4.4	Análise da estrutura.....	29
3.5	Suscetibilidade das células planctónicas a antibióticos.....	30
3.6	Expressão de genes.....	30
3.6.1	Extração de RNA	30
3.6.2	Tratamento com DNase.....	31
3.6.3	Quantificação de RNA e avaliação da pureza e integridade	32
3.6.4	Síntese de DNA complementar	32
3.6.5	PCR quantitativo	33
3.7	Análise estatística	35
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1	Efeito do plasma comercial no crescimento planctónico de <i>S. epidermidis</i>	37
4.2	Otimização das condições de crescimento	38
4.3	Variabilidade nos meios complexos e comparação com meios quimicamente definidos	40
4.4	Avaliação da coesividade do biofilme crescido em plasma	42
4.5	Efeito do plasma na estrutura tridimensional do biofilme.....	43
4.6	Efeito do plasma na indução de dormência.....	45
4.7	Efeito do plasma na morfologia celular.....	46
4.8	Efeito do plasma na suscetibilidade a antibióticos	47
4.9	Efeito do plasma na alteração da expressão de genes	51
5.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	55
	REFERÊNCIAS.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

Aae	Proteína de adesão
Aap	Proteína associada à acumulação
Agr	Gene regulador acessório
AMP	Péptido antimicrobiano
ANOVA	Análise de Variância
Aps	Sistema de deteção de péptidos antimicrobianos
AtIE	Autolisina E
Bhp	Proteína homologa à proteína associada ao biofilme
C/CDM	Meio quimicamente definido
C3b	Proteína do sistema complemento
cDNA	DNA complementar
CFU	Unidades formadoras de colónias
CLSM	Microscopia confocal de varrimento laser
CoNS	Estafilococos coagulase-negativos
CP	Ponto de cruzamento
C_q	Ciclo de quantificação
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
Dlt	Proteína de D-alanilação de ácidos teicóicos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
DO	Densidade ótica
E	Eficiência de reação
Ebp	Proteína de ligação à elastina
Ecp	Cisteíno protease
eDNA	DNA extracelular
Esp	Serina endopeptidase
FAME	Éster metílico de ácido gordo
FDA	Agência federal de administração de alimentos e medicamentos
FS	<i>Forward scatter</i>
Fw	<i>Forward</i>
GehC	Lipase
GehD	Lipase

GluSE	Glutamil endopeptidase
<i>ica</i>	Gene de adesão intercelular
Ig	Imunoglobulina
ISO	Organização Internacional de Normalização
LF	Liofilchem
MprF	Fator de resistência a vários péptidos
mRNA	RNA mensageiro
MSCRAMMs	Componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas da matriz adesiva
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a agentes Patogénicos
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGA	Ácido poli- γ -glutâmico
PNAG	Poli-N-acetilglucosamina
PRR	Recetores de reconhecimento de padrões
PSM	Modulina solúvel em fenol
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
QRDR	Região determinante de resistência às quinolonas
QS	<i>Quorum sensing</i>
R	Razão
RIF	Rifampicina
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
Rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
Rv	<i>Reverse</i>
SdrF	Proteína de ligação ao colagénio
SdrG	Proteína de ligação ao fibrinogénio
SdrH	Proteína de ligação à elastina
SepA	Protease
SitA	Proteína transportadora de ferro
SitB	Proteína transportadora de ferro
SitC	Proteína transportadora de ferro
SS	<i>Side scatter</i>

SspA	Serina endopeptidase
SspB	Cisteíno protease
T/TSB	Caldo trípico de soja
TET	Tetraciclina
TSA	Agar trípico de soja
VAN	Vancomicina
VraF/G	Proteína de exportação de AMP
WGA	Lectina de gérmen de trigo

LISTA DE PUBLICAÇÕES DERIVADAS DESTA TESE

Apresentação de Poster em Congresso Internacional

Oliveira, S.; França, A. and Cerca, N. (2017). The influence of human plasma on *Staphylococcus epidermidis* virulence. EUROBIOFILMS´17, 19-22 September, Amsterdam, Netherlands.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Etapas de desenvolvimento de um biofilme.	2
Figura 1.2. Formação de biofilme em <i>S. epidermidis</i> : as células planctónicas aderem a uma superfície sólida ou às proteínas da matriz do hospedeiro e, aderidas entre si, crescem formando agregados. Este fenómeno de agregação é auxiliado pela produção de PNAG, ácidos teicóicos e algumas proteínas como a proteína associada à acumulação (Aap). Um biofilme maduro é constituído por uma mistura de bactérias impregnadas numa matriz extracelular composta por proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos. Após a maturação do biofilme ocorre o destacamento das células, cujo processo depende da expressão de modulinas solúveis em fenol (PSMs), possibilitando a colonização de novas superfícies.	6
Figura 1.3. Representação esquemática de exemplos de mecanismos de resistência e tolerância a antibióticos subjacentes ao estado de biofilme, respetivos gradientes fisiológicos de oxigénio e nutrientes, formados no interior da sua estrutura, e a sua relação com a diferenciação celular em diferentes estados de crescimento. Abreviatura: QS - <i>quorum sensing</i>	9
Figura 1.4. Representação esquemática de formação de biofilme em modelos <i>in vitro</i>	13
Figura 1.5. Representação esquemática de infeção associada a cateteres em modelo de ratinho, em estudos <i>in vivo</i>	14
Figura 1.6. Representação de três vias de infeção em <i>C. elegans</i> . (A) Infeção intestinal a qual permite a proliferação bacteriana no lúmen intestinal. (B) Infeção por adesão à cutícula com subsequente penetração da epiderme. (C) Adesão à região da cauda e subsequente invasão retal.	14
Figura 1.7. Representação esquemática da utilização do modelo de infeção de larva da traça da cera em estudos <i>in vivo</i>	15
Figura 1.8. Representação esquemática da utilização de sangue de voluntários em modelos <i>ex vivo</i>	16
Figura 4.1. Representação gráfica do crescimento planctónico de <i>S. epidermidis</i> em TSB (T) e em TSB suplementado com 5%, 10%, 20% e 40% de plasma humano. O gráfico A1 representa a DO _{640nm} e o gráfico A2 representa os valores de logaritmo de base 10 de CFU, ambos referentes aos tempos 0, 6, 12 e 24 horas. A concentração inicial de células foi de 6×10^6 CFU/mL. Os valores correspondem à média e as barras de erro representam o desvio padrão, com um intervalo de confiança de 95%. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas por asteriscos (One-way ANOVA, $p < 0.05$).	38

Figura 4.2. Representação gráfica da influência da concentração de inóculo inicial no crescimento planctônico de <i>S. epidermidis</i> em TSB (T) e em TSB com 5% e 10% de plasma humano. Neste estudo foram analisados os tempos 0, 6, 12 e 24 horas, por medição da DO _{640nm} (A1, B1 e C1), tendo sido verificada a respectiva cultivabilidade das células por contagem de CFU (A2, B2 e C2). Os valores correspondem à média e as barras de erro representam o desvio padrão, com um intervalo de confiança de 95%, estando as diferenças estatisticamente significativas assinaladas por asteriscos (One-way ANOVA, p<0.05).	39
Figura 4.3. Representação gráfica do crescimento planctônico de <i>S. epidermidis</i> em diferentes formulações de TSB (T) - VWR e Liofilchem (LF) - e CDM na ausência e presença de 5% e 10% de plasma humano. Neste estudo foram analisados os tempos 0, 6, 12 e 24 horas, por medição da DO _{640nm} (A1, B1 e C1), tendo sido verificada a respectiva cultivabilidade das células por contagem de CFU (A2, B2 e C2). Os valores correspondem à média e as barras de erro representam o desvio padrão, com um intervalo de confiança de 95%, estando as diferenças estatisticamente significativas assinaladas por asteriscos (One-way ANOVA, p<0.05).....	41
Figura 4.4. Representação gráfica da formação de biofilme de <i>S. epidermidis</i> em duas formulações de TSB (T) - VWR e Liofilchem (LF) - e CDM, na ausência e presença de 5%, 10% e 20% de plasma humano, por quantificação com violeta de cristal a uma DO _{570 nm} . A concentração inicial de células foi de 2×10^6 CFU/mL. Os valores correspondem à média e as barras de erro representam o desvio padrão, com um intervalo de confiança de 95%, estando as diferenças estatisticamente significativas assinaladas por asteriscos (Teste T, p <0.05). ...	42
Figura 4.5. Biofilmes de <i>S. epidermidis</i> formados em placas de 8 poços, em CDM na ausência e presença de 5%, 10% e 20% de plasma humano. Após a remoção do meio de cultura, os biofilmes da primeira fila não foram lavados, tendo-se procedido a duas lavagens da segunda fila de biofilmes com NaCl a 0,9%. A concentração inicial de células foi de 2×10^6 CFU/mL.....	43
Figura 4.6. Representação das imagens de CLSM das células dos biofilmes de <i>S. epidermidis</i> , crescidos em CDM na ausência de plasma, coradas com DAPI (cor azul), WGA - Vermelho Texas - (cor vermelha) e a combinação de ambas.	44
Figura 4.7. Imagens de CLSM referentes às células dos biofilmes de <i>S. epidermidis</i> formados em CDM sem plasma humano e com diferentes concentrações do mesmo (5%, 10% e 20%). Os ácidos nucleicos foram corados com DAPI (azul) e os resíduos de N-acetilglucosamina com WGA (vermelho).....	45

Figura 4.8. Representação gráfica da cultivabilidade, determinada por contagem de CFU, e viabilidade, determinada por citometria de fluxo, das células de biofilmes de *S. epidermidis* formados em CDM na ausência e presença de 5%, 10% e 20% de plasma humano. A concentração inicial de células foi de 2×10^6 CFU/mL. Os valores correspondem à média e as barras de erro representam o desvio padrão, com um intervalo de confiança de 95%, e as diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas por asteriscos (Teste T, $p < 0,05$). 46

Figura 4.9. Representação gráfica do tamanho (FS-*forward scatter*) e complexidade (SS-*side scatter*) das células dos biofilmes de *S. epidermidis*, crescidas em CDM na ausência e presença de 5%, 10% e 20% de plasma humano, avaliados por citometria de fluxo. Os valores correspondem à média e as barras de erro representam o desvio padrão, com um intervalo de confiança de 95%, e as diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas por asteriscos (Teste T, $p < 0,05$). 47

Figura 4.10. Representação gráfica da influência da concentração de inóculo na suscetibilidade de células planctónicas de *S. epidermidis* à vancomicina (VAN). Após 6 horas de crescimento em CDM, foi adicionada a vancomicina na concentração sérica e analisada a cultivabilidade das células por contagem de CFU após 3 horas da adição do antibiótico. Os valores correspondem à média e as barras de erro representam o desvio padrão, com um intervalo de confiança de 95%, e as diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com asteriscos (Teste T, $p < 0,05$). 48

Figura 4.11. Representação gráfica da redução média da cultivabilidade das células planctónicas de *S. epidermidis* após 3 horas de exposição aos antibióticos vancomicina (VAN), rifampicina (RIF) e tetraciclina (TET). O eixo Y indica a diferença de \log_{10} CFU/mL entre a estirpe sem os antibióticos (controlos) e a estirpe tratada com os antibióticos. Após 6 horas de crescimento em CDM na ausência e presença de 5%, 10% e 20% de plasma humano, foram adicionados os antibióticos na concentração sérica e analisada a cultivabilidade das células por CFU. As barras de erro representam o desvio padrão, com um intervalo de confiança de 95%, e as diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas por asteriscos (Teste T, $p < 0,05$). 49

Figura 4.12. Representação gráfica da redução média da cultivabilidade das células planctónicas de *S. epidermidis* após 3 horas de exposição aos antibióticos vancomicina (VAN), rifampicina (RIF) e tetraciclina (TET) em 2 modelos diferentes (1 e 2). O eixo Y indica a diferença de \log_{10} CFU/mL entre a estirpe sem os antibióticos (controlos) e a estirpe tratada com os antibióticos. No modelo 1, após 6 horas de crescimento em CDM na ausência

e presença de 10% de plasma humano, foram adicionados os antibióticos na concentração sérica e analisada a cultivabilidade das células por contagem de CFU. No modelo 2, após as 6 horas de crescimento em 10% de plasma, procedeu-se à remoção do plasma do meio, suspensão em meio fresco sem plasma e posterior adição dos antibióticos. As barras de erro representam o desvio padrão, com um intervalo de confiança de 95%, e as diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas por asteriscos (Teste T, $p < 0,05$).... 50

Figura 4.13. Representação da integridade do RNA, extraído de culturas planctónicas de *S. epidermidis* crescidas em CDM e em CDM com 5%, 10% e 20% de plasma humano, avaliada por visualização de um gel de 1% de agarose não desnaturante, corado com Midori Green (Nippon Genetics Europe GmbH, Alemanha)..... 51

Figura 4.14. Expressão relativa dos genes *icaA*, *dltA*, *sepA* e *sdrG* de culturas planctónicas de *S. epidermidis*, crescidas em CDM na ausência e presença de 5%, 10% e 20% de plasma humano. Os valores correspondem à média e as barras de erro representam o desvio padrão, com um intervalo de confiança de 95%. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (One-way ANOVA)..... 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Infecções associadas à formação de biofilme e respectivos exemplos de microrganismos causadores.....	4
Tabela 1.2. Outros fatores de virulência de <i>S. epidermidis</i>	5
Tabela 2.1. Pontuações parciais atribuídas a cada critério de classificação dos CDM selecionados, segundo duas escalas qualitativas definidas de acordo com a relevância dos critérios.....	21
Tabela 2.2. Avaliação qualitativa de CDM de acordo com os critérios aplicabilidade, relacionado com o tipo de testes e espécie, e facilidade, referente ao número de compostos e etapas.....	22
Tabela 2.3. Orçamento para os componentes do CDM com a maior classificação segundo os critérios aplicabilidade e facilidade. De forma a obter o orçamento mais económico, após uma comparação de preços entre diferentes empresas, foram selecionados os preços mais baixos, individualmente, para cada componente.	23
Tabela 2.4. Orçamento para os componentes do CDM com a segunda maior classificação de acordo com os critérios aplicabilidade e facilidade. De forma a obter o orçamento mais económico, após uma comparação de preços entre diferentes empresas, foram selecionados os preços mais baixos, individualmente, para cada componente.....	24
Tabela 3.1. <i>Primers</i> usados nos ensaios de qPCR.....	34

1. INTRODUÇÃO

1.1 Evolução do comportamento unicelular para o comportamento multicelular em bactérias

Ao longo da história evolutiva da vida no planeta ocorreram diversas mudanças importantes na complexidade organizacional dos seres vivos, constituindo a biosfera extremamente complexa conhecida nos dias de hoje ¹. Um dos eventos evolucionários mais importante foi o aparecimento da multicelularidade ². As bactérias, embora por definição sejam organismos unicelulares, também podem apresentar comportamento multicelular. Este comportamento pode ser organizado em três grupos gerais. O primeiro grupo é composto por bactérias filamentosas, constituindo longas cadeias de células unidas topo a topo que, geralmente, partilham o citoplasma ³. O segundo grupo compreende as bactérias magnetotáticas multicelulares, tipicamente constituídas por 10 a 40 células dispostas em torno de um compartimento acelular central, possivelmente responsável pela comunicação intercelular ⁴. Estas deslocam-se como uma unidade, devido à presença de flagelos, e de acordo com o campo geomagnético ⁵. Finalmente, o último grupo inclui as bactérias que formam uma estrutura multicelular através do fenómeno de agregação. Estes agregados incluem biofilmes e *swarms*, sendo encontrados em todo o domínio bacteriano ^{6,7}.

Os biofilmes são estruturas ancestrais tendo sido o primeiro registo fóssil destas estruturas datado em 3,25 mil milhões de anos, sendo comuns numa ampla gama de organismos, incluindo não só bactérias, mas também *archaea* e micróbios eucariontes tais como fungos ⁸. O surgimento destes biofilmes primitivos parece ter coincidido com a primeira evidência de uma transição evolutiva de organização unicelular para multicelular ⁸.

1.2 Formação de biofilmes

Nos diversos nichos ambientais, os microrganismos existem naturalmente em pelo menos um dos dois estados principais, que incluem o estado planctónico, de vida livre, ou, como referido anteriormente, estado sésil - aderidos a uma superfície - biofilmes. No estado planctónico, as bactérias podem existir numa ampla variedade de fluidos, incluindo efluente, óleo, água, urina, e purulência ⁹. No entanto, os microrganismos demonstraram ter uma

preferência para viverem em comunidade, formando biofilmes ¹⁰. Esta preferência pode ser explicada pelo facto de que muitas bactérias vivem sob condições de limitação de nutrientes e sob constante perigo de serem removidas da fonte de alimento. Assim, para se protegerem da influência das condições ambientais adversas, as bactérias formam os biofilmes ¹¹. A transição do estado planctónico para biofilme ocorre, portanto, como consequência de alterações ambientais ^{8,12,13}. Assim, a presença de um sinal de stress desencadeia a formação de um biofilme, o qual aumenta a resistência a stresses exógenos, permitindo a sobrevivência bacteriana sob condições desfavoráveis ¹³. A heterogeneidade fenotípica e a especialização localizada nos biofilmes pode ser vista através da expressão diferencial de pili, fímbrias, flagelos ¹⁴, hidratos de carbono ¹⁵, adesinas ¹⁶, genes associados à dormência ¹⁷ e resistência e/ou tolerância a antibióticos ¹⁸ nas células de diferentes zonas do biofilme.

O desenvolvimento de um biofilme bacteriano está dividido em três fases: 1) adesão, 2) maturação e 3) destacamento (figura 1.1) ¹³. A adesão de microrganismos pode ocorrer em superfícies abióticas ou bióticas, como a superfície polimérica de um dispositivo médico invasivo ou o tecido humano, respetivamente ¹⁹. Relativamente à adesão a uma superfície abiótica, sabe-se que se encontra fortemente dependente das características físico-químicas da superfície bacteriana ²⁰ e do biomaterial, como a textura (rugosa ou lisa) ²¹, a carga superficial ²², a hidrofobicidade ²¹, pH e temperatura ²³ e a tensão superficial ²⁴. Este tipo de adesão é mediada por interações não específicas, principalmente por interações hidrofóbicas ou eletrostáticas ²⁵. No caso da adesão a tecido humano, as interações são muito específicas envolvendo recetores particulares ^{26,27}. É sabido, ainda, que a adesão de microrganismos pode ocorrer em superfícies abióticas revestidas por proteínas da matriz do hospedeiro, as quais facilitam a formação de biofilme através de interações específicas ²⁸ que serão abordadas na secção 1.4.

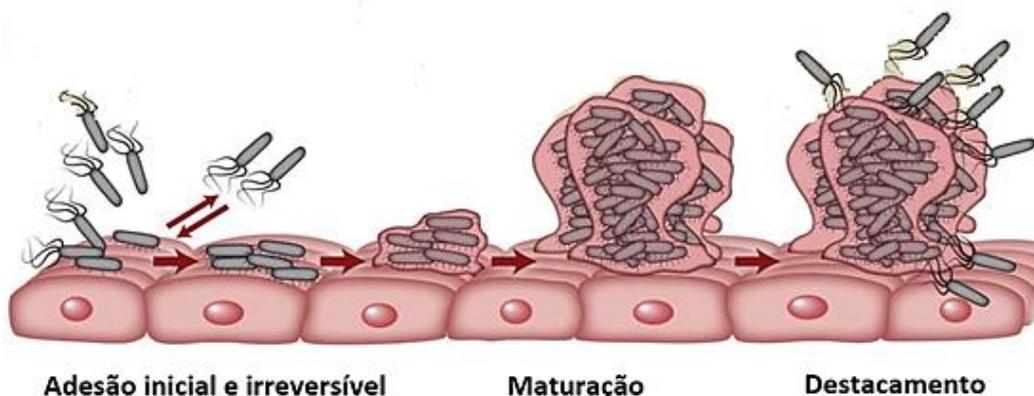


Figura 1.1. Etapas de desenvolvimento de um biofilme. Adaptado de ²⁹.

Relativamente ao fenómeno de maturação, há uma proliferação celular de múltiplas camadas, bem como a adesão intercelular, culminando na formação de microcolónias³⁰. Dentro dos biofilmes, as bactérias estão embebidas numa matriz extracelular por elas produzida, que pode representar cerca de 90% da biomassa³¹. A matriz é constituída por substâncias poliméricas extracelulares que, juntamente com proteínas de ligação a hidratos de carbono^{32,33}, pili, flagelos¹⁴, outras fibras adesivas^{34,35} e DNA extracelular (eDNA)³⁶ atuam como um esqueleto para estabilizar a estrutura tridimensional do biofilme. A maturação do biofilme compreende processos adesivos, que promovem a ligação entre as bactérias durante a proliferação, mas também processos disruptivos, que levam à formação de canais, os quais são necessários para que as células do biofilme em camadas mais profundas consigam alcançar os nutrientes, bem como descartar os resíduos produzidos pelas células¹³. Além disso, os processos disruptivos provocam o destacamento e a dispersão de aglomerados de células do biofilme, controlando a sua expansão²⁶.

1.3 *Quorum sensing*

A comunicação dos microrganismos inter e intra-espécies é mediada por um mecanismo conhecido como *quorum sensing* (QS)³⁷. Este mecanismo envolve a produção, libertação e deteção de moléculas de sinalização química denominadas auto-indutores.³⁷ O QS apresenta-se como um tipo específico de regulação da expressão genética que depende da densidade da população bacteriana³⁸. A concentração de auto-indutores no meio extracelular é diretamente proporcional ao número de bactérias pertencentes a essa população, aumentando à medida que a densidade celular aumenta³⁹. Assim, quando um número suficiente de células, o quórum, está presente ocorre a acumulação extracelular da concentração mínima estimuladora de auto-indutores³⁸. Em consequência, é induzida a alteração da expressão genética, ocorrendo a sincronização de atividades, como a formação de biofilme⁴⁰ e outros fatores de virulência⁴¹. Através da utilização destes sistemas de sinal-resposta, as bactérias conseguem controlar comportamentos específicos numa dada população, funcionando assim como organismos multicelulares⁴².

1.4 Relevância clínica dos biofilmes

A formação de biofilme é reconhecida como um dos principais fatores de virulência numa grande variedade de microrganismos^{12,43}, representando um grande problema na área

da saúde pública. Atualmente, estima-se que os biofilmes são responsáveis por mais de 65% das infecções hospitalares e 80% de todas as infecções microbianas ⁴⁴. São diversas as infecções associadas à formação de biofilme (tabela 1.1), sendo o género estafilococos um dos mais frequentes causadores destas infecções.

Tabela 1.1. Infecções associadas à formação de biofilme e respetivos exemplos de microrganismos causadores.

Infeções associadas à formação de biofilme	Microrganismos causadores (exemplos)	Referências
Infeção pulmonar: Fibrose cística	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	45,46
Feridas crónicas	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	47,48
Cateteres: infeção urinária ou sanguínea	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. epidermidis</i>	48-51
Válvulas cardíacas: Endocardite	<i>Mycobacterium fortuitum</i> , <i>S. epidermidis</i>	52,53
Próteses ortopédicas: osteomielite	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i>	54
Infeção ocular: ceratite	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	55-57

Os estafilococos são colonizadores comuns da pele e das membranas mucosas de humanos e de outros mamíferos ⁵⁸. Deste género de bactérias destacam-se as espécies *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* que juntos ocupam os primeiros lugares entre os agentes causadores de infecções hospitalares ⁵⁹. *S. aureus* é considerado o agente patogénico clássico do género estafilococos, causando doenças graves em indivíduos saudáveis e sendo caracterizado pela sua elevada virulência ⁶⁰. *S. epidermidis* pertence aos estafilococos coagulase-negativos (CoNS), os quais são considerados agentes patogénicos oportunistas uma vez que causam infecções em indivíduos mais fragilizados tais como recém-nascidos, idosos e pacientes imunocomprometidos ⁶¹. Em termos de diagnóstico, distinguem-se dos estafilococos coagulase-positivos, tais como *S. aureus*, por não possuírem a enzima coagulase ⁶².

Em particular, esta tese centra-se na espécie *S. epidermidis* por constituir um colonizador permanente e pela sua ubiquidade na pele humana, representando a fonte mais comum de infecções associadas à colonização de dispositivos médicos invasivos ⁶³. Estas infecções geralmente começam com a introdução de bactérias a partir da pele do paciente, ou

do pessoal de cuidados de saúde, durante a inserção do dispositivo, como são exemplo a introdução de cateteres intravenosos periféricos ou centrais, próteses articulares e dispositivos cardíacos ⁶². Embora as infecções causadas por *S. epidermidis* sejam raramente fatais, a sua frequência e o facto de serem extremamente difíceis de tratar ⁶⁴ representam um sério problema de saúde pública.

As implicações clínicas do crescimento bacteriano em biofilme são a elevada tolerância a antibióticos ⁶⁵ e a capacidade de evasão à resposta imunitária inata do hospedeiro ⁶⁶. *S. epidermidis* apresenta um conjunto de proteínas que facilitam o estabelecimento da infecção e persistência no corpo humano (tabela 1.2).

Tabela 1.2. Outros fatores de virulência de *S. epidermidis*. Adaptado de ¹⁹.

Fatores de virulência	Gene(s)	Função
AtlE	<i>atlE</i>	Autolisina bifuncional e adesina Liga-se a várias proteínas da matriz do hospedeiro
Aae	<i>aae</i>	Autolisina bifuncional e adesina Liga-se a várias proteínas da matriz
SdrF	<i>sdrF</i>	Liga-se ao colagénio
SdrG ou Fbe	<i>sdrG</i> ou <i>fbe</i>	Liga-se ao fibrinogénio
SdrH	<i>sdrH</i>	Função putativa de ligação
Ebp	<i>ebp</i>	Liga-se à elastina (em <i>S. aureus</i>)
Dlt, MprF, VraF e VraG	<i>dltA, dltB, dltC, dltD, mprF, vraF</i> e <i>vraG</i>	D-alanilação de ácidos teicóicos (Dlt), lisilação de fosfolípidos (MprF) e exportação putativa de AMP (VraF e VraG)
Protease SepA	<i>sepA</i>	Degradação da AMP Maturação de lipase, resistência à AMP e, potencialmente, dano tecidual
Sistema Aps	<i>apsR</i> ou <i>graR, apsS</i> ou <i>graS</i>) e <i>apsX</i>	Sensor de AMP, regulador de mecanismos de resistência AMP
Cisteíno proteases (SspB e Ecp)	<i>sspB</i>	Desconhecida: danificação de tecidos?
Glutamil-Endopeptidase e serina-protease (GluSE, SspA and Esp)	<i>sspA</i>	Degradação de fibrinogénio e fator complemento C5
Lipases GehC e GehD	<i>gehC</i> e <i>gehD</i>	Persistência nas secreções de ácidos gordos?
Estafiloferrinas	<i>locus sfna</i> (<i>S. aureus</i> <i>estafiloferrina A</i>)	Sideróforos (aquisição de ferro)
SitA, SitB e SitC	<i>sitABC</i>	Importador de ferro
FAME	Não identificados	Desintoxicação de ácidos gordos bactericidas

*AMP (do inglês Anti-microbial peptide) - péptido antimicrobiano

Não obstante, a virulência de *S. epidermidis* é principalmente atribuída à sua capacidade para formar biofilmes ⁶⁷. Em estafilococos a formação de biofilme é regulada principalmente pelo gene regulador acessório (*agr*) do sistema QS, denominado sistema *agr* ⁶⁸. Este sistema controla a secreção de modulinas solúveis em fenol (PSMs do inglês phenol-soluble modulins) ⁶⁹, que constituem péptidos α -helicoidais anfipáticos com propriedades surfactantes ^{70,71}, que medeiam as etapas de maturação e destacamento dos biofilmes de *S. epidermidis* ⁷². A maturação do biofilme depende da expressão de moléculas com propriedades adesivas, as quais se pensa serem responsáveis pela integração de células de *S. epidermidis* na estrutura complexa de biofilme ⁷³. Em *S. epidermidis*, a formação de biofilme (figura 1.2) encontra-se, maioritariamente, associada com a produção de poli-N-acetilglucosamina (PNAG), cuja biossíntese é realizada pelos genes codificados no locus *icaADBC* ⁷⁴. Este exopolímero permite a conexão entre as células, funcionando como uma adesina intercelular polissacarídica ⁷⁵.

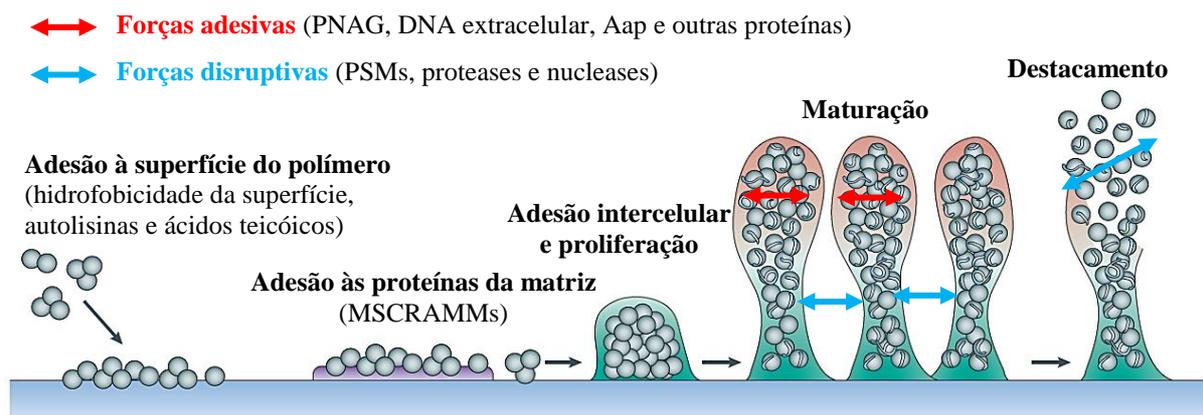


Figura 1.2. Formação de biofilme em *S. epidermidis*: as células planctónicas aderem a uma superfície sólida ou às proteínas da matriz do hospedeiro e, aderidas entre si, crescem formando agregados. Este fenómeno de agregação é auxiliado pela produção de PNAG, ácidos teicóicos e algumas proteínas como a proteína associada à acumulação (Aap). Um biofilme maduro é constituído por uma mistura de bactérias impregnadas numa matriz extracelular composta por proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos. Após a maturação do biofilme ocorre o destacamento das células, cujo processo depende da expressão de modulinas solúveis em fenol (PSMs), possibilitando a colonização de novas superfícies. Adaptado de ⁴³.

Contudo, estudos demonstraram que a produção da PNAG não é essencial para a formação de biofilme em todas as estirpes de *S. epidermidis* ⁷⁶. Efetivamente, além da PNAG, duas proteínas parecem estar envolvidas na formação de biofilme, nomeadamente a proteína associada à acumulação (Aap do inglês accumulation-associated protein) ⁷⁷ e a proteína homóloga à proteína associada ao biofilme em *S. aureus* (Bhp do inglês biofilm-homologue protein) ^{78,79}. No caso da formação de biofilme em estirpes não produtoras de PNAG, onde

estas proteínas adesivas, muito provavelmente, substituem o polissacarídeo, a proteína mais importante envolvida nesta formação parece ser a Aap^{77,80}. Estudos revelaram que 27% das estirpes de *S. epidermidis* isoladas de infecções associadas à colonização de próteses ortopédicas formavam biofilme independentemente da PNAG, sendo que na maioria dos casos a formação de biofilme parecia ser mediada por Aap⁸¹. A Aap é uma proteína de 220 kD que necessita ser proteoliticamente clivada numa proteína menor de 140 kD para poder induzir a formação de biofilme⁸⁰. Dado ao facto da Aap ser amplamente difundida entre isolados clínicos e a formação de biofilme dependente da Aap ter sido demonstrada em amostras clínicas, é possível destacar a grande relevância que a adesão intercelular mediada por Aap apresenta na patogénese de infecções causadas por biofilmes de *S. epidermidis*^{80,82}.

Como referido anteriormente, após a inserção de dispositivos médicos no organismo, as proteínas extracelulares da matriz ou do plasma humano rapidamente revestem as suas superfícies²⁸. *S. epidermidis* tem uma vasta gama de proteínas de superfície chamadas de componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas da matriz adesiva (MSCRAMMs do inglês microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) que têm a capacidade para se ligarem a proteínas do plasma humano, tais como o fibrinogénio, fibronectina ou vitronectina, e muitas vezes combinam a capacidade de ligação para várias proteínas da matriz²⁷. Os MSCRAMMs são covalentemente ligados à superfície da bactéria pela sortase A⁸³ ou através de interações não-covalentes com polímeros de superfície, tais como ácidos teicóicos⁸⁴. Os ácidos teicóicos ocorrem em duas formas principais, os ácidos lipoteicóicos, ligados à membrana celular e os ácidos teicóicos de parede, covalentemente ligados ao peptidoglicano⁸⁵. Em estafilococos, os ácidos teicóicos apresentam múltiplos papéis na fisiologia e patogénese, contribuindo para a adesão, colonização e inflamação⁸⁶⁻⁸⁸. Em *S. epidermidis*, estes polímeros mostraram aumentar a adesão à fibronectina⁸⁹.

Finalmente, no que concerne à última etapa do desenvolvimento do biofilme, sabe-se que *S. epidermidis* produz algumas exoproteases, com baixa especificidade de substrato, responsáveis pela degradação das proteínas de superfície, causando o destacamento do biofilme⁹⁰⁻⁹². Em particular, as PSMs têm um papel chave no destacamento do biofilme levando à formação de canais na sua estrutura através da interrupção de interações moleculares não-covalentes⁴³.

1.5 Tolerância e resistência das células dos biofilmes a antibióticos

Um dos problemas mais graves associados à formação de biofilmes em dispositivos médicos é a elevada tolerância que as células dos biofilmes apresentam aos antibióticos. Os mecanismos de tolerância subjacentes ao crescimento em biofilme são numerosos e diversos (figura 1.3). Vários estudos indicam que, em comparação com as respectivas populações planctônicas, é necessária uma concentração de agentes antimicrobianos bastante superior para eliminar bactérias pertencentes a um biofilme ^{65,93-95}. Um dos elementos chave na persistência das infecções causadas por biofilmes é a matriz extracelular, que se sabe que protege as bactérias do biofilme de antibióticos, biocidas e outros químicos ou stresses físicos ^{96,97}. A secreção da matriz proporciona um nicho ecológico protegido para a proliferação e propagação da resistência aos antibióticos através da troca de material genético ^{98,99}, permitindo a acumulação de mutações e elementos genéticos que conferem resistência ao longo do tempo ¹⁰⁰⁻¹⁰².

Não obstante, a tolerância conferida por um biofilme não é apenas a consequência de uma matriz abrangente, mas também pode resultar da heterogeneidade das subpopulações bacterianas subjacentes. Estas subpopulações variam não apenas no grau de suscetibilidade aos antibióticos, mas também no mecanismo pelo qual apresentam tolerância aos antibióticos ^{97,103}. Certas subpopulações de bactérias podem produzir enzimas que degradam antibióticos, enquanto outras subpopulações apresentam uma regulação positiva de bombas de efluxo ¹⁰⁴. A ecologia global da comunidade de biofilme também impõe um stresse oxidativo endógeno aos seus membros ¹⁰⁵, induzindo um estado de hipermutabilidade às bactérias do biofilme ^{106,107}. Para além disso, os biofilmes maduros contêm células com atividades metabólicas diferentes ¹⁰⁸, incluindo células dormentes ¹⁰⁹. A dormência é definida como um estado fisiológico onde a atividade de muitos processos celulares, tais como a síntese de proteínas e a replicação de DNA está reduzida e onde as bactérias persistem sem divisão por períodos prolongados ^{110,111}. Assim, as bactérias dormentes estão associadas a uma maior tolerância a antibióticos ¹¹²⁻¹¹⁵, podendo determinar o perfil inflamatório de um biofilme ^{109,115} e, conseqüentemente, ter implicações críticas para o tratamento clínico. Apesar da antibioterapia prolongada, as células permanecem dentro dos biofilmes durante longos períodos de tempo. A sobrevivência a longo prazo parece ser devida, em parte, à presença de células persistentes ^{111,116}.

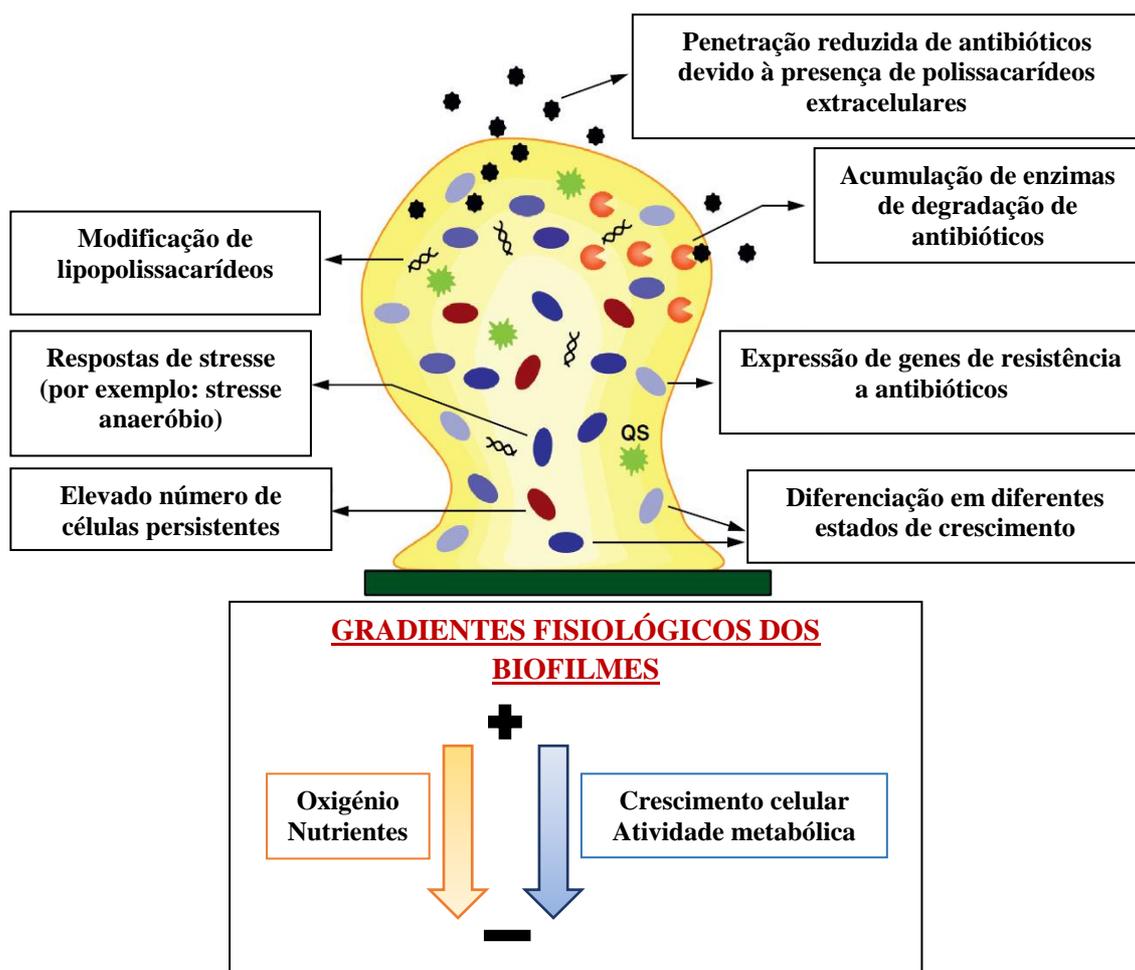


Figura 1.3. Representação esquemática de exemplos de mecanismos de resistência e tolerância a antibióticos subjacentes ao estado de biofilme, respetivos gradientes fisiológicos de oxigênio e nutrientes, formados no interior da sua estrutura, e a sua relação com a diferenciação celular em diferentes estados de crescimento. Abreviatura: QS - *quorum sensing*. Adaptado de ¹¹⁷.

Ao contrário das bactérias resistentes aos antibióticos, que crescem na presença de um antibiótico, as bactérias persistentes constituem uma pequena subpopulação de bactérias que sobrevivem à exposição a concentrações letais de antibióticos ^{111,116}. Estas células não representam mutantes resistentes a fármacos, a sua elevada tolerância constitui uma mudança fenotípica transitória ^{118,119}. As células persistentes sobrevivem a altas concentrações de antibióticos por sobreexpressão de genes específicos, tais como os genes que codificam os módulos toxina-antitoxina, os quais minimizam vários dos processos celulares ativos e, por conseguinte, os alvos dos antibióticos, resultando numa célula dormente que é tolerante à ação letal de antibióticos ¹²⁰. Recentemente, foi demonstrado que os biofilmes de *S. epidermidis* contêm um elevado número de células persistentes após exposição aos antibióticos ¹¹⁴. Finalmente, os biofilmes podem produzir em excesso proteínas ou outros biopolímeros que contribuem para a sua tolerância a antibióticos ¹²¹.

A presença de genes de resistência a antibióticos é comum em *S. epidermidis*. Em muitos países, incluindo nos Estados Unidos, 75-90% de todos os isolados de *S. epidermidis* recolhidos em hospitais são resistentes à meticilina, que constitui um antibiótico de primeira escolha para o tratamento de infecções causadas por bactérias pertencentes ao grupo dos estafilococos ¹²². A resistência à meticilina é codificada pela cassete cromossômica *mec*, um elemento genético móvel. Esta cassete cromossômica contém o gene *mecA* que codifica uma proteína de ligação à penicilina, a qual diminui a afinidade para a meticilina ¹²³. A presença de plasmídeos com genes de resistência a outros antibióticos são mais frequentemente encontrados em estirpes resistentes à meticilina do que sensíveis à meticilina, provavelmente devido ao facto de a resistência à meticilina e a outros antibióticos ser frequente em estirpes nosocomiais endémicas ¹²⁴.

Para além da resistência à meticilina, várias estirpes de *S. epidermidis* adquiriram resistência a outros antibióticos importantes, incluindo a vancomicina, rifamicina, fluoroquinolonas, gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, clindamicina e sulfonamidas ⁶². Apesar da resistência generalizada à meticilina e a outros antibióticos, 80% dos cateteres infetados com *S. epidermidis* podem ser tratados, sem remoção do cateter, com antibióticos como a vancomicina ¹²⁵. Não obstante, como referido anteriormente, também foi descrita resistência intermédia à vancomicina ¹²⁶, encontrando-se associada com o aumento da expressão do gene *atIE* ^{127,128}. Alguns estudos propõem que o surgimento de resistência à rifamicina se deve a uma mutação no gene que codifica a subunidade β da RNA polimerase ¹²⁹. No caso das fluoroquinolonas, sabe-se que a resistência a este antibiótico ocorre devido a mudanças nos aminoácidos, particularmente naqueles que se encontram na região denominada de região determinante de resistência às quinolonas (QRDR) ¹³⁰. Em estafilococos, as mutações na subunidade ParC são comumente observadas em isolados resistentes ¹³¹. Relativamente à gentamicina, o gene de resistência mais frequentemente encontrado em estafilococos é o *aac (6') - aph (2'')* ¹³². A resistência à tetraciclina é baseada na expressão do gene *tetM*, amplamente disseminado, ou pelo gene *tetK* ¹³³. No que diz respeito ao cloranfenicol, sabe-se que a resistência é principalmente mediada pelo gene *catA* ¹³⁴. Estudos realizados em vários países indicam que o gene *ermC* é o gene mais prevalente em isolados clínicos de *S. epidermidis* resistentes à eritromicina ^{133,135,136}. No caso da clindamicina, a resistência é codificada pelos genes *erm*, tal como acontece na resistência à eritromicina. Além disso, o gene *msrA* estafilocócico protege as bactérias hospedeiras tanto de antibióticos da classe dos macrólidos como de os da classe das lincosamidas ^{137,138}. Por último, a resistência à sulfonamida é principalmente mediada pelos genes *sul1*, *sul2* e *sul3* ¹³⁹.

1.6 Evasão dos biofilmes à resposta imunitária do hospedeiro

A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra organismos invasores, permitindo o reconhecimento e fornecimento de uma defesa rápida contra os mesmos ¹⁴⁰. Os mecanismos de defesa inata do hospedeiro são desencadeados pelo reconhecimento de estruturas invariantes na superfície bacteriana - tais como peptidoglicano, lipopéptidos, ácidos lipoteicóicos, ou mesmo por moléculas específicas, como as PSMs ⁴³ - constituindo estas Padrões Moleculares Associados a agentes Patogénicos (PAMPs do inglês Pathogen-Associated Molecular Pattern) - que ativam a resposta imunitária inata por interação com diferentes recetores de reconhecimento de Padrões (PRR do inglês Pattern recognition receptors) ^{141,142}. A defesa inata do hospedeiro compreende principalmente a atividade de fagócitos, AMPs e o sistema do complemento ⁴³.

Os biofilmes de *S. epidermidis* são revestidos por uma matriz extracelular ¹⁴³ que os protege da fagocitose de células com capacidade fagocítica, como os neutrófilos ¹⁴⁴. Além disso, a matriz extracelular diminui a disponibilidade de AMPs, pela ligação entre ambos, impedindo-os de atingir o seu alvo predominante: a membrana citoplasmática ¹⁴⁵. Apesar da associação observada entre a produção da PNAG e a virulência de *S. epidermidis*, não é inteiramente clara a forma como este polissacarídeo afeta a resposta imunitária do hospedeiro. Se por um lado foi demonstrado que a PNAG estimula a produção de mediadores pró-inflamatórios ^{146,147}, por outro também é sabido que prejudica a fagocitose ¹⁴⁸. De facto, diferentes estudos revelaram que a PNAG contribui para a propriedade antifagocítica da matriz extracelular de *S. epidermidis* ⁶⁶ através da inibição da fagocitose por neutrófilos, redução da acessibilidade de AMPs, bem como através da inibição da deposição de imunoglobulinas e de proteínas do sistema complemento ¹⁴⁹. A grande quantidade de PNAG nos biofilmes de *S. epidermidis* atua como um recetor para anticorpos anti-PNAG e imunoglobulinas G (IgG) e inibe a deposição de uma das opsoninas mais importantes do sistema complemento, a C3b ¹⁴⁹. Consequentemente, diminui a opsonização da superfície bacteriana, levando a um aumento da resistência à fagocitose por neutrófilos ¹⁴⁸, uma vez que este processo é dependente da opsonização da superfície da bactéria ¹⁵⁰. É de salientar, ainda, o papel do ácido poli- γ -glutâmico (PGA) que constitui uma molécula extracelular aniónica que também medeia a resistência à fagocitose, à ação de AMPs e possui função osmoprotetora, promovendo o crescimento de *S. epidermidis* em concentrações salinas elevadas, como é o caso da pele humana ^{151,152}. Para além disso, é importante referir que a produção de toxinas por *S. epidermidis* é limitada à produção de PSMs, as quais têm a

capacidade para atrair e estimular neutrófilos ⁷¹. É de referir, também, que esta espécie produz uma série de proteases que destroem o tecido e as proteínas do hospedeiro, como por exemplo a protease SepA que degrada AMPs humanos ¹⁵³.

1.7 Modelos *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*

A formação de biofilmes tem um preocupante impacto na saúde pública, como já referido anteriormente, sendo muitas vezes considerado o motivo subjacente ao insucesso do tratamento com agentes antimicrobianos ¹⁰⁴. Por este motivo torna-se crucial a escolha do modelo mais adequado para o estudo dos biofilmes sob condições controladas, para obter uma melhor compreensão sobre os mecanismos envolvidos na formação de biofilme de *S. epidermidis* e na sua virulência. O modelo a utilizar deve mimetizar a situação real com a maior aproximação possível, de forma a obter resultados fidedignos que permitam o avanço para estudos *in vivo* e, posteriormente, o delineamento de estratégias de prevenção e combate de infeções. Os modelos mais comuns e acessíveis são os modelos *in vitro*; os modelos *in vivo*, mais caros e complexos, conseguem aproximar-se mais dos fenómenos que acontecem durante a infeção em humanos e, por último, os modelos *ex-vivo* apresentam um misto de características das duas classes de modelos anteriores.

Nas últimas três décadas, os investigadores desenvolveram várias maneiras de estudar biofilmes utilizando modelos *in vitro* ¹⁵⁴. Os modelos *in vitro* apresentam-se adequados para fins de rastreio, uma vez que permitem incluir num único ensaio múltiplas condições. Para além disso, são mais rápidos e mais baratos ¹⁵⁵. Os modelos *in vitro* têm fornecido uma compreensão detalhada sobre os processos que levam à formação de biofilme. Em particular, a sua combinação com técnicas de biologia molecular revelou importantes informações relacionadas com os requisitos genéticos necessários para o desenvolvimento do biofilme ¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. No entanto, os biofilmes formados *in vitro* desenvolvem-se em condições muito diferentes das que se verificam *in vivo*, não estando presentes, por exemplo, os fatores do hospedeiro ¹⁵⁵. Várias evidências já foram encontradas que demonstram que a produção de certas proteínas da bactéria, *in vivo*, não se verifica *in vitro* ^{159,160}.

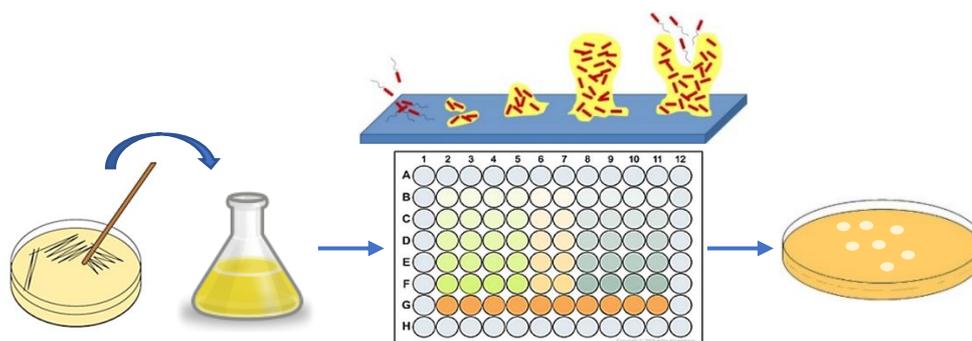


Figura 1.4. Representação esquemática de formação de biofilme em modelos *in vitro*.

Os fatores do sistema imunitário do hospedeiro desempenham um papel importante no combate a infecções, sendo este o motivo pelo qual se destacam os modelos *in vivo*, pois mimetizam com maior proximidade as condições naturais nas quais os biofilmes se desenvolvem ¹⁶¹. Por esta razão, são usados os modelos *in vivo* com animais vertebrados que, por considerarem o sistema imunitário do hospedeiro são indispensáveis para uma melhor compreensão das infecções relacionadas com dispositivos médicos. No entanto, o avanço para estudos *in vivo* com animais vertebrados, normalmente só ocorre após a recolha de evidências em estudos *in vitro*, ou quando modelos *in vitro* ou *in vivo* com animais inferiores não são adequados para resolver a questão de pesquisa específica. Além disso, nestes modelos deve-se usar o menor número possível de animais, alternativas aos procedimentos dolorosos e anestesia adequada ¹⁶². Embora a melhor forma de mimetizar o hospedeiro humano seja a utilização de animais maiores, tais como porcos, ovelhas, cabras e cães, os custos associados são elevados, especialmente quando é necessário um número relativamente elevado de animais ¹⁶³. Por essa razão, são preferidos na maioria dos estudos os animais pequenos, que são fáceis de infectar e relativamente económicos, incluindo ratinhos, ratos, coelhos e hamsters.

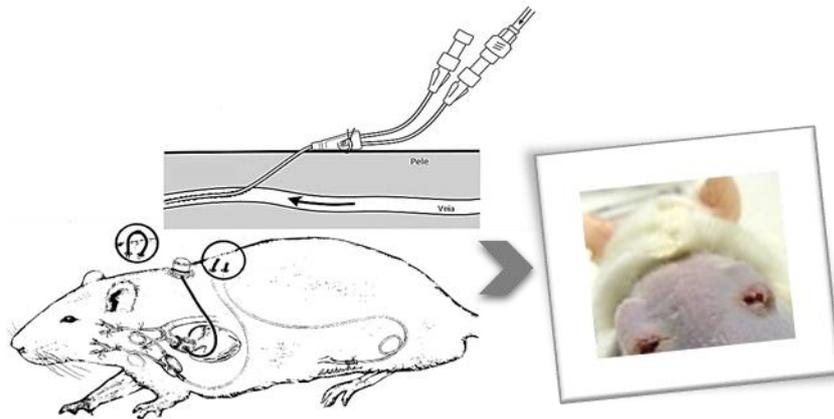


Figura 1.5. Representação esquemática de infecção associada a cateteres em modelo de ratinho, em estudos *in vivo*.

Em suma, estas experiências são demoradas, caras e requerem uma consideração ética total. Assim, existe a necessidade de utilizar modelos de infecção preliminares e alternativos que gerem dados *in vivo* de forma rápida, barata e que não exijam as mesmas considerações éticas. Por esse motivo, os modelos animais não mamíferos são cada vez mais utilizados para o estudo de vários aspectos de doenças infecciosas, sendo frequentemente utilizado para este fim o nemátodo *Caenorhabditis elegans* ¹⁶⁴.

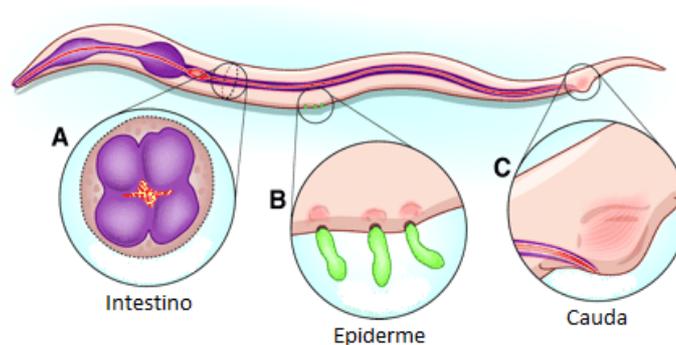


Figura 1.6. Representação de três vias de infecção em *C. elegans*. (A) Infecção intestinal a qual permite a proliferação bacteriana no lúmen intestinal. (B) Infecção por adesão à cutícula com subsequente penetração da epiderme. (C) Adesão à região da cauda e subsequente invasão retal. Adaptado de ¹⁶⁵.

Tal como outros modelos de infecção não mamíferos, a virulência microbiana na larva da traça da cera, *Galleria mellonella*, é semelhante à verificada em mamíferos, sendo, por isso, muitas vezes utilizada como modelo de infecção para o estudo de vários agentes patogênicos humanos, incluindo espécies estafilocócicas ^{166,167}. Comparativamente com outros modelos de infecção não mamíferos, as experiências com este modelo podem ser

executadas à temperatura corporal do ser humano (37 °C), o que pode ser importante para a expressão de certos fatores de virulência microbiana ¹⁶⁸. Além disso, é importante referir que a resposta imunitária do inseto é semelhante à resposta imunitária inata de mamíferos, sendo utilizados mecanismos semelhantes para causar a morte dos agentes patogênicos invasores ^{169,170}. Finalmente, o modelo de larva da traça da cera tem sido bastante utilizado no estudo terapêutico de infecções ¹⁷¹⁻¹⁷⁴.



Figura 1.7. Representação esquemática da utilização do modelo de infecção de larva da traça da cera em estudos *in vivo*.

Contudo, apesar de representarem uma aproximação às condições reais, os modelos *in vivo* apresentam uma capacidade limitada para reproduzir os processos extremamente complexos que ocorrem no organismo humano ¹⁷⁵. De facto, estudos com modelos animais parecem sobrestimar cerca de 30% a probabilidade de eficácia de um tratamento ¹⁷⁶. Por essa razão, as últimas etapas de investigação biomédica são constituídas por ensaios clínicos em seres humanos ^{177,178}.

Vários investigadores têm utilizado métodos inovadores para reproduzir parcialmente determinadas condições reais através de modelos que, envolvendo uma componente *in vivo*, são considerados modelos híbridos, sendo conhecidos como modelos *ex vivo* ¹⁷⁹. Os dispositivos médicos explantados constituem um dos modelos *ex vivo* mais usados, onde são estudadas a adesão e a formação de biofilmes de estafilococos, através do revestimento de dispositivos com uma película condicionante derivada do hospedeiro. Esses estudos são normalmente efetuados para compreender o papel das proteínas do sangue na adesão dos estafilococos, utilizando cateteres vasculares explantados de pacientes ou voluntários ^{180,181}.

As infecções da corrente sanguínea causadas por *S. epidermidis* são tipicamente indolentes e difíceis de erradicar, aumentando significativamente a morbidade ¹⁸² e a mortalidade entre os pacientes imunocomprometidos ¹⁸³ e imunossuprimidos ¹⁸⁴, constituindo, ainda, uma enorme carga financeira ¹⁸⁵. É sabido que 22% das infecções da corrente sanguínea diagnosticadas em pacientes das unidades de cuidados intensivos nos EUA são devido à

formação de biofilme de *S. epidermidis* sobre os cateteres ¹⁹. Pela sua importância na saúde humana, estudos *ex vivo* com sangue humano foram desenvolvidos, tendo-se verificado uma extensa reprogramação do transcriptoma das células do biofilme de *S. epidermidis* na presença de sangue humano ¹⁸⁶. Pelo facto de o sangue constituir uma mistura complexa de células e moléculas solúveis, têm sido realizados estudos *ex vivo* também com plasma humano.

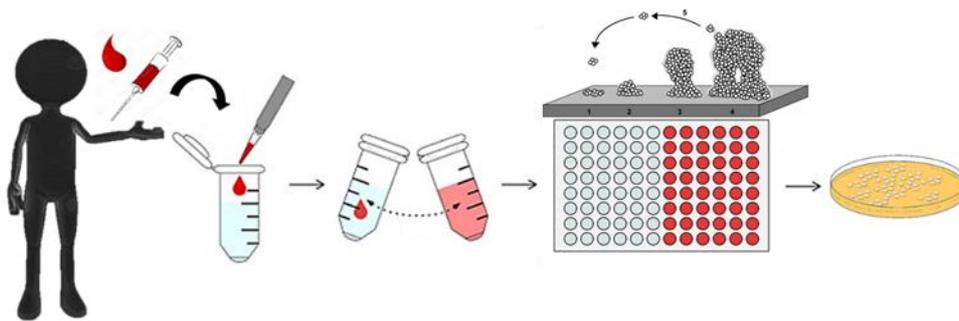


Figura 1.8. Representação esquemática da utilização de sangue de voluntários em modelos *ex vivo*.

1.7.1 Plasma humano

Uma das diferenças entre as condições *in vitro* e *in vivo* é a ausência de proteínas do hospedeiro, as quais são abundantemente encontradas no plasma humano ^{180,187-189}. O plasma é um líquido que constitui aproximadamente 55% (volume/volume) do sangue humano, e no qual estão presentes proteínas como a albumina, fatores de coagulação, globulinas, entre outros fatores ^{190,191}. A maior parte dos fluidos corporais consiste em filtrados de plasma, sendo possível encontrar as proteínas presentes no plasma, em concentrações variáveis, em vários fluidos corporais humanos, incluindo (por cento, v/v) exsudados de feridas de queimadura (10-44%) ¹⁹², secreções nasais (15-45%) ¹⁹³, fluido ascítico (4-26%) ¹⁹⁴, líquido linfático (10-50%) ¹⁹⁵ e líquido sinovial (1-73%) ¹⁹⁶. Vários estudos têm realçado a importância das proteínas do hospedeiro na facilitação da formação de biofilmes, tendo sido demonstrado que os implantes médicos são muitas vezes revestidos por proteínas da matriz do hospedeiro, as quais aumentam a ligação bacteriana e a formação de biofilmes *in vivo* ^{187,188} assim como *in vitro*, onde a suplementação do meio com plasma ou o revestimento da superfície, aumentam significativamente a capacidade de formação de biofilme ^{197,198}.

Foi demonstrado num estudo comparativo que, embora o sangue humano tenha provocado alterações significativas na estrutura do biofilme e no número de células viáveis e

cultiváveis de *S. epidermidis*, o plasma foi o principal regulador da transcrição de genes com papel central na formação de biofilme, maturação e evasão imunitária ¹⁹⁹. Assim, é necessário intensificar estudos que visem a avaliação do impacto dos fatores solúveis do hospedeiro na formação e persistência dos biofilmes de *S. epidermidis*.

1.8 Objetivos

A presente tese visa o estudo da influência do plasma humano na formação de biofilme e virulência de *S. epidermidis*, introduzindo a importante interação com os fatores do hospedeiro, presentes no plasma humano, no modelo *in vitro*, de forma a otimizar a mimetização das condições *in vivo* e, conseqüentemente aumentar a relevância clínica dos resultados obtidos. Para isso, inicialmente foi avaliado o crescimento planctônico de *S. epidermidis* em diferentes concentrações de plasma e testada a suscetibilidade a antibióticos neste modo de crescimento, usando a técnica de contagem de unidades formadoras de colônias (CFU). Posteriormente, procedeu-se à verificação da capacidade de formação de biofilme em diferentes concentrações de plasma através da determinação da biomassa, viabilidade por citometria de fluxo, cultivabilidade por CFU e avaliação da sua estrutura por microscopia confocal de varrimento laser (CLSM). Por último, foi avaliada a alteração da expressão de genes associados classicamente à virulência desta espécie usando PCR quantitativo (qPCR).

2. MEIOS QUIMICAMENTE DEFINIDOS PARA O ESTUDO DE *STAPHYLOCOCCUS SPP.*

2.1 Meios de cultura complexos e meios quimicamente definidos

A cultura celular constitui uma das principais técnicas nas ciências da vida, sendo de crucial importância a escolha do meio de crescimento mais adequado para a cultura *in vitro*²⁰⁰. Atualmente, a comunidade científica utiliza diferentes meios de cultura para o estudo de biofilmes do género estafilococos: os meios complexos são os mais amplamente utilizados²⁰¹⁻²⁰⁵, enquanto que os meios quimicamente definidos (CDM do inglês *chemically defined media*) são utilizados para estudos mais específicos²⁰⁶⁻²¹⁰.

Os meios dizem-se complexos quando incluem componentes quimicamente indefinidos, de origem natural. Isto implica que, entre diferentes produções do mesmo meio, da mesma marca, a composição química exata é variável. Os componentes mais comuns destes meios incluem extrato de levedura, extrato de carne, peptona, hidrolisado de caseína, farinha de esqueleto ou farinha de semente de planta. Entre esses componentes, o extrato de levedura é um dos suplementos de meio mais utilizado, sendo constituído por uma mistura de carboidratos, aminoácidos, péptidos, vitaminas e micronutrientes²¹¹. A composição de extratos de levedura pode apresentar variações dramáticas de lote para lote devido às diferenças entre as estirpes de levedura, processos de produção de levedura, métodos para autólise ou purificação a jusante²¹¹. Assim, uma alteração do lote de extrato de levedura utilizado para a preparação de um meio de crescimento pode provocar elevadas alterações na taxa de crescimento e na produção do produto, tal como já foi descrito em vários estudos realizados em diferentes organismos²¹¹⁻²¹³. Consequentemente, a principal desvantagem destes meios é a sua menor reprodutibilidade devido à variação inerente da composição química. Não obstante, estes meios apresentam-se vantajosos pelo baixo custo associado, pela rápida preparação laboratorial, por permitirem a manutenção de uma grande variedade de microrganismos, devido à presença de uma vasta gama de nutrientes, promovendo o crescimento de organismos mais exigentes, e sendo usados quando as necessidades nutricionais dos microrganismos são desconhecidas.

Contrariamente aos meios complexos, os CDM requerem a identificação das composições químicas exatas dos componentes. Estes meios contêm ingredientes orgânicos e

inorgânicos ultrapuros sem contaminação, podendo também conter aditivos proteicos puros, como fatores de crescimento ²¹⁴. Os seus constituintes são produzidos em bactérias ou leveduras por engenharia genética com a adição de vitaminas, colesterol, aminoácidos específicos e ácidos gordos ²¹⁵. Este tipo de meio apresenta uma maior reprodutibilidade e simplicidade tanto do processamento a jusante como da análise do produto final. No entanto, caracterizam-se por apresentarem rendimentos mais baixos e custos mais elevados, especialmente se a lista de componentes do meio incluir fatores de crescimento e vitaminas ²¹⁶.

Para melhor cumprir o objetivo desta dissertação, torna-se relevante a utilização de um CDM para aumentar a reprodutibilidade dos resultados. Desta maneira, será possível ultrapassar a variabilidade causada pelos meios complexos e assegurar a consistência dos resultados experimentais, de forma a avaliar a verdadeira influência do plasma humano no crescimento e formação de biofilme de *S. epidermidis*. Para isso, é necessário pesquisar qual o CDM mais adequado ao tipo de testes que serão realizados: crescimento planctónico, capacidade de formação de biofilme e avaliação da sua estrutura, viabilidade e cultivabilidade das células dos biofilmes, suscetibilidade das células planctónicas a antibióticos e alteração da expressão de genes.

2.2 Pesquisa bibliográfica sobre utilização de meios quimicamente definidos

Como referido anteriormente, os CDM são utilizados em estudos mais específicos, tendo sido, por isso, direcionada a pesquisa bibliográfica para a espécie em estudo. Assim, após uma seleção primária de vários artigos relacionados com o uso de CDM em estafilococos, foi analisado o tipo de testes realizados em cada um dos estudos. Adicionalmente, foi verificado o número de citações de cada artigo científico no *ISI Web of Knowledge* (tabela 2.2), de forma a avaliar o impacto do CDM na bibliografia científica existente. Após reunir um conjunto considerável de artigos, foi realizada uma análise comparativa dos CDM utilizados em cada um dos estudos. A seleção do CDM mais adequado para a realização deste trabalho foi efetuada tendo em consideração três critérios: 1) custos, 2) aplicabilidade - referente ao tipo de testes efetuados e à espécie estudada e 3) facilidade - relativa ao número de compostos necessários e ao número de etapas para a preparação do meio (tabela 2.2).

2.3 Análise comparativa de meios quimicamente definidos relevantes para este estudo

Os CDM foram avaliados, inicialmente, de acordo com o critério aplicabilidade por ser considerado o mais relevante, uma vez que representa a especificidade dos testes realizados e a espécie estudada. Segundo uma escala qualitativa, definida neste trabalho, foi atribuída a pontuação 1 aos meios com baixa semelhança, 3 aos meios com uma semelhança intermédia e 5 aos meios com uma elevada semelhança em relação ao tipo de testes e espécie usados neste trabalho. De seguida, procedeu-se à avaliação dos CDM respeitando o critério facilidade de preparação, referente ao número de compostos e etapas necessárias, uma vez que estes meios requerem preparações em passos independentes. Devido à sua menor relevância em relação ao critério anterior, foi utilizada uma escala qualitativa mais reduzida, entre 1 e 3. No que diz respeito ao número de compostos, foram classificados com a pontuação 1 os meios com mais de 40 compostos, 2 a gama entre 30 a 40 compostos e 3 os meios com menos de 30 compostos. Finalmente, para o número de etapas, foi atribuída a classificação 1 aos meios que não especificavam o número de etapas, 2 aos meios com mais de 10 etapas e 3 aos meios com um número de etapas inferior a 10. A tabela 2.1 descreve as pontuações parciais para cada um destes critérios. Após o somatório dos pontos atribuídos a cada meio, foi realizado um orçamento para os dois CDM com maior pontuação final (tabela 2.3 e 2.4), de forma a verificar a diferença de preço entre ambos.

Tabela 2.1. Pontuações parciais atribuídas a cada critério de classificação dos CDM selecionados, segundo duas escalas qualitativas definidas de acordo com a relevância dos critérios.

Critérios Semelhança	APLICABILIDADE (Tipo de testes e Espécie)	FACILIDADE	
		Nº compostos	Nº etapas
Baixa	1	1 \geq 40	1 <input type="checkbox"/> Não consta
Intermédia	3	30 \geq 2 < 40	2 \geq 10
Elevada	5	3 < 30	3 < 10

Tabela 2.2. Avaliação qualitativa de CDM de acordo com os critérios aplicabilidade, relacionado com o tipo de testes e espécie, e facilidade, referente ao número de compostos e etapas.

Referência	Nº Citações ISI	APLICABILIDADE		FACILIDADE		Pontuação Total
		Tipo Testes	Espécie	Nº compostos	Nº Etapas	
217,218	77	Crescimento, biofilme, suscetibilidade antibióticos, qPCR, PFGE e hibridização (+5).	<i>S. epidermidis</i> (+5)	34 (+2)	7 (+3)	15
207	3	Cinética de crescimento, MIC, formação biofilme, análise de transcriptoma e proteoma (+3).	<i>S. aureus</i> (+3)	32 (+2)	7 (+3)	11
219	3	Crescimento, desenvolvimento de meio e estudo de crescimento, atividade hemolítica (+1).	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> (+5)	28 (+3)	Não consta (+1)	10
220	96	Mutagenese de transposões, formação biofilme, CLSM, detecção PNAG (+3).	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> (+3)	24 (+3)	Não consta (+1)	10
221	*	Crescimento em meio líquido/ sólido e resistência meticilina (+1).	<i>S. aureus</i> (+3)	39 (+2)	7 (+3)	9
222	*	Crescimento, detecção MRSA, Microscopia Eletrônica de Varrimento, determinação componentes biofilme, MIC, manipulação DNA e RNA, proteoma (+1).	<i>S. aureus</i> (+3)	32 (+2)	8 (+3)	9
208,223	10	Crescimento, mutagenese, construção plasmídeos, qRT-PCR, ensaios pigmento carotenoide, avaliação biossíntese fenilalanina, detecção fluorescência, ensaio sensibilidade peróxido de hidrogênio, sepsia e disseminação modelo murino (+1).	<i>S. aureus</i> (+3)	34 (+2)	7 (+3)	9
224,225	42	Análise Microarray, RT-PCR semi-quantitativo, modelo de infecção, análise histológica (+3).	<i>S. aureus</i> (+3)	68 (+1)	11 (+2)	9
209	5	Crescimento, mutagenese, transporte radioativo, qPCR, infecção sistêmica (+3).	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> (+3)	34 (+2)	Não consta (+1)	9
225,226	42	Manipulação DNA e plasmídeos, construção vetor, monocultura e co-cultura, isolamento RNA, biblioteca RNAseq, adesão celular, imunofluorescência, microscopia (+1).	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Corynebacterium spp.</i> , <i>E. coli</i> (+3)	68 (+1)	11 (+2)	7
206	5	Crescimento, MIC, MBC, biossíntese de macromoléculas, citometria de fluxo, microscopia eletrônica de transmissão, citotoxicidade (+1).	<i>Staphylococcus spp.</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>Candida spp.</i> (+3)	44 (+1)	Não consta (+1)	6
227-229	114	Crescimento, Northern Blot, ensaios infecção (+1).	<i>S. aureus</i> (+3)	40 (+1)	Não consta (+1)	6

* Estes artigos não estavam indexados

Tabela 2.3. Orçamento para os componentes do CDM com a maior classificação segundo os critérios aplicabilidade e facilidade. De forma a obter o orçamento mais económico, após uma comparação de preços entre diferentes empresas, foram selecionados os preços mais baixos, individualmente, para cada componente.

COMPOSTO	Concentração (mg/L)	Referência e Quantidade composto	Volume meio (L)	Empresa	Quantidades	Preço (€)
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	10000	124990010 (1 kg)	100	Enzymatic	1	28,5
KH_2PO_4	3000	BP363-1 (1 kg)	333,3	Enzymatic	1	25,17
Ácido L-Aspártico	150	105041000 (100 g)	666,7	Enzymatic	1	12,73
L- Alanina	100	BP369-100 (100 g)	1000	Enzymatic	1	31,54
L- Arginina	100	A15738-14 (25 g)	250	Enzymatic	1	13,78
L-Cisteína	50	BP377-100 (100 g)	2000	Enzymatic	1	32,06
Glicina	100	036435-30 (250 g)	2500	Enzymatic	1	22,99
Ácido L-Glutâmico	150	156212500 (250 g)	1666,7	Enzymatic	1	18,15
L-Histidina	100	BP382-100 (100 g)	1000	Enzymatic	1	44,11
L-Isoleucina	150	BP384-100 (100 g)	666,7	Enzymatic	1	38,72
L-Lisina	100	303341000 (100 g)	1000	Enzymatic	1	63,46
L-Leucina	150	BP385-100 (100 g)	666,7	Enzymatic	1	24,18
L-Metionina	100	J61904-22 (100 g)	1000	Enzymatic	1	12,35
L-Fenilalanina	100	130310250 (25 g)	250	Enzymatic	1	31,25
L-Prolina	150	P5607-25G (25 g)	166,7	Sigma	1	52,6
L-Serina	100	A11179-14 (25 g)	250	Enzymatic	1	27,55
L-Treonina	150	BP394-100 (100 g)	666,7	Enzymatic	1	29,18
L-Triptofano	100	T8941-25G (25 g)	250	Sigma	1	86,6
L-Tirosina	100	T8566-25G (25 g)	250	Sigma	1	47,3
L-Valina	150	BP397-100 (100 g)	666,7	Enzymatic	1	28,57
Glucose	10000	A0883,1000 (1 kg)	100	Enzymatic	1	26,04
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	500	BP213-1 (1 kg)	2000	Enzymatic	1	18,65
Biotina	0,1	BP232-1 (1 g)	10000	Enzymatic	1	35,69
Ácido Nicotínico	2	128291000 (100 g)	50000	Enzymatic	1	17,29
D-Pantotenato de cálcio	2	A16609-22 (100 g)	50000	Enzymatic	1	35,91
Piridoxal	4	352710010 (1 g)	250	Enzymatic	1	29,45
Dicloridrato de piridoxamina	4	436250010 (1 g)	250	Enzymatic	1	39,9
Riboflavina	2	132350250 (25 g)	12500	Enzymatic	1	23,18
Cloridrato de tiamina	2	BP892-100 (100 g)	50000	Enzymatic	1	32,72
Sulfato de adenina	20	201596,0025 (25 g)	1250	Frilabo	1	70,67
Cloridrato de guanina	20	A11532-18 (50g)	25000	Enzymatic	1	95,95
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	10	389262500 (250 g)	25000	Enzymatic	1	10,55
$MnSO_4$	5	A17615-22 (100 g)	20000	Enzymatic	1	15,87
$(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$	6	423721000 (100 g)	16666,7	Enzymatic	1	19,47
					TOTAL (sem iva)	1142,1
					TOTAL (com iva)	1404,8

Tabela 2.4. Orçamento para os componentes do CDM com a segunda maior classificação de acordo com os critérios aplicabilidade e facilidade. De forma a obter o orçamento mais económico, após uma comparação de preços entre diferentes empresas, foram selecionados os preços mais baixos, individualmente, para cada componente.

COMPOSTO	Concentração (mg/L)	Referência e Quantidade composto	Volume meio (L)	Empresa	Quantidades	Preço (€)
Ácido L-Aspártico	150	105041000 (100 g)	666,7	Enzymatic	1	12,73
L- Alanina	100	BP369-100 (100 g)	10000	Enzymatic	1	31,54
L- Arginina	100	A15738-14 (25 g)	250	Enzymatic	1	13,78
L-Cisteína	50	BP377-100 (100 g)	2000	Enzymatic	1	32,06
Glicina	100	036435-30 (250 g)	2500	Enzymatic	1	22,99
Ácido L-Glutâmico	150	156212500 (250 g)	1666,7	Enzymatic	1	18,15
L-Histidina	100	BP382-100 (100 g)	1000	Enzymatic	1	44,11
L-Isoleucina	150	BP384-100 (100 g)	666,7	Enzymatic	1	38,72
L-Lisina	100	303341000 (100 g)	1000	Enzymatic	1	63,46
L-Leucina	150	BP385-100 (100 g)	666,7	Enzymatic	1	24,18
L-Metionina	100	J61904-22 (100 g)	1000	Enzymatic	1	12,35
L-Fenilalanina	100	130310250 (25 g)	250	Enzymatic	1	31,25
L-Prolina	150	P5607-25G (25 g)	166,7	Sigma	1	52,6
L-Serina	100	A11179-14 (25 g)	250	Enzymatic	1	27,55
L-Treonina	150	BP394-100 (100 g)	666,7	Enzymatic	1	29,18
L-Triptofano	100	T8941-25G (25 g)	250	Sigma	1	86,6
L-Tirosina	100	T8566-25G (25 g)	250	Sigma	1	47,3
L-Valina	150	BP397-100 (100 g)	666,7	Enzymatic	1	28,57
Glucose	10000	A0883,1000 (1 kg)	100	Enzymatic	1	26,04
<i>MgSO₄ · 7H₂O</i>	500	BP213-1 (1 kg)	2000	Enzymatic	1	18,65
Biotina	0,1	BP232-1 (1 g)	10000	Enzymatic	1	35,69
Ácido Nicotínico	2	128291000 (100 g)	50000	Enzymatic	1	17,29
D-Pantotenato de cálcio	2	A16609-22 (100 g)	50000	Enzymatic	1	35,91
Piridoxal	4	352710010 (1 g)	250	Enzymatic	1	29,45
Dicloridrato de piridoxamina	4	436250010 (1 g)	250	Enzymatic	1	39,9
Riboflavina	2	132350250 (25 g)	12500	Enzymatic	1	23,18
Cloridrato de tiamina	2	BP892-100 (100 g)	50000	Enzymatic	1	32,72
Sulfato de adenina	20	201596,0025 (25 g)	1250	Frilabo	1	70,67
Cloridrato de guanina	20	A11532-18 (50g)	25000	Enzymatic	1	95,95
<i>CaCl₂ · 6H₂O</i>	10	389262500 (250 g)	25000	Enzymatic	1	10,55
<i>MnSO₄</i>	5	A17615-22 (100 g)	20000	Enzymatic	1	15,87
<i>(NH₄)₂Fe(SO₄)₂ · 6H₂O</i>	6	423721000 (100 g)	16666,7	Enzymatic	1	19,47
					TOTAL (sem iva)	1088,5
					TOTAL (com iva)	1338,8

A obtenção do orçamento para cada CDM foi baseada numa comparação de preços de cada um dos compostos entre diferentes empresas, onde foram selecionadas, de forma individual, as empresas com o preço mais baixo. Relativamente ao investimento inicial, tendo sido constatada uma diferença de preço de apenas 66 € para os 100 L estimados, entre os orçamentos dos dois CDM analisados, foi escolhido o CDM com a pontuação mais alta, prevalecendo o critério aplicabilidade devido à sua maior importância em relação aos custos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Plasma humano

O plasma humano utilizado (Tebu-bio, Lisboa, Portugal) foi obtido através da centrifugação de sangue colhido na presença de um anticoagulante composto por ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e potássio (K₂EDTA) e pertencente apenas a um dador saudável. O processamento do sangue em plasma, através da centrifugação e congelamento imediato, seguiu procedimentos aprovados pela agência federal de administração de alimentos e medicamentos (FDA do inglês Food and Drug Administration; Marilândia, EUA) e pela Organização Internacional de Normalização (ISO do inglês International Organization for Standardization; Genebra, Suíça). Note-se também que foram aplicados testes para detetar o vírus hepatite B (HBsAg) e C (HCV), o vírus da imunodeficiência humana (HIV-1, HIV-2, HIV-1Ag ou HIV 1- NAT), hepatopatias (ALT) e sífilis, por métodos aprovados pela FDA.

3.2 Bactéria e condições de crescimento

Uma colónia de *Staphylococcus epidermidis* da estirpe RP62A (ATCC[®] 35984[™]), foi inoculada, a partir de uma placa de agar tríptico de soja (TSA do inglês Tryptic Soy Agar), em 2 mL de caldo tríptico de soja (TSB, VWR, Alfragide, Portugal) num matraz de 10 mL e este incubado durante a noite a 37 °C e com agitação a 120 rpm (ES-20 Shaker-Incubator, BioSan, Riga, Letónia). Todos os ensaios foram realizados a partir deste crescimento inicial.

3.3 Influência do plasma no crescimento planctónico de *S. epidermidis*

Os ensaios foram realizados em TSB de duas marcas distintas: VWR e Liofilchem (Téramo, Itália), e num meio quimicamente definido (CDM), na ausência e presença de diferentes concentrações de plasma humano (5%, 10%, 20% e 40%). Para avaliar a influência do plasma no crescimento planctónico de *S. epidermidis*, o pré-inóculo (crescido como descrito em 3.2), foi diluído de forma a obter uma suspensão com uma densidade ótica (DO) de $0,100 \pm 0,05$, a um comprimento de onda de 640 nm (DO_{640nm}), num volume final de 3 mL de cada meio. Após 0, 6, 12 e 24 horas, o crescimento da bactéria foi avaliado através da

medição da DO_{640nm} e por contagem de unidades formadoras de colónias (CFU do inglês Colony-Forming Unit), após a cultura em placas de TSA e incubação a 37 °C durante a noite.

3.4 Influência do plasma na formação de biofilme de *S. epidermidis*

3.4.1 Formação de biofilme

Para a quantificação da biomassa, os biofilmes foram formados em placas de 96 poços (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Bélgica). Resumidamente, a partir do pré-inóculo preparou-se uma suspensão em TSB (VWR) com $DO_{640nm} = 0,250 \pm 0,05$ correspondente a, aproximadamente, 2×10^8 CFU/mL²³⁰. Dois μ L desta suspensão foram inoculados em 200 μ L de TSB (Liofilchem) ou CDM sem plasma humano ou suplementados com diferentes concentrações do mesmo (5%, 10% e 20%). Incubaram-se as placas durante 24 horas a 37 °C com agitação a 120 rpm.

Para avaliar a influência do plasma na viabilidade, cultivabilidade e estrutura dos biofilmes usaram-se placas de 8 poços (Lab-Tek® Chamber Slides, Nunc, Sigma-Aldrich). Novamente, a partir do pré-inóculo preparou-se uma suspensão com uma DO_{595nm} de $0,120 \pm 0,02$ em TSB (VWR), correspondente a, aproximadamente, 2×10^8 CFU/mL. Quatro μ L desta suspensão foram inoculados em 400 μ L de CDM ou CDM suplementado com diferentes concentrações de plasma humano (5%, 10% e 20%). Incubaram-se as placas durante 24 horas a 37 °C com agitação a 120 rpm.

3.4.2 Quantificação da biomassa

A biomassa dos biofilmes foi quantificada pelo método de violeta de cristal²³¹. Após a formação dos biofilmes, retiraram-se os meios de cultura e lavaram-se os biofilmes, duas vezes, com 0,2 mL de cloreto de sódio (NaCl, VWR, Bélgica) a 0,9% (p/v) de forma a remover as células planctónicas. De seguida, procedeu-se à fixação com 0,2 mL de metanol a 99% (v/v) (Merck, Darmestádio, Alemanha) e, após 15 minutos, os poços foram esvaziados e secos ao ar. Em seguida, cada poço foi corado com 0,2 mL de violeta de cristal a 1% (v/v) (Merck, Darmestádio, Alemanha), durante 5 minutos. O excesso de corante foi removido com duas lavagens com água da torneira. Depois das placas terem sido secas ao ar, o corante ligado à biomassa foi solubilizado com 160 μ L de ácido acético glacial a 33% (v/v) (Fisher, Leicestershire, Reino Unido). A DO foi medida a 570 nm, tendo sido efetuadas diluições de forma a respeitar a linearidade do espectrofotómetro.

3.4.3 Quantificação do número de células viáveis e cultiváveis

De forma a determinar a viabilidade e a cultivabilidade das células dos biofilmes, na ausência e na presença de plasma, após a remoção do meio, procedeu-se a uma lavagem cuidadosa dos biofilmes com 0,4 mL de NaCl a 0,9%. Em seguida, os biofilmes foram suspensos em 0,2 mL de tampão fosfato salino (PBS do inglês Phosphate-Buffered Saline) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Porto, Portugal) e sonicados durante 3 segundos a 40% de amplitude (Cole-Parmer 750-Watt Ultrasonic Processor, Vernon Hills-Illinois, EUA), com o intuito de reduzir os agregados bacterianos ²³².

Para a quantificação do número de bactérias viáveis por citometria de fluxo, após agitação em vórtex, as células dos biofilmes formados em CDM na ausência e presença de 5% de plasma foram previamente diluídas 10 vezes em PBS, não tendo sido diluídas as que foram formadas em CDM com 10% e 20% de plasma. De seguida, 20 µL destas suspensões foram incubados, durante 2 minutos, com 180 µL de PBS, contendo 20 µg/mL de iodeto de propídio (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e 1:80000 do corante de DNA SYBR Green safe (Molecular Probes, Marilândia, EUA). A contagem das células foi efetuada utilizando um citómetro de fluxo EC800™ (Sony Biotech, Califórnia, EUA) ¹⁹⁹. Cem µL de suspensão ou 65.000 eventos foram analisados para cada uma das amostras a um fluxo de 10 µL/minuto. Os dados adquiridos foram analisados através do software EC800™ versão 1.3.6.

A fim de determinar o número de células cultiváveis dentro de cada biofilme, após agitação em vórtex, realizaram-se diluições em série das suspensões bacterianas em NaCl a 0,9% e procedeu-se à cultura em TSA. Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C durante a noite.

3.4.4 Análise da estrutura

Para a avaliação da arquitetura do biofilme foi utilizada a microscopia confocal de varrimento laser (CLSM) tal como descrito anteriormente ¹⁹⁹. De forma resumida, após a formação de biofilmes e remoção do meio, procedeu-se a uma lavagem da metade dos biofilmes formados com NaCl a 0,9%, não tendo sido lavada a outra metade dos biofilmes. De seguida, foram corados os polissacarídeos com 100 µL de lectina de gérmen de trigo (WGA do inglês Wheat Germ Agglutinin; Oregon Green 488, Life Technologies, Califórnia, EUA) a 10 µg/mL, durante 15 minutos, e os ácidos nucleicos com 100 µL de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) a 100 µg/mL, durante 5 minutos. Posteriormente, foi realizada uma lavagem com 100 µL de água ultrapura para remover o excesso de corante. As imagens dos biofilmes foram adquiridas num CLSM Olympus™

FluoView FV1000 (Lisboa, Portugal). Por fim, observaram-se os biofilmes utilizando uma objetiva de 40 vezes de imersão em água.

3.5 Suscetibilidade das células planctónicas a antibióticos

A suscetibilidade das células planctónicas a antibióticos foi testada utilizando os seguintes antibióticos, na concentração sérica máxima: vancomicina (40 µg/mL, Sigma-Aldrich), rifampicina (10 µg/mL, Sigma-Aldrich) e tetraciclina (16 µg/mL, Sigma-Aldrich). Após 6 horas de crescimento planctónico em CDM sem plasma ou suplementado com diferentes concentrações do mesmo (5%, 10% e 20%), tal como descrito em 3.2, procedeu-se à adição dos antibióticos, depois de uma prévia sonicação das culturas planctónicas durante 6 segundos a 40% de amplitude (Modelo 1). Com o intuito de perceber o mecanismo pelo qual o plasma interferia com o efeito dos antibióticos, alteração da fisiologia da bactéria ou ligação às moléculas de antibiótico, foi realizado um segundo teste, no qual após as 6 horas de crescimento planctónico na presença de 10% de plasma foi introduzido um passo de centrifugação a 7745 g (Eppendorf AG 5430R, Hamburgo, Alemanha), durante 10 minutos à temperatura ambiente, de forma a remover o meio contendo plasma. Imediatamente a seguir, as bactérias foram suspendidas em CDM fresco sem plasma humano e adicionaram-se os antibióticos (Modelo 2). Em ambos os modelos, a cultivabilidade das bactérias foi analisada antes e após 3 horas da adição dos antibióticos por contagem de CFU.

3.6 Expressão de genes

Para avaliar a alteração da expressão de genes associados à proteção da bactéria contra fatores imunitários – *icaA*, *dltA* e *sepA* – e adesão a proteínas humanas – *srdG* – procedeu-se à extração de RNA total de culturas planctónicas na ausência e presença de plasma humano, seguindo-se o tratamento com DNase para digerir o DNA genómico, síntese da cadeia de DNA complementar (cDNA) e realização de PCR quantitativo (qPCR).

3.6.1 Extração de RNA

O protocolo para a extração de RNA total combinou um método de lise mecânica (esferas de vidro) com uma membrana de isolamento de RNA do kit comercial *Extractme RNA bacteria & yeast* (DNA-Gdansk, BLIRT S.A. Polónia) tal como otimizado anteriormente²³³.

Após o crescimento planctônico em CDM suplementado com diferentes concentrações de plasma humano, procedeu-se à recolha de 1 mL de cada amostra e centrifugação das suspensões bacterianas a 16000 g durante 7 minutos a 4 °C (1730R Scanspeed, Dinamarca). Uma vez centrifugadas, descartaram-se os sobrenadantes e suspenderam-se os *pellets* bacterianos em 600 µL de tampão de lise RYBL. De seguida, cada suspensão foi transferida para um tubo de 2 mL, com sistema *safe lock*, contendo 0,5 g de esferas de vidro (diâmetro 150-212 µm) (Sigma-Aldrich, EUA) lavadas com ácido, e os tubos colocados no disruptor celular FastPrep® (MP Biomedicals, BIOPORTUGAL, Portugal) a uma velocidade de 6.5 m/s durante 35 segundos. Foram repetidos 4 ciclos, tendo-se colocado as amostras em gelo durante 5 minutos entre cada ciclo. Depois, centrifugaram-se as amostras a 16000 g durante 3 minutos a 4 °C para remover restos celulares e esferas, transferiu-se o lisado para uma coluna de limpeza e centrifugou-se a 12000 g durante 2 minutos à temperatura ambiente (Scanspeed mini, Dinamarca). Posteriormente o fluxo de passagem foi transferido para um tubo isento de RNases e adicionou-se igual volume de etanol a 70% (preparado em água isenta de RNases). Seguidamente, transferiu-se a mistura para uma coluna de purificação de RNA e centrifugou-se novamente a 12000 g durante 2 minutos à temperatura ambiente. Descartou-se o fluxo de passagem e inseriu-se cada coluna num novo tubo de recolha. De forma a lavar as colunas, adicionaram-se 650 µL de tampão de lavagem RYBW1 e centrifugou-se a 12000 g durante 1 minuto à temperatura ambiente. Mais uma vez, eliminou-se o fluxo de passagem e reinseriu-se cada coluna no mesmo tubo de recolha. Depois disso, adicionaram-se 650 µL de tampão de lavagem RYBW2 e centrifugou-se a 12000 g durante 1 minuto à temperatura ambiente. Descartou-se o fluxo de passagem e reinseriaram-se as colunas no tubo de recolha. Procedeu-se a uma segunda lavagem com o tampão de lavagem RYBW2 (500 µL). Após centrifugação voltou a descartar-se o fluxo de passagem e, reutilizando o tubo de recolha, realizou-se mais uma centrifugação a 12000 g durante 2 minutos para remover qualquer vestígio de etanol, conhecido por influenciar as aplicações subsequentes. Depois, descartou-se o fluxo de passagem e o tubo de recolha e transferiu-se, cuidadosamente, cada coluna para um novo tubo de 1,5 mL isento de DNase/RNase. Por fim, de forma a efetuar a eluição do RNA total adicionaram-se 50 µL de água ultrapura isenta de nucleases para o centro da membrana, tendo-se incubado durante 3 minutos, com posterior centrifugação durante 2 minutos a 12000 g. Os tubos contendo o RNA foram imediatamente colocados em gelo até se iniciar o tratamento com DNase, que foi realizado de seguida.

3.6.2 Tratamento com DNase

O DNA genómico foi digerido com DNase I (Thermo Scientific, Porto, Portugal). Resumidamente, adicionaram-se 5 µL de tampão de reação e 2 µL de DNase I a cada amostra de RNA e incubaram-se a 37 °C durante 30 minutos. Em seguida, para inativar a enzima DNase I, adicionou-se 5 µL de EDTA 25 mM à mistura e incubou-se a 65 °C durante 10 minutos. Após este tratamento os tubos contendo o RNA foram armazenados a curto prazo a -20 °C.

3.6.3 Quantificação de RNA e avaliação da pureza e integridade

Após a digestão do DNA genómico com DNase I, determinou-se a concentração e a pureza do RNA utilizando um espectrofotómetro NanoDrop 1000™ (Thermo Scientific, EUA). Antes de analisar o RNA, ligou-se o NanoDrop para permitir o aquecimento e estabilização da fonte de luz. Usaram-se as razões de absorvância A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} como indicadores de contaminação de proteínas e contaminação química (polissacarídeos, fenol ou sais caotrópicos), respetivamente ²³⁴. Para determinar a integridade do RNA, avaliou-se o padrão das bandas 23S e 16S num gel de agarose a 1% não desnaturante corado com Midori Green (Nippon Genetics Europe GmbH, Alemanha). A eletroforese foi realizada a 80 V durante, aproximadamente, 60 minutos. As imagens dos géis foram obtidas pelo software Image Lab (BioRad).

3.6.4 Síntese de DNA complementar

O cDNA constitui a forma mais conveniente de se manipular a sequência de codificação do RNA mensageiro (mRNA), isto porque o RNA é uma molécula facilmente degradada por enzimas denominadas RNases. A partir do molde de mRNA, a enzima transcriptase reversa sintetiza uma cadeia de DNA, constituindo o cDNA ²³⁵.

Para tal, num tubo de 0,2 mL isento de RNases foram misturadas 1000 ng de RNA total com 1 µL de *random primers* (BIORON GmbH, Ludwigshafen-Reno, Alemanha) e água até perfazer um volume final de 10 µL. De seguida, procedeu-se ao aquecimento dos tubos a 65 °C durante 5 minutos com posterior arrefecimento em gelo pelo mesmo período de tempo, constituindo uma etapa adequada para moldes de RNA ricos em guaninas e citosinas e para moléculas de RNA com várias estruturas secundárias. Uma *mix* contendo 1 µL de água, 2 µL de tampão, 1 µL de nucleótidos, 0,25 µL de inibidor de RNases, e 0,75 µL da enzima transcriptase reversa RevertAid H minus (Thermo Scientific, Porto, Portugal) foi preparada. As quantidades finais de cada componente foram determinadas tendo em consideração o número de amostras e a adição de mais uma ou duas amostras (uma no caso de serem 10

amostras, no total, e duas no caso de serem 20 amostras) para salvaguardar o erro associado à pipetagem dos volumes. Depois, num novo tubo de 0,2 mL foram adicionados 5 µL das amostras de RNA previamente preparadas, contendo água e os *random primers*, e 5 µL da *master mix*, procedendo-se à sua homogeneização através de pipetagens consecutivas e cuidadosas do volume total. Além disso, foi realizado um passo de centrifugação rápida para garantir que toda a mistura se encontrava no fundo do tubo. Seguidamente, as amostras foram colocadas num termociclador MJ Mini™ (Bio-Rad, Califórnia, EUA) e sujeitas ao seguinte ciclo: 25 °C durante 5 minutos, 42 °C durante 60 minutos e, por fim, 10 minutos a 70 °C. Para determinar o nível de contaminação com DNA genómico e a contaminação dos reagentes, prepararam-se, respetivamente, reações de controlo sem a enzima transcriptase reversa e sem amostra²³⁶. Note-se, ainda, que o cDNA foi armazenado a -20 °C até ser usado na corrida de PCR.

3.6.5 PCR quantitativo

A corrida de qPCR foi efetuada tal como otimizada previamente²³³ com algumas alterações. O cDNA foi diluído 400 vezes em água e 2 µL distribuídos por placas de 96 poços específicas para qPCR (Thermo Scientific, Porto, Portugal). De seguida, 8 µL de uma mistura contendo 5 µL de Xpert Fast SYBR (Grisp, Porto, Portugal), 0,5 µL de cada um dos *primers forward* e *reverse* (tabela 3.1) (a uma concentração de 10 µM) e 2 µL de água foram adicionados ao cDNA. A corrida de qPCR foi efetuada num termociclador CFX96 (Bio-Rad, Califórnia, EUA) com os seguintes parâmetros: 2 minutos a 95 °C, seguido por 40 repetições de 5 segundos a 95 °C e 30 segundos a 60°C, uma vez que a hibridação dos *primers* e a extensão ocorrem num único passo. A eficiência da reação foi determinada pelo método de diluição a 60 °C (tabela 3.1).

Tabela 3.1. *Primers* usados nos ensaios de qPCR

Gene Alvo	Sequência oligonucleotídica (5'→3')	Eficiência da reação (%)	Tamanho (pb)
<i>16S rRNA</i>	Fw GGG CTA CAC ACG TGC TAC AA Rv GTA CAA GAC CCG GGA ACG TA	93	176
<i>icaA</i>	Fw TGC ACT CAA TGA GGG AAT CA Rv TAA CTG CGC CTA ATT TTG GAT T	96	134
<i>sepA</i>	Fw TCT TAA GGC ATC TCC GCC TA Rv GTC TGG TGC GAA TGA TGT TG	89	196
<i>dltA</i>	Fw ACA CAT ATG GAC CAA CTG AAG CTA Rv CCT CAA TGA CAA GTT CTC CTT CTT	94	150
<i>sdrG</i>	Fw GGA CGA TTA CAC GAC GAT ACA GCA Rv GAG GCA AGT CAC CTT GTC CTT GA	98	140

- pb – pares de bases; Fw- *forward*; Rv - *reverse*

Note-se que foram consideradas as amostras de RNA sem contaminação significativa de DNA genómico, quando a diferença do ciclo de quantificação (C_q) entre o sinal específico e o respetivo controlo sem transcriptase reversa foi superior a 10. Neste caso detetaram-se diferenças de pelo menos 20 ciclos entre o sinal específico e o controlo sem transcriptase reversa. É importante salientar que não foram detetados dímeros de *primers* pela análise da curva de fusão. Por último, a quantidade relativa de cada gene foi determinada através da formula de Pfaffl²³⁷. A quantificação relativa determina as alterações nos níveis de mRNA de um gene em múltiplas amostras e expressa-a em relação aos níveis de mRNA de um controlo interno, denominado gene de referência, muitas vezes correspondente ao gene *housekeeping*²³⁷, como foi o caso deste estudo, onde foi usado como gene de referência o *16S rRNA*. A razão da expressão relativa de cada gene foi calculada com base nas suas eficiências de qPCR (E) e na diferença do ponto de cruzamento (CP) (Δ) entre a amostra e o controlo (ΔCP controlo - amostra) (equação 3.1).

$$R = \frac{(E_{alvo})^{\Delta CP_{alvo} (controlo-amostra)}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref} (controlo-amostra)}}$$

Equação 3.1. Representação da equação de Michael W. Pfaffl para a quantificação relativa da expressão de um gene.

3.7 Análise estatística

A significância estatística dos resultados experimentais foi determinada por aplicação do teste t de *Student*, para a análise de dois grupos e um fator, e do teste One-away ANOVA, para a análise de mais de dois grupos e um fator, usando a versão 6.01 do programa GraphPad Prism (Califórnia, EUA). Todos os testes foram realizados com um nível de confiança de 95%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito do plasma comercial no crescimento planctónico de *S. epidermidis*

Para a realização desta tese, optou-se pela utilização de plasma comercial, obtido a partir de apenas um dador, para tentar reduzir a variabilidade inerente à utilização de amostras biológicas humanas ²³⁸. Por outro lado, ao utilizarmos plasma de apenas um dador, podemos ter enviesado os resultados, visto que em alguns dadores, o plasma, por si só, apresenta capacidade antimicrobiana ²³⁹, e pode induzir uma adaptação fisiológica distinta ¹⁹⁹. No entanto, como o objetivo principal desta tese era averiguar o efeito dos componentes do hospedeiro, em particular do plasma humano, na fisiologia da bactéria, de forma a melhor simular as condições *in vivo*, considerou-se esta limitação preferível à alternativa de se introduzir variabilidade biológica em cada novo ensaio efetuado.

De forma a caracterizar o potencial antimicrobiano do plasma comercial em uso neste estudo, analisou-se o seu efeito no crescimento planctónico, adicionando-se diferentes concentrações de plasma ao meio de cultura TSB. Este estudo foi feito, inicialmente, analisando o crescimento hora a hora, até 12 horas. No entanto, verificou-se a formação de aglomerados bacterianos, o que obrigou à sonicação das suspensões bacterianas a cada tempo de amostragem. Isto levantou problemas práticos, pelo que se optou por avaliar o crescimento da bactéria em apenas 3 pontos: passado 6 horas - fase exponencial inicial -, após 12 horas - fase exponencial tardia - e 24 horas depois - fase estacionária. Tal como podemos observar através da medição da DO_{640nm} e do número de células cultiváveis, determinado pela contagem de CFU, o crescimento planctónico de *S. epidermidis* foi inibido, aparentemente, pela presença de plasma humano no meio de cultura (figura 4.1). Esta redução da cultivabilidade poderá ter a ver com características únicas do dador em questão, mas também com o processo de recolha e processamento do plasma.

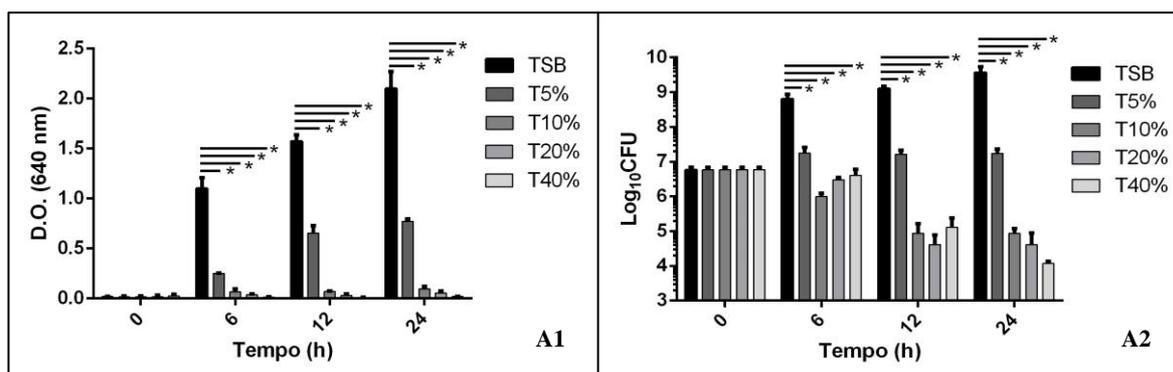


Figura 4.1. Representação gráfica do crescimento plactónico de *S. epidermidis* em TSB (T) e em TSB suplementado com 5%, 10%, 20% e 40% de plasma humano. O gráfico A1 representa a DO_{640nm} e o gráfico A2 representa os valores de logaritmo de base 10 de CFU, ambos referentes aos tempos 0, 6, 12 e 24 horas. A concentração inicial de células foi de 6×10^6 CFU/mL. Os valores correspondem à média e as barras de erro representam o desvio padrão, com um intervalo de confiança de 95%. As diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas por asteriscos (One-way ANOVA, $p < 0.05$).

Apesar de não terem sido encontrados estudos semelhantes ao nosso em *S. epidermidis*, recentemente, foi demonstrada a redução da cultivabilidade das células libertadas dos biofilmes de *S. epidermidis* após a exposição, durante 2 horas, a 100% de plasma²³⁹. No entanto, é importante referir que nesse estudo o efeito do plasma foi altamente variável entre diferentes dadores e estirpes de *S. epidermidis*, sendo que em 5 de 13 dadores, verificou-se um considerável efeito bactericida na presença de 100% de plasma. Provavelmente, o efeito do plasma pode ser explicado tendo em conta o efeito desempenhado individualmente por cada um dos seus constituintes e a concentração de cada um deles. Isto porque é sabido que a concentração das proteínas que constituem o plasma pode variar com o género, idade, estado de saúde, entre outros fatores²³⁸, resultando na variabilidade característica inerente a cada dador.

É necessário referir que, nos ensaios seguintes não foram usadas concentrações de plasma superiores a 20%, tendo em conta o efeito inibitório apresentado pelo plasma comercial usado, proveniente de um único dador.

4.2 Otimização das condições de crescimento

A otimização das condições de crescimento de um microrganismo constitui uma etapa crucial para o seu estudo. Por essa razão, procedemos à avaliação da influência da concentração inicial de células no efeito do plasma, tendo em consideração que o seu efeito pode variar consoante a proporção entre as proteínas do plasma e o número de bactérias

presentes no meio, cuja relação é conhecida como multiplicidade de infecção ²⁴⁰. Para isso, foram inoculadas três concentrações de células diferentes, nomeadamente, 1×10^7 , 1×10^8 e 1×10^9 CFU/mL, e avaliado o crescimento planctónico em TSB com e sem plasma, através da medição da DO_{640nm} após 6, 12 e 24 horas (figura 4.2).

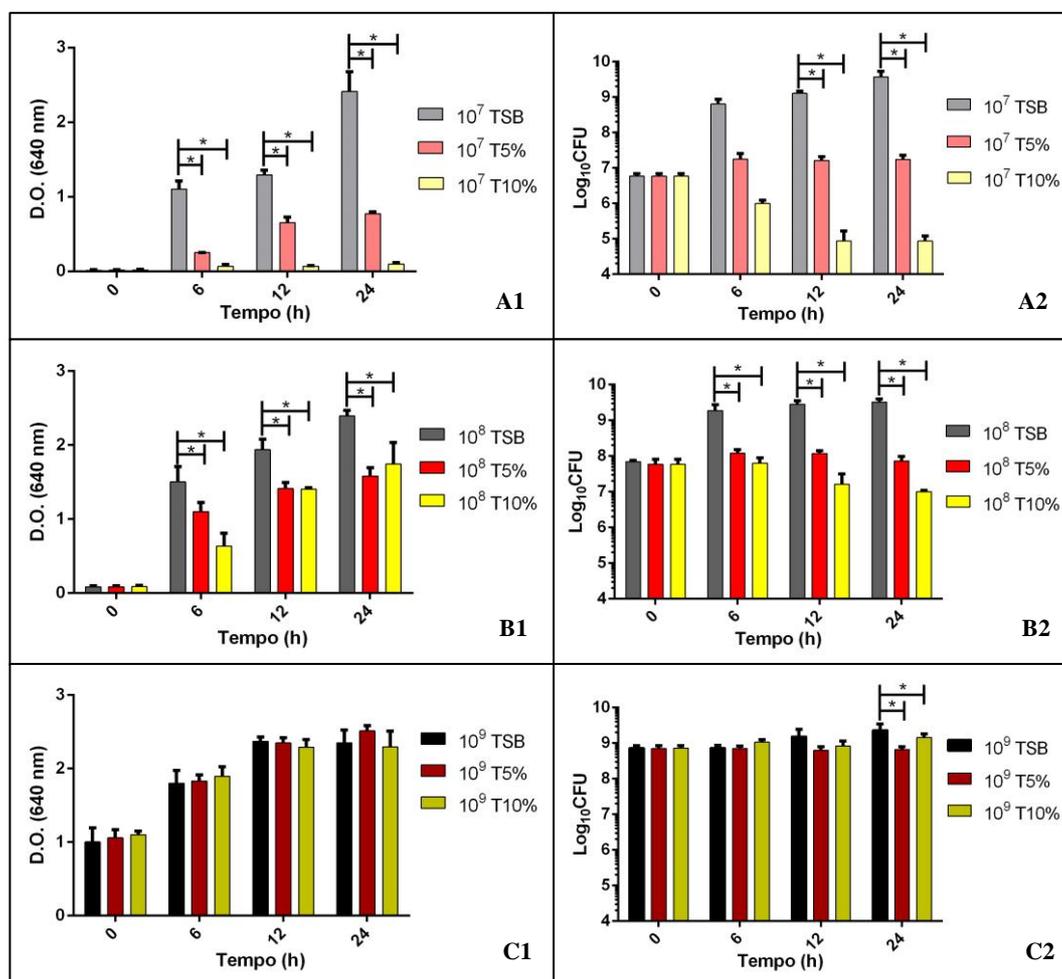


Figura 4.2. Representação gráfica da influência da concentração de inóculo inicial no crescimento planctónico de *S. epidermidis* em TSB (T) e em TSB com 5% e 10% de plasma humano. Neste estudo foram analisados os tempos 0, 6, 12 e 24 horas, por medição da DO_{640nm} (A1, B1 e C1), tendo sido verificada a respetiva cultivabilidade das células por contagem de CFU (A2, B2 e C2). Os valores correspondem à média e as barras de erro representam o desvio padrão, com um intervalo de confiança de 95%, estando as diferenças estatisticamente significativas assinaladas por asteriscos (One-way ANOVA, $p < 0.05$).

Como se pode observar, a concentração inicial de células influenciou o efeito do plasma no crescimento planctónico de *S. epidermidis*. De facto, o efeito do plasma diminuiu na presença de concentrações celulares iniciais elevadas (1×10^9 CFU/mL) (figura 4.2, C1 e C2). Provavelmente, a taxa de inibição do crescimento das bactérias era proporcional à quantidade de plasma disponível para cada bactéria no momento da exposição. Por conseguinte, a

capacidade de inibição do plasma pode ter requerido uma quantidade massiva de plasma e dos seus componentes solúveis por célula, justificando a atenuação do efeito inibitório do plasma com o aumento da concentração celular. Dessa forma, optou-se por utilizar a concentração celular inicial intermédia 1×10^8 CFU/mL nos ensaios subsequentes, uma vez que um número de células elevado diminuiu significativamente o efeito do plasma, por haver mais células por cada proteína de plasma, ao passo que na presença de uma concentração celular reduzida se verificou um acentuado efeito do plasma e, conseqüentemente, uma elevada redução da biomassa e número de CFU.

4.3 Variabilidade nos meios complexos e comparação com meios quimicamente definidos

Diferentes meios de cultura têm vindo a ser usados para estudar o crescimento e a formação de biofilmes de *S. epidermidis*, consistindo, maioritariamente, em meios complexos, como o TSB^{199,241,242}. Por essa razão, optou-se por utilizar, inicialmente, o meio complexo TSB como meio de cultura.

Por coincidência, as primeiras experiências foram realizadas com TSB da empresa VWR. Quando o meio terminou, passou-se a utilizar um TSB da empresa Liofilchem (LF), que era o único disponível no laboratório, à altura. Curiosamente, quando foi alterada a marca do TSB foram obtidos resultados diferentes no crescimento planctónico de *S. epidermidis* em diferentes concentrações de plasma (figura 4.3). De facto, o efeito observável do plasma no crescimento bacteriano foi dependente do meio de cultura utilizado. Como descrito na literatura, as condições de crescimento dos microrganismos em estudo influenciam os resultados obtidos, como é o caso da composição do meio de cultura^{243,244}. Efetivamente, é sabido que existe uma variação de resultados experimentais inerente à composição dos meios complexos, como no caso do TSB, causada pela presença de componentes quimicamente indefinidos de origem natural, por exemplo, extratos de levedura, cuja composição varia de lote para lote²⁴³⁻²⁴⁵. Por esse motivo, passamos a usar um meio de cultura quimicamente definido (CDM) específico para os testes realizados neste estudo (tal como descrito no capítulo 2), cuja composição química exata era conhecida, de forma a melhorar a consistência dos resultados. Note-se que, o crescimento de *S. epidermidis* em CDM, suplementado com diferentes concentrações de plasma, apresentou uma tendência semelhante de inibição do crescimento para concentrações mais elevadas de plasma, embora de forma menos acentuada

(figura 4.3). Dessa forma, os nossos resultados destacam a substancial influência dos meios de cultura escolhidos, nos resultados obtidos.

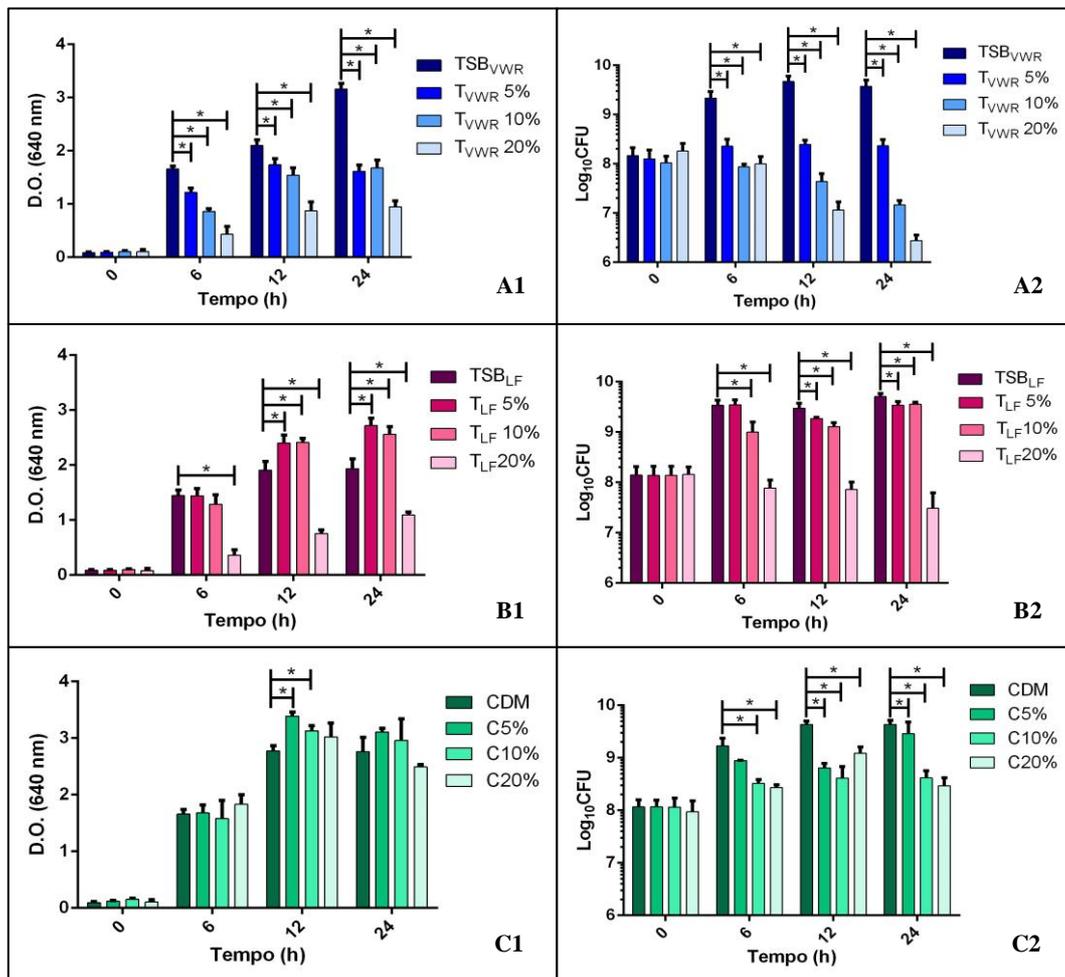


Figura 4.3. Representação gráfica do crescimento planctônico de *S. epidermidis* em diferentes formulações de TSB (T) - VWR e Liofilchem (LF) - e CDM na ausência e presença de 5% e 10% de plasma humano. Neste estudo foram analisados os tempos 0, 6, 12 e 24 horas, por medição da DO_{640nm} (A1, B1 e C1), tendo sido verificada a respectiva cultivabilidade das células por contagem de CFU (A2, B2 e C2). Os valores correspondem à média e as barras de erro representam o desvio padrão, com um intervalo de confiança de 95%, estando as diferenças estatisticamente significativas assinaladas por asteriscos (One-way ANOVA, p<0.05).

Pela mesma razão, foi avaliada a capacidade de formação de biofilme de *S. epidermidis* nas duas marcas de TSB testadas, bem como em CDM, utilizando as mesmas percentagens de plasma (figura 4.4). Tal como esperado, os meios complexos fizeram variar a capacidade de formação de biofilmes. Curiosamente, o efeito do plasma foi mais pronunciado no meio TSB VWR. Comparando ambas as marcas de TSB, a formação de biofilme parece ser favorecida pela utilização de TSB LF. Em relação aos biofilmes formados em CDM, verificou-se uma maior variabilidade na presença de plasma, aparentemente relacionada com

a formação de biofilmes pouco coesos, possivelmente devido a uma fraca interação entre as células, tal como discutido na secção seguinte. Embora nos três meios de cultura usados a capacidade máxima de formação de biofilme tenha sido diminuída provavelmente pela presença de plasma no meio, é possível destacar que no caso dos biofilmes formados em CDM com plasma, essa diminuição foi, em média, menor do que a observada para ambas as marcas de TSB.

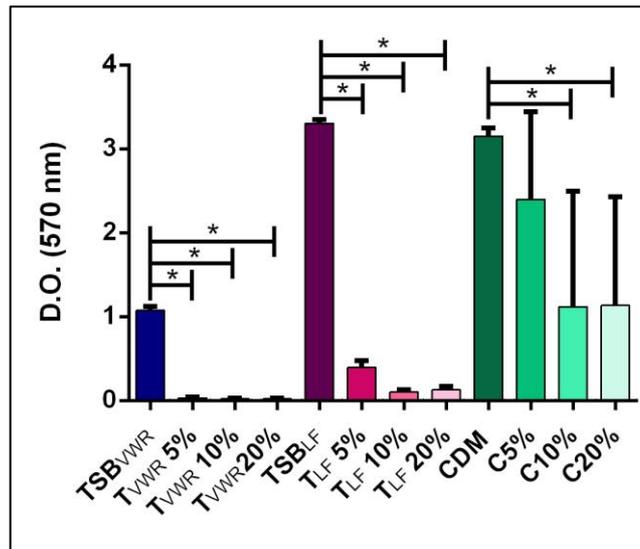


Figura 4.4. Representação gráfica da formação de biofilme de *S. epidermidis* em duas formulações de TSB (T) - VWR e Liofilchem (LF) - e CDM, na ausência e presença de 5%, 10% e 20% de plasma humano, por quantificação com violeta de cristal a uma DO_{570nm} . A concentração inicial de células foi de 2×10^6 CFU/mL. Os valores correspondem à média e as barras de erro representam o desvio padrão, com um intervalo de confiança de 95%, estando as diferenças estatisticamente significativas assinaladas por asteriscos (Teste T, $p < 0.05$).

4.4 Avaliação da coesividade do biofilme crescido em plasma

No decorrer das experiências de formação de biofilme, verificou-se que, na presença de plasma, a quantificação dos biofilmes estava a ser influenciada pelo processo de lavagem. O processo de remoção do meio de cultura do biofilme, embora realizado cuidadosamente, era suficiente para promover um ligeiro destacamento dos biofilmes formados na presença de plasma, que se acentuava aquando o processo de lavagem com NaCl a 0,9%. De facto, é sabido que o processo de lavagem envolve forças electrostáticas suficientes para remover células aderidas a superfícies ²⁴⁶. Para tentar quantificar este fenómeno, avaliaram-se, macroscopicamente, as diferenças da quantificação dos biofilmes crescidos com ou sem plasma, antes e após o processo de lavagem (figura 4.5). Como podemos ver, evitando o processo de lavagem é possível constatar visualmente que *S. epidermidis* apresentou a

capacidade de formar biofilmes na presença de diversas percentagens de plasma. Não obstante, após a lavagem dos biofilmes a quantidade de biomassa diminuiu significativamente. De facto, as diferenças observadas inerentes ao processo de lavagem ressaltam a reduzida coesão dos biofilmes de *S. epidermidis* formados em meio suplementado com plasma. Com base nos valores de biomassa obtidos por violeta de cristal (figura 4.4) e no que foi observado pela figura 4.5, verificou-se que a coesão do biofilme era tanto menor quanto maior a concentração de plasma.

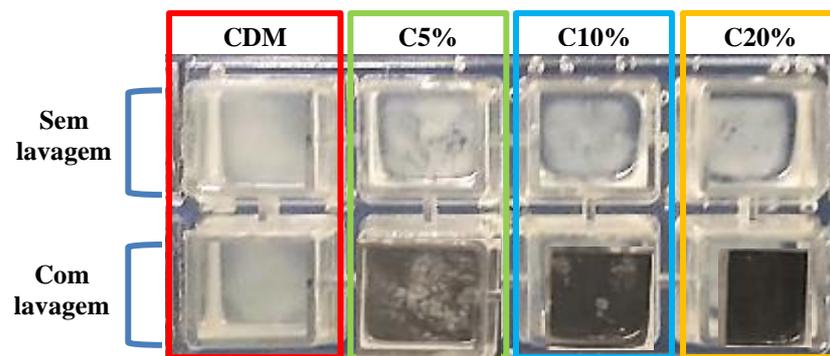


Figura 4.5. Biofilmes de *S. epidermidis* formados em placas de 8 poços, em CDM na ausência e presença de 5%, 10% e 20% de plasma humano. Após a remoção do meio de cultura, os biofilmes da primeira fila não foram lavados, tendo-se procedido a duas lavagens da segunda fila de biofilmes com NaCl a 0,9%. A concentração inicial de células foi de 2×10^6 CFU/mL.

Note-se que a variabilidade observada nos nossos resultados (figura 4.4) pode residir na variação da força de lavagem dos biofilmes, que por constituir um processo manual pode variar significativamente entre experiências, e ter um impacto considerável na desagregação dos biofilmes formados na presença de plasma, caracteristicamente pouco coesos e, por isso, mais facilmente destacáveis.

4.5 Efeito do plasma na estrutura tridimensional do biofilme

No sentido de melhor caracterizar a influência do plasma nos biofilmes de *S. epidermidis*, a sua estrutura foi analisada por CLSM. Após a formação de biofilmes na ausência e presença de diferentes concentrações de plasma humano, os ácidos nucleicos das células dos biofilmes foram corados com DAPI (cor azul) e os resíduos de N-

acetilglucosamina com WGA (cor vermelha), resultando na obtenção de imagens com a combinação de ambas as cores (figura 4.6).

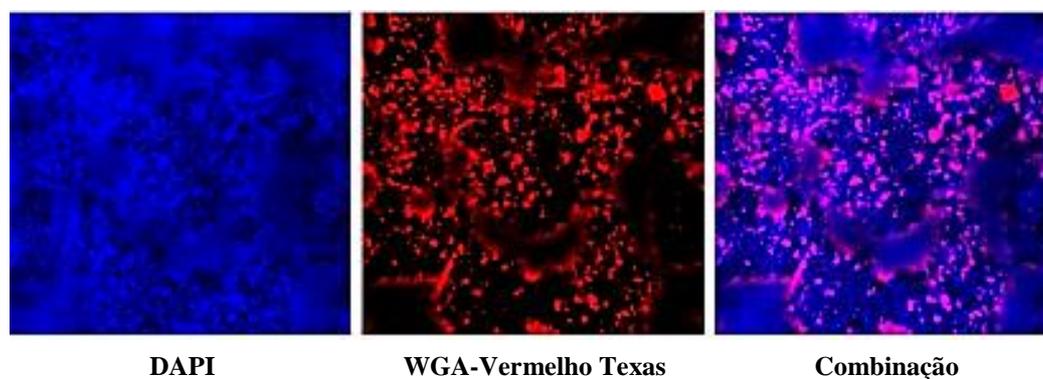


Figura 4.6. Representação das imagens de CLSM das células dos biofilmes de *S. epidermidis*, crescidos em CDM na ausência de plasma, coradas com DAPI (cor azul), WGA - Vermelho Texas - (cor vermelha) e a combinação de ambas.

As imagens obtidas por CLSM permitiram verificar que a superfície onde o biofilme estava aderido, se encontrava completamente repleta de células (figura 4.7). Na verdade, vários estudos já evidenciaram o papel das proteínas do plasma na adesão bacteriana. Por um lado, foi descrito que a albumina, a fibronectina e o fibrinogénio inibiram a adesão de *S. epidermidis*²⁴⁷⁻²⁴⁹, por outro também já foi reportado o efeito oposto destas proteínas nesta espécie^{250,251}. Não obstante, com base nas imagens observadas foi possível constatar que o plasma não afetou a adesão das bactérias à superfície, reforçando a hipótese de o plasma interferir com a ligação entre as células. De facto, a presença de plasma no meio demonstrou fragilizar a interação entre as células, levando à formação de biofilmes menos coesos. Consequentemente, ocorreu o destacamento de parte dos biofilmes, conduzindo a uma redução da biomassa, após o processo de lavagem. Sabendo que as bactérias dentro do biofilme se encontram embebidas numa matriz extracelular, responsável por conferir a estabilidade mecânica e manter a integridade estrutural do biofilme³¹, é plausível considerar que a presença de plasma afetou a matriz extracelular do biofilme, desestabilizando as forças mecânicas coesivas que ligam os microrganismos entre si. Além disso, uma observação mais minuciosa das imagens permite perceber uma ligeira diminuição do sinal vermelho, representativo da quantidade de PNAG, nos biofilmes formados na presença de plasma.

Efetivamente, estes resultados demonstram que os biofilmes que costumamos ter nas condições normais laboratoriais (TSB suplementado com glucose) são diferentes dos que se

desenvolvem na presença de plasma humano e, presumivelmente, distintos dos que se formam em condições *in vivo*.

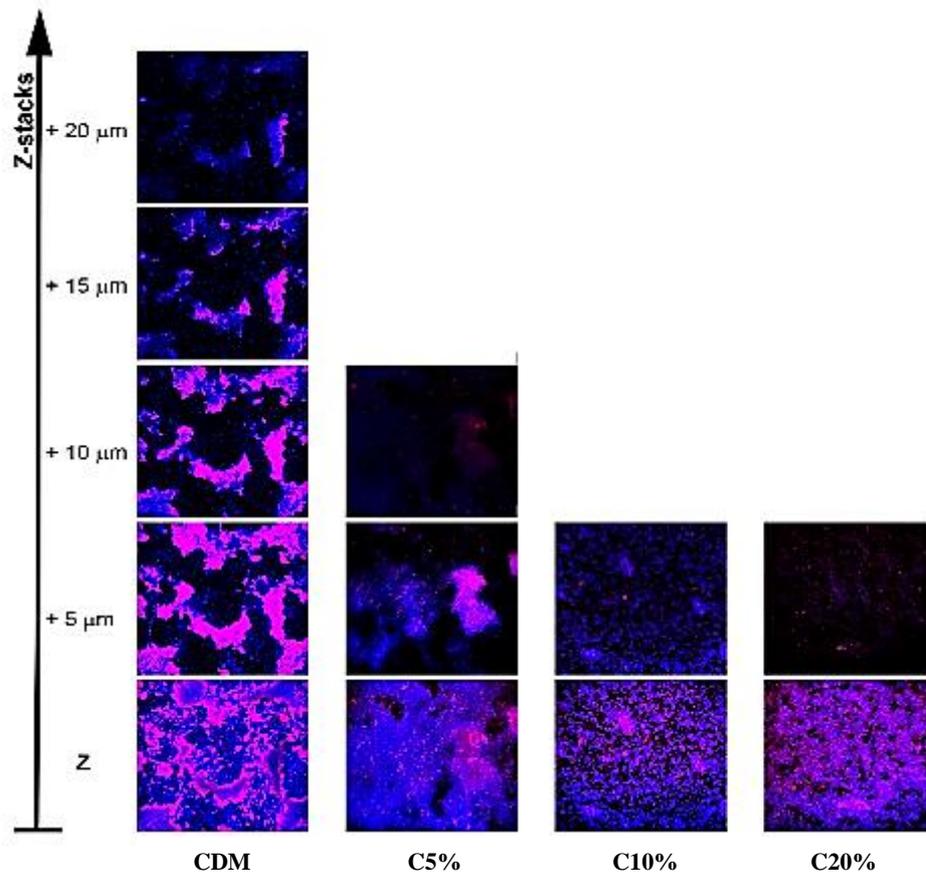


Figura 4.7. Imagens de CLSM referentes às células dos biofilmes de *S. epidermidis* formados em CDM sem plasma humano e com diferentes concentrações do mesmo (5%, 10% e 20%). Os ácidos nucleicos foram corados com DAPI (azul) e os resíduos de N-acetilglucosamina com WGA (vermelho).

4.6 Efeito do plasma na indução de dormência

É sabido que os biofilmes apresentam uma fisiologia particular, sendo constituídos por células em diferentes estados metabólicos incluindo, entre outras, um número considerável de bactérias dormentes, que lhes conferem a capacidade de causar infecções recalcitrantes em seres humanos¹¹¹. Recentemente, foi demonstrado que a exposição, durante 2 horas, a 100% de plasma, de biofilmes de 24 horas de *S. epidermidis*, induziu um aumento na proporção de células dormentes¹⁹⁹. Por essa razão, decidimos averiguar a influência do plasma na indução de dormência nas células dos biofilmes de *S. epidermidis*, através da comparação do número de CFU com o número de células viáveis, número o qual foi determinado por citometria de fluxo.

Ao contrário do demonstrado para *S. epidermidis* e como referido anteriormente, no nosso estudo só se utilizaram concentrações de plasma até 20%. De acordo com os nossos resultados, verificou-se uma redução tanto da cultivabilidade como do número de células viáveis na presença de plasma (figura 4.8). Isto permite-nos concluir que, a 20% de concentração, o plasma não induziu dormência nas células dos biofilmes, ao contrário do que pode acontecer com 100% de plasma, como anteriormente reportado ¹⁹⁹.

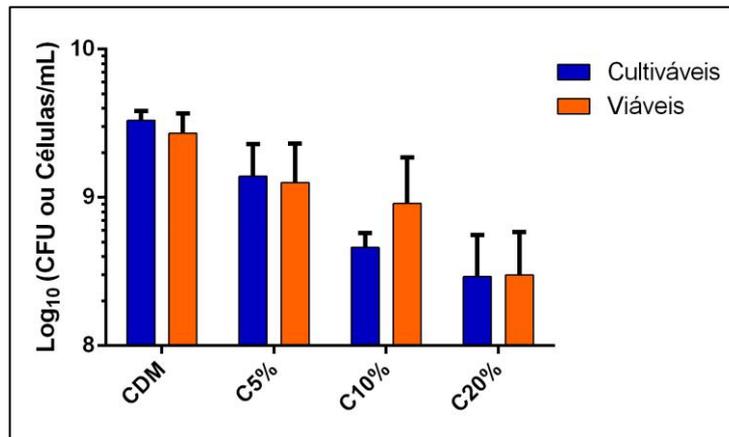


Figura 4.8. Representação gráfica da cultivabilidade, determinada por contagem de CFU, e viabilidade, determinada por citometria de fluxo, das células de biofilmes de *S. epidermidis* formados em CDM na ausência e presença de 5%, 10% e 20% de plasma humano. A concentração inicial de células foi de 2×10^6 CFU/mL. Os valores correspondem à média e as barras de erro representam o desvio padrão, com um intervalo de confiança de 95%, e as diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas por asteriscos (Teste T, $p < 0,05$).

4.7 Efeito do plasma na morfologia celular

Ainda através da técnica de citometria de fluxo, foram avaliados os parâmetros *forward scatter* e *side scatter*, correspondentes ao tamanho e complexidade das células dos biofilmes de *S. epidermidis*, respetivamente ²⁵². Tendo em conta os nossos resultados, a presença de plasma no meio induziu um aumento no tamanho e na complexidade das bactérias de *S. epidermidis* (figura 4.9). Esta alteração na morfologia das células pode ter sido resultado da opsonização das bactérias pelas proteínas do plasma ou também de uma adaptação das mesmas a um ambiente modificado, pela presença de fatores do hospedeiro no meio de crescimento. De facto, os nossos resultados são consistentes com um estudo que descreveu que biofilmes de *S. aureus* crescidos em meios suplementados com plasma revelaram mudanças significativas na morfologia celular das bactérias individuais do biofilme, aparecendo como cocobacilos com uma parede celular mais espessa e

heterogénea¹⁹⁷. Estas mudanças na morfologia celular destacam os múltiplos efeitos que o plasma pode exercer sobre as bactérias, enfatizando o impacto dos fatores do hospedeiro nos modelos *in vitro*.

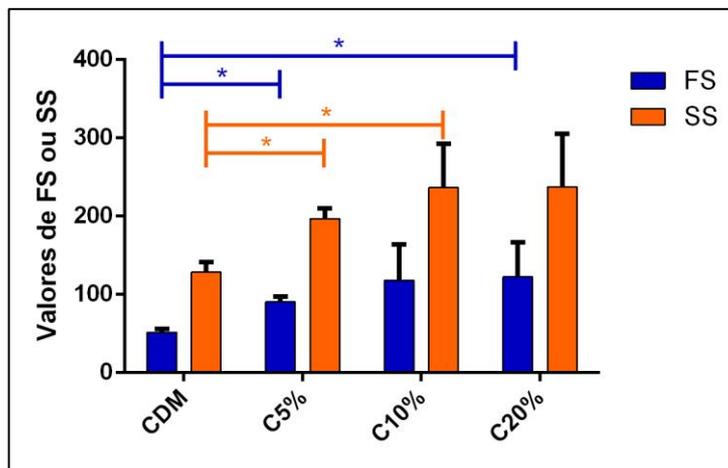


Figura 4.9. Representação gráfica do tamanho (FS-*forward scatter*) e complexidade (SS-*side scatter*) das células dos biofilmes de *S. epidermidis*, crescidas em CDM na ausência e presença de 5%, 10% e 20% de plasma humano, avaliados por citometria de fluxo. Os valores correspondem à média e as barras de erro representam o desvio padrão, com um intervalo de confiança de 95%, e as diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas por asteriscos (Teste T, $p < 0,05$).

4.8 Efeito do plasma na suscetibilidade a antibióticos

Vários estudos têm reportado o problema da resistência de estafilococos coagulase-negativos (CoNS) aos antibióticos com particular destaque para *S. epidermidis*²⁵³. No sentido de verificar a influência do plasma na suscetibilidade aos antibióticos, foi avaliada a suscetibilidade de culturas planctônicas desta espécie à vancomicina, rifampicina e tetraciclina, nas suas concentrações séricas máximas⁶⁵, na ausência e presença de diferentes concentrações de plasma.

Tendo sido anteriormente descrito que a eficácia dos antibióticos é influenciada pela quantidade de bactérias²⁵⁴, foi determinada a concentração ótima de inóculo inicial para a realização dos ensaios de suscetibilidade aos antibióticos. Dessa forma, foi avaliada a suscetibilidade de células planctônicas de *S. epidermidis* à vancomicina utilizando-se três concentrações de inóculo diferentes: 1×10^7 CFU/mL, 1×10^8 CFU/mL e 1×10^9 CFU/mL. Como se pode ver (figura 4.10), a vancomicina não apresentou qualquer efeito na presença de uma concentração de células muito elevada (1×10^8 CFU/mL e 1×10^9 CFU/mL).

Efetivamente, os nossos resultados evidenciaram a influência da concentração inicial de células no efeito dos antibióticos, convergindo com estudos anteriores ²⁵⁴.

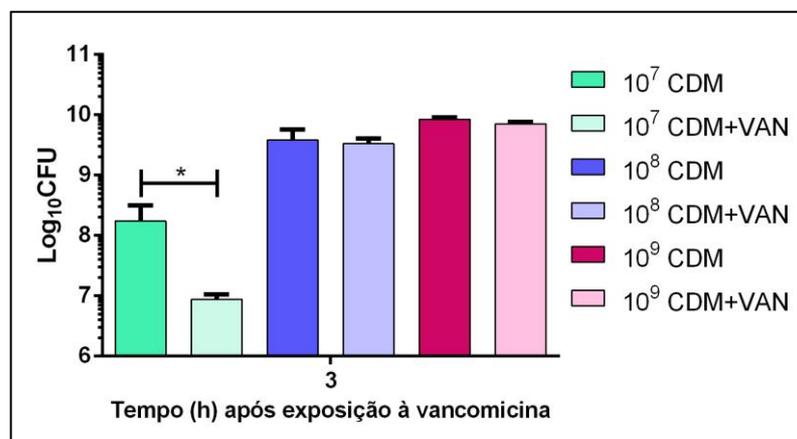


Figura 4.10. Representação gráfica da influência da concentração de inóculo na suscetibilidade de células planctônicas de *S. epidermidis* à vancomicina (VAN). Após 6 horas de crescimento em CDM, foi adicionada a vancomicina na concentração sérica e analisada a cultivabilidade das células por contagem de CFU após 3 horas da adição do antibiótico. Os valores correspondem à média e as barras de erro representam o desvio padrão, com um intervalo de confiança de 95%, e as diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas com asteriscos (Teste T, $p < 0.05$).

Sabe-se há algum tempo que a quantidade relativa de antibióticos necessária para inibir o crescimento de uma população bacteriana aumenta com a densidade dessa população ^{255,256}. Existem pelo menos dois motivos subjacentes à diminuição da eficácia do antibiótico pela presença de uma densidade celular elevada ²⁵⁴. O primeiro está relacionado com a diminuição da concentração efetiva de antibiótico, ou seja, medicamento ativo livre no meio, devido à presença de enzimas desnaturantes de antibióticos ou pela ligação do antibiótico às estruturas celulares de bactérias mortas, viáveis, aos seus componentes químicos estruturais e detritos. A taxa a que estes processos ocorrem seria proporcional à densidade de bactérias expostas ^{257,258}. A segunda razão baseia-se no princípio de que a taxa de morte ou inibição do crescimento das bactérias pode ser proporcional à quantidade de antibiótico disponível para cada bactéria no momento da exposição. Mais precisamente, a capacidade dos antibióticos de matar ou inibir o crescimento de bactérias pode exigir um número massivo de moléculas de antibiótico por célula. Assim, daí em diante, passou a usar-se a concentração de inóculo que evidenciava o efeito do antibiótico, correspondente a 1×10^7 CFU/mL.

Dessa forma, procedeu-se à avaliação da suscetibilidade das culturas planctônicas de *S. epidermidis* a antibióticos com diferentes mecanismos de ação, nomeadamente, vancomicina, rifampicina e tetraciclina. Além disso, a cultivabilidade das células foi medida

após 3 horas de exposição aos antibióticos e analisada a diferença logarítmica entre as culturas controle, que não foram expostas aos antibióticos, e as culturas expostas aos antibióticos (figura 4.11). Os nossos resultados revelaram que a presença de plasma reduziu o efeito da vancomicina e da tetraciclina e potenciou o efeito da rifampicina. Em relação à vancomicina e tetraciclina, verificamos que o efeito do antibiótico era tanto menor quanto maior a concentração de plasma. Na verdade, a reduzida suscetibilidade desta espécie à vancomicina foi observada anteriormente em *S. aureus* para o modo de crescimento em biofilme na presença de 10% de plasma humano, tendo sido relacionada com uma elevada concentração de células, com o aumento do número de células persistentes e com o aumento da espessura da parede celular ¹⁹⁷. Quanto ao efeito da rifampicina, a sua intensificação ocorreu apenas para as concentrações de 5% e 10% de plasma. Como vimos, na ausência de plasma a tetraciclina revelou ser o antibiótico mais potente contra *S. epidermidis*. Não obstante, bastou a adição de uma pequena percentagem de plasma (5%) ao meio para se verificar uma acentuada redução do efeito deste antibiótico, tornando-se o menos eficaz.

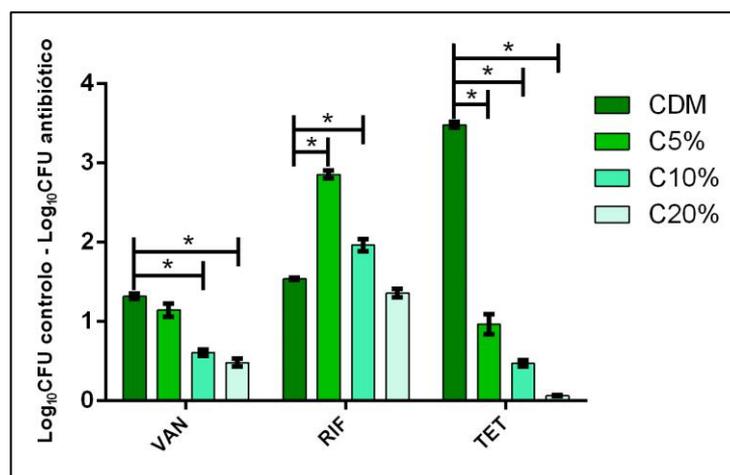


Figura 4.11. Representação gráfica da redução média da cultivabilidade das células planctônicas de *S. epidermidis* após 3 horas de exposição aos antibióticos vancomicina (VAN), rifampicina (RIF) e tetraciclina (TET). O eixo Y indica a diferença de $\log_{10}\text{CFU/mL}$ entre a estirpe sem os antibióticos (controle) e a estirpe tratada com os antibióticos. Após 6 horas de crescimento em CDM na ausência e presença de 5%, 10% e 20% de plasma humano, foram adicionados os antibióticos na concentração sérica e analisada a cultivabilidade das células por CFU. As barras de erro representam o desvio padrão, com um intervalo de confiança de 95%, e as diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas por asteriscos (Teste T, $p < 0,05$).

As alterações observadas no efeito dos antibióticos causadas pela presença de plasma, suscitarão a necessidade de perceber o mecanismo pelo qual o plasma interferia com o efeito dos antibióticos. Até ao momento é sabido que o plasma pode ligar-se às moléculas de

antibiótico ²⁵⁹, limitando a sua disponibilidade, ou alterar a fisiologia das bactérias ¹⁹⁷. Nesse sentido foi efetuado um segundo ensaio que incluiu a remoção do plasma do meio, após um período de adaptação das bactérias ao plasma, com posterior suspensão das bactérias em meio fresco sem plasma, seguida da exposição aos antibióticos (figura 4.12). O que verificamos foi que a suscetibilidade de *S. epidermidis* à vancomicina e rifampicina manteve-se semelhante em ambos os modelos, com exceção da tetraciclina. De facto, quando removemos o plasma do meio observou-se um aumento acentuado da suscetibilidade desta espécie à tetraciclina. Isto sugere que quando o plasma estava presente no meio, se ligou às moléculas de tetraciclina, diminuindo a sua disponibilidade e, por conseguinte, interferindo com a sua eficácia. Efetivamente, já foi descrito que a ligação das proteínas do plasma reduz a eficácia de certos antibióticos *in vitro* ²⁵⁹. Por outro lado, este efeito da presença ou ausência do plasma não se verificou com vancomicina ou rifampicina. Isto poderá indicar que o crescimento na presença do plasma alterou a fisiologia das bactérias de forma a que elas apresentem uma suscetibilidade distinta aos antibióticos.

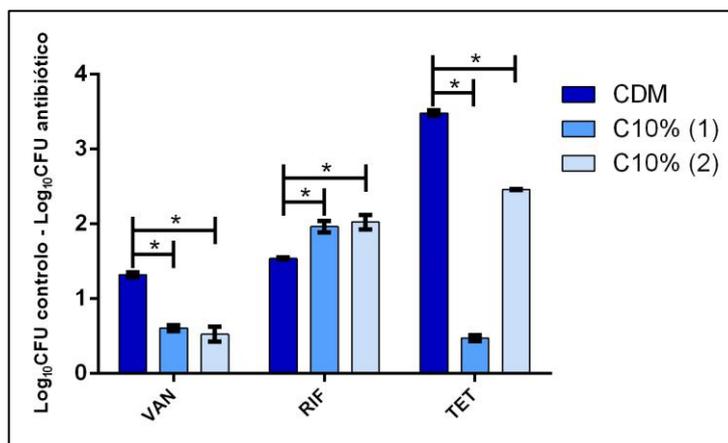


Figura 4.12. Representação gráfica da redução média da cultivabilidade das células planctónicas de *S. epidermidis* após 3 horas de exposição aos antibióticos vancomicina (VAN), rifampicina (RIF) e tetraciclina (TET) em 2 modelos diferentes (1 e 2). O eixo Y indica a diferença de log₁₀CFU/mL entre a estirpe sem os antibióticos (controlos) e a estirpe tratada com os antibióticos. No modelo 1, após 6 horas de crescimento em CDM na ausência e presença de 10% de plasma humano, foram adicionados os antibióticos na concentração sérica e analisada a cultivabilidade das células por contagem de CFU. No modelo 2, após as 6 horas de crescimento em 10% de plasma, procedeu-se à remoção do plasma do meio, suspensão em meio fresco sem plasma e posterior adição dos antibióticos. As barras de erro representam o desvio padrão, com um intervalo de confiança de 95%, e as diferenças estatisticamente significativas encontram-se assinaladas por asteriscos (Teste T, p < 0,05).

Uma possibilidade prende-se com o facto de que, apesar de se ter removido o plasma do meio, as proteínas do plasma provavelmente continuaram aderidas à superfície das bactérias,

opsonizando-as. Pelo facto dos fatores solúveis do plasma, incluindo as proteínas do complemento e imunoglobulinas, estarem ligados às membranas plasmáticas, para além de as fragilizarem, acabaram também por ficar menos disponíveis para se ligarem aos antibióticos, estabelecendo-se um sinergismo que conduziu à amplificação do efeito dos antibióticos.

4.9 Efeito do plasma na alteração da expressão de genes

Recentemente, foi demonstrado o papel central do plasma humano na regulação da transcrição de genes que codificam os principais fatores de virulência de *S. epidermidis*¹⁹⁹. Com base nesse facto, procedemos ao estudo da influência do plasma na alteração da expressão de genes associados à proteção da bactéria contra fatores imunitários, nomeadamente *icaA*^{66,149}, *dltA*²⁶⁰ e *sepA*¹⁵³, e adesão a proteínas humanas, neste caso o *srdG*²⁶¹, em culturas planctónicas, através da técnica qPCR. É de referir que todos os procedimentos de extração de RNA resultaram em níveis aceitáveis de contaminação proteica ($A_{260}/A_{280} > 1,8$) e que a integridade do RNA total foi avaliada através da visualização do padrão de bandas do RNA ribossomal 23S/16S. Como se pode ver na figura 4.13, o RNA extraído estava intacto, uma vez que não foi detetado *smear*, indicativo da degradação do RNA.

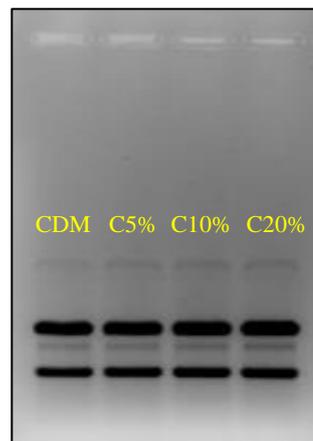


Figura 4.13. Representação da integridade do RNA, extraído de culturas planctónicas de *S. epidermidis* crescidas em CDM e em CDM com 5%, 10% e 20% de plasma humano, avaliada por visualização de um gel de 1% de agarose não desnaturante, corado com Midori Green (Nippon Genetics Europe GmbH, Alemanha).

De acordo com os nossos resultados, verificou-se uma tendência de redução da expressão dos genes na presença de plasma humano, embora não tenha sido estatisticamente

significativa (figura 4.14). Estes resultados são diferentes do que foi reportado num estudo recente que demonstrou um aumento da expressão dos genes *icaA* e *sepA*, após a incubação de biofilmes de *S. epidermidis* com 100% de plasma, sendo importante destacar que a expressão do gene *sepA* apresentou uma grande variabilidade, dependente do dador ¹⁹⁹.

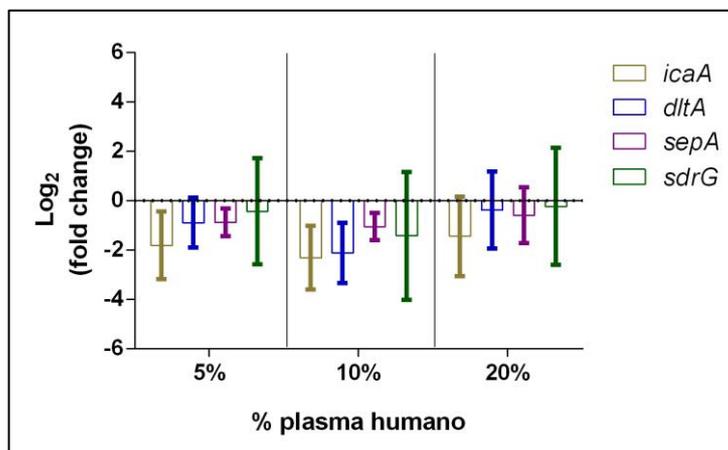


Figura 4.14. Expressão relativa dos genes *icaA*, *dltA*, *sepA* e *sdrG* de culturas planctônicas de *S. epidermidis*, crescidas em CDM na ausência e presença de 5%, 10% e 20% de plasma humano. Os valores correspondem à média e as barras de erro representam o desvio padrão, com um intervalo de confiança de 95%. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (One-way ANOVA).

O gene *sepA* codifica uma protease envolvida na evasão imunitária da bactéria, através da degradação de péptidos antimicrobianos produzidos pelo hospedeiro ¹⁵³. Em relação ao gene *dltA*, sabe-se que está associado à alteração da carga da bactéria, tornando-a mais positiva, conseqüentemente, repelindo os péptidos antimicrobianos ²⁶⁰. Da mesma forma, envolvido na evasão da bactéria ao sistema imunitário do hospedeiro, o *icaA* confere proteção contra as imunoglobulinas G, proteínas do sistema complemento, fagocitose e péptidos antimicrobianos ¹⁴⁹. Nesse sentido, como mecanismo de defesa, seria de esperar que a transcrição destes genes aumentasse na presença de plasma. É importante destacar que a tendência de redução da expressão do gene *icaA* verificada na presença de plasma é consistente com a aparente diminuição da quantidade de PNAG, observada pelas imagens de CLSM, nos biofilmes formados com plasma (ver figura 4.7). Sabendo que a PNAG funciona como uma adesina intercelular polissacarídica, permitindo a conexão entre as células, a diminuição da sua quantidade poderá ser um dos motivos subjacentes à redução da coesão dos biofilmes formados em CDM com plasma. Pela sua importância no estabelecimento da infecção, a SdrG, uma proteína de ligação ao fibrinogénio ²⁶², tem sido o MSCRAMM mais intensamente estudado de *S. epidermidis*. Foi reportado que a expressão de *sdrG* aumenta em

condições *in vivo* ¹⁵⁹. Por essa razão, na presença das proteínas do plasma, em particular, o fibrinogênio, seria de esperar um aumento na expressão de *sdrG*. A tendência observada sugere que talvez fosse necessário aumentar a concentração de plasma para se verificar um aumento da expressão destes genes. No entanto, como discutido anteriormente, devido ao efeito antimicrobiano do plasma comercial utilizado, não foi possível aumentar a concentração de plasma neste estudo. Em contrapartida, a divergência de resultados pode estar também relacionada com as diferentes condições experimentais: no nosso estudo foram usadas células planctônicas que cresceram na presença de plasma, enquanto que no estudo anterior se expôs um biofilme pré-formado a 100% plasma, durante apenas 2 horas. Por outro lado, também foi demonstrado num outro estudo que a exposição das bactérias de *S. epidermidis* a 10% de plasma resultou num aumento significativo da expressão de MSCRAMMs ¹⁹⁷, enaltecendo a hipótese relacionada com a variabilidade proveniente do dador do plasma em relação à percentagem de plasma usada.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

S. epidermidis é um dos agentes mais comuns em infecções relacionadas com dispositivos médicos, estando associado com o aumento da morbidade dos pacientes e a uma enorme carga financeira para o sistema nacional de saúde. Por essa razão, os fatores de virulência de *S. epidermidis* têm sido amplamente estudados nos últimos anos. No entanto, a maioria dos estudos foi realizada *in vitro*, utilizando meios ricos artificiais, cuja composição não reflete as condições *in vivo*, e na ausência de fatores do hospedeiro, reduzindo a sua significância clínica. Nesse sentido, o principal objetivo desta dissertação foi avaliar a influência do plasma humano na virulência de *S. epidermidis*, introduzindo os fatores do hospedeiro no modelo *in vitro* de forma a aproximá-lo das condições *in vivo*, aumentando, conseqüentemente, a relevância clínica dos resultados obtidos.

Devido ao efeito inibitório que o nosso plasma comercial mono-dador apresentou, este estudo esteve limitado à análise de uma concentração máxima de 20% de plasma. Mesmo assim, 20% de plasma foi o suficiente para alterar drasticamente o efeito da tolerância a certos antibióticos, reduzindo o efeito da vancomicina e tetraciclina e potenciando o efeito da rifampicina. É de salientar que, aparentemente, o plasma se ligou às moléculas de tetraciclina, diminuindo a sua disponibilidade e, conseqüentemente, interferindo com a sua eficácia.

Curiosamente, diferentes resultados foram obtidos em meios de cultura de diferentes marcas, salientando a importância da escolha do meio de cultura mais adequado para o estudo em questão. Além disso, a coesão dos biofilmes de *S. epidermidis* foi afetada pela presença de plasma, que mostrou interferir com a interação entre as células. Neste estudo foi também demonstrado um aumento do tamanho e complexidade das células dos biofilmes na presença de plasma, muito provavelmente devido à opsonização das bactérias com as proteínas do plasma ou talvez pela adaptação morfológica das bactérias, estimulada pela presença de fatores do hospedeiro no meio. Por último, foi verificada uma tendência de diminuição da expressão dos genes *icaA*, *dltA* e *sepA*, associados à proteção da bactéria contra fatores imunitários, bem como do gene *srdG*, envolvido na adesão a proteínas humanas, na presença de plasma.

Em suma, os nossos resultados salientam a importância de se utilizar plasma humano nas experiências laboratoriais, enfatizando a relevância da introdução dos fatores do hospedeiro nos modelos *in vitro*, de forma a melhor simular as condições *in vivo*.

Evidentemente, uma das limitações do nosso estudo residiu no facto de ter sido usado plasma proveniente de um único dador, não tendo em consideração a variabilidade

característica inerente a cada dador. Por conseguinte, futuramente seria plausível a repetição dos ensaios usando plasma de diferentes dadores, numa gama de concentrações mais alargada, bem como a utilização de proteínas do plasma numa concentração conhecida, de forma a reduzir a variabilidade dos resultados. Adicionalmente, seria interessante intensificar os estudos sobre a interação dos componentes do plasma humano nos biofilmes de *S. epidermidis*, por constituírem a maioria das causas de infeções hospitalares. Para isso, no sentido de retratar melhor o ambiente das infeções bacterianas seria importante usar plasma de pacientes infetados, tendo em consideração que as experiências deste estudo foram realizadas com plasma de um dador saudável. Por último, outras estirpes de *S. epidermidis* deveriam ser testadas, tendo em conta a conhecida variabilidade entre diferentes estirpes.

REFERÊNCIAS

1. Turner, D. The Major Transitions in Evolution Revisited. *Reports Natl. Cent. Sci. Educ.* **33**, 11.1-11.3 (2013).
2. Shapiro, J. a. Bacteria as Multicellular Organisms. *Sci. Am.* **258**, 82–89 (1988).
3. Justice, S. S., Hunstad, D. a, Cegelski, L. & Hultgren, S. J. Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 162–168 (2008).
4. Keim, C. N., Abreu, F., Lins, U., De Barros, H. L. & Farina, M. Cell organization and ultrastructure of a magnetotactic multicellular organism. *J. Struct. Biol.* **145**, 254–262 (2004).
5. Simmons, S. L. & Edwards, K. J. Unexpected diversity in populations of the many-celled magnetotactic prokaryote. *Environ. Microbiol.* **9**, 206–215 (2007).
6. Vlamakis, H., Chai, Y., Beaugregard, P., Losick, R. & Kolter, R. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 157–168 (2013).
7. Jones, B. V., Young, R., Mahenthiralingam, E. & Stickler, D. J. Ultrastructure of *Proteus mirabilis* swarmer cell rafts and role of swarming in catheter-associated urinary tract infection. *Infect. Immun.* **72**, 3941–3950 (2004).
8. Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. & Stoodley, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* **2**, 95–108. (2004).
9. Percival, S. L., McCarty, S. M. & Lipsky, B. Biofilms and Wounds: An Overview of the Evidence. *Adv. Wound Care* **4**, 373–381 (2014).
10. Burmølle, M. *et al.* Biofilms in chronic infections - A matter of opportunity - Monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **59**, 324–336 (2010).
11. Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. & Lappin-Scott, H. M. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**, 711–745 (1995).
12. Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science (80-.)*. **284**, 1318–1322 (1999).
13. O’Toole, G., Kaplan, H. B. & Kolter, R. Biofilm Formation as Microbial Development. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 49–79 (2000).
14. Barken, K. B. *et al.* Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ. Microbiol.* **10**, 2331–2343 (2008).
15. Vuong, C. *et al.* A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J. Biol. Chem.* **279**, 54881–54886 (2004).
16. Vergara-Irigaray, M. *et al.* Relevant role of fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* biofilm-associated foreign-body infections. *Infect. Immun.* **77**, 3978–3991 (2009).
17. Carvalhais, V., Cerveira, F., Vilanova, M., Cerca, N. & Vitorino, R. An immunoproteomic approach for characterization of dormancy within *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Mol. Immunol.* **65**, 429–435 (2015).
18. Bagge, N. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1175–87 (2004).
19. Otto, M. *Staphylococcus epidermidis* - the ‘accidental’ pathogen. *Building* **7**, (2009).
20. Dahlbäck, B., Hermansson, M., Kjelleberg, S. & Norkrans, B. The hydrophobicity of bacteria - An important factor in their initial adhesion at the air-water interface. *Arch. Microbiol.* **128**, 267–270 (1981).
21. Donlan, R. M. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* **8**,

- 881–890 (2002).
22. Abdallah, F. Ben, Chaieb, K., Zmantar, T., Kallel, H. & Bakhrouf, A. Adherence assays and Slime production of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Brazilian J. Microbiol.* **40**, 394–398 (2009).
 23. Nilsson, R. E., Ross, T. & Bowman, J. P. Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. *Int. J. Food Microbiol.* **150**, 14–24 (2011).
 24. Dunne, W. M. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews* **15**, 155–166 (2002).
 25. van Loosdrecht, M. C. M., Lyklema, J., Norde, W. & Zehnder, A. J. B. Bacterial adhesion: A physicochemical approach. *Microb. Ecol.* **17**, 1–15 (1989).
 26. Otto, M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med* **64**, 175–188 (2013).
 27. Patti, J. M., Allen, B. L., McGavin, M. J. & Höök, M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**, 585–617 (1994).
 28. Otto, M. Staphylococcal biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **322**, 207–228 (2008).
 29. Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M. & Hultgren, S. J. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 1–23 (2013). doi:10.1101/cshperspect.a010306
 30. Hoiby, N. *et al.* The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci* **3**, 55–65 (2011).
 31. Flemming, H. & Wingender, J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 623–33 (2010).
 32. Tielker, D. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology* **151**, 1313–1323 (2005).
 33. Branda, S. S., Chu, F., Kearns, D. B., Losick, R. & Kolter, R. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol. Microbiol.* **59**, 1229–1238 (2006).
 34. Cegelski, L. *et al.* Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 913–9 (2009).
 35. Pinkner, J. S. *et al.* Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 17897–902 (2006).
 36. Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C. & Mattick, J. S. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**, 1487 (2002).
 37. Rutherford, S. T. & Bassler, B. L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, (2012).
 38. Fuqua, W. C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density- responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology* **176**, 269–275 (1994).
 39. Schauder, S. & Bassler, B. L. The languages of bacteria. *Genes and Development* **15**, 1468–1480 (2001).
 40. Waters, C. M., Lu, W., Rabinowitz, J. D. & Bassler, B. L. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae* through modulation of cyclic Di-GMP levels and repression of *vpsT*. *J. Bacteriol.* **190**, 2527–2536 (2008).
 41. Antunes, L. C. M., Ferreira, R. B. R., Buckner, M. M. C. & Finlay, B. B. Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology* **156**, 2271–2282 (2010).
 42. Waters, C. M. & Bassler, B. L. Quorum Sensing : Communication in Bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 319–346 (2005).

43. Otto, M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Seminars in Immunopathology* **34**, 201–214 (2012).
44. Römling, U. & Balsalobre, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of Internal Medicine* **272**, 541–561 (2012).
45. Brugha, R. E. & Davies, J. C. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pathogenesis and new treatments. *Br. J. Hosp. Med. (Lond)*. **72**, 614–9 (2011).
46. Goerke, C. & Wolz, C. Adaptation of *Staphylococcus aureus* to the cystic fibrosis lung. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 520–5 (2010).
47. Høgsberg, T., Bjarnsholt, T., Thomsen, J. S. & Kirketerp-Møller, K. Success rate of split-thickness skin grafting of chronic venous leg ulcers depends on the presence of *Pseudomonas aeruginosa*: A retrospective study. *PLoS One* **6**, (2011).
48. Seth, A. K. *et al.* Understanding the host inflammatory response to wound infection: An *in vivo* study of *Klebsiella pneumoniae* in a rabbit ear wound model. *Wound Repair Regen.* **20**, 214–225 (2012).
49. Seno, Y., Kariyama, R., Mitsuhata, R., Monden, K. & Kumon, H. Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. *Acta Med. Okayama* **59**, 79–87 (2005).
50. Muder, R. R. *et al.* Isolation of *Staphylococcus aureus* from the urinary tract: association of isolation with symptomatic urinary tract infection and subsequent staphylococcal bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* **42**, 46–50 (2006).
51. Cho, S. H., Naber, K., Hacker, J. & Ziebuhr, W. Detection of the *icaADBC* gene cluster and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from catheter-related urinary tract infections. in *International Journal of Antimicrobial Agents* **19**, 570–575 (2002).
52. Bosio, S. *et al.* *Mycobacterium fortuitum* prosthetic valve endocarditis: A case for the pathogenetic role of biofilms. *Cardiovasc. Pathol.* **21**, 361–364 (2012).
53. Karchmer, A. W., Archer, G. L. & Dismukes, W. E. *Staphylococcus epidermidis* causing prosthetic valve endocarditis: Microbiologic and clinical observations as guides to therapy. *Ann. Intern. Med.* **98**, 447–455 (1983).
54. Guhlman A, Brecht-Krauss D, Sugar G, Glatting G, Kotzerke J, Kinzi L, Reske, S. N. Chronic Osteomyelitis : Detection with FDG PET and correlation with histopathologic findings. *Radiology* **206**, 749–753 (1998).
55. Suzuki, T. A new target for *Staphylococcus aureus* associated with keratitis. *Cornea* **30 Suppl 1**, S34-40 (2011).
56. Goodman, D. F. & Gottsch, J. D. Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* keratitis treated with vancomycin. *Arch Ophthalmol* **106**, 1570–1571 (1988).
57. Fleiszig, S. M. J. & Evans, D. J. The pathogenesis of bacterial keratitis: Studies with *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical and Experimental Optometry* **85**, 271–278 (2002).
58. Coates, R., Moran, J. & Horsburgh, M. J. Staphylococci: Colonizers and Pathogens of Human Skin. *Future Microbiol.* **9**, 75–91 (2014).
59. Rosenthal, V. D. *et al.* International Nosocomial Infection Control Consortium report, data summary for 2002-2007, issued January 2008. *Am. J. Infect. Control* **36**, 627–637 (2008).
60. Deurenberg, R. H. & Stobberingh, E. E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution* **8**, 747–763 (2008).
61. Morfin-Otero, R., Martínez-Vázquez, M. A., López, D., Rodríguez-Noriega, E. & Garza-González, E. Isolation of rare coagulase-negative isolates in immunocompromised patients: *Staphylococcus gallinarum*, *Staphylococcus pettenkoferi* and *Staphylococcus pasteurii*. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **42**, 182–185 (2012).
62. Rogers, K. L., Fey, P. D. & Rupp, M. E. Coagulase-Negative Staphylococcal

- Infections. *Infectious Disease Clinics of North America* **23**, 73–98 (2009).
63. Uçkay, I. *et al.* Foreign body infections due to *Staphylococcus epidermidis*. *Ann.Med.* **41**, 109–119 (2009).
 64. McCann, M. T., Gilmore, B. F. & Gorman, S. P. *Staphylococcus epidermidis* device-related infections: pathogenesis and clinical management. *J. Pharm. Pharmacol.* **60**, 1551–1571 (2008).
 65. Cerca, N. *et al.* Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 331–336 (2005).
 66. Vuong, C. *et al.* Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell. Microbiol.* **6**, 269–275 (2004).
 67. Vuong, C. & Otto, M. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and Infection* **4**, 481–489 (2002).
 68. Vuong, C., Gerke, C., Somerville, G. a, Fischer, E. R. & Otto, M. Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Infect. Dis.* **188**, 706–718 (2003).
 69. Vuong, C. *et al.* Regulated expression of pathogen-associated molecular pattern molecules in *Staphylococcus epidermidis*: Quorum-sensing determines pro-inflammatory capacity and production of phenol-soluble modulins. *Cell. Microbiol.* **6**, 753–759 (2004).
 70. Mehlin, C., Headley, C. M. & Klebanoff, S. J. An inflammatory polypeptide complex from *Staphylococcus epidermidis*: isolation and characterization. *J. Exp. Med.* **189**, 907–18 (1999).
 71. Wang, R. *et al.* Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nat. Med.* **13**, 1510–4 (2007).
 72. Wang, R. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 238–248 (2011).
 73. Mack, D., Horstkotte, M.A., Rohde, H., and Knobloch, J. K. M. Coagulase-negative Staphylococci. In *Biofilms, Infection and Antimicrobial Therapy*. (ed. Pace, John; Rupp, Mark; Finch, R.) CRC Press, Taylor and Francis, Boca Raton, 109–153 (2006).
 74. O’Gara, J. P. *ica* and beyond: Biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters* **270**, 179–188 (2007).
 75. Arciola, C. R., Campoccia, D., Ravaioli, S. & Montanaro, L. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **5**, 7 (2015).
 76. Kogan, G., Sadovskaya, I., Chaignon, P., Chokr, A. & Jabbouri, S. Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin. *FEMS Microbiol. Lett.* **255**, 11–16 (2006).
 77. Hussain, M., Herrmann, M., Von Eiff, C., Perdreau-Remington, F. & Peters, G. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect. Immun.* **65**, 519–524 (1997).
 78. Bowden, M. G. *et al.* Identification and preliminary characterization of cell-wall-anchored proteins of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **151**, 1453–1464 (2005).
 79. Tormo, M. Á., Knecht, E., Götz, F., Lasa, I. & Penadés, J. R. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: Evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology* **151**, 2465–2475 (2005).

80. Rohde, H. *et al.* Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol. Microbiol.* **55**, 1883–1895 (2005).
81. Rohde, H. *et al.* Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* **28**, 1711–1720 (2007).
82. Rohde, H. *et al.* Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 5614–5619 (2004).
83. Mazmanian, S. K. *Staphylococcus aureus* Sortase, an Enzyme that Anchors Surface Proteins to the Cell Wall. *Science* (80-). **285**, 760–763 (1999).
84. Navarre, W. W. & Schneewind, O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 174–229 (1999).
85. Bazaka, K., Crawford, R. J., Nazarenko, E. L. & Ivanova, E. P. Bacterial extracellular polysaccharides. *Adv. Exp. Med. Biol.* **715**, 213–226 (2011).
86. Gross, M., Cramton, S. E., Götz, F. & Peschel, A. Key Role of Teichoic Acid Net Charge in *Staphylococcus aureus* Colonization of Artificial Surfaces. *Infect. Immun.* **69**, 3423–2426 (2001).
87. Weidenmaier, C. *et al.* Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nat. Med.* **10**, 243–245 (2004).
88. Weidenmaier, C. & Peschel, A. Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nat.Rev.Microbiol.* **6**, 276–287 (2008).
89. Hussain, M., Heilmann, C., Peters, G. & Herrmann, M. Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized fibronectin. *Microb. Pathog.* **31**, 261–70 (2001).
90. Teufel, P. & Gotz, F. Characterization of an extracellular metalloprotease with elastase activity from *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol.* **175**, 4218–4224 (1993).
91. Ohara-Nemoto, Y. *et al.* Characterization and molecular cloning of a glutamyl endopeptidase from *Staphylococcus epidermidis*. *Microb. Pathog.* **33**, 33–41 (2002).
92. Dubin, G. *et al.* Molecular cloning and biochemical characterisation of proteases from *Staphylococcus epidermidis*. *Biol. Chem.* **382**, 1575–1582 (2001).
93. Donlan, R. M. & Costerton, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin.Microbiol. Rev.* **15**, 167–19 (2002).
94. Larsen, T. & Fiehn, N. E. Resistance of *Streptococcus sanguis* biofilms to antimicrobial agents. *APMIS* **104**, 280–284 (1996).
95. Ceri, H. *et al.* The Calgary Biofilm Device: New technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1771–1776 (1999).
96. Stewart, P. S. & Costerton, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**, 135–138 (2001).
97. Schmidt, S., Wallbrecher, R., van Kuppevelt, T. H. & Brock, R. Methods to Study the Role of the Glycocalyx in the Uptake of Cell-Penetrating Peptides. In *Cell-Penetrating Peptides: Methods and Protocols* (ed. Langel, Ü.) Springer New York, 123–131, (2015).
98. Arciola, C. R. *et al.* Antibiotic resistance in exopolysaccharide-forming *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from orthopaedic implant infections. *Biomaterials* **26**, 6530–6535 (2005).

99. Campoccia, D., Montanaro, L., Speziale, P. & Arciola, C. R. Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use. *Biomaterials* **31**, 6363–6377 (2010).
100. Davies, J. & Davies, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 417–433 (2010).
101. Nikaido, H. Multidrug resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 119–146 (2009).
102. Thallinger, B., Prasetyo, E. N., Nyanhongo, G. S. & Guebitz, G. M. Antimicrobial enzymes: An emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. *Biotechnol. J.* **8**, 97–109 (2013).
103. Kester, J. C. & Fortune, S. M. Persisters and beyond: mechanisms of phenotypic drug resistance and drug tolerance in bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **49**, 91–101 (2014).
104. Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S. & Ciofu, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* **35**, 322–332 (2010).
105. Boles, B. R. & Singh, P. K. Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 12503–12508 (2008).
106. Driffield, K., Miller, K., Bostock, J. M., O’neill, A. J. & Chopra, I. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, 1053–1056 (2008).
107. Conibear, T. C. R., Collins, S. L. & Webb, J. S. Role of mutation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *PLoS One* **4**, (2009).
108. Rani, S. A. *et al.* Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. *J. Bacteriol.* **189**, 4223–4233 (2007).
109. Cerca, F. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* biofilms with higher proportions of dormant bacteria induce a lower activation of murine macrophages. *J. Med. Microbiol.* **60**, 1717–1724 (2011).
110. Kaprelyants, A. S., Gottschal, J. C. & Kell, D. B. Dormancy in non-sporulating bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **104**, 271–285 (1993).
111. Lewis, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 48–56 (2007).
112. Williamson, K. S. *et al.* Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms includes expression of ribosome hibernation factors in the antibiotic-tolerant subpopulation and hypoxia-induced stress response in the metabolically active population. *J. Bacteriol.* **194**, 2062–2073 (2012).
113. Kim, J., Hahn, J.S., Franklin, M.J., Stewart, P.S., Yoon, J. Tolerance of dormant and active cells in *Pseudomonas aeruginosa* PA01 biofilm to antimicrobial agents. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**, (2009).
114. Shapiro, J. A., Nguyen, V. L. & Chamberlain, N. R. Evidence for persisters in *Staphylococcus epidermidis* RP62a planktonic cultures and biofilms. *J. Med. Microbiol.* **60**, 950–960 (2011).
115. Cerca, F., França, A., Perez-Cabezas, B., Carvalhais, V., Ribeiro, A., Azeredo, J., Pier, G.B., Cerca, N., Vilanova, M. Dormant bacteria within *Staphylococcus epidermidis* biofilms have low inflammatory properties and maintain tolerance to vancomycin and penicillin after entering planktonic growth. *J. Med. Microbiol.* **63**, 1274–1283 (2014).
116. Lewis, K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Moscow)* **70**, 267–274 (2005).
117. De la Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Fernández, L. & Hancock, R. E. W. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: Antibiotic resistance and new

- therapeutic strategies. *Curr. Opin. Microbiol.* **16**, 580–589 (2013).
118. Bigger, J. W. Treatment of staphylococcal infections with penicillin. *Lancet* **244**, 497–500 (1944).
 119. Brooun, A., Liu, S. & Lewis, K. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 640–646 (2000).
 120. Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N. & Lewis, K. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**, 8172–8180 (2004).
 121. Yao Y, Sturdevant DE, O. M. Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms. *J Infect Dis* **191(2)**, 289–298 (2005).
 122. Diekema, D. J. *et al.* Survey of Infections Due to Staphylococcus Species: Frequency of Occurrence and Antimicrobial Susceptibility of Isolates Collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific Region for the SENTRY Antimicrobial Surveillanc. *Clin Infect Dis* **29**, 595–607 (1999).
 123. Chambers HF Hartman BJ, T. A. Increased amounts of a novel penicillin binding protein in a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* **76**, 325–331. (2005).
 124. Miragaia, M. *et al.* Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones: Evidence of geographic dissemination. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 430–438 (2002).
 125. Raad, I., Hanna, H. & Maki, D. Intravascular catheter-related infections: advances in diagnosis, prevention, and management. *Lancet Infect.Dis.* **7**, 645–657 (2007).
 126. Schwalbe, R. S., Stapleton, J. T. & Gilligan, P. H. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. *N. Engl. J. Med.* **316**, 927–931 (1987).
 127. Biavasco, F., Vignaroli, C. & Varaldo, P. E. Glycopeptide resistance in coagulase-negative staphylococci. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* **19**, 403–417 (2000).
 128. Gazzola, S. & Cocconcetti, P. S. Vancomycin heteroresistance and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* from food. *Microbiology* **154**, 3224–3231 (2008).
 129. Gillespie, S. H. Antibiotic resistance in the absence of selective pressure. *International Journal of Antimicrobial Agents* **17**, 171–176 (2001).
 130. Willmott, C. J. R. & Maxwell, A. A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 126–127 (1993).
 131. Schmitz, F. J. *et al.* Characterization of *grlA*, *grlB*, *gyrA* and *gyrB* mutations in 116 unrelated isolates of *Staphylococcus aureus* and effects of mutations on ciprofloxacin MIC. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 1249–1252 (1998).
 132. Udo, E. E. & Dashti, A. A. Detection of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in staphylococci by polymerase chain reaction and dot blot hybridization. *Int. J. Antimicrob. Agents* **13**, 273–279 (2000).
 133. Ardic, N., Ozyurt, M., Sareyyupoglu, B. & Haznedaroglu, T. Investigation of erythromycin and tetracycline resistance genes in methicillin-resistant staphylococci. *Int. J. Antimicrob. Agents* **26**, 213–218 (2005).
 134. Trieu-cuot, P. *et al.* Study of Heterogeneity of Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) Genes in Streptococci and Enterococci by Polymerase Chain Reaction : Characterization of a New CAT Determinant. **37**, 2593–2598 (1993).
 135. Westh, H., Hougaard, D. M., Vuust, J. & Rosdahl, V. T. *erm* genes in erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *APMIS* **103**,

- 225–232 (1995).
136. Petrelli, D. *et al.* Analysis of different genetic traits and their association with biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from central venous catheter infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **25**, 773–781 (2006).
 137. Bhalerao, D. S., Kinikar, A. G., Roushani, S. B. & Saini, S. Prevalence of inducible clindamycin resistance among Staphylococcal isolates in a rural tertiary care hospital. *Biomed.* **33**, 196–199 (2013).
 138. Roberts, M. C. *et al.* Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 2823–2830 (1999).
 139. Sköld, O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist. Updat.* **3**, 155–160 (2000).
 140. Valle, J., Solano, C., García, B., Toledo-Arana, A. & Lasa, I. Biofilm switch and immune response determinants at early stages of infection. *Trends in Microbiology* **21**, 364–371 (2013).
 141. Eduardo Coelho Andrade Rua Botucatu, L. *et al.* ARTIGO DE REVISÃO Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev Bras Reum.* **50**, 434–61 (2010).
 142. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P & Janeway CA Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394–397 (1997).
 143. Peters, G., Locci, R. & Pulverer, G. Microbial colonization of prosthetic devices. II. Scanning electron microscopy of naturally infected intravenous catheters. *Zentralbl.Bakteriol.Mikrobiol.Hyg.[B]* **173**, 293–299 (1981).
 144. Johnson, G. M. *et al.* Interference with granulocyte function by *Staphylococcus epidermidis* slime. *Infect. Immun.* **54**, 13–20 (1986).
 145. Otto, M. Bacterial evasion of antimicrobial peptides by biofilm formation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **306**, 251–258 (2006).
 146. Aarag Fredheim, E. G. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin activates complement. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **63**, 269–280 (2011).
 147. Stevens, N. T. *et al.* *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin induces IL-8 expression in human astrocytes via a mechanism involving TLR2. *Cell. Microbiol.* **11**, 421–432 (2009).
 148. Cerca, N., Jefferson, K. K., Oliveira, R., Pier, G. B. & Azeredo, J. Comparative antibody-mediated phagocytosis of *Staphylococcus epidermidis* cells grown in a biofilm or in the planktonic state. *Infect. Immun.* **74**, 4849–4855 (2006).
 149. Kristian, S. A. *et al.* Biofilm Formation Induces C3a Release and Protects *Staphylococcus epidermidis* from IgG and Complement Deposition and from Neutrophil-Dependent Killing. *J. Infect. Dis.* **197**, 1028–1035 (2008).
 150. Clark, L. A. & Easmon, C. S. F. Opsonic requirements of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Med. Microbiol.* **22**, 1–7 (1986).
 151. Kocianova, S. *et al.* Key role of poly-gamma-DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Invest* **115**, 688–694 (2005).
 152. Fey, P. D. & Olson, M. E. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiol.* **5**, 917–933 (2010).
 153. Lai, Y. *et al.* The human anionic antimicrobial peptide dermcidin induces proteolytic defence mechanisms in staphylococci. *Mol. Microbiol.* **63**, 497–506 (2007).
 154. McBain, A. J. *In Vitro* Biofilm Models. An Overview in *Advances in Applied Microbiology* **69**, 99–132 (2009).
 155. Coenye, T. & Nelis, H. J. *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm

- formation. *J. Microbiol. Methods* **83**, 89–105 (2010).
156. Friedman, L. & Kolter, R. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol. Microbiol.* **51**, 675–690 (2004).
 157. Heilmann, C., Gerke, C., Perdreau-Remington, F. & Götz, F. Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. *Infect. Immun.* **64**, 277–282 (1996).
 158. Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M. & Romling, U. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol. Microbiol.* **53**, 1123–1134 (2004).
 159. Sellman, B. R. *et al.* Expression of *Staphylococcus epidermidis* SdrG increases following exposure to an *in vivo* environment. *Infect. Immun.* **76**, 2950–2957 (2008).
 160. Cheung, A. L., Bayer, A. S., Zhang, G., Gresham, H. & Xiong, Y. Q. Regulation of virulence determinants *in vitro* and *in vivo* in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* (2004).
 161. Joo, H. S. & Otto, M. Molecular basis of *in vivo* biofilm formation by bacterial pathogens. *Chem. Biol.* **19**, 1503–1513 (2012).
 162. Sciencedirect, S. & Behaviour, A. Guidelines for the treatment of animals in behavioural research and teaching. *Anim. Behav.* **111**, I–IX (2016).
 163. An, Y.H., Hill, C.M., Friedman, R. J. *Animal models of orthopaedic implant infection.* (Cambridge University Press, 2003).
 164. Mylonakis, E., Casadevall, A. & Ausubel, F. M. Exploiting amoeboid and non-vertebrate animal model systems to study the virulence of human pathogenic fungi. *PLoS Pathogens* **3**, 0859–0865 (2007).
 165. Kim, D. Studying host-pathogen interactions and innate immunity in *Caenorhabditis elegans*. *Dis. Model. Mech.* **1**, 205–208 (2008).
 166. Peleg, A. Y. *et al.* Reduced susceptibility to vancomycin influences pathogenicity in *Staphylococcus aureus* infection. *J. Infect. Dis.* **199**, 532–6 (2009).
 167. Gao, W. *et al.* Two novel point mutations in clinical *Staphylococcus aureus* reduce linezolid susceptibility and switch on the stringent response to promote persistent infection. *PLoS Pathog.* **6**, (2010).
 168. Konkel, M. E. & Tilly, K. Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. *Microbes Infect.* **2**, 157–166 (2000).
 169. García-Lara, J., Needham, A. J. & Foster, S. J. Invertebrates as animal models for *Staphylococcus aureus* pathogenesis: A window into host-pathogen interaction. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **43**, 311–323 (2005).
 170. Kavanagh, K. & Reeves, E. P. Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**, 101–112 (2004).
 171. Peleg, A. Y. *et al.* *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 2605–2609 (2009).
 172. Mylonakis, E. *et al.* *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect. Immun.* **73**, 3842–3850 (2005).
 173. Rowan, R., Moran, C., McCann, M. & Kavanagh, K. Use of *Galleria mellonella* larvae to evaluate the *in vivo* anti-fungal activity of [Ag₂(mal)(phen)₃]. *BioMetals* **22**, 461–467 (2009).
 174. Coughlan, A., Scanlon, K., Mahon, B. P. & Towler, M. R. Zinc and silver glass polyalkenoate cements: An evaluation of their antibacterial nature. *Biomed. Mater. Eng.* **20**, 99–106 (2010).
 175. Perel, P. *et al.* Comparison of treatment effects between animal experiments and

- clinical trials: systematic review. *BMJ* **334**, 197 (2007).
176. Sena, E. S., Bart van der Worp, H., Bath, P. M. W., Howells, D. W. & Macleod, M. R. Publication bias in reports of animal stroke studies leads to major overstatement of efficacy. *PLoS Biol.* **8**, (2010).
 177. Mahan, V. L. Clinical Trial Phases. *Int. J. Clin. Med.* **5**, 1374–1383 (2014).
 178. Skolnick, B. E. *et al.* A clinical trial of progesterone for severe traumatic brain injury. *N. Engl. J. Med.* **371**, 2467–76 (2014).
 179. Rupp, Luke D. Handke, M. E. *In Vivo* Models for the Study of Biomaterial- Associated Infection by *Biofilm-Forming Staphylococci*. 289-303 (2009).
 180. Vaudaux, P. *et al.* Host Factors Selectively Increase Staphylococcal Adherence on Inserted Catheters: A Role for Fibronectin and Fibrinogen or Fibrin. *J. Infect. Dis.* **160**, 865–875 (1989).
 181. Muller, E., Takeda, S., Goldmann, D. A. & Pier, G. B. Blood proteins do not promote adherence of coagulase-negative staphylococci to biomaterials. *Infect. Immun.* **59**, 3323–3326 (1991).
 182. Kleinschmidt, S., Huygens, F., Faoagali, J., Rathnayake, I. U. & Hafner, L. M. *Staphylococcus epidermidis* as a cause of bacteremia. *Future Microbiol.* **10**, 1859–1879 (2015).
 183. Khashu, M. Persistent Bacteremia and Severe Thrombocytopenia Caused by Coagulase-Negative Staphylococcus in a Neonatal Intensive Care Unit. *Pediatrics* **117**, 340–348 (2006).
 184. Bender J. W., H. W. T. Fatal *Staphylococcus epidermidis* sepsis following bone marrow transplantation. *Johns Hopkins Med. J.* **146**, 13–15 (1980).
 185. Kilgore, M. & Brossette, S. Cost of bloodstream infections. *Am. J. Infect. Control* **36**, (2008).
 186. França, Â. *et al.* Alterations in the *Staphylococcus epidermidis* biofilm transcriptome following interaction with whole human blood. *Pathog. Dis.* **70**, 444–448 (2014).
 187. Bjarnsholt, T. *et al.* The *in vivo* biofilm. *Trends in Microbiology* **21**, 466–474 (2013).
 188. Wagner, C., Aytac, S. & Maria Hänsch, G. Biofilm growth on implants: Bacteria prefer plasma coats. *Int. J. Artif. Organs* **34**, 811–817 (2011).
 189. Herrmann, M. *et al.* Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J. Infect. Dis.* **158**, 693–701 (1988).
 190. Fallis, A. . *Junqueira's Basic Histology. Journal of Chemical Information and Modeling* **53**, (2013).
 191. Burnouf, T. Modern Plasma Fractionation. *Transfus. Med. Rev.* **21**, 101–117 (2007).
 192. Wade, C. *et al.* Loss of Protein, Immunoglobulins, and Electrolytes in Exudates From Negative Pressure Wound Therapy. *Nutr. Clin. Pract.* **25**, 510–516 (2010).
 193. Igarashi, Y. *et al.* Analysis of nasal secretions during experimental rhinovirus upper respiratory infections. *J. Allergy Clin. Immunol.* **92**, 722–731 (1993).
 194. Henderson, J. M. *et al.* Analysis of Twenty-three plasma proteins in ascites. The depletion of fibrinogen and plasminogen. *Ann. Surg.* **192**, 738–42 (1980).
 195. Miller, G. J. *et al.* Haemostatic factors in human peripheral afferent lymph. *Thromb. Haemost.* **83**, 427–432 (2000).
 196. Chang, P., Aronson, D. L., Borenstein, D. G. & Kessler, C. M. Coagulant proteins and thrombin generation in synovial fluid: A model for extravascular coagulation. *Am. J. Hematol.* **50**, 79–83 (1995).
 197. Cardile, A. P. *et al.* Human plasma enhances the expression of Staphylococcal microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules promoting biofilm formation and increases antimicrobial tolerance *in vitro* . *BMC Res. Notes* **7**,

- (2014).
198. Watters, C. M., Burton, T., Kirui, D. K. & Millenbaugh, N. J. Enzymatic degradation of *in vitro* *Staphylococcus aureus* biofilms supplemented with human plasma. *Infect. Drug Resist.* **9**, 71–78 (2016).
 199. França, A. & Cerca, N. Plasma is the main regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilms virulence genes transcription in human blood. *Pathog. Dis.* **74**, (2016).
 200. Arora, M. Cell Culture Media: A Review. (2016). at <<https://www.labome.com/method/Cell-Culture-Media-A-Review.html>>
 201. Merino, N. *et al.* Protein A-mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **191**, 832–843 (2009).
 202. Shanks, R. M. Q. *et al.* Heparin Stimulates *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. *J. Med. Microbiol.* **73**, 4596–4606 (2005).
 203. Shanks, R. M. Q. *et al.* Genetic evidence for an alternative citrate-dependent biofilm formation pathway in *Staphylococcus aureus* that is dependent on fibronectin binding proteins and the grars two-component regulatory system. *Infect. Immun.* **76**, 2469–2477 (2008).
 204. Luong, T. T., Lei, M. G. & Lee, C. Y. *Staphylococcus aureus* Rbf activates biofilm formation *in vitro* and promotes virulence in a murine foreign body infection model. *Infect. Immun.* **77**, 335–340 (2009).
 205. Craigen, B., Dashiff, A. & Kadouri, D. E. The Use of Commercially Available Alpha-Amylase Compounds to Inhibit and Remove *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Open Microbiol. J.* **5**, 21–31 (2011).
 206. Nowakowska, J., Griesser, H. J., Textor, M., Landmann, R. & Khanna, N. Antimicrobial properties of 8-hydroxyserrulat-14-en-19-oic acid for treatment of implant-associated infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 333–342 (2013).
 207. Bui, L. M. G., Hoffmann, P., Turnidge, J. D., Zilm, P. S. & Kidd, S. P. Prolonged growth of a clinical *Staphylococcus aureus* strain selects for a stable small-colony-variant cell type. *Infect. Immun.* **83**, 470–481 (2015).
 208. Sapp, A. M. *et al.* Contribution of the nos-pdt operon to virulence phenotypes in methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **9**, (2014).
 209. Kaiser, J. C., Omer, S., Sheldon, J. R., Welch, I. & Heinrichs, D. E. Role of BrnQ1 and BrnQ2 in branched-chain amino acid transport and virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **83**, 1019–1029 (2015).
 210. Stingley, R. L., Liu, H., Mullis, L. B., Elkins, C. A. & Hart, M. E. *Staphylococcus aureus* toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) production and *Lactobacillus* species growth in a defined medium simulating vaginal secretions. *J. Microbiol. Methods* **106**, 57–66 (2014).
 211. Zhang, J., Reddy, J., Buckland, B. & Greasham, R. Toward consistent and productive complex media for industrial fermentations: Studies on yeast extract for a recombinant yeast fermentation process. *Biotechnol. Bioeng.* **82**, 640–652 (2003).
 212. Sørensen, J. L. & Sondergaard, T. E. InternationaSørensen, J.L. & Sondergaard, T.E., The effects of different yeast extracts on secondary metabolite production in *Fusarium*. *Int. J. Food Microbiol.* **170**, 55–60 (2014).
 213. Fu, X., Wei, D. & Tong, W. Effect of yeast extract on the expression of thioredoxin – human parathyroid hormone from recombinant *Escherichia coli*. **1871**, 1866–1871 (2006).
 214. Nagle, S. C. A Chemically Defined Medium for Growth of Animal Cells in Suspension. *Appl Microbiol* **16**, 53–5 (1968).
 215. Stoll, T. S., Mühlethaler, K., Von Stockar, U. & Marison, I. W. Systematic improvement of a chemically-defined protein-free medium for hybridoma growth and

- monoclonal antibody production. *J. Biotechnol.* **45**, 111–123 (1996).
216. Mary Jo Zimbro, B.S., MT (ASCP), David A. Power, Ph.D., Sharon M. Miller, B.S., MT (ASCP), George E. Wilson, MBA, B.S., MT (ASCP), Julie A. Johnson, B. A. Manual of Microbiological Culture Media. Difco & BB (2003). at <http://www.unicolmayor.edu.co/recursos_user/portal/rec/arc_1158.pdf>
 217. Cafiso, V. *et al.* Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 1081–1088 (2004).
 218. Hussain, M., Hastings, J. G. M. & White, P. J. A chemically defined medium for slime production by coagulase-negative staphylococci. *J. Med. Microbiol.* **34**, 143–147 (1991).
 219. Unit, M. *In vitro* studies of haemolysis by some staphylococci grown in chemically defined media. (1989).
 220. Toledo-arana, A. *et al.* *Staphylococcus aureus* Develops an Alternative , *ica*-Independent Biofilm in the Absence of the *arlRS* Two-Component System. **187**, 5318–5329 (2005).
 221. Vitko, N. P. & Richardson, A. R. Laboratory maintenance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Curr. Protoc. Microbiol.* 1–14 (2013).
 222. Bui, L. M. G. *Staphylococcus aureus* : stress response and its roles in pathogenesis. Ph.D. Thesis. University of Adelaide, School of Biological Sciences, (2015).
 223. Lincoln, R. A., Leigh, J. A. & Jones, N. C. The amino acid requirements of *Staphylococcus aureus* isolated from cases of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* **45**, 275–279 (1995).
 224. Sadaka, A., Palmer, K., Suzuki, T. & Gilmore, M. S. *In vitro* and *in vivo* models of *Staphylococcus aureus* endophthalmitis implicate specific nutrients in ocular infection. *PLoS One* **9**, (2014).
 225. Socransky, S. S., Dzink, J. L. & Smith, C. M. Chemically defined medium for oral microorganisms. *J. Clin. Microbiol.* **22**, 303–305 (1985).
 226. Ramsey, M. M., Freire, M. O., Gabriliska, R. A., Rumbaugh, K. P. & Lemon, K. P. *Staphylococcus aureus* Shifts toward Commensalism in Response to *Corynebacterium* Species. *Front. Microbiol.* **7**, 1230 (2016).
 227. Pöther, D. C. *et al.* Distribution and infection-related functions of bacillithiol in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* **303**, 114–123 (2013).
 228. Pöther, D. C. *et al.* Diamide triggers mainly S thiolations in the cytoplasmic proteomes of *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **191**, 7520–7530 (2009).
 229. Gertz, S. *et al.* Regulation of sigma(B)-dependent transcription of *sigB* and *asp23* in two different *Staphylococcus aureus* strains. *Mol. Gen. Genet.* **261**, 558–566 (1999).
 230. Cerca, N., Pier, G. B., Vilanova, M., Oliveira, R. & Azeredo, J. Influence of batch or fed-batch growth on *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *Lett. Appl. Microbiol.* **39**, 420–424 (2004).
 231. Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B. & Svabic-Vlahovic, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* **40**, 175–179 (2000).
 232. Freitas, A. I., Vasconcelos, C., Vilanova, M. & Cerca, N. Optimization of an automatic counting system for the quantification of *Staphylococcus epidermidis* cells in biofilms. *J. Basic Microbiol.* **54**, 750–757 (2014).
 233. França, Â., Freitas, A. I., Henriques, A. F. & Cerca, N. Optimizing a qPCR gene expression quantification assay for *S. epidermidis* biofilms: A comparison between commercial kits and a customized protocol. *PLoS One* **7**, (2012).
 234. Tavares, L., Alves, P. M., Ferreira, R. B. & Santos, C. N. Comparison of different

- methods for DNA-free RNA isolation from SK-N-MC neuroblastoma. *BMC Res. Notes* **4**, 3 (2011).
235. Kubista, M. *et al.* The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* **27**, 95–125 (2006).
 236. Sousa, C., França, Â. & Cerca, N. Assessing and reducing sources of gene expression variability in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Biotechniques* **57**, 295–301 (2014).
 237. Pfaffl, M. Quantification strategies in real-time PCR Michael W . Pfaffl. *A-Z Quant. PCR* 87–112 (2004).
 238. Cancelas, J. A. & Rugg, N. Plasma Protein Timings: Relative Contributions of Storage Time, Donor Age and Donation Season. *EBioMedicine* **12**, 32–33 (2016).
 239. Gonçalves, V. Survival of *Staphylococcus epidermidis* biofilm-released cells in human blood and plasma. (University of Minho, Braga, Portugal, 2016).
 240. Fields, B. N., Knipe, D. M. & Howley, P. M. *Fields Virology, 5th Edition. Fields Virology* **2**, (2007).
 241. Oliveira, F., Lima, C. A., Brás, S., França, Â. & Cerca, N. Evidence for inter- and intraspecies biofilm formation variability among a small group of coagulase-negative staphylococci. *FEMS Microbiol. Lett.* **362**, (2015).
 242. França, Â., Carvalhais, V., Vilanova, M., Pier, G. B. & Cerca, N. Characterization of an *in vitro* fed-batch model to obtain cells released from *S. epidermidis* biofilms. *AMB Express* **6**, 23 (2016).
 243. Doern, G. V., Tubert, T. A., Chapin, K. & Rinaldi, M. G. Effect of medium composition on results of macrobroth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. *J. Clin. Microbiol.* **24**, 507–511 (1986).
 244. Annous, B. A. & Kozempel, M. F. Influence of Growth Medium on Thermal Resistance of *Pediococcus sp.* NRRL 8-2354 (Formerly *Micrococcus freudenreichii*) in Liquid Foods. *J. Food Prot.* **61**, 578–581 (1998).
 245. Ishii, M., Matsumoto, Y. & Sekimizu, K. Compounds in a particular production lot of tryptic soy broth inhibit *Staphylococcus aureus* cell growth. *Drug Discov. Ther.* **9**, 178–183 (2015).
 246. Bos, R., Van Der Mei, H. C. & Busscher, H. J. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - Its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews* **23**, 179–229 (1999).
 247. Dunne, W. M. & Burd, E. M. Fibronectin and proteolytic fragments of fibronectin interfere with the adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to plastic. *J. Appl. Bacteriol.* **74**, 411–416 (1993).
 248. Galliani, S., Viot, M., Cremieux, A. & Vanderauwera, P. Early adhesion of bacteremic strains of *Staphylococcus epidermidis* to polystyrene, influence of hydrophobicity, slime production, plasma, albumin, fibrinogen, and fibronectin. *J. Lab. Clin. Med.* **123**, 685–692 (1994).
 249. Linnes, J. C., Mikhova, K. & Bryers, J. D. Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to biomaterials is inhibited by fibronectin and albumin. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **100 A**, 1990–1997 (2012).
 250. Hartford, O., O'Brien, L., Schofield, K., Wells, J. & Foster, T. J. The Fbe (SdrG) protein of *Staphylococcus epidermidis* HB promotes bacterial adherence to fibrinogen. *Microbiology* **147**, 2545–2552 (2001).
 251. Schroeder, A. C. *et al.* Influence of fibronectin on the adherence of *Staphylococcus epidermidis* to coated and uncoated intraocular lenses. *J. Cataract Refract. Surg.* **34**, 497–504 (2008).
 252. Ibrahim, S. F. & Van Den Engh, G. Flow cytometry and cell sorting. in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **106**, 19–39 (2007).

253. May, L., Klein, E. Y., Rothman, R. E. & Laxminarayan, R. Trends in antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci in the United States, 1999 to 2012. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 1404–1409 (2014).
254. Udekwo, K. I., Parrish, N., Ankomah, P., Baquero, F. & Levin, B. R. Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**, 745–757 (2009).
255. Soriano, F., Santamaría, M., Ponte, C., Castilla, C. & Fernández-Roblas, R. *In vivo* significance of the inoculum effect of antibiotics on *Escherichia coli*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **7**, 410–412 (1988).
256. LaPlante, K. L. & Rybak, M. J. Impact of high-inoculum *Staphylococcus aureus* on the activities of nafcillin, vancomycin, linezolid, and daptomycin, alone and in combination with gentamicin, in an in vitro pharmacodynamic model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 4665–4672 (2004).
257. Garrod, L. P. & Waterworth, P. M. Effect of medium composition on the apparent sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* to gentamicin. *J. Clin. Pathol.* **22**, 534–538 (1969).
258. Baudoux, P. *et al.* Combined effect of pH and concentration on the activities of gentamicin and oxacillin against *Staphylococcus aureus* in pharmacodynamic models of extracellular and intracellular infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**, 246–253 (2007).
259. Zeitlinger, M. A. *et al.* Protein binding: Do we ever learn? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55**, 3067–3074 (2011).
260. Peschel, A. *et al.* Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem.* **274**, 8405–8410 (1999).
261. Nilsson, M. *et al.* A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **66**, 2666–73 (1998).
262. McCrea, K. W. *et al.* The serine-aspartate repeat (Sdr) protein family in *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* **146**, 1535–1546 (2000).