

Gisela Patrícia Neto Magalhães Pinto

Biofilmes e Feridas Crónicas

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2016

Gisela Patrícia Neto Magalhães Pinto

Biofilmes e Feridas Crónicas

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2016

Gisela Patrícia Neto Magalhães Pinto

Biofilmes e Feridas Crônicas

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Resumo

As feridas crónicas são um problema de saúde relevante em todo o mundo. Para garantir a cicatrização é necessário controlar fatores como a infeção a relevância dos biofilmes e o papel destes na cicatrização. Os biofilmes funcionam como sistemas biológicos formados por comunidades de microrganismos agregados, organizados e funcionais embebidos numa matriz exopolissacarídica. A formação de um biofilme ocorre geralmente em várias etapas consecutivas.

A resistência antimicrobiana tornou-se uma das mais eminentes ameaças para a saúde global e uma preocupação crescente para os especialistas em saúde. Muitas infeções tornaram-se resistentes aos antimicrobianos usados para as tratar, resultando em elevadas taxas de mortalidade. Uma vez que, as resistências individuais são já um problema universal, é possível inferir que o paradigma séssil é ainda mais problemático, pois representa um somatório de resistências que permite ao biofilme ser substancialmente mais resistente à ação de antimicrobianos do que as células que estão em estado planctónico. A fraca penetração e difusão dos antimicrobianos através da matriz polisacarídica, a forma específica como os microrganismos se organizam no biofilme são algumas das hipóteses explicativas para o aumento da resistência individual e coletiva (biofilmes) aos antimicrobianos. O diagnóstico e a terapêutica das infeções causadas por biofilme é um processo difícil, daí haver um reforço na importância da prevenção.

Deste modo, as feridas crónicas apresentam-se como um desafio à qualidade de vida dos doentes, à abordagem efetuada pelos profissionais de saúde e aos recursos despendidos pelas instituições de saúde no seu tratamento. Assim sendo, é relevante propor um algoritmo síntese que possa ser facilitador na gestão, por parte dos profissionais de saúde, dos biofilmes nas feridas.

Como se explica a existência de feridas crónicas? Qual a importância do paradigma séssil para explicar os sinais e sintomas que caracterizam as infeções crónicas? Que dinâmica de investigação existe atualmente para apresentar soluções para este grave problema de saúde pública?

Palavras-chave: Biofilmes, Cicatrização, Feridas crônicas, Resistência a antimicrobianos, Gestão de biofilmes.

Abstract

Chronic wounds are a major health problem all around the world. To ensure healing is necessary to control factors such as infection, the relevance of biofilms and their role in healing. Biofilms can be defined as biological systems formed by communities of aggregated, organized and functional cells embedded in exopolymetric matrix. The biofilm formation usually occurs in several stages.

The antimicrobial resistance has become one of the most eminent threats to global health and a rising concern for healthcare specialists. Many common infections are becoming resistant to the antimicrobial drugs used to treat them, resulting in higher mortality rates. Once the individual resistances are already a universal problem, it can be inferred that the sessile paradigm is even more problematic because it is a summation of resistances allowing the biofilm to be substantially more resistant to the action of antimicrobials than those cells grown planktonically. The low penetration and dissemination of antimicrobial agents through the polysaccharide matrix and the specific way in which the microorganisms are organized in biofilms are some of the hypotheses proposed to explain the increasing individual and collective (biofilms) antimicrobial resistance. The diagnosis and treatment of biofilm infections caused by biofilms is a difficult process, that's why prevention is really important.

This way, chronic wounds appear as a challenge to the patients' quality of life, the approach made by health professionals and resources spent by health institutions in their treatment. Therefore, it is important to propose a synthesis algorithm that can be a help in the management of biofilms in wounds by health professionals.

How do you explain the existence of chronic wounds? How important is the sessile paradigm to explain the signs and symptoms that characterize chronic infections? What dynamic research currently exists to provide solutions to this serious public health problem?

Key words: Microbial Biofilms, Wound Healing, Chronic Wounds, Antimicrobial Resistance, Biofilm Management.

Dedicatória

*É o tempo de travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à
margem de nós mesmos.*

(Fernando Pessoa)

Às pessoas mais importantes da minha vida,

Pelo que me ensinaram e transmitiram

Pelo apoio incondicional e incessante

Pelo que sou.

Agradecimentos

Por estar na reta final, deixo aqui expresso o mais profundo agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para o meu percurso académico, de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, que culmina com a realização desta dissertação.

À Universidade Fernando Pessoa agradeço a qualidade de ensino que me concedeu, contribuindo de forma excelente para a minha formação.

Um agradecimento especial ao meu orientador, Professor, Doutor António Pedro Fonseca, por toda a paciência, compreensão, incentivo e disponibilidade cedida ao longo da realização desta monografia, dispensando sempre a sua opinião e críticas construtivas que foram fundamentais para a conclusão desta etapa.

A todos os meus amigos que me apoiaram e desafiaram ao longo destes anos. Citando Fernando Pessoa “(...) existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis (...)”. Assim, agradeço particularmente ao meu grupo: à Alexandra, à Ana, à Ana Carolina, à Carolina, à Cláudia, à Joana, e ao João Ricardo; por todos os momentos que compartilhamos ao longo destes 5 anos. Um futuro brilhante para nós!

À Rita, a minha afilhada de praxe, amiga e confidente, obrigada pela presença em todas as etapas, apoio incondicional e crença em mim.

Ao Álvaro, um agradecimento pelo apoio e carinho diários, pelas palavras e pela transmissão de confiança e de força, em todos os momentos.

À minha família, aos meus avós, aos meus irmãos e em especial aos meus pais, um enorme obrigada por acreditarem sempre em mim. Espero que esta etapa, que agora termino, possa de alguma forma, “retribuir” todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente, me oferecem e que tornaram mais fáceis todas as etapas alcançadas.

A todos, o meu eterno Obrigada!

Índice Geral

I. Introdução	1
II. Desenvolvimento	3
1. Biofilmes	3
i. Definição, estrutura e formação de biofilmes	3
2. Papel dos biofilmes nas feridas crónicas	8
i. Pele e formação de feridas	8
ii. Efeitos dos biofilmes na cicatrização	14
iii. Biofilmes microbianos como agentes causadores de doenças	16
iv. Resposta inflamatória do hospedeiro aos biofilmes	21
3. Opções de diagnóstico e terapêutica para os biofilmes em feridas crónicas	23
i. Mecanismos de resistência	23
ii. Métodos de deteção	29
iii. Estratégias de controlo de biofilmes	33
iv. Proposta de algoritmo para a deteção e tratamento de biofilmes nas feridas crónicas	45

III. Conclusão e Perspetivas Futuras	47
IV. Referências Bibliográficas	49
V. Anexos.....	i

Índice de Tabelas

Tabela 1: Diferenças entre as bactérias no estado planctónico e no estado sésil4

Tabela 2: Microrganismos responsáveis pela formação de biofilmes presentes em superfícies bióticas e abióticas18

Índice de Figuras

Figura 1: Acumulação do biofilme, segundo um padrão sigmoidal, ao longo do tempo ...5	
Figura 2: Etapas de formação de um biofilme 7	
Figura 3: Evolução do número relativo de células nas fases sequenciais do processo de cicatrização 13	
Figura 4: Localização das úlceras mais frequentes 19	
Figura 5: Esquema representativo das relações entre o meio ambiente, os microrganismos, os antimicrobianos e o hospedeiro 23	
Figura 6: Representação dos diversos mecanismos de resistência bacteriana 25	
Figura 7: Algumas hipóteses de mecanismos de resistência dos biofilmes aos antimicrobianos 27	
Figura 8: Preparação do leito da ferida, seguindo o conceito TIME para a cicatrização ..35	
Figura 9: Proposta de algoritmo para a detecção e tratamento de biofilmes nas feridas46	

Índice de Anexos

Anexo 1	i
Anexo 2	ii
Anexo 3	iii
Anexo 4	iv
Anexo 5	v
Anexo 6	vi
Anexo 7	vii
Anexo 8	viii

Lista de Abreviaturas

AHLs: N-acil-L-homoserina lactonas

AMPs: Péptidos antimicrobianos

CFU: Unidades formadoras de colónias

CIM: Concentração mínima inibitória

CLSM: Microscopia de varrimento laser

DAP: Doença arterial periférica

DM: Diabetes mellitus

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPS: Substância polimérica extracelular

FISH: Hibridização fluorescente in situ

IL-1: Interleucina-1

IVC: Insuficiência venosa crónica

MAMPs: Padrões moleculares associados a agentes patogénicos

MEC: Matriz extracelular

MMPs: Metaloproteinases da matriz

PBPs: Proteínas de ligação à penicilina

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PHMB: Polihexametileno biguanida ou polihexanida

PPi: Pirofosfato

PRRs: Recetores de reconhecimento de padrão celular

QS: Quorum sensing

ROS: Espécies reativas de oxigénio

SEM: Microscopia eletrónica de varrimento

TLRs: Recetores Toll-like

TNF: Fator de necrose tumoral

UV: Ultravioleta

I. Introdução

O número de pessoas que desenvolve feridas crônicas está a progredir com o aumento da incidência das doenças relacionadas com o estilo de vida, tais como obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares (Kirteterp-Moller *et al.*, 2008). A diminuição da qualidade de vida do doente e da produtividade (perda de emprego) representam custos indiretos associados à gestão de feridas, sendo também um gasto de milhões de euros para o Sistema Nacional de Saúde (Leaper *et al.*, 2015; Seth *et al.*, 2012). Para os doentes com infeções de feridas crônicas (1-2% da população ocidental) mais do que 60% envolvem biofilmes (Kirteterp-Moller *et al.*, 2008; Menoita *et al.*, 2012).

A maior parte das feridas crônicas podem persistir em estado de coexistência com o doente durante anos (Seth *et al.*, 2012). As feridas crônicas têm o ambiente ideal para a formação de biofilmes. O tecido necrótico e os detritos permitem a adesão bacteriana e as feridas são suscetíveis à infeção devido à resposta debilitada do sistema imunitário (Zhao *et al.*, 2013).

Bactérias e fungos podem estar em suspensão (estado planctónico) ou aderidas a superfícies sobre a forma sésil ou de biofilmes (Hoiby *et al.*, 2015). O paradigma sésil contrasta com as teorias históricas que explicam a patologia infecciosa, designadamente os "Postulados de Koch" (Robert Koch, 1843-1910). Estes princípios foram inicialmente estabelecidos com base na etiologia do carbúnculo e tuberculose. No entanto, estes postulados já foram generalizados para outras doenças, incluindo infeções de feridas e cicatrização demorada. Atualmente sabe-se que o paradigma sésil não é explicável à luz dos postulados de Koch, pelo que merece uma atenção especial por parte dos profissionais de saúde (Percival *et al.*, 2010).

Os biofilmes distinguem-se das bactérias planctónicas em estrutura, dinâmica, expressão genética, comunicação e interação com o hospedeiro (Zhao *et al.*, 2013). Assim, um biofilme é representado pela tendência que as bactérias têm em formar agregados de várias espécies que crescem aderidas a uma superfície e estão envolvidas por uma matriz extracelular (Henriques *et al.*, 2013). Desta forma os biofilmes são autossustentáveis e funcionam como entidades sésseis coesas (Ganesh *et al.*, 2014).

A formação de biofilme é influenciada por vários fatores, que vão desde a morfologia dos microrganismos à complexidade do ambiente em termos de nutrientes ou presença de agentes químicos e físicos (Fonseca, 2011). A sua formação envolve várias etapas, sendo a primeira a adesão, que pode ocorrer em superfícies inertes ou abióticas (dispositivos médicos) ou superfícies bióticas (Henriques *et al.*, 2013).

A infecção de feridas é o maior contributo para a sua cronicidade, uma vez que as infeções persistentes param o crescimento do tecido de reparação como também modificam a resposta inflamatória (Ganesh *et al.*, 2014). Dado ser frequente a sua persistência e resiliência aos mecanismos de defesa inata e adaptativa do hospedeiro verifica-se a natureza crónica dos biofilmes. E por outro lado, a dificuldade da terapêutica antimicrobiana, quer seja administrada por via tópica ou sistémica com doses terapêuticas marcadamente insuficientes (Hoiby *et al.*, 2015; Leaper *et al.*, 2015).

Para remover os corpos estranhos e tecido desvitalizado deve fazer-se desbridamento, pois a presença destes serve como nutrientes para desenvolvimento e proliferação microbiana (Fonseca, 2011). A estratégia de combinação de terapias pode ser o método mais efetivo para a prevenção ou remoção dos biofilmes (Hoiby *et al.*, 2015). No entanto, o principal objetivo deve ser sempre a prevenção para que seja possível reduzir a quantidade de agentes patogénicos assim como os fatores de virulência (Fonseca, 2011).

Esta revisão sistemática da literatura pretende descrever o que são biofilmes e o papel importante destes ao impedir a cicatrização de feridas, bem como potenciais intervenções para remover ou reduzir os biofilmes, e também prevenir o reaparecimento destes. Assim, pretende-se dar conhecimento adicional aos profissionais de saúde sobre a importância do paradigma séssil ou de biofilme na explicação para retardamento do processo de cicatrização de feridas, e por fim, propor um algoritmo de diagnóstico e terapêutica.

A pesquisa bibliográfica foi feita com base em documentos publicados nos principais motores de busca: Pubmed, Science Direct, Scientific Electronic Library Online (SciELO), B-On e Google Scholar; e também no repositório da Universidade Fernando Pessoa e da Universidade do Minho. O recorte temporal utilizado foi do ano 2000 até ao presente, com exceção de bibliografias essenciais ao estudo. Utilizou-se as seguintes

palavras-chave com ou sem combinações entre si: “Biofilms”, “Chronic wounds”, “Healing” e “Biofilm diagnostic”, “Biofilm treatment”, “Chronic wounds diagnostic”, “Chronic wounds management”.

II. Desenvolvimento

1. Biofilmes

i. Definição, estrutura e formação de biofilmes

A maioria das bactérias não crescem como células individuais, isto é, no estado planctónico, mas sim em comunidades estruturadas como organismos pseudomulticelulares ou biofilmes (estado sésil), estando presentes em praticamente todos os ecossistemas naturais e patogénicos (Fonseca, 2011; Trentin *et al.*, 2013).

As comunidades polimicrobianas que vão constituir os biofilmes muitas vezes incluem fungos, vírus e/ou protozoários, além de comunidades de múltiplas espécies bacterianas (Ganesh *et al.*, 2014).

As células em estado planctónico permitem a rápida proliferação e propagação dos agentes patogénicos para outros locais, no entanto em estado sésil estão associadas a situações de infeções crónicas (Trentin *et al.*, 2013).

Tabela 1: Diferenças entre as bactérias no estado planctônico e no estado sésil (adaptado de Behlau *et al.*, 2008).

Bactérias planctônicas	Bactérias em estado sésil
Células em suspensão e separadas	Agregados de células e múltiplas células numa interface
Matriz capsular pequena	Bactérias rodeadas por matriz de EPS
Sinalização intracelular, que não é essencial para a divisão celular	Sinalização intracelular que é fundamental para o crescimento e formação organizada
Células fisiologicamente ativas são suscetíveis a antimicrobianos	10 a 1000 vezes mais resistentes a antimicrobianos
Resposta imune do hospedeiro reconhece células individuais	Células ao estarem envolvidas por uma matriz mucopolissacarídica estão inacessíveis à resposta do hospedeiro e são resistentes aos agentes antimicrobianos

O desenvolvimento do biofilme representa um modo de crescimento que permite à bactéria sobreviver em ambientes hostis e colonizarem novos nichos por vários mecanismos dispersos (Hall-Stoodley *et al.*, 2009). O ciclo de vida do biofilme tem distintas fases incluindo a adesão de células planctônicas a uma superfície, o crescimento de células numa colônia madura (biofilme) e a dispersão das células pertencentes ao biofilme para o ambiente circundante (Mancl *et al.*, 2013). Todas as etapas envolvem processos complexos físicos, químicos e biológicos que governam a adesão bacteriana, a formação de biofilmes e a coesão persistente (Lazar, 2011).

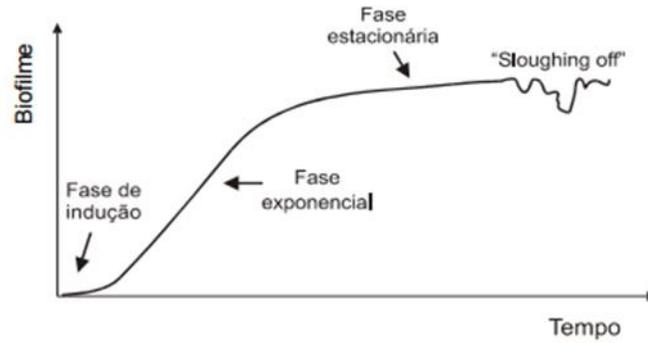


Figura 1: Acumulação do biofilme, segundo um padrão sigmoideal, ao longo do tempo (Pereira, 2001).

As bactérias planctônicas poderão fixar-se numa superfície, dando origem a um biofilme (Pedro *et al.*, 2012). Na sequência da sua formação há a expressão de determinadas adesinas, designadamente os flagelos e as fímbrias que são importantes na mobilidade (*swimming, swarming e twitching motility*) (Widgerow, 2008).

A adesão permite aos microrganismos criar um ambiente com condições para uma maior proteção e, conseqüentemente, maior resistência (Percival *et al.*, 2015a). Existem dois estados de adesão: primária ou reversível e secundária ou irreversível. No estado reversível, o agente patogénico pode reverter à forma planctónica. No estado irreversível, os microrganismos estão aderidos à superfície e a formação do biofilme é iniciada (Steinberg, 2011).

Quando a adesão ocorre a superfícies abióticas são necessárias interações físico-químicas não específicas como forças Van der Waals (hidrofóbicas), ácido-base e interações electrostáticas. Por outro lado, a adesão a superfícies bióticas necessita de interações moleculares mediadas por ligações específicas do tipo recetor-ligando. Assim, a determinação final de adesão depende da soma de forças de atração ou repulsão gerada entre duas superfícies bem como das adesinas bacterianas (flagelo, fímbria IV) de células hospedeiras (Trentin *et al.*, 2013).

Após a adesão, ocorre um aumento na produção, libertação e deteção de moléculas sinalizadoras autoindutoras. À medida que a densidade bacteriana aumenta, as moléculas

autoindutoras podem-se acumular e induzir a transcrição de genes específicos que regulam várias funções como a mobilidade, a virulência, a produção da matriz extrapoliissacarídica e a formação do biofilme. Deste modo, as bactérias em comunidade sésil resistem a diversas condições e a sua sobrevivência a nível populacional está facilitada (Hall-Stoodley *et al.*, 2009).

O fato de existirem fenómenos de *Quorum Sensing* (QS), isto é, a comunicação entre células microbianas via sinais químicos, permite aos agentes patogénicos responder fenotipicamente ao ambiente, uma vez que há uma avaliação da densidade celular (*quorum sensing*) ou dos estímulos ambientais (Hall-Stoodley *et al.*, 2009). Assim sendo poder-se-á afirmar que as moléculas de QS são fatores de virulência, tal como as enzimas ou toxinas, sendo que nas Gram positivas são péptidos e nas Gram negativas são as N-acil-L-homoserina lactonas (AHL) (Hoiby *et al.*, 2011).

Os microrganismos multiplicam-se, diferenciam a sua expressão genética e aderem mais firmemente à superfície para sobreviver. Sintetizam e excretam uma substância polimérica extracelular (EPS) criando-lhes um ambiente protetor, pelo que aderem firmemente a uma superfície viva ou inanimada, constituindo-se assim o biofilme (Pedro *et al.*, 2012). A EPS, composta por polissacarídeos, proteínas, glicoproteínas, iões metálicos, DNA extracelular, RNA, lípidos, é importante porque oferece aos biofilmes proteção e medeia a comunicação entre células e célula-superfície que permite a estabilização do biofilme, sendo também uma fonte de nutrientes (Percival *et al.*, 2015a).

Os biofilmes no seu estado mais avançado são compostos por comunidades mono ou poli específicas nos quais é possível encontrar estruturas designadas de canais que permitem a troca de nutrientes e resíduos metabólicos, transferência de material genético, transporte de moléculas de QS e outras interações bacterianas (Mancl *et al.*, 2013).

Depois de fixos e maduros, quando o ambiente já não é favorável ou devido a uma programação celular, ocorre o desprendimento de células planctónicas ou de grupos de células unidas pela EPS (disseminação), que têm a capacidade de dispersar para diversos locais que vão colonizar e estabelecer novos biofilmes. Nestes os microrganismos que o constituem podem atuar de forma sinérgica, uma vez que existe a possibilidade, já

referida, de comunicarem uns com os outros, podendo desta forma assegurar a sua sobrevivência coletiva e individual. Isto leva a que algumas espécies prosperem juntas e formem comunidades polimicrobianas que por sua vez têm maior virulência e patogenicidade (Pedro *et al.*, 2012; Trentin *et al.*, 2013).

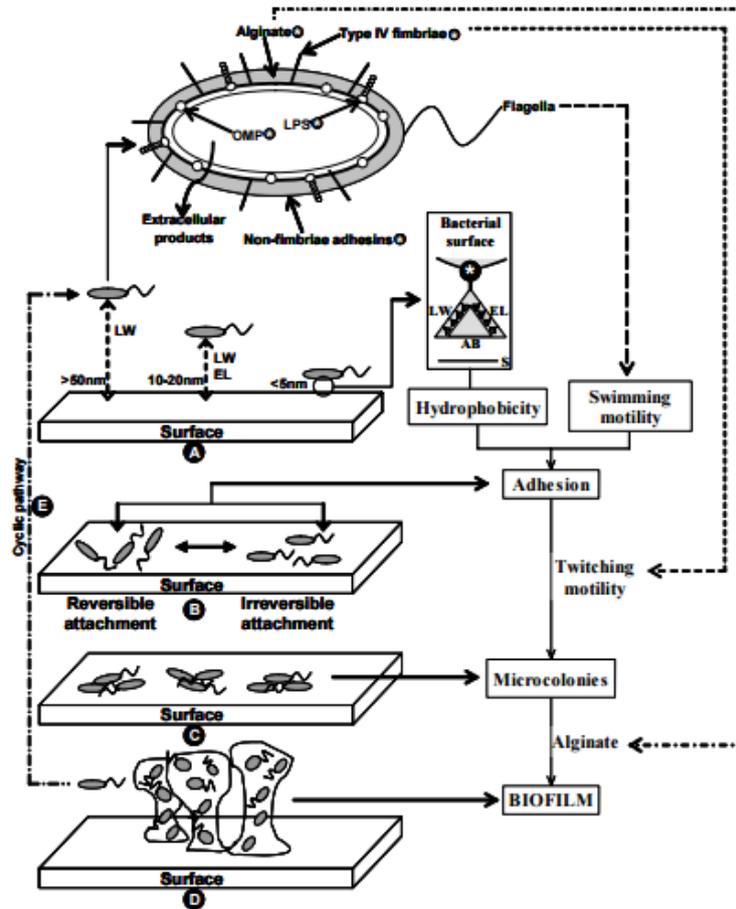


Figura 2: Etapas de formação de um biofilme (Fonseca *et al.*, 2006).

Biofilme é uma comunidade microbiana sésil caracterizada por células que estão aderidas irreversivelmente ao substrato ou interface ou umas às outras, que estão envoltas numa matriz extracelular de substâncias poliméricas que elas próprias produziram, e exibem um fenótipo alterado no que diz respeito à taxa de crescimento e transcrição de genes (Donlan *et al.*, 2002).

A formação de um biofilme no hospedeiro é uma estratégia dos microrganismos para sobreviverem às defesas do hospedeiro e também para otimizarem o uso de ambiente rico em nutrientes e trabalho cooperativo entre os organismos do biofilme (Fonseca, 2011).

O desenvolvimento de biofilmes requer cerca de 24 a 48 horas e é um processo complexo que envolve múltiplos fatores e uma variedade de interações, nomeadamente as respostas adaptativas de microrganismos sésseis. A formação depende da sua morfologia, da disponibilidade de nutrientes, da sua taxa de adesão a superfícies e da presença de agentes químicos e físicos. O aumento de nutrientes permite o aumento de moléculas QS, enzimas e outros aminoácidos essenciais que são necessários à formação e crescimento do biofilme, por outro lado a falta de nutrientes faz as células planctónicas presentes no biofilme dispersar de forma mais eficiente (Fonseca, 2011; Steinberg *et al.*, 2011).

Vide o anexo 1 – mapa conceptual deste item

2. Papel dos biofilmes nas feridas crônicas

i. Pele e formação de feridas

A pele é o maior órgão do corpo humano, corresponde a cerca de 15% do peso total de um adulto e tem uma área de cerca de 2m² (Lai-Cheong *et al.*, 2009). Assenta na hipoderme ou tecido subcutâneo, que serve de suporte e amortecimento da pele, fornecendo-lhes vasos sanguíneos e nervos (Seeley *et al.*, 2003).

A pele é composta por duas camadas: a camada superficial, epiderme, a qual funciona como uma barreira ao ambiente externo, e a camada mais profunda, derme, que é composta por tecido conjuntivo e fornece à pele as suas propriedades mecânicas (Bielefeld *et al.*, 2013).

A derme representa a maior parte da resistência estrutural da pele e tem como função a retenção de humidade, sangue e oxigénio. É composta por tecido conjuntivo com

fibroblastos, algumas células adiposas e macrófagos, colagénio, terminações nervosas, folículos pilosos, músculos lisos, glândulas e vasos linfáticos (Seeley *et al.*, 2003).

A epiderme é a camada mais externa da pele, protegendo da perda de água e permite a manutenção da integridade cutânea (Lai-Cheong *et al.*, 2009). A maior parte das células são queratinócitos (95%) que produzem queratina e citoquinas em resposta à lesão, sendo também responsáveis pela resistência estrutural e pelas características de permeabilidade da epiderme. As outras células são melanócitos, células de Langerhans (fazem parte do sistema imunitário) e células de Merkel. Da camada mais profunda à mais superficial distinguem-se 5 camadas: camada basal, camada espinhosa, camada granulosa, camada translúcida e camada córnea (Seeley *et al.*, 2003; Venus *et al.*, 2011).

A pele funciona como uma barreira física contra o ambiente externo e ajuda a reduzir a perda de água. Algumas das suas funções são (Seeley *et al.*, 2003):

- **Proteção:** A pele protege contra a abrasão e a luz ultravioleta (UV). Impede entrada de microrganismos e previne a desidratação, ao reduzir a perda de água corporal. Contribui também para a imunidade inata pois tem células de Langerhans que agem como células sentinela para iniciar as respostas do sistema imunitário contra as ameaças microbianas.
- **Sensibilidade:** Contém recetores sensoriais capazes de detetar o calor, frio, tato, pressão e dor.
- **Regulação da temperatura:** A temperatura é regulada pelo controlo do fluxo de sangue através da pele e pela atividade das glândulas sudoríparas. Os vasos sanguíneos da derme dilatam-se e permitem o aumento do fluxo de sangue através da pele, transferindo assim o calor dos tecidos mais profundos para a pele.
- **Síntese de vitamina D:** Ao produzir vitamina D, quando exposta à radiação UV, contribui para a formação dos ossos, metabolismo do cálcio e aspetos da regulação imunitária (Lai-Cheong *et al.*, 2009).
- **Excreção**

As feridas podem afetar a fisiologia da pele e decorrem de lesões por agentes mecânicos, térmicos, químicos e bacterianos (Tazima *et al.*, 2008).

Uma ferida pode ser descrita como uma interrupção na continuidade do tecido da pele, com maior ou menor extensão, quer seja causada por um trauma como desencadeada por uma afeção clínica. As feridas podem ser agudas ou crônicas. As primeiras são de fácil cicatrização, por outro lado as crônicas podem ultrapassar 6 semanas para cicatrizar. Deste modo, constituem um problema de saúde pública, uma vez que tem impacto psicológico, social e económico para o paciente e crescentes custos para o sistema de saúde (Leite *et al.*, 2012).

Independentemente do agente causador, o processo cicatricial é comum a todas as feridas, sendo sistémico e dinâmico (Campos *et al.*, 2007).

A cicatrização é uma cascata de fenómenos celulares, moleculares e bioquímicos que interagem para que ocorra reconstituição tecidual.

A perda tecidual pode atingir a derme completa (espessura total) ou incompleta (espessura parcial), ou então atingir todo o órgão chegando ao tecido celular subcutâneo (Mandelbaum *et al.*, 2003). Para que ocorra a reparação de um tecido tem de haver a substituição de células mortas por células viáveis, que pode dar-se por regeneração ou substituição. Na substituição desenvolve-se um novo tipo de tecido que pode originar a formação de cicatrizes e alguma perda de funcionalidade (Seeley *et al.*, 2003). Na ausência de formação de cicatriz, a regeneração seria a restauração perfeita do tecido pré-existente, mas apenas ocorre no desenvolvimento embrionário, ou em tecidos como ossos e fígado (Tazima *et al.*, 2008).

Durante a cicatrização de feridas cutâneas, a barreira e as propriedades mecânicas da pele são restauradas pelas ações de vários tipos de células que se submetem a proliferação, diferenciação, migração e apoptose para reconstruir a pele (Bielefeld *et al.*, 2013).

A cicatrização tem as seguintes etapas: fase inflamatória, fase de proliferação ou granulação e fase de remodelação ou maturação (Campos *et al.*, 2007).

✓ **Fase inflamatória**

A fase inflamatória surge imediatamente após a lesão. As plaquetas ao aderirem aos vasos sanguíneos danificados iniciam uma reação de libertação de fatores de crescimento, dando origem a uma cascata de coagulação do sangue que impede o sangramento excessivo e proporciona proteção na área da ferida. Há a formação de um coágulo que contém fibrina (proteína filamentosa) que une os bordos da ferida (Seeley *et al.*, 2003). Por outro lado, o coágulo serve de reservatório proteico para as citocinas e fatores de crescimento, e cria também uma barreira impermeabilizante que protege da contaminação por microrganismos e outras substâncias estranhas. A libertação local de histamina, serotonina e bradicinina causa vasodilatação e há o aumento do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente calor e rubor. As prostaglandinas são os mediadores mais importantes no processo de cicatrização, porque aumentam a permeabilidade vascular, favorecem a exsudação plasmática e promovem a quimiotaxia dos leucócitos para a área da ferida. Os neutrófilos são as primeiras células fagocitárias a chegar, libertando espécies reativas de oxigênio (ROS) que vão auxiliar na destruição bacteriana, ajudando a combater a infecção, e são, posteriormente, destruídos e substituídos por macrófagos. Estes últimos aparecem na zona da ferida após 48 a 96 horas e fagocitam as bactérias, desbridam corpos estranhos e direcionam o desenvolvimento do tecido de granulação. Os macrófagos também ativam fibroblastos e células endoteliais que vão ser necessários nas fases seguintes da cicatrização. De seguida, ocorre a apoptose de células inflamatórias que ocorre gradualmente dentro de alguns dias após o ferimento (Demidova-Rice *et al.*, 2012; Tazima *et al.*, 2008).

A resposta inflamatória é crucial para proteger o corpo do doente contra organismos estranhos no local da lesão e muitas das citocinas inflamatórias e fatores de crescimento libertados durante este processo vão promover a formação de cicatriz (Bielefeld *et al.*, 2013).

✓ **Fase proliferativa**

A fase proliferativa pode ser caracterizada pela epitelização, angiogênese, formação do tecido de granulação e deposição de colagénio (Campos *et al.*, 2007). O tecido de granulação é constituído por fibroblastos, macrófagos, colagénio, capilares, fibronectina e ácido hialurónico. Esta etapa surge normalmente no 3º dia após a lesão, e pode durar cerca de 2 a 3 semanas, até à formação de uma cicatriz, que inicialmente apresenta uma tonalidade vermelha viva devido à grande vascularização do tecido (Seeley *et al.*, 2003; Tazima *et al.*, 2008).

A angiogênese consiste na formação de novos vasos sanguíneos, que são essenciais para o suprimento oxigénico, a nutrição do tecido e aumento do número de células para o local da ferida (Tazima *et al.*, 2008).

A reepitelização permite reconstituir a integridade da permeabilidade da epiderme, resultando de vários mecanismos como a migração e diferenciação de queratinócitos, diferenciação do neoepitélio e reestruturação da membrana basal (Laureano *et al.*, 2011). Os fatores de crescimento estimulam a proliferação de células do epitélio nas seguintes 24 a 36 horas após a lesão, ocorrendo a migração dos queratinócitos não danificados que se encontram nas bordas da ferida, quando esta é de espessura parcial. As feridas ocluídas reepitelizam mais rápido do que as feridas superficiais abertas e ressecadas (Mandelbaum *et al.*, 2003).

Após lesão, as células mesenquimais são transformadas em fibroblastos e atraídas para o local inflamatório, onde ocorre a sua divisão e produzem componentes da matriz extracelular (formação do tecido de granulação – fibroplasia). Os fibroblastos surgem logo ao 3º dia, ou seja, ainda na fase inflamatória, e sintetizam o colagénio que é essencial para a sustentação e força tênsil da cicatriz (Tazima *et al.*, 2008).

Quando a ferida é de espessura total há contração da ferida, através de um movimento centrípeto de toda a espessura da pele circundante (Mandelbaum *et al.*, 2003).

✓ Fase de maturação

Por fim, na última fase há a remodelação do tecido cicatricial e a reorganização do alinhamento das fibras de colagénio (aumento da resistência). O colagénio é a proteína mais abundante do tecido conectivo em cicatrização sendo sintetizado por fibroblastos, predominantemente nos ossos e tendões (tipo I) e nos tecidos moles (tipo III) e a degradação é muito ativa durante o processo inflamatório. Deste modo, a formação da matriz extracelular resulta do balanço entre a síntese e degradação do colagénio (Campos *et al.*, 2007). A fase de maturação dura toda a vida da ferida, à medida que o coágulo de fibrina é substituído por tecido de granulação (Laureano *et al.*, 2011).

Cerca de um mês após o ferimento, a ferida encontra-se fechada na sua totalidade, a crosta solta-se e o tecido de granulação é substituído pela derme (Seeley *et al.*, 2003). Todas as fases coincidem e acontecem simultaneamente, permitindo o sucesso da cicatrização (Mandelbaum *et al.*, 2003).

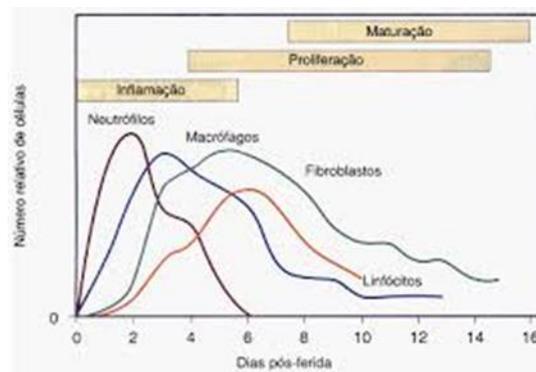


Figura 3: Evolução do número relativo de células nas fases sequenciais do processo de cicatrização (Tazima *et al.*, 2008).

Existem fatores que podem interferir no processo de cicatrização normal retardando qualquer uma das suas fases. Esses fatores podem ser locais (relacionados diretamente com as condições da ferida) ou sistêmicos (relacionados às condições clínicas do indivíduo). A presença de corpos estranhos, infecção, isquemia ou edema/pressão tecidual aumentada constituem exemplos de fatores locais. Os fatores gerais são a idade, desnutrição, diabetes, doenças hereditárias, alterações cardiocirculatórias e de

coagulação, aterosclerose, insuficiência hepática e renal, insuficiência respiratória, tabagismo, radioterapia, uso de drogas sistêmicas e alguns medicamentos (Campos *et al.*, 2007; Mandelbaum *et al.*, 2003).

Vide o anexo 2 – mapa conceitual deste item

ii. Efeitos dos biofilmes na cicatrização

As feridas surgem na sequência da existência de descontinuidades na pele, fato que constitui uma primeira quebra das defesas do hospedeiro e uma oportunidade para adesão e colonização microbiana. Assim sendo, numa situação de normalidade o hospedeiro tende a reagir para que a cicatrização se faça o mais rápido possível (Rhoads *et al.*, 2008).

Após uma “terapêutica orientada”, se uma ferida não cicatriza em 6 semanas é considerada uma ferida crônica, verificando-se uma dificuldade na recuperação da integridade anatômica e funcional da pele e do organismo num intervalo de tempo normal (Justiniano, 2010; Laureano *et al.*, 2011).

Ao haver um aumento do inóculo também aumenta a probabilidade de ocorrer infecção, pelo que é suscetível a ocorrência desta quando as condições na ferida são ideais para a multiplicação dos microrganismos e quando há uma baixa resistência por parte do hospedeiro (Santos *et al.*, 2012a). Condições como perfusão pobre, má nutrição, presença de corpos estranhos, pressão, trauma repetitivo, hiperglicemia e disfunção dos glóbulos brancos facilitam o surgimento de feridas crônicas. Se o biofilme já está estabelecido, a presença deste na ferida pode ser difícil de suprimir, especialmente num indivíduo com o sistema imunitário comprometido (Rhoads *et al.*, 2008).

As feridas crônicas podem conter agentes patogênicos que estão em elevada replicação (Santos *et al.*, 2012a).

Como referido anteriormente, num processo de cicatrização normal há uma transição da fase inflamatória (que dura alguns dias) com progressão para a regeneração e

reorganização dos tecidos. Com a presença e persistência de biofilmes numa ferida crônica verifica-se uma fase inflamatória persistente devido à presença de tecido necrótico, corpos estranhos e contaminação microbiana (Laureano *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2012a; Zhao *et al.*, 2013).

Os biofilmes estimulam uma resposta inflamatória crônica e prolongada que altera a progressão da cicatrização da pele (Zhao *et al.*, 2013). Como em qualquer estado inflamatório, surge uma infiltração de células mononucleares (macrófagos, linfócitos e plasmócitos), acompanhado por destruição tecidual, proliferação exagerada dos vasos sanguíneos e substituição permanente de tecido conectivo e fibrose (Justiniano, 2010). Estas células inflamatórias vão libertar elevados níveis de ROS e de proteases (metaloproteinases da matriz – MMPs e elastase) (Phillips *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2013).

Como ocorre na cicatrização de todas as feridas, as MMPs produzidas pelas células e induzidas pelos fatores de crescimento (PDGF e FGF), fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1) degradam a matriz extracelular e as proteínas envolvidas no processo de cicatrização, e uma vez que se aumenta essa degradação, prolonga-se o estado inflamatório e os danos aos tecidos do hospedeiro (Justiniano, 2010).

Uma resposta inflamatória nem sempre é eficaz na remoção do biofilme, tal como já foi afirmado pode permitir o aumento da produção de exsudato, oferecendo assim uma fonte de nutrição e, conseqüentemente, o desenvolvimento do biofilme (Phillips *et al.*, 2010).

Na fase proliferativa há um aumento na proliferação dos fibroblastos e há alteração da fase de remodelação (esta última é regulada por proteases que dependem de fatores como pH e colonização bacteriana no local da ferida) (Laureano *et al.*, 2011). Verifica-se um aumento da ação das MMPs, devido aos inibidores destas estarem diminuídos, pelo que há a degradação da fibronectina e da vitronectina e, conseqüentemente, bloqueio da ação dos fatores de crescimento. Assim, há um aumento do colagénio que vai atrasar a cicatrização e macerar a pele adjacente à ferida. A proliferação dos queratinócitos que é controlada pela MMP-1 (colagenase intersticial) está diminuída assim como a formação de células endoteliais (Justiniano, 2010).

Concluindo, a existência de biofilmes altera a fisiologia das feridas fazendo com que elas se tornem crônicas, devido a fatores como o envelhecimento precoce dos fibroblastos, o aumento das MMPs que condicionam um aumento da degradação da matriz extracelular (MEC) e mecanismos inflamatórios persistentes (Laureano *et al.*, 2011).

Vide o anexo 3 – mapa conceptual deste item

iii. Biofilmes microbianos como agentes causadores de doenças

A formação de biofilmes representa um problema para a saúde, uma vez que contribui para várias doenças inflamatórias crônicas (Phillips *et al.*, 2010). São exemplo de infecções crônicas provavelmente associadas a biofilmes a fibrose cística, as infecções do trato urinário, a endocardite, a otite média persistente, a prostatite, a periodontite, a conjuntivite, a vaginite, a rinosite crônica, a osteomielite, a dermatite e as feridas crônicas (Donlan *et al.*, 2002; Henriques *et al.*, 2013; Trentin *et al.*, 2003).

O aumento da esperança média de vida representa uma maior necessidade de substituir e reparar funções biológicas, surgindo um aumento do número de pessoas hospitalizadas onde há necessidade de utilizar dispositivos médicos, designadamente para permitir o acesso terapêutico à cavidade peritoneal e a outros locais para permitir por um lado a reparação tecidual apropriada e por outro a cicatrização das feridas (Poelstra *et al.*, 2002). São exemplos destes dispositivos médicos: cateteres venosos, arteriais e urinários, dispositivos intrauterinos, lentes de contato, próteses, *pacemakers*, implantes ortopédicos e da mama (Henriques *et al.*, 2013; Trentin *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2013). O meio intersticial que circunda os implantes é conhecido por representar uma região suscetível a colonização microbiana e favorável ao surgimento de infecções, uma vez que se sabe que mesmo populações bacterianas com pouca virulência podem facilmente desenvolver-se (Campoccia *et al.*, 2006).

Algumas das características comuns das infecções causadas por biofilmes são (Nascimento *et al.*, 2003):

- O crescimento lento;
- Os antimicrobianos eliminam os sintomas da infecção provocada pelos biofilmes mas não o próprio biofilme, havendo infecções recorrentes;
- As células bacterianas podem separar-se da estrutura do biofilme em qualquer fase da infecção e estabelecer uma nova infecção aguda e/ou crônica.

O aumento da incidência de infecções associada ao uso de implantes cirúrgicos resultam da incapacidade do hospedeiro em eliminar microrganismos oportunistas contaminantes das feridas crônicas (Campoccia *et al.*, 2006; Poelstra *et al.*, 2002). Assim sendo, estas doenças tornam-se mais complicadas em doentes imunodeprimidos, uma vez que estes não têm defesas contra os organismos invasores (Donlan *et al.*, 2002).

Várias espécies microbianas possuem adesinas que medeiam a adesão das células a superfícies bióticas ou abióticas, podendo estas últimas ser cobertas por proteínas da matriz extracelular (tais como colagénio, fibrinogénio, fibronectina, elastina) e por sua vez condicionar as espécies de microrganismos que podem aderir (Campoccia *et al.*, 2006).

Os biofilmes podem ser monomicrobianos ou polimicrobianos independentemente da superfície biótica ou abiótica. Por outro lado, o tempo em que o dispositivo médico está em contato com doente ou implantado pode condicionar a formação de biofilmes. As infecções são frequentemente causadas pelas populações microbianas autóctones Gram positivas como *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus viridans* ou Gram negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, ubíquas e organismos anaeróbicos de origem entérica junto aos tecidos circundantes à cirurgia. No entanto, estes microrganismos não são patogénicos no local onde habitualmente se encontram, o fato de migrarem para outros locais do organismo é que os torna patogénicos (Donlan, 2001).

Tabela 2: Microrganismos responsáveis pela formação de biofilmes presentes em superfícies bióticas e abióticas (adaptado de Trentin *et al.*, 2013).

Infeção ou local afetado	Microrganismo responsável
Cateteres venosos	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativos (SCoN); <i>Staphylococcus aureus</i> ; <i>Enterococcus faecalis</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Candida spp.</i>
Dispositivos intrauterinos	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ; <i>Enterococcus spp.</i> ; <i>Streptococcus b-hemolítico</i> ; Lactobacilos
Endocardite	<i>Streptococcus viridans</i> ; <i>S. epidermidis</i> ; <i>S. aureus</i> ; <i>Streptococcus spp.</i> ; <i>Enterococcus spp.</i> ; <i>P. aeruginosa</i> ; <i>Candida spp.</i> ; <i>Aspergillus spp.</i>
Esófago	<i>Candida spp.</i>
Lentes de contacto	<i>P. aeruginosa</i> e cocos Gram positivos
Osteomielite	<i>S. aureus</i>
Otite média	<i>S. aureus</i>
Prostatites	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Chlamydia trachomatis</i> ; <i>Mycoplasma</i>
Próteses ortopédicas	<i>S. aureus</i> ; <i>S. epidermidis</i>
Fibrose cística	<i>P. aeruginosa</i>
Cateteres urinários	<i>E. coli</i> ; <i>Proteus mirabilis</i> ; SCoN; <i>E. faecalis</i> ; <i>Candida spp.</i>
Tubos endotraqueais	Gram negativos entéricos; <i>Staphylococcus spp.</i> ; <i>Streptooccus spp.</i> ; <i>Enterococcus spp.</i>
Vagina	<i>Candida spp.</i>

Quanto às feridas crônicas é provável que quase todas tenham estas comunidades polimicrobianas sobre o leito da ferida, atrasando a cicatrização da mesma (Phillips *et al.*, 2010). A insuficiência venosa crônica (IVC) dos membros inferiores, as alterações vasculares e neuropatias periféricas associadas à Diabetes mellitus (DM) e as úlceras de pressão podem facilitar o surgimento de feridas crônicas (Laureano *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2012).



Figura 4: Localização das úlceras mais frequentes (Ramos *et al.*, 2009).

Úlceras de pressão: As úlceras de pressão são áreas localizadas de isquemia e necrose tecidular que se desenvolvem quando a pele e/ou tecidos adjacentes são sujeitos a uma pressão extrínseca, usualmente sobre uma proeminência óssea (Luz *et al.*, 2010; Wada *et al.*, 2010). Estas úlceras são mais frequentes na região sacral e calcâneos (Rocha *et al.*, 2006).

Os principais microrganismos envolvidos são *Enterobacter spp.*, *Staphylococcus spp.* e *Enterococcus faecalis* (Luz *et al.*, 2010).

Os indivíduos com maior probabilidade de desenvolver as úlceras de pressão são aqueles com (Luz *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2006; Wada *et al.*, 2010):

- Idade avançada;
- Alterações mobilidade;
- Alterações percepção sensorial;
- Alterações do nível de consciência;
- Presença morbidades (hipertensão arterial sistêmica, diabetes);
- Incontinência.

Úlceras vasculares: A úlcera vascular, também conhecida por úlcera de perna verifica-se quando há perda circunscrita ou irregular da pele (derme ou epiderme) nos membros

inferiores e cuja causa está relacionada com o sistema vascular arterial ou venoso (Barbosa *et al.*, 2010).

A IVC é a causa mais frequente de úlceras nas pernas. Outros fatores são a obesidade e os antecedentes familiares. Estas úlceras localizam-se na região do maléolo interno mas podem estar presentes noutras partes se resultantes de traumas ou infeções (Barbosa *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2009).

Os microrganismos causadores das úlceras vasculares mais comuns são *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus θ -hemolítico*; mas também é comum um conjunto polibacteriano variável que inclui microorganismos endógenos e aeróbios facultativos (Ramos *et al.*, 2009).

As úlceras venosas (mais comuns) tem uma evolução lenta, são mais superficiais, exsudativas, evidenciando umas bordas irregulares em que se verifica a presença de edema. Por outro lado, as úlceras arteriais são produzidas quando o fluxo sanguíneo para os membros inferiores está diminuído resultando em isquemia e necrose (Barbosa *et al.*, 2010).

Úlceras Neuropáticas: Um dos tipos de úlceras neuropáticas são as úlceras diabéticas, resultantes da DM. A hiperglicemia induz neuropatia e com a presença ou ausência de doença arterial periférica (DAP) produz-se ulceração do pé (Duarte *et al.*, 2011). A hiperglicemia poderá afetar os nervos periféricos das pernas e pés o que diminui ou resulta na perda de sensibilidade (Revilla *et al.*, 2007).

As úlceras neuropáticas são causadas principalmente devido a *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, bacilos aeróbios Gram negativos, mas há uma tendência polimicrobiana pois existem populações autóctones que encontram um ambiente favorável nos espaços interdigitais dos pés (Duarte *et al.*, 2011).

A incidência da neuropatia diabética aumenta com a idade do doente, tempo de duração da diabetes e gravidade da hiperglicemia (Revilla *et al.*, 2007).

Existem ainda outros tipos de feridas crônicas, nomeadamente feridas malignas, úlceras traumáticas e as feridas resultantes de doenças parasitárias como a Filariose. Após a identificação da etiologia da ferida crônica é possível estabelecer a terapêutica adequada (Justiniano, 2010).

Vide o anexo 4 – mapa conceptual deste item

iv. Resposta inflamatória do hospedeiro aos biofilmes

O desenvolvimento de uma infeção num hospedeiro saudável envolve mecanismos como o modo de interação do microrganismo com o sistema imune e a resposta deste contra o agente invasor. A imunidade inata é a primeira linha de defesa e, quando está a funcionar corretamente, é capaz de superar potenciais agentes patogénicos. Uma vez sujeito ao estímulo de antígenos, o sistema imune desenvolve defesas a longo prazo contra os agentes invasores, que se denominam, imunidade adaptativa. Esta última é caracterizada por uma resposta mais específica, mais forte e menos autodestrutiva quando o hospedeiro é confrontado com os mesmos agentes patogénicos, pois após o primeiro contato são geradas células de memória (Coelho-Castelo *et al.*, 2009). Em contraste, a resposta inata, por si só não distingue entre uma exposição primária ou uma subsequente (Jensen *et al.*, 2010).

A imunidade inata e a imunidade adaptativa, ocorrem em simultâneo para o controlo de uma infeção de forma a aumentar a eficácia de resposta, e o tipo de resposta da imunidade inata influencia o tipo de resposta imune adaptativa gerada (Coelho-Castelo *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2010).

Os componentes celulares do sistema imune inato, tais como os neutrófilos e macrófagos, são capazes de responder à presença de biofilmes (Jensen *et al.*, 2010). O hospedeiro usa recetores de reconhecimento de padrão celular (PRRs), que por sua vez reconhecem padrões moleculares associados a agentes patogénicos (MAMPs). Estes PRRs, nomeadamente os *Toll-like* (TLRs) que são expressos em tecidos com macrófagos, estimulam a resposta imune inata e desencadeiam a produção de citocinas inflamatórias (TNF, IL-1, IL-6) e quimiocinas (por exemplo, CCL2 e CXCL8), assim como

prostaglandinas. Estes mediadores inflamatórios, em seguida atuam em tecidos-alvo para induzir a vasodilatação e extravasamento de neutrófilos para o tecido infetado (Mancl *et al.*, 2013; Marsh *et al.*, 2011; Medzhitov, 2010).

Atualmente são conhecidos vários tipos de PRRs e os seus ligantes correspondentes, contudo no caso de microrganismos em crescimento no biofilme ainda não foram identificados PRRs específicos. A resiliência de biofilmes pode, em parte, resultar da estimulação contínua e ativação de PRRs pertencentes à imunidade inata. No entanto, estudos recentes têm demonstrado que TLRs podem mediar respostas aos componentes da matriz de biofilmes e de produtos bacterianos tanto de biofilmes como de infecções planctônicas (Alhede *et al.*, 2014; Jensen *et al.*, 2010).

No caso de infecções por biofilme, a persistente infecção pode resistir aos anticorpos libertados e fagócitos opsonizados, bem como a outros componentes da resposta do hospedeiro. O tecido circundante à lesão é sujeito a radicais oxidativos (ROS) prejudiciais e enzimas libertadas a partir do próprio hospedeiro. Além disso, vários fatores de virulência específicos dos agentes patogênicos, a libertação de proteases e outras exoenzimas das células do hospedeiro pode resultar na degradação de moléculas importantes que atuam nas células do sistema imune e, assim contribuem para o efeito debilitado do hospedeiro. Assim, a resposta do hospedeiro pode ser a maior causa do dano tecidual (Jensen *et al.*, 2010).

Numa ferida crônica, o biofilme pode mesmo sequestrar a resposta imune do hospedeiro. Os agentes patogênicos bacterianos expressam uma variedade de fatores de virulência que podem reduzir ou reorientar a imunidade inata ou adaptativa. Alguns estudos demonstraram que as bactérias podem regular positivamente as citocinas pró-inflamatórias com o intuito de “manipular” a defesa do hospedeiro (Wolcott *et al.*, 2008a):

- Mecanismos gerais de indução da inflamação no hospedeiro

Continuamente, os biofilmes libertam bactérias planctônicas a partir da matriz, que recruta a resposta inflamatória do hospedeiro. O biofilme pode obter nutrientes do exsudato do hospedeiro, que acompanha essa resposta.

- Mecanismos gerais para manter a inflamação crônica – proteases

As feridas crônicas são altamente proteolíticas e possuem excessivas proteases do hospedeiro – elastase, collagenases e gelatinases, que resultam principalmente da imunidade inata.

Vide o anexo 5 – mapa conceptual deste item

3. Opções de diagnóstico e terapêutica para os biofilmes em feridas crônicas

- Mecanismos de resistência

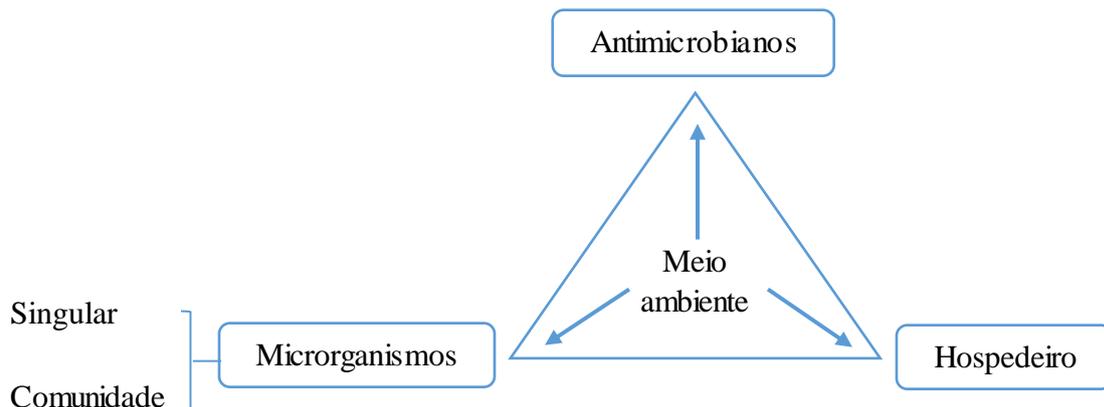


Figura 5: Esquema representativo das relações entre o meio ambiente, os microrganismos, os antimicrobianos e o hospedeiro (adaptado de Sousa, 2006).

Os antimicrobianos apresentam uma eficácia limitada quando os microrganismos estão na forma de comunidade sésil, em comparação com a forma planctónica. As bactérias presentes nos biofilmes são 100 a 1000 vezes mais resistentes aos antimicrobianos (antibióticos e antissépticos) do que as bactérias no estado planctónico (Dufour *et al.*, 2010). Acresce ainda que os biofilmes são muito mais resistentes à ação do hospedeiro, efetuada pelos anticorpos e células inflamatórias (Menoita *et al.*, 2012). Além disso, os

microrganismos dentro de biofilmes podem facilmente adquirir resistência através da transferência de plasmídeos de resistência e de virulência (Donlan, 2002).

Os antimicrobianos podem ser classificados segundo a estrutura química, os tipos de microrganismos que afetam e modo de ação (Fonseca *et al.*, 2006). Quanto aos mecanismos de ação os mais comuns são (Sousa, 2006; Tenover, 2006):

- Inibição da síntese da parede celular (Antimicrobianos antiparietais);
- Inibição da síntese ou dano na membrana citoplasmática (Antimicrobianos antimembranares);
- Inibição da síntese proteica nos ribossomas (Antimicrobianos inibidores da síntese proteica);
- Alterações na síntese de ácidos nucleicos (Antimicrobianos inibidores da síntese de ácidos nucleicos);
- Alteração de metabolitos celulares (Antimicrobianos antimetabolitos).

As bactérias Gram negativas por possuírem um invólucro celular (membrana externa e parede celular) tem uma “barreira física” para a entrada de moléculas no interior da bactéria. No caso das Gram positivas o mesmo não acontece, pois a ausência de membrana externa resulta num aumento de sensibilidade aos antimicrobianos (Caumo *et al.*, 2010).

Os mecanismos de resistência a antimicrobianos consistem no aumento da Concentração Mínima Inibitória (CIM) e podem ocorrer por mutação natural ou aquisição de genes de resistência (por conjugação, transformação ou transdução) (Mah, 2012).

A resistência bacteriana pode ser definida como um grupo de mecanismos adquiridos pela bactéria para evitar ou conceder-lhe proteção contra os efeitos prejudiciais dos antimicrobianos. Na resistência intrínseca, o microrganismo tem a capacidade de desenvolver uma estrutura que lhe confere resistência a um antimicrobiano ou a um grupo de antimicrobianos (Fonseca *et al.*, 2006). Os principais mecanismos de resistência

bacteriana ocorrem por alteração da permeabilidade, alteração do local de ação, bomba de efluxo e mecanismo enzimático (Sousa, 2006).

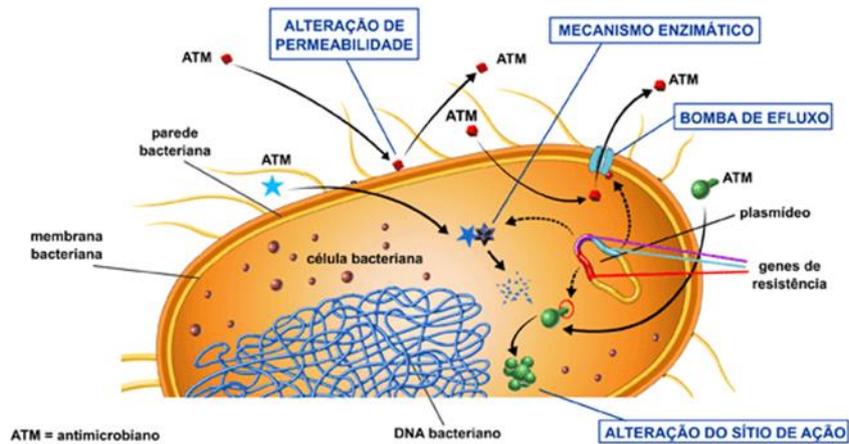


Figura 6: Representação dos diversos mecanismos de resistência bacteriana (Anvisa, 2007).

✓ Alteração da permeabilidade

As bactérias Gram negativas têm uma camada interna constituída por fosfolípidos e uma membrana externa constituída por lipopolissacarídeos, o que confere uma entrada lenta por parte dos fármacos. É necessário atravessar a membrana externa através das porinas que estabelecem canais específicos pelos quais as substâncias podem passar para o espaço plasmático e, de seguida, para o interior da célula (Dzidic *et al.*, 2008). Desta forma, uma diminuição na função ou quantidade de porinas contribui para que a bactéria seja resistente ao antimicrobiano, pois diminui a entrada (Declour, 2009).

✓ Alteração do local de ação

A modificação do local-alvo constitui provavelmente um dos mecanismos de resistência mais específicos, ocorrendo assim a modificação bioquímica do alvo de ligação do antimicrobiano (Caumo *et al.*, 2010). Um exemplo são as PBPs no caso da penicilina.

✓ **Bomba de efluxo**

As bombas de efluxo são proteínas de transporte envolvidas na eliminação de tóxicos de dentro das células para o ambiente extracelular (Webber *et al.*, 2003). Desta forma, o efluxo ativo produz resistência bacteriana a determinados antimicrobianos. É um mecanismo de resistência essencial nas bactérias Gram negativas (Soto, 2013). A maior parte dos sistemas de efluxo não é seletiva para uma classe específica de antimicrobiano, mas apresentam maior eficácia na presença de macrólidos, tetraciclina e fluoroquinolonas, pois estes inibem a biossíntese de proteínas e de DNA (Caumo *et al.*, 2010; Dzidic *et al.*, 2008).

✓ **Mecanismo enzimático**

Este mecanismo está relacionado com a produção de diferentes enzimas por parte das bactérias que neutralizam ou inibem os efeitos antimicrobianos. Isto pode acontecer por hidrólise, transferência de um grupo ou processo oxidação-redução (Dzidic *et al.*, 2008; Sousa, 2006). São exemplos de enzimas que inativam antimicrobianos, as β -lactamases e as aminoglicosídeos quinases. As penicilinas e cefalosporinas possuem um anel β -lactâmico na sua estrutura química e as bactérias resistentes a esses antimicrobianos produzem enzimas específicas (as β -lactamases) que são capazes de degradar por hidrólise esse anel, tornando o fármaco inativo (Caumo *et al.*, 2010). Os antibióticos com mecanismos de ação que envolve a inibição enzimática tornam-se inativos por não terem alvo para atuar (Guimarães *et al.*, 2010).

Além dos mecanismos de resistência de bactérias no estado singular, existem também mecanismos responsáveis pela resistência na forma de comunidade sésil. Algumas hipóteses propostas para explicar o aumento das resistências a antimicrobianos em células sésseis são:

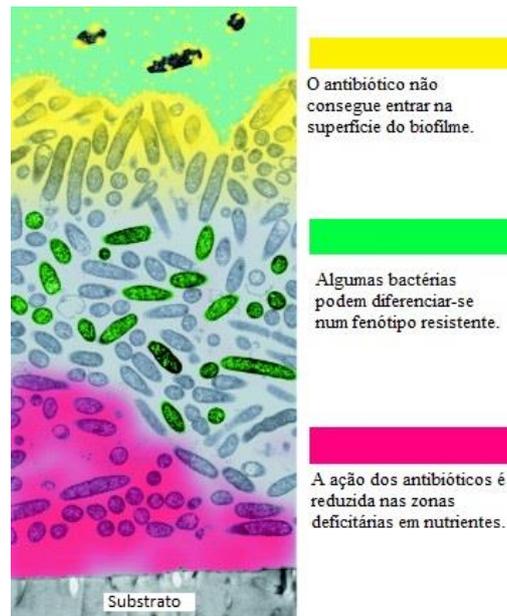


Figura 7: Algumas hipóteses de mecanismos de resistência dos biofilmes aos antimicrobianos (adaptado de Stewart *et al.*, 2001).

- **Fraca penetração e difusão dos agentes quimioterápicos** através da matriz polissacarídica normalmente estável (Fonseca *et al.*, 2006; Patel, 2005).
- **Adsorção dos antimicrobianos na matriz exopolimérica** devido à sua natureza aniônica e hidrofílica. Deste modo, a concentração adequada não é atingida nos tecidos do hospedeiro nem no ambiente intracelular (Menoita *et al.*, 2012; Smith, 2005).
- **Presença de células dormentes (“persistir”):** A formação de células num estado de dormência (apresentam crescimento muito lento ou inexistente) é outro mecanismo de resistência. Estas células podem ser definidas como variantes fenotípicas da população celular geral e são capazes de sobreviver a elevadas concentrações de antimicrobianos (Dufour *et al.*, 2010; Kishen, 2010; Trentin *et al.*, 2013).
- **Resposta dos microrganismos ao ambiente nos biofilmes:** As células que se encontram na parte mais interna do biofilme sofrem condições de falta de oxigénio e de nutrientes, pode ocorrer anaerobiose, o que vai obrigar o biofilme a entrar na fase

estacionária de crescimento, gerando fenômenos de tolerância. Estes microrganismos tornam-se menos suscetíveis à ação de antimicrobianos que dependem da multiplicação bacteriana (por exemplo, os β -lactâmicos). Portanto, existem subpopulações celulares fenotipicamente distintas dentro de um biofilme, sendo a evolução metabólica destas progressivamente de inativas para ativas. A ativa está na área mais superficial em contato com o meio externo e está suscetível aos mecanismos de ação dos antibióticos. A segunda subpopulação encontra-se embebida na matriz exopolimérica no interior do biofilme onde a taxa de divisão celular é lenta e por isso menos vulnerável à ação dos antimicrobianos (Dufour *et al.*, 2010; Fonseca *et al.*, 2006; Jayaraman, 2009; Patel, 2005; Smith, 2005; Soto, 2013).

- **Idade do biofilme:** Com o aumento da idade do biofilme verifica-se um aumento na matriz produzida, o que pode resultar em gradientes de oxigênio e de nutrientes deficitários que por sua vez diminuem o metabolismo e as taxas de crescimento dos microrganismos, alterando a suscetibilidade aos antimicrobianos (Donlan, 2002).
- **Proximidade de células bacterianas:** Uma vez que num biofilme as células estão mais próximas umas das outras, pensa-se que haverá um aumento das trocas de material genético (Menoita *et al.*, 2012).
- **Comunicação celular:** A comunicação interbacteriana e intrabacteriana presente nas células num biofilme, isto é, o *QS* permite às bactérias funcionar num coletivo. As moléculas autoindutoras são responsáveis pela expressão de vários genes, o que torna as células do biofilme mais resistentes a antimicrobianos (Kalia, 2013; Lazar, 2011).
- **Aumento da expressão de bombas de efluxo:** Quando as células formam biofilmes, os genes deste mecanismo são regulados positivamente (Soto, 2013).

O mecanismo de resistência ocorre principalmente nas células sésseis; no entanto os mecanismos clássicos de resistência bacteriana vão adicionar resistência ao biofilme, colaborando para o nível global de resistência (Mah, 2012).

Vide o anexo 6 – mapa conceptual deste item

ii. Métodos de detecção

Em superfícies abióticas, é fácil a visualização do biofilme a olho nu quando este tem um determinado tamanho e apresenta cor. Por outro lado, a identificação macroscópica de biofilmes em superfícies bióticas, nomeadamente em feridas crônicas, é especulativa e baseada numa cor induzida pelos agregados sésseis ou microrganismos planctónicos dominantes (Percival *et al.*, 2015b).

Quando os biofilmes não se distinguem a olho nu, outros indicadores clínicos indiretos podem indicar presença do mesmo (Høiby *et al.*, 2015; Keast *et al.*, 2014; Metcalf *et al.*, 2016):

- Os sinais clínicos de infeção local (rubor, dor, odor,...);
- Excessiva humidade;
- Tecido de granulação friável;
- Infeção persistente;
- Falha do tratamento com antimicrobiano e recorrência da infeção;
- Resultados negativos em cultura, apesar dos sinais de colonização bacteriana ou alta suspeita de infeção clínica;
- Ferida continua recalcitrante.

O diagnóstico de infeção é obtido através dos sintomas clínicos. No entanto, a “carga” microbiana de amostras nas feridas pode ser maior do que 1×10^5 microrganismos/g de tecido, sem sinais de infeção clínica, podendo mesmo evoluir para septicemia ou morte (Fonseca, 2011).

O uso de zaragoas para a recolha de amostras da superfície é um método inadequado, por causa da contaminação a partir das populações microbianas autóctones da pele, da

forte aderência do biofilme ao epitélio do hospedeiro e do crescimento de microrganismos anaeróbios nos tecidos profundos. Assim, nas feridas, as amostras mais fiáveis para detetar biofilmes são os tecidos de biópsia (Høiby *et al.*, 2015).

Para a deteção de biofilmes é necessário que os métodos de microscopia mostrem provas de um processo infeccioso (presença de leucócitos) e que os microrganismos presentes demonstrem que são agregados microbianos incorporados numa matriz (Høiby *et al.*, 2015). A presença de células bacterianas de crescimento lento, que residem no biofilme dificulta a capacidade para diagnosticar uma infeção de biofilme (Percival *et al.*, 2015b).

O método de cultura consiste na contagem em placas de Petri das unidades formadoras de colónias de bactérias. As culturas usadas em microbiologia normalmente só detetam bactérias planctónicas, pelo que são necessários procedimentos especiais para a cultura de microrganismos presentes em biofilmes. Inicialmente, as amostras são tratadas com soluções antissépticas (cerca de 24 horas) que matam rapidamente microrganismos no estado planctónico. As comunidades de biofilme são dispersas fisicamente com ultrassons e, posteriormente, cultivadas em placas de agar nutriente para quantificar os níveis de bactérias nos biofilmes (Keast *et al.*, 2014).

O diagnóstico de biofilmes em amostras clínicas pode ser difícil e demorado, e pode dar origem a falsos negativos, se as amostras não forem representativas do foco da infeção do biofilme, pelo que o método de cultura não deve ser o único a ser usado para detetar a ausência de infeções associadas a biofilmes (Hall-Stoodley *et al.*, 2012; Høiby *et al.*, 2015).

Os métodos dependentes de cultura de microrganismos permitem o isolamento e identificação de apenas 5% das espécies de bactérias presentes em feridas, pelo que as amostras de biópsia são mais precisas quanto à diversidade microbiana nos biofilmes. O ideal seria a combinação de métodos de cultivo com moleculares (Fonseca, 2011; Høiby *et al.*, 2015). Os métodos de cultura identificam os agentes patogénicos em cerca de 25-30% das vezes, por outro lado os métodos independentes de cultura tem uma taxa de identificação de microrganismos de 80-100% (Hall-Stoodley *et al.*, 2012).

A identificação das bactérias presentes nos biofilme pode ser avaliada utilizando vários métodos moleculares: impressões digitais (16S rRNA), hibridação fluorescente *in situ* (FISH), PCR quantitativo (Q-PCR) e métodos de pirosequenciação (Fonseca, 2011).

O mais comum dos métodos moleculares são os métodos de ácido nucleico com técnicas de amplificação, como a reação em cadeia da polimerase (PCR). Este permite caracterizar os microrganismos presentes em feridas e a variação nos números de bactérias entre as amostras dos diferentes locais da mesma ferida. Permite também saber sobre a prevalência e o tipo de espécies, apresentando uma elevada sensibilidade para os detectar quando em número muito reduzido. Contudo, não há informação sobre a organização estrutural e distribuição espacial das bactérias no biofilme nem a contribuição relativa de cada bactéria para a patogênese da doença (Fonseca, 2011; Hall-Stoodley *et al.*, 2012).

O Q-PCR também pode fornecer dados sobre a abundância relativa dos microrganismos que estão presentes. As desvantagens deste método incluem a dissociação da amostra que vai impedir a avaliação microscópica de microrganismos agregados, a contaminação da amostra, as amostras contendo inibidores PCR e o potencial de amplificação de DNA a partir de microrganismos não viáveis (Hall-Stoodley *et al.*, 2012).

Nos métodos de cultura convencional ou métodos independentes de cultura baseado na técnica de PCR não é possível distinguir microrganismos em estado planctônico dos em estado sésil, podendo não revelar a presença de patogênicos importantes (Høiby *et al.*, 2015).

A pirosequenciação é uma técnica de sequenciação do DNA que se baseia na detecção de pirofosfato (PPi) que é libertado durante a síntese do DNA. Ocorrem várias reações que incluem enzimas (ATP sulfúrilase e luciferase) e substratos (adenosina 5' fosfosulfato e luciferina), gerando-se uma luz visível que é proporcional ao número de nucleótidos incorporados (Dowd *et al.*, 2008; Ronaghi, 2001). É possível a obtenção de resultados rapidamente e ao facilitar a sequenciação do genoma microbiano, permite identificar espécies e estirpes bacterianas e ainda detectar mutações (que podem ser as responsáveis pela resistência a antimicrobianos) (Cummings *et al.*, 2013).

Na hibridização fluorescente *in situ* (FISH) usam-se ácido nucleicos peptídicos que vão ligar-se ao DNA (ácido peptídico específico do ácido nucleico PNA), para uma identificação específica dos microrganismos presentes no biofilme (Fonseca, 2011; Høiby *et al.*, 2014). Como FISH tem o RNA ribossomal como alvo, este método também indica a atividade metabólica recente da bactéria. Permite estudar amostras de tecidos complexos e avaliar a presença de agregados microbianos. Algumas das desvantagens deste método são a necessidade de fixação e permeabilização da amostra, as poucas sondas disponíveis no mercado e o elevado custo (Hall-Stoodley *et al.*, 2012).

Com a microscopia confocal de varrimento laser (CLSM) é possível uma visualização 3D da amostra biológica para ver a composição e a distribuição de células vivas no interior da estrutura do biofilme *in vivo* e em tempo real (Fonseca, 2011).

A utilização de uma combinação de PNA-FISH e CLSM pode ser usada para avaliar a distribuição espacial e a organização estrutural de bactérias de biofilme em feridas crônicas. Esta combinação demonstra que as comunidades microbianas em feridas crônicas são frequentemente polimicrobianas (Fonseca, 2011). Esta combinação permite demonstrar a organização espacial do biofilme. Deste modo, é possível identificar se as bactérias presentes estão em agregados, confirmar a natureza polimicrobiana de um biofilme e indicar a sua extensão numa superfície (Hall-Stoodley *et al.*, 2012).

Os métodos mais adequados para revelar biofilmes em biópsias são a CLSM e a microscopia eletrônica de varredura (SEM) (Høiby *et al.*, 2015).

As técnicas anteriormente referidas são complexas e limitadas a laboratórios de pesquisa, portanto, há uma necessidade de desenvolver meios mais simples de detecção de biofilmes em microbiologia de rotina (Fonseca, 2011). É crucial desenvolver meios de diagnóstico mais fiáveis e acessíveis, pois destes depende a eficácia dos métodos escolhidos para o tratamento (Mota *et al.*, 2012).

Vide o anexo 7 – mapa conceptual deste item

iii. Estratégias de controlo de biofilmes

Para uma melhoria na qualidade de vida dos doentes com feridas crônicas é fundamental adotar algumas estratégias para o controlo dos biofilmes. A falta de adesão por parte do doente pode, muitas vezes, ser a razão pela qual as feridas não cicatrizam (Gale *et al.*, 2014).

É necessária uma avaliação geral do doente para permitir identificar e tratar as suas morbilidades, otimizar o seu estado nutricional e de hidratação (há perdas de fluidos na drenagem de feridas), minimizar ou eliminar os riscos de infeção. Medicamentos como esteroides, imunossuppressores, agentes quimioterápicos podem interferir, pelo que é necessário verificar se o ajuste da medicação pode beneficiar a ferida a cicatrizar. A depressão e outras doenças psicológicas devem ser identificadas pois podem afetar a adesão ao tratamento e a psicossomática (Gale *et al.*, 2014; Justiniano, 2010).

A identificação da etiologia da ferida permitirá definir as medidas terapêuticas que favoreçam a cura da ferida e possam prevenir não só a sua recidiva mas a prevenção do aparecimento de novas feridas semelhantes. O tratamento da ferida tem três objetivos fundamentais: tratar a infeção, remover a “carga necrótica” do leito da ferida (tecido necrótico) e o excesso de exsudato (Justiniano, 2010).

A eficácia da terapêutica no tratamento de uma ferida crónica infetada está dependente de quatro fatores (Leaper *et al.*, 2012):

- Concentração antimicrobiana nos tecidos no local da infeção;
- A presença de isquemia ou necrose tecidular, que dificulta a distribuição dos fármacos;
- Populações autóctones microbianas da ferida crónica;
- Resistência antimicrobiana intrínseca ou extrínseca.

Deve usar-se uma estratégia combinada na preparação do leito da ferida de forma a reduzir a carga do biofilme e, ao mesmo tempo, prevenir a sua reconstituição (Phillips *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2013).

É também necessário o uso concomitante de estratégias que eliminem os microrganismos em forma planctônica e em forma sésil, para uma melhor gestão do biofilme em feridas (Pedro *et al.*, 2012).

Criou-se então um guia prático para a avaliação e tratamento de feridas crônicas – TIME, que permite ao clínico identificar a causa do problema e implementar um plano de atuação de forma a alcançar um tecido de granulação saudável e um leito da ferida vascularizado. As observações clínicas e intervenções relacionadas com a preparação do leito da ferida estão agrupados em (Dowsett *et al.*, 2005; Leaper *et al.*, 2012):

- Tecido: avaliação e desbridamento de material não viável ou externo sobre a superfície da ferida. Deste modo, há a necessidade de identificar tecidos necróticos no leito da ferida e eliminá-los por desbridamento.
- Infecção/Inflamação: avaliação da etiologia de cada ferida, a necessidade de antisséptico tópico e/ou uso de antimicrobiano sistêmico para controlar a infecção e gestão da inflamação.

É importante distinguir três conceitos importantes: colonização, inflamação e infecção. A colonização é a multiplicação de microrganismos que aderem à superfície da ferida, não causa danos celulares ao hospedeiro, por isso não prejudica a cicatrização (Schultz *et al.*, 2004). A infecção consiste no contato de microrganismos, a maioria potenciais causadores de doenças, com um organismo vivo. Por outro lado, a inflamação é o mecanismo de defesa do organismo contra qualquer tipo de “agressões”, tendo como objetivo libertar o organismo do agente agressor e respetivas consequências deste. Muitas vezes, a infecção é causa frequente da inflamação (Leaper *et al.*, 2015).

Todas as feridas, em particular, as crônicas são colonizadas por bactérias da pele, trato respiratório, trato gastrointestinal do paciente ou por bactérias exógenas transferidas do ambiente ou transportadas nas mãos dos profissionais de saúde. A ferida é considerada infetada quando a “carga” microbiana atinge 10^5 CFU (unidades formadoras de colónias) /g de tecido, mesmo que não apresente sinais. Quando os níveis são superiores a 10^6 ou estão presentes mais de 4 espécies provavelmente ocorre dificuldade na cicatrização. A formação de biofilmes microbianos está associada a esta dificuldade (Miller *et al.*, 2014).

- Humidade: avaliação da etiologia e gestão do exsudado da ferida.
- Epiderme dos bordos da ferida: avaliação das bordas (e estado da pele circundante).

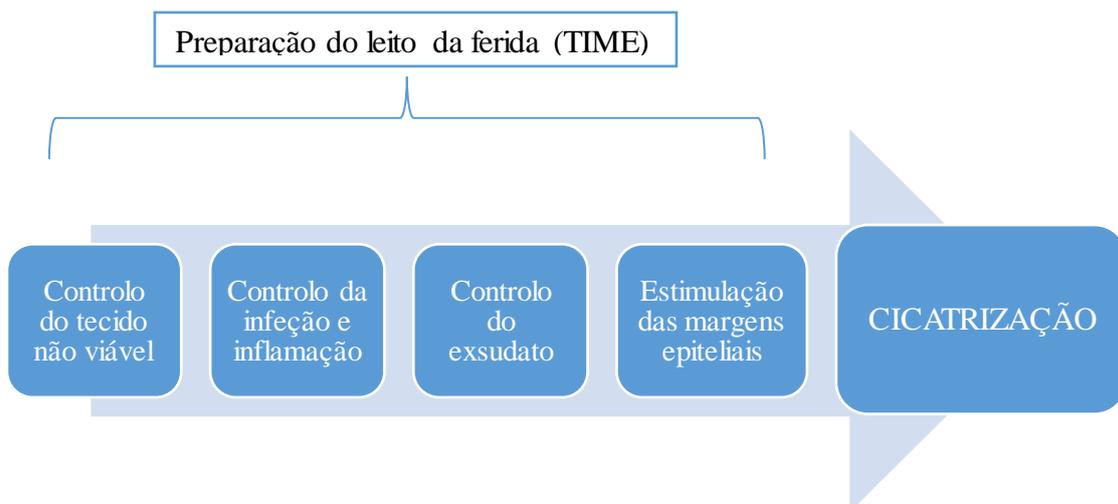


Figura 8: Preparação do leito da ferida, seguindo o conceito TIME, para a cicatrização (adaptado de Bouza *et al.*, 2013).

A presença de tecido necrótico, excesso de exsudato e resíduos metabólicos pode impedir a cicatrização pelo que a limpeza da ferida pode ter um impacto positivo (Santos *et al.*, 2012b). A opção pelo método de limpeza da ferida deve ter como critérios a facilidade de uso, a não toxicidade, a hipoalergenicidade e o custo efetivo (Keast *et al.*, 2014).

O mais apropriado seria o uso da solução salina estéril normal pois esta tem propriedades isotônicas, não causa danos nos tecidos nem altera as populações autóctones bacterianas normais da pele. É desaconselhado o uso de antissépticos bactericidas ou bacteriostáticos, como o hipoclorito de sódio, pois pode afetar negativamente o tecido de reparação (Leaper *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2012b).

Esfregar redistribui os microrganismos (não remove), podendo até introduzir corpos estranhos e danificar os novos tecidos. Por outro lado, a lavagem por irrigação assegura a limpeza adequada do leito da ferida, mas deve-se ter em atenção o uso de uma pressão adequada. Uma vez que, o uso de pinças e gazes pode contaminar a ferida, os profissionais de saúde devem optar pelo uso de luvas e compressas tecido-não-tecido (Santos *et al.*, 2012b).

O tecido necrótico poder estimular a inflamação e o crescimento bacteriano excessivo são razões pelas quais se pode optar por técnicas de gestão da ferida como o desbridamento de tecido necrótico. Este processo de remoção de tecido desvitalizado e/ou material estranho de uma ferida pode transformar a ferida crónica em aguda. O desbridamento pode ter um impacto positivo na redução da “carga” bacteriana, remover células senescentes e reduzir o odor (Dowsett *et al.*, 2005; Gale *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2012a).

O método escolhido para preparação do leito da ferida pode variar com o tipo de ferida e para aumentar a eficácia é necessário a combinação destas técnicas bem como uma manutenção das mesmas para reduzir a “carga” necrótica, a “carga” microbiana, a exsudação excessiva e o biofilme (Gale *et al.*, 2014). O desbridamento inclui técnicas cirúrgicas, cortantes, enzimáticas, mecânicas, autolíticas e biológicas.

- **Cirúrgicas:** Ao remover a carga biológica do leito da ferida, reduz os microrganismos e revitaliza as defesas imunológicas do hospedeiro (Mota *et al.*, 2012). Este é usado normalmente em feridas de maiores dimensões (Justiniano, 2010).
- **Cortantes:** O desbridamento cortante altera a anatomia do leito da ferida e remove a fibrina ou tecido desvitalizado (incluindo a EPS do biofilme). É

considerado o método mais rápido de remoção de qualquer tecido necrótico, diminui a carga microbiana e estimula a cicatrização de feridas (Pedro *et al.*, 2012; Steinberg *et al.*, 2011).

Ambas as técnicas de desbridamento, cirúrgico e cortante, são eficazes mas requerem um profissional com formação especializada. No entanto, o desbridamento cirúrgico requer anestesia por ser um processo mais extenso (Madhok *et al.*, 2013; Ousey *et al.*, 2010).

- **Mecânicas:** Os métodos mecânicos de desbridamento, como por exemplo a irrigação são raramente usados pois podem aumentar a dor do paciente e danificar o tecido de granulação recém-formado (Dowsett *et al.*, 2005). Outro exemplo é a técnica de ultrassons que para além de remover o tecido também desregula o QS de bactérias no biofilme e diminui a virulência. A estimulação tem sido usada para ajudar na penetração de alguns agentes tópicos (Steinberg *et al.*, 2011).
- **Enzimáticas:** Este processo é o menos comum e consiste na aplicação de enzimas exógenas no leito da ferida onde se vão combinar com as enzimas endógenas para quebrar o tecido desvitalizado sem causar dano nos tecidos viáveis (Dowsett *et al.*, 2005). Deste modo, os biofilmes são penetrados e desregulados (Steinberg *et al.*, 2011).
- **Autolíticas:** Atua por hidratação do leito da ferida, por fibrinólise ou por ação enzimática sobre os lipossomas e outros produtos das populações autóctones bacterianas, o que permite eliminar os tecidos necrosados (Justiniano, 2010). É um método altamente seletivo e é o mais utilizado no tratamento das feridas crônicas (Dowsett *et al.*, 2005). Podem ser usadas as enzimas do paciente e apenas funciona quando a ferida está húmida (Fonseca, 2011).
- **Biológicas (larvaterapia):** As larvas alimentam-se de tecidos mortos e bactericidas excretados que diminuem a carga microbiana da ferida sem comprometer o tecido de granulação saudável, e que assim inibem a formação de biofilmes (Fonseca, 2011; Justiniano, 2010; Pedro *et al.*, 2012). Apesar de ser um

método rápido e eficiente para a remoção de fibrina e outros detritos da ferida, nem todos os doentes aceitam este método (Dowsett *et al.*, 2005).

Na melhor das hipóteses, o desbridamento de biofilmes de feridas crônicas é um meio supressivo, daí ser um meio efetivo (Leaper *et al.*, 2015).

Apesar de nenhum método de limpeza ou desbridamento conseguir remover o biofilme de reconstituir-se, este fica mais vulnerável a antimicrobianos durante o processo de recuperação (leva 24 horas para restabelecer) (Fonseca, 2011; Mancl *et al.*, 2013; Phillips *et al.*, 2010).

Os antimicrobianos pretendem evitar a reconstituição do biofilme, ao eliminar as células planctônicas que foram desagregadas por mecanismos físicos. Estes podem ser eficazes pois penetram na membrana do próprio biofilme e causam a morte celular (Santos *et al.*, 2013).

Os antissépticos são usados topicamente e têm mais que um mecanismo de ação. O uso destes reduz a carga microbiana e suprime a formação e reformação de biofilmes, sem impactos adversos na cura. Em situações ideais os agentes antissépticos possuem um largo espectro de ação e são resistentes à degradação pelo sangue ou pelas proteínas dos tecidos e devem ser inócuos para as células eucarióticas e possuir baixa alergenicidade (Leaper *et al.*, 2015).

O controlo do exsudato inicia-se com a limpeza da ferida, posterior desbridamento e após este, aplicam-se pensos absorventes, hidrofibras, alginatos de cálcio ou espumas de poliuretano. Quando as feridas são muito húmidas ou muito secas, a cicatrização é mais difícil, pelo que se opta pelo uso de pensos que mantêm um ambiente húmido (Gale *et al.*, 2014). De seguida, é necessário combater a infeção com antimicrobianos. A associação de um tratamento local com pensos impregnados com substâncias antissépticas é vantajosa porque ainda não são conhecidas resistências (Justiniano, 2010). Além disso, o uso de pensos tópicos antissépticos pode ser considerado uma medida profilática em doentes em que há suspeita de infeção, porque impede a fixação e, posterior, maturação do biofilme (Leaper *et al.*, 2012).

Pode ser necessário a utilização de pensos e agentes antimicrobianos tópicos, devido à natureza polimicrobiana de muitos biofilmes (Phillips *et al.*, 2010). Um penso antimicrobiano deve ter propriedades como: ser confortável, adaptável, fornecer uma barreira microbiana, proporcionar um ambiente de cicatrização húmido, absorver e reter bactérias e evitar uma remoção traumática (Santos *et al.*, 2012a).

É recomendado o uso de coberturas antimicrobianas inicialmente por 2 semanas, com posterior reavaliação do estado da ferida do paciente após um tempo de exposição adequado, caso não se verifique evolução clínica deve-se alterar o composto antimicrobiano (Dowsett, 2013; Leaper *et al.*, 2012).

Atualmente as substâncias com atividade bactericida de largo espectro são prata, iodo, PHMB e mel.

- **Prata:** A prata é um bom exemplo de um agente antisséptico que exerce atividade antimicrobiana em diferentes partes da bactéria. Esses vários mecanismos de ação envolvem a ligação da prata à parede celular e destabilização desta, danificando as membranas intracelulares e nucleares, desnaturando as moléculas de DNA e RNA (Leaper *et al.*, 2015). Tem sido muito comercializados pensos com libertação de íons de prata pois estes suprimem a infecção e toxinas bacterianas, e tem também capacidade para prevenir a formação de biofilmes. Os pensos têm baixa toxicidade para as feridas, contudo o seu uso deve ser interrompido quando o equilíbrio bacteriano é restabelecido (Santos *et al.*, 2012a; Santos *et al.*, 2013; Steinberg *et al.*, 2011). Apesar do espectro de ação largo, alguns investigadores referem que a prata pode ser tóxica para os queratinócitos e fibroblastos (Leaper *et al.*, 2015).
- **Cadexómero de iodo:** É um antisséptico eficaz nas feridas crônicas com exsudato, atua contra a produção do material polimérico para destruir a sua estrutura. Pode ser usado na supressão do biofilme e não causa dano no hospedeiro por apresentar baixa toxicidade (Pedro *et al.*, 2012).

O iodo desnatura as proteínas, inativa as enzimas, os fosfolípidos e estruturas da membrana que impedem as ligações de hidrogênio com os aminoácidos. Tem sido muito utilizado como antisséptico e possui largo espectro de atividade contra bactérias, fungos, protozoários e vírus (Santos *et al.*, 2012a). Contudo, nas feridas exsudativas fica mais rapidamente inativo o que pode levar à reconstituição do biofilme (Santos *et al.*, 2013).

- **Polihexametileno biguanida ou polihexanida (PHMB):** É um polímero sintético semelhante aos péptidos antibacterianos (AMPs). Após penetração nas células alvo, o PHMB liga-se ao DNA e outros ácidos nucleicos, danificando ou inativando o DNA bacteriano. Dada a sua ampla ação antimicrobiana, anti-fúngica e anti-inflamatória, garante eficácia e segurança, redução dos biofilmes, sem desenvolver resistência, sem riscos tóxicos e de reabsorção, promovendo a cicatrização. (Santos *et al.*, 2012a; Leaper *et al.*, 2012).

Atualmente é muito usada uma solução que contém betaína (surfactante que interfere na produção de homoserina lactona (fator de virulência) e no QS) e polihexanida (conservante, ajuda na manutenção de hidratação e eliminação dos microrganismos da ferida), pelo que a limpeza do leito da ferida é facilitada, reduzindo o tempo de cicatrização da mesma (Santos *et al.*, 2012a). É histocompatível, sendo das soluções mais utilizadas incluindo nas feridas infectadas com MRSA (Santos *et al.*, 2012b).

- **Mel:** Inibe a mitose celular, atua em várias fases do desenvolvimento do biofilme, em diferentes estirpes de bactérias e o risco de desenvolver resistências é reduzido. Por ser higroscópico aumenta a osmolaridade e o teor elevado de glicose estimula a ação dos macrófagos e diminui o aporte de água às bactérias (desidrata-as) e o pH (Leaper *et al.*, 2012; Pedro *et al.*, 2012; Steinberg *et al.*, 2011). Ao proteger a ferida dos ROS (efeito antioxidante) reduz a inflamação. O mel tem propriedades antimicrobianas, estimula a atividade anti-inflamatória, promove um ambiente húmido e reduz o odor (Santos *et al.*, 2012a).

Dos antimicrobianos sistêmicos apenas 25-32% são eficazes contra biofilmes porque só suprimem as células que crescem rapidamente nos seus limites exteriores e não conseguem eliminar a causa da cronicidade da ferida devido aos mecanismos de sobrevivência dos biofilmes. Apenas as células planctônicas são destruídas e as infecções continuam a propagar-se (infecções recorrentes e crônicas) após terminar a terapêutica com os antimicrobianos (Fonseca 2011; Santos *et al.*, 2013).

O sucesso do tratamento de infecções associadas a biofilmes é difícil devido ao elevado nível de resistência por parte dos agentes patogênicos aos antimicrobianos. Assim, surgem novas abordagens antibiofilme como alternativa porque o mecanismo de ação destes são muito menos suscetíveis ao aparecimento de resistência e menos tóxicos (Sun *et al.*, 2013). Estes podem ser usados em simultâneo com os antimicrobianos clássicos o que resulta num efeito sinérgico sobre o tratamento de infecções no biofilme (Pedro *et al.*, 2012).

- **Lactoferrina:** Bloqueia a capacidade da bactéria aderir à superfície porque tem propriedades de ligação do ferro, diminuindo a disponibilidade deste, o que prejudica o primeiro passo de formação de biofilmes, a adesão irreversível (Mota *et al.*, 2012; Pedro *et al.*, 2012).
- **Péptidos antimicrobianos (AMPs):** Por serem catiónicos podem ligar-se a moléculas carregadas negativamente na membrana do microrganismo, o que reduz a capacidade das bactérias desenvolverem resistência. A modificação de sequências de aminoácidos primárias permitem melhorar a eficácia e estabilidade e tem um menor custo de produção, se realizada em grandes quantidades (Sun *et al.*, 2013).
- **Bacteriófagos:** Os fagos são um tipo de vírus que infeta unicamente bactérias, estes são metabolicamente inertes e, após a infecção, reproduzem-se usando a bactéria hospedeira. Devido a anularem a proteção conferida por biofilmes são usados no tratamento de infecções bacterianas. Uma vantagem relativamente a antimicrobianos tópicos é o fato de terem a capacidade de se replicar no local da infecção, ficando assim os predadores naturais das bactérias diretamente sobre a

ferida, em abundância (Flores *et al.*, 2010). Em conjunto com antimicrobianos verifica-se um efeito sinérgico, e as bactérias que são resistentes a um ainda podem ser mortas pelo segundo agente, pelo que é menos provável o aparecimento de resistência no uso de uma terapia combinada (Sun *et al.*, 2013).

- **Tratamento ultrassônico:** Pode melhorar o transporte de antimicrobianos para o biofilme devido à fragmentação física das barreiras do biofilme e à absorção dos antimicrobianos devido ao aumento na permeabilidade da membrana de células bacterianas (Sun *et al.*, 2013).
- **Inibidores do *Quorum Sensing*:** Ao impedirem a ação do *QS*, proporcionam métodos alternativos para o tratamento de infecções por biofilmes e se usado como adjuvante para a administração de antimicrobianos e aumentar a suscetibilidade das bactérias. Há pouca probabilidade de se desenvolver resistência porque o *QS* não está diretamente envolvido em processos essenciais para o crescimento bacteriano (Sun *et al.*; 2013). RIP (RNA-III inibidor péptidos) e furanona C30 são exemplos destes inibidores (Pedro *et al.*, 2012).
- **Enzimas que degradam matriz:** DNase I, α -amilase e dispersina B. A DNase I altera a forma do biofilme, permitindo a penetração dos antibióticos. A α -amilase não só inibe a formação do biofilme como é eficaz na degradação de biofilmes maduros. A dispersina B degrada a EPS. O uso concomitante de enzimas com antibióticos que degradam a matriz do biofilme é altamente eficaz para a remoção de biofilmes (Pedro *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2013).
- **Gálio:** perturba os processos que dependem de ferro (não conseguem distinguir Ga^{3+} de Fe^{3+}) (Pedro *et al.*, 2012).
- **Xilitol:** Interfere com a formação do biofilme, dado que compromete o desenvolvimento da matriz e prejudica o espessamento da parede celular nas bactérias Gram positivas (Rhoads *et al.*, 2008; Wolcott *et al.*, 2008b).

- **EDTA:** O ácido etilenodiamino tetra-acético é um composto orgânico que é usado como agente quelante, diminuindo a disponibilidade do ferro. Apresenta um efeito bactericida e impede a fixação das bactérias (Rhoads *et al.*, 2008).
- **Utilização de concentrações subinibitórias de antibióticos:** As concentrações subinibitórias podem influenciar os parâmetros de virulência bacteriana pois promovem a perda de adesinas (afeta capacidade de adesão) e determinam a hidrofobicidade da superfície celular, assim como diminuem a formação do biofilme (Fonseca *et al.*, 2006).

Existem ainda terapias mais avançadas como os derivados de plaquetas, fator de crescimento das células beta e oxigenoterapia hiperbárica (Pedro *et al.*, 2012).

A **oxigenoterapia hiperbárica (OHB)** foi proposta para promover o fornecimento de oxigênio a feridas que resultam da presença concomitante de hipoxia tecidual e infecção, e assim, promover o seu tratamento (Gomes *et al.*, 2012; Löndahl *et al.*, 2010). Em pessoas com úlceras nos pés devido à DM, a OHB reduz significativamente o risco de amputação e pode promover a cura no período de um ano. Relativamente ao efeito da OHB em feridas crônicas associadas a outras patologias, qualquer benefício desta terapia tem de ser examinado mais profundamente (Kranke *et al.*, 2015).

O tratamento consiste em colocar o paciente no interior de uma câmara hiperbárica, isto é, com uma pressão superior à atmosférica (2,5 a 3 atmosferas), onde irá inalar oxigênio puro a 100% (Fife *et al.*, 2016; Fonder *et al.*, 2008; Gill *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2012). O aumento da pressão irá aumentar a pressão arterial e tecidual de oxigênio (promove a entrada deste por difusão simples), sendo esta a responsável pelos efeitos terapêuticos da OHB (Gomes *et al.*, 2012).

Em síntese, o oxigênio atua como substrato para as enzimas envolvidas no processo de cicatrização, pois permite a epitelização, a síntese e depósito de colágeno, a angiogênese e o combate à infecção (Gill *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2012; Kranke *et al.*, 2015; Löndahl *et al.*, 2010).

Foi desenvolvida uma nova geração de pensos antibacterianos (NGAD) usando uma tecnologia de hidrofibra capaz de gerir o exsudato bem como as barreiras que impedem a cicatrização, nomeadamente o biofilme e a infeção (Bowler, 2015).

Até hoje, **Aquacel Ag⁺ Extra** (ConvaTec) é o primeiro penso comercializado para feridas especificamente desenhado para gerir biofilmes e há cada vez mais evidências que demonstram a excecional eficácia clínica (Metcalf *et al.*, 2016).

Possui 2 camadas de carboximetilcelulose de sódio (CMC) impregnadas com 1,2% de prata iónica (agente antimicrobiano) melhorada com EDTA (agente quelante) e cloreto de benzetónio (surfactante quaternário catiónico), a um pH de 5,5. Estes componentes tem um efeito sinérgico o que perturba o biofilme e expõe os microrganismos ao largo espectro de ação antimicrobiana da prata iónica (Bowler, 2015; Bowler *et al.*, 2016).

O pH ácido é preferível porque as feridas são tipicamente alcalinas e as enzimas proteolíticas encontradas nas feridas tem pico de atividade a pH alcalino ou neutro, assim como aumenta a atividade da prata iónica e diminui a integridade do biofilme. Após vários estudos apenas o penso com hidrobifra é capaz de eliminar a estirpe de *S. aureus* altamente resistente a antibióticos, na forma de biofilme (Bowler *et al.*, 2016).

Este penso contribuirá significativamente para a gestão de biofilmes nas feridas e infeções, bem como promover a cicatrização dos pacientes debilitados com feridas recalcitrantes (Metcalf *et al.*, 2016; Bowler, 2015; Bowler *et al.*, 2016).

Apesar das várias estratégias de tratamento até hoje conhecidas nenhuma é considerada totalmente eficaz, pelo que o primeiro passo e o mais importante é a prevenção.

As medidas terapêuticas devem reduzir a quantidade de microrganismos e fatores de virulência. Deve optar-se por uma estratégia tripla para suprimir e eliminar biofilmes: antissépticos tópicos, antibióticos sistémicos e antimicrobianos antibiofilme. Assim, é prejudicado o metabolismo e integridade da célula e aumentam as defesas do hospedeiro (Fonseca 2011).

Com um expectável aumento de doentes internados nos hospitais, deverá haver cada mais uma consciencialização por parte dos profissionais de saúde no tratamento destas infeções, nomeadamente no que diz respeito às condições de assepsia e do tratamento abusivo com antibióticos, indicado como o principal responsável pelos recentes aumentos de microrganismos com resistências a antimicrobianos (Høiby *et al.*, 2015).

O avanço da tecnologia e o desenvolvimento de dispositivos médicos mais resistentes à colonização microbiana e mais eficientes (que possam reduzir o tempo necessário para a resolução do problema) serão certamente um dos fatores mais importantes na abordagem ao tratamento e prevenção de infeções e a profilaxia com os antimicrobianos e dosagem correta (Henriques *et al.*, 2013).

Devemos ainda estar conscientes que o processo de supressão dos biofilmes não é definitivo, continua enquanto a ferida estiver aberta, sendo que o objetivo não é a sua erradicação, mas a supressão abaixo do nível de interferência na cicatrização (Mota *et al.*, 2012).

Vide o anexo 8 – mapa conceptual deste item

- iv. Proposta de algoritmo para a deteção e tratamento de biofilmes nas feridas crónicas

O algoritmo proposto serve como um guia para o profissional de saúde na confirmação da presença de um biofilme numa ferida e, conseqüentemente, quais as medidas apropriadas para o gerir.

Biofilmes e Feridas Crônicas

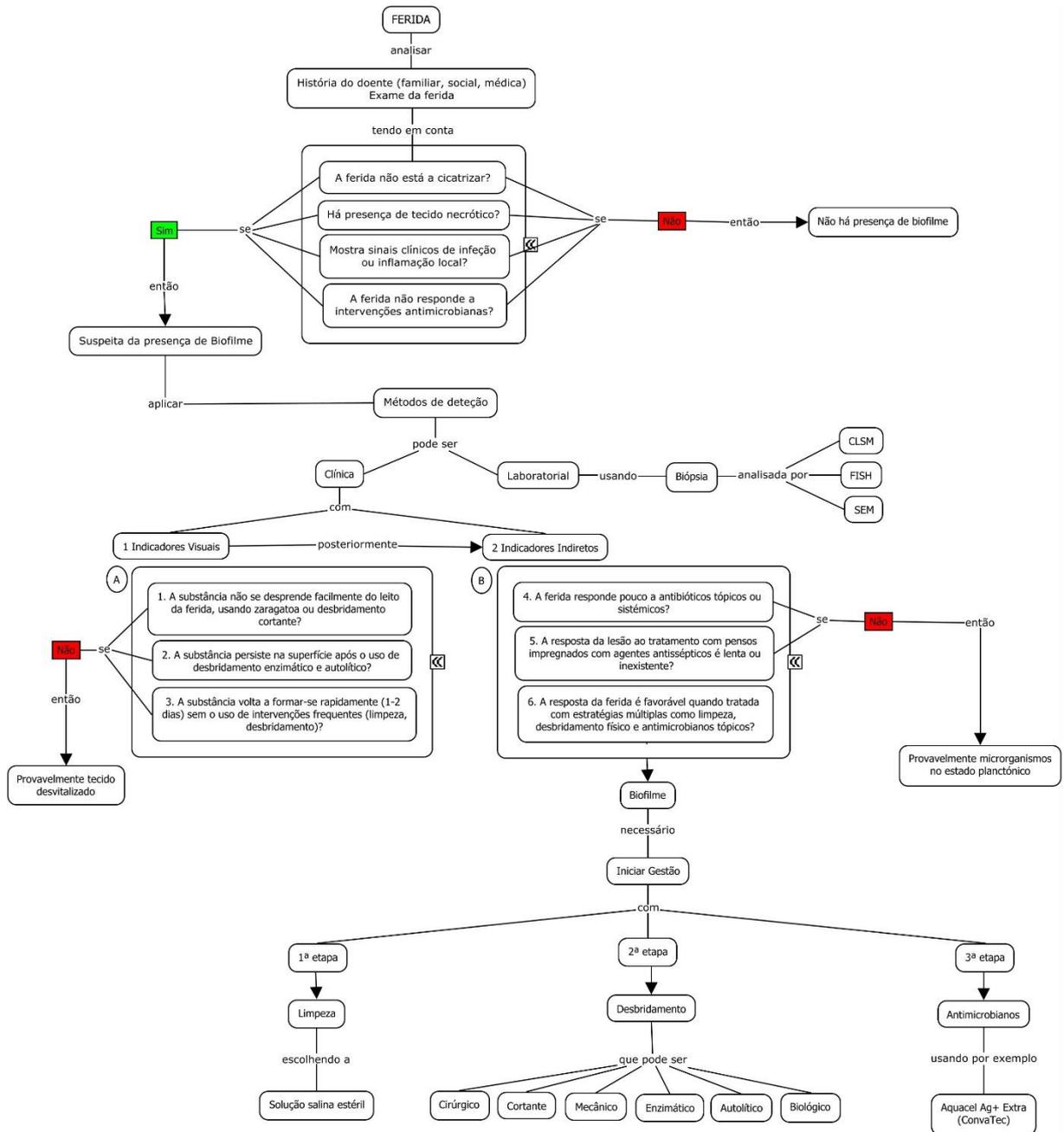


Figura 9: Proposta de algoritmo para a deteção e tratamento de biofilmes nas feridas (adaptado de Metcalf *et al.*, 2016; Pedro *et al.*, 2012; Percival *et al.*, 2015b).

III. Conclusão e Perspetivas Futuras

O aumento da incidência de feridas crônicas na população idosa é um problema importante e atual. Há uma grande necessidade de encontrar estratégias terapêuticas eficazes, pelo que também é fundamental o desenvolvimento de meios mais fiáveis e acessíveis para diagnosticar as infeções por biofilme.

Através de uma revisão de literatura é possível concluir que as estratégias de gestão de biofilmes nas feridas crônicas inclui desbridamento, uso de antissépticos tópicos, antibióticos sistémicos e agentes anti-biofilme. A base da gestão passa pela utilização de estratégias múltiplas que potenciam o ataque simultâneo a todos os mecanismos de resistência que caracterizam os biofilmes. Deve-se ter em conta que as feridas garantem um ambiente no qual o ecossistema microbiano é dinâmico e instável, e como tal torna-se estritamente difícil reproduzir experimentalmente. Atualmente não existem métodos de deteção de rotina disponíveis e as intervenções eficazes dependem da qualidade do diagnóstico.

Atendendo á literatura consultada constata-se que o diagnóstico e terapêutica das infeções causadas por biofilme é um processo complexo e de elevada dificuldade, pelo que deverá existir uma consciencialização clínica para o paradigma séssil, reforçando-se fortemente o papel e a importância da prevenção no ato médico.

Assim sendo, torna-se fundamental o estabelecimento de relações de trabalho intensas e profícuas entre clínicos e investigadores, de forma a otimizar o trabalho em equipa e a partilha de recursos. A investigação clínica deve desta forma promover uma “conversa contínua” entre estes profissionais, de forma a melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Dado que o processo de remoção do biofilme não é definitivo, o objetivo tem de ser a sua supressão abaixo do nível de interferência na cicatrização. A predominância de agentes patogénicos numa comunidade séssil pode ser minimizada ou mesmo eliminada, promovendo a transformação de biofilme patogénico em biofilme saudável, designadamente com recurso a prebióticos e probióticos.

Tendo em consideração a literatura consultada até à presente data pretende-se propor um algoritmo síntese que possa ser facilitador para o conhecimento dos biofilmes nas feridas e, conseqüentemente melhorar o processo de gestão do processo de cicatrização, por parte dos profissionais de saúde.

A título final gostaria de referir a reduzida experiência na realização de trabalhos monográficos designadamente tendo em consideração a necessidade de existir um olhar inovador na revisão bibliográfica apresentada. Acresce ainda que houve dada a complexidade multidisciplinar do tema escolhido houve alguma dificuldade na compreensão da linguagem técnica, específica, conceptual e metodológica, designadamente, os algoritmos clínicos.

IV. Referências Bibliográficas

Alhede, M., Bjarnsholt, T., Givskov, M., *et al.* (2014). Pseudomonas aeruginosa biofilms: mechanisms of immune evasion. *Advances in Applied Microbiology*, 86, pp. 1-40.

Anvisa. [Em linha]. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo3/mecanismos.htm>. [Consultado em 22/07/2016].

Barbosa, J. A. G., Campos, L. M. N. (2010). Directrices para el tratamiento de úlcera venosa. *Enfermería Global*, 9(3), pp. 1-13.

Behlau, I., Gilmore, M. S. (2008). Microbial biofilms in ophthalmology and infectious disease. *Archives of Ophthalmology*, 126(11), pp. 1572-1581.

Bielefeld, K. A., Amini-Nik, S., Alman, B. A. (2013). Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(12), pp. 2059-2081.

Bouza, E. T., Platas, S. P., Díaz, M. Á., *et al.* (2013). Cura en ambiente húmedo en úlceras crónicas a través del Concepto TIME. Recomendaciones basadas en la evidencia. *Enfermería Dermatológica*, 7(20), pp. 31-42.

Bowler, P. (2015). A real-life clinical evaluation of a next-generation antimicrobial dressing on acute and chronic wounds. *Wounds*, 5(6), pp. 9.

Bowler, P. G., Parsons, D. (2016). Combatting wound biofilm and recalcitrance with a novel anti-biofilm Hydrofiber® wound dressing. *Wound Medicine*, 14, pp. 6-11.

Campoccia, D., Montanaro, L., Arciola, C. R. (2006). The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials*, 27(11), pp. 2331-2339.

Campos, A. C. L., Borges-Branco, A., Groth, A. K. (2007). Cicatrização de feridas. *ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*, 20(1), pp. 51-58.

Caumo, K., Duarte, M., Cargnin, S. T., *et al.* (2010). Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. *Revista Liberato*, 11(16), pp. 89-188.

Coelho-Castelo, A. A., Trombone, A. P., Rocha, C. D., *et al.* (2009). Resposta imune a doenças infecciosas. *Medicina (Ribeirão Preto)*, 42(2), pp. 127-142.

Cummings, P. J., Ahmed, R., Durocher, J. A., *et al.* (2013). Pyrosequencing for microbial identification and characterization. *Journal of Visualized Experiments*, (78), pp. e50405-e50405.

Declour, A., (2009). Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. *National Institutes of Health*, 1749 (5), pp. 808-816.

Demidova-Rice, T. N., Hamblin, M. R., Herman, I. M. (2012). Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. *Advances in Skin & Wound Care*, 25(7), pp. 304-314.

Donlan, R. M. (2001). Biofilms and device-associated infections. *Emerging Infectious Diseases*, 7(2), pp. 277-281.

Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), pp. 881-890.

Donlan, R. M., Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), pp. 167-193.

- Dowd, S. E., Wolcott, R. D., Sun, Y., *et al.* (2008). Polymicrobial nature of chronic diabetic foot ulcer biofilm infections determined using bacterial tag encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *Microbiome of Diabetic Ulcers*, 3(10), pp. e3326.
- Dowsett, C., Newton, H. (2005). Wound bed preparation: TIME in practice. *Wounds UK*, 1(3), pp. 58.
- Dowsett, C. (2013). Biofilms: A practice-based approach to identification and treatment. *Wounds UK*, 9(2), pp. 68-72.
- Duarte, N., Gonçalves, A. (2011). Pé diabético. *Angiologia e Cirurgia Vasculare*, 7(2), pp. 65-79.
- Dufour, D., Leung, V., Lévesque, C. M. (2010). Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*, 22(1), pp. 2-16.
- Dzidic, S., Suskovic, J., Kos, B. (2008). Antibiotic resistance mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. *Food Technology Biotechnology*, 46(11), pp. 11-21.
- Flores, J., Baylina, P., Balcão, V. *et al.* (2010). Bacteriófagos no tratamento de feridas. *Cadernos de Saúde – número especial infecção associada à prática de cuidados de saúde*, 3, pp. 107-108.
- Fife, C. E., Eckert, K. A., Carter, M. J. (2016). An Update on the Appropriate Role for Hyperbaric Oxygen: Indications and Evidence. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 138(3S), pp. 107S-116S.
- Fonder, M. A., Lazarus, G. S., Cowan, D. A., *et al.* (2008). Treating the chronic wound: a practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 58(2), pp. 185-206.

Fonseca, A. P. (2011). Biofilms in wounds: An unsolved problem? *EWMA Journal*, 11(2), pp. 10-23.

Fonseca, A. P., Sousa, J. C., Tenreiro, R., *et al.* (2006). *Pseudomonas aeruginosa* as a nosocomial pathogen: epidemiology, virulence, biofilm formation and antimicrobial therapy. *Recent Research Developments in Microbiology*, 10, pp. 97-132.

Gale, S. S., Lurie, F., Treadwell, T., *et al.* (2014). DOMINATE wounds. *Wounds*, 26(1), pp. 1-12.

Ganesh, K., Sinha, M., Mathew-Steiner, S.S., *et al.* (2014). Chronic Wound Biofilm Model. *Advances in Wound Care*, 4(7), pp. 382-388.

Gill, A. L., Bell, C. N. (2004). Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. *Qjm*, 97(7), pp. 385-395.

Gomes, C., Jesus, C. (2012). Benefits of the Application of Hyperbaric Oxygen Therapy in Wound Healing of Lower Extremity. *Journal of Aging and Innovation*, 1(2), pp. 40-47.

Guimarães, D. O., Momesso, L. D. S., Pupo, M. T. (2010). Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, 33(3), pp. 667-679.

Hall-Stoodley, L., Stoodley, P. (2009). Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular microbiology*, 11(7), pp. 1034-1043.

Hall-Stoodley, L., Stoodley, P., Kathju, S., *et al.* (2012). Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 65(2), pp. 127-145.

Henriques, A., Vasconcelos, C., Cerca, N. (2013). A importância dos biofilmes nas infecções nosocomiais: O estado da arte. *Arquivos de Medicina*, 27(1), pp. 27-36.

Høiby, N., Ciofu, O., Johansen, H. K., *et al.* (2011). The clinical impact of bacterial biofilms. *International Journal of Oral Science*, 3(2), pp. 55-65.

Høiby, N., Bjarnsholt, T., Moser, C., *et al.* (2015). ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clinical Microbiology and Infection*, 21, pp. S1-S25.

Jayaraman, R. (2009). Antibiotic resistance: an overview of mechanisms and a paradigm shift. *Current Science*, 96(11), pp. 1475-1484.

Jensen, P. Ø., Givskov, M., Bjarnsholt, T., *et al.* (2010). The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 59(3), pp. 292-305.

Justiniano, A. (2010). Feridas crônicas – Fisiopatologia e Tratamento. *Cadernos de Saúde – número especial infecção associada à prática de cuidados de saúde*, 3, pp. 69-75.

Kalia, V. C. (2013). Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnology Advances*, 31(2), pp. 224-245.

Keast, D., Swanson, T., Carville, K., *et al.* (2014). Ten Top Tips... Understanding and managing wound biofilm. *Journal of Lymphoedema*, 5(2), pp. 20-24.

Kirketerp-Møller, K., Jensen, P. Ø., Fazli, M., *et al.* (2008). Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(8), pp. 2717-2722.

Kishen, A. (2010). Advanced therapeutic options for endodontic biofilms. *Endodontic Topics*, 22(1), pp. 99-123.

Kranke, P., Bennett, M. H., Martyn-St James, *et al.* (2015). Hyperbaric oxygen therapy for chronic wounds. *Cochrane Database of Systematic Reviews 2015*, 6. [Em linha]. Disponível em <http://www.cochrane.org/CD004123/WOUNDS_hyperbaric-oxygen-therapy-for-treating-chronic-wounds>. [Consultado em 29/08/2016].

Kratzer, C., Graninger, W., Macfelda, K., *et al.* (2007). Comparative activities of antibiotics against intracellular non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 119(9), pp. 297-302.

Lai-Cheong, J. E., Mc Grath, J. A. (2009). Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine*, 37(5), pp. 223-226.

Laureano, A., Rodrigues A. M. (2011). Cicatrização de feridas. *Revista da Sociedade Portuguesa de Dermatologia*, 69(3), pp. 355-367.

Lazar, V. (2011). Quorum sensing in biofilms – how to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power?. *Anaerobe*, 17(6), pp. 280-285.

Leaper, D. J., Schultz, G., Carville, K., *et al.* (2012). Extending the TIME concept: what have we learned in the past 10 years? *International Wound Journal*, 9(2), pp. 1-19.

Leaper, D., Assadian, O., Edmiston, C. E. (2015). Approach to chronic wound infections. *British Journal of Dermatology*, 173(2), pp. 351-358.

Leite, A. P., de Oliveira, B. G. R. B., Barrocas, D. L. R., *et al.* (2012). Uso e efetividade da papaína no processo de cicatrização de feridas: uma revisão sistemática. *Revista Gaúcha de Enfermagem*, 33(3), pp. 198-207.

Löndahl, M., Katzman, P., Nilsson, A., *et al.* (2010). Hyperbaric oxygen therapy facilitates healing of chronic foot ulcers in patients with diabetes. *Diabetes Care*, 33(5), pp. 998-1003.

Luz, S. R., Lopacinski, A. C., Fraga, R., *et al.* (2010). Úlceras de pressão. *Geriatrics & Gerontology*, 4(1), pp. 36-43.

Madhok, B. M., Vowden, K., Vowden, P. (2013). New techniques for wound debridement. *International Wound Journal*, 10(3), pp. 247-251.

Mah, T. F. (2012). Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiology*, 7(9), pp. 1061-1072.

Mancl, K. A., Kirsner, R. S., Ajdic, D. (2013). Wound biofilms: lessons learned from oral biofilms. *Wound Repair and Regeneration*, 21(3), pp. 352-362.

Marsh, P. D., Devine, D. A. (2011). How is the development of dental biofilms influenced by the host?. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(s11), pp. 28-35.

Mandelbaum, S. H., Di Santis, E. P., Mandelbaum, M. H. S. (2003). Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 78(4), pp. 393-408.

Medzhitov, R. (2010). Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*, 140(6), pp. 771-776.

Pedro, I., Saraiva, S. (2012). Intervenções de enfermagem na gestão de biofilmes em feridas complexas. *Journal of Aging and Innovation*, 1(6), pp. 77-88.

Menoita, E., Santos, V., Gomes, C., *et al.* (2012) Role of Biofilms in Chronic Wounds. *Journal of Aging and Innovation*, 1(2), pp. 33-42.

Metcalf, D. G., Bowler, P. G., Hurlow, J. (2016). A clinical algorithm for wound biofilm identification. *Journal of Wound Care*, 23(3), pp. 137-142.

Miller, K. G., Tran, P. L., Haley, C. L., *et al.* (2014). Next science wound gel technology, a novel agent that inhibits biofilm development by gram-positive and gram-negative wound pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(6), pp. 3060-3072.

Mota, M. C., Melo, S. C., Costa, T. P. (2012). Estratégias de gestão de biofilmes em feridas crônicas: uma revisão da literatura. *Journal of Tissue Regeneration & Healing*. [Em linha]. Disponível em <<http://www.trh-journal.com/gestao-de-biofilmes/>>. [Consultado em 25/08/2016].

Ousey, K., McIntosh, C. (2010). Understanding wound bed preparation and wound debridement. *British Journal of Community Nursing*, 15(3), pp. S22-S28.

Patel, R. (2005). Biofilms and antimicrobial resistance. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 437, pp. 41-47.

Pedro, I., Saraiva, S. (2012). Nursing Intervention for Biofilm management en Complex Wounds. *Journal of Aging and Innovation*, 1(6), pp. 78-88.

Percival, S. L., Thomas, J. G., Williams, D. W. (2010). Biofilms and bacterial imbalances in chronic wounds: anti-Koch. *International Wound Journal*, 7(3), pp. 169-175.

Percival, S. L., McCarty, S. M., Lipsky, B. (2015a). Biofilms and wounds: an overview of the evidence. *Advances in Wound Care*, 4(7), pp. 373-381.

Percival, S. L., Vuotto, C., Donelli, G., *et al.* (2015b). Biofilms and wounds: an identification algorithm and potential treatment options. *Advances in Wound Care*, 4(7), pp. 389-397.

Pereira, M. O. (2001). *Comparação da eficiência de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme*. Tese de Doutoramento, Escola de Engenharia da Universidade do Minho, Portugal.

Phillips, P. L., Wolcott, R. D., Fletcher, J., *et al.* (2010). Biofilms made easy. *Wounds International*, 1(3), pp. 1-6.

Poelstra, K. A., Barekzi, N. A., Rediske, A. M., *et al.* (2002). Prophylactic treatment of gram-positive and gram-negative abdominal implant infections using locally delivered polyclonal antibodies. *Journal of Biomedical Materials Research*, 60(1), pp. 206-215.

Ramos, O. E. T., Pareyón, L. A. R. (2009). Algunos aspectos clínico-patológicos de la úlcera de pierna. *Dermatología Revista Mexicana*, 53(2), 80-91.

Revilla, G. P., Sá, A. B., Carlos, J. S. (2007). O pé dos diabéticos. *Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar*, 23(5), pp. 615-626.

Rhoads, D. D., Wolcott, R. D., Percival, S. L. (2008). Biofilms in wounds: management strategies. *Journal of Wound Care*, 17(11), p. 502-508.

Rocha, J. A., Miranda, M. J., Andrade, M. J. (2006). Abordagem terapêutica das úlceras de pressão: intervenções baseadas na evidência. *Acta Médica Portuguesa*, 19(1), pp. 29-38.

Ronaghi, M. (2001). Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Research*, 11(1), pp. 3-11.

Santos, V., Marques, J., Santos, A., *et al.* (2012a). Identification and treatment of infection on complex wounds. *Journal of Aging and Innovation*, 1(2), pp. 48-64.

Santos, V., Marques, J., Santos, A., *et al.* (2012b). Chronic Wounds Cleansing: Evidence Based Approach. *Journal of Aging and Innovation*, 1(4), pp. 53-61.

Santos, V., Santos, A., Menoita, E. (2013) Wound Biofilm Approach: Case Studies. *Journal of Aging and Innovation*, 2(1), pp. 76-96.

Schultz, G. S., Barillo, D. J., Mazingo, D. W., *et al.* (2004). Wound bed preparation and a brief history of TIME. *International Wound Journal*, 1(1), pp. 19-32.

Seeley, R. R., Stephens, T. D., Tate, P. (2003). *Anatomia & Fisiologia*. Loures, Lusociência.

Seth, A. K., Geringer, M. R., Hong, S. J., *et al.* (2012). In vivo modeling of biofilm-infected wounds: a review. *Journal of Surgical Research*, 178(1), pp. 330-338.

Smith, A. W. (2005). Biofilms and antibiotic therapy: is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems?. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), pp. 1539-1550.

Soto, S. M. (2013). Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*, 4(3), pp. 223-229.

Sousa, J. C. F. (2006). *Manual de antibióticos antibacterianos*. Porto, Edições Universidade Fernando Pessoa.

Steinberg, J., Siddiqui, F. (2011). The chronic wound and the role of biofilm. *Podiatry Management*, 30(6), pp. 181-190.

Stewart, P. S., Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 358(9276), pp. 135-138.

Sun, F., Qu, F., Ling, Y., *et al.* (2013). Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. *Future Microbiology*, 8(7), pp. 877-886.

Tazima, M. F. G. S., Vicente, Y. A. M. V. A., Moriya, T. (2008). Biologia da ferida e cicatrização. *Medicina (Ribeirão Preto)*, 41(3), pp. 259-64.

Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119(6), pp. S3-S10.

Trentin, D., Giordani, R. B., Macedo, A. J. (2013). Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate 1. *Revista Liberato*, 14(22), pp. 213-236.

Venus, M., Waterman, J., Mc Nab, I. (2011). Basic physiology of the skin. *Surgery (Oxford)*, 29(10), pp. 471-474.

Wada, A., Neto, N. T., Ferreira, M. C. (2010). Úlceras por pressão. *Revista de Medicina*, 89(3/4), pp.170-177.

Webber, M. A., Piddock, L. J. V. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(1), pp. 9-11.

Widgerow, A. D. (2008). Persistence of the chronic wound-implicating biofilm: chronic wounds. *Wound Healing Southern Africa*, 1(2), pp. 5-7.

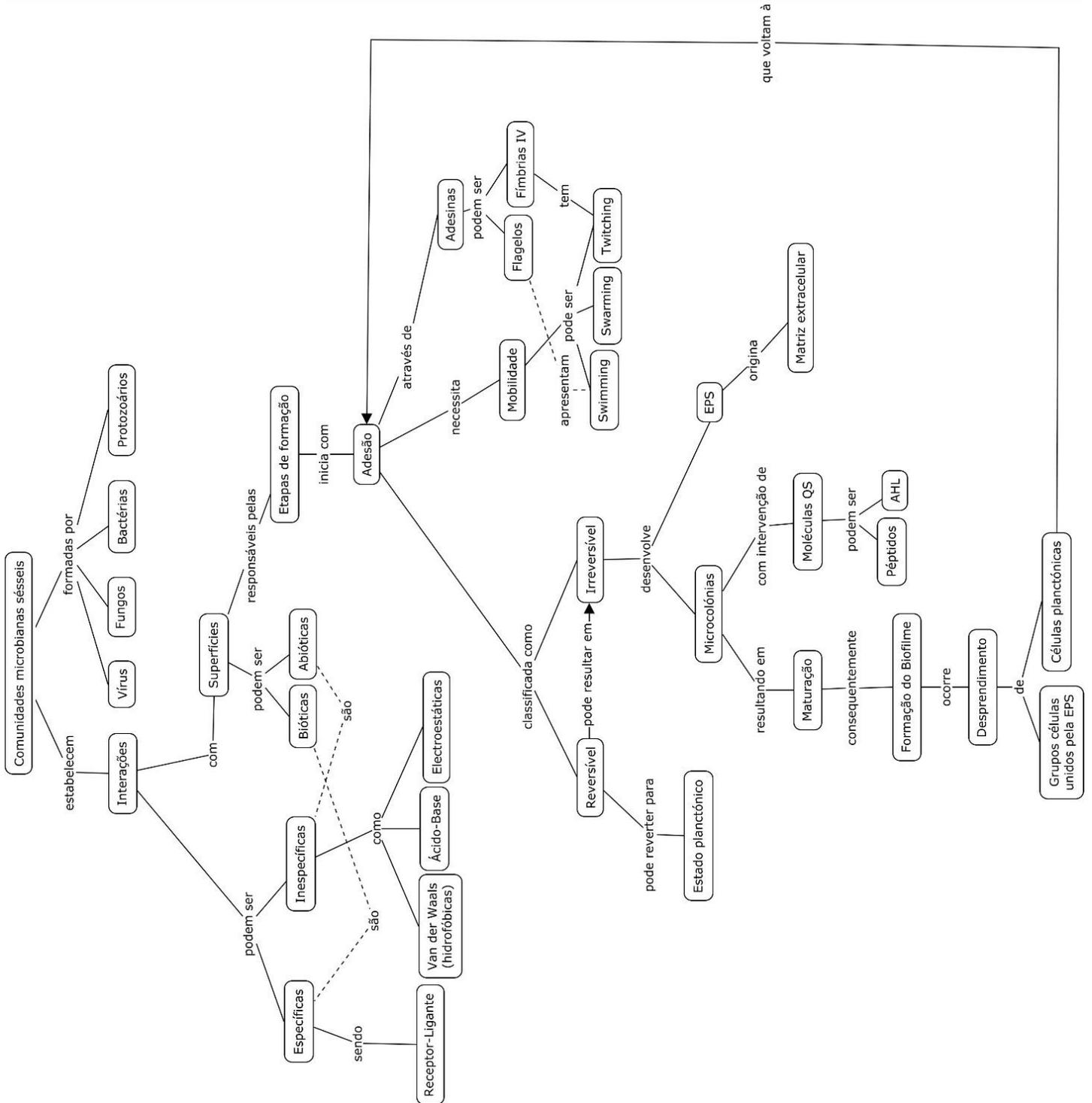
Wolcott, R. D., Rhoads, D. D., Dowd, S. E. (2008a). Biofilms and chronic wound inflammation. *Journal of Wound Care*, 17(8), pp. 333-341.

Wolcott, R. D., Rhoads, D. D. (2008b). A study of biofilm-based wound management in subjects with critical limb ischaemia. *Journal of Wound Care*, 17(4), pp. 145-155.

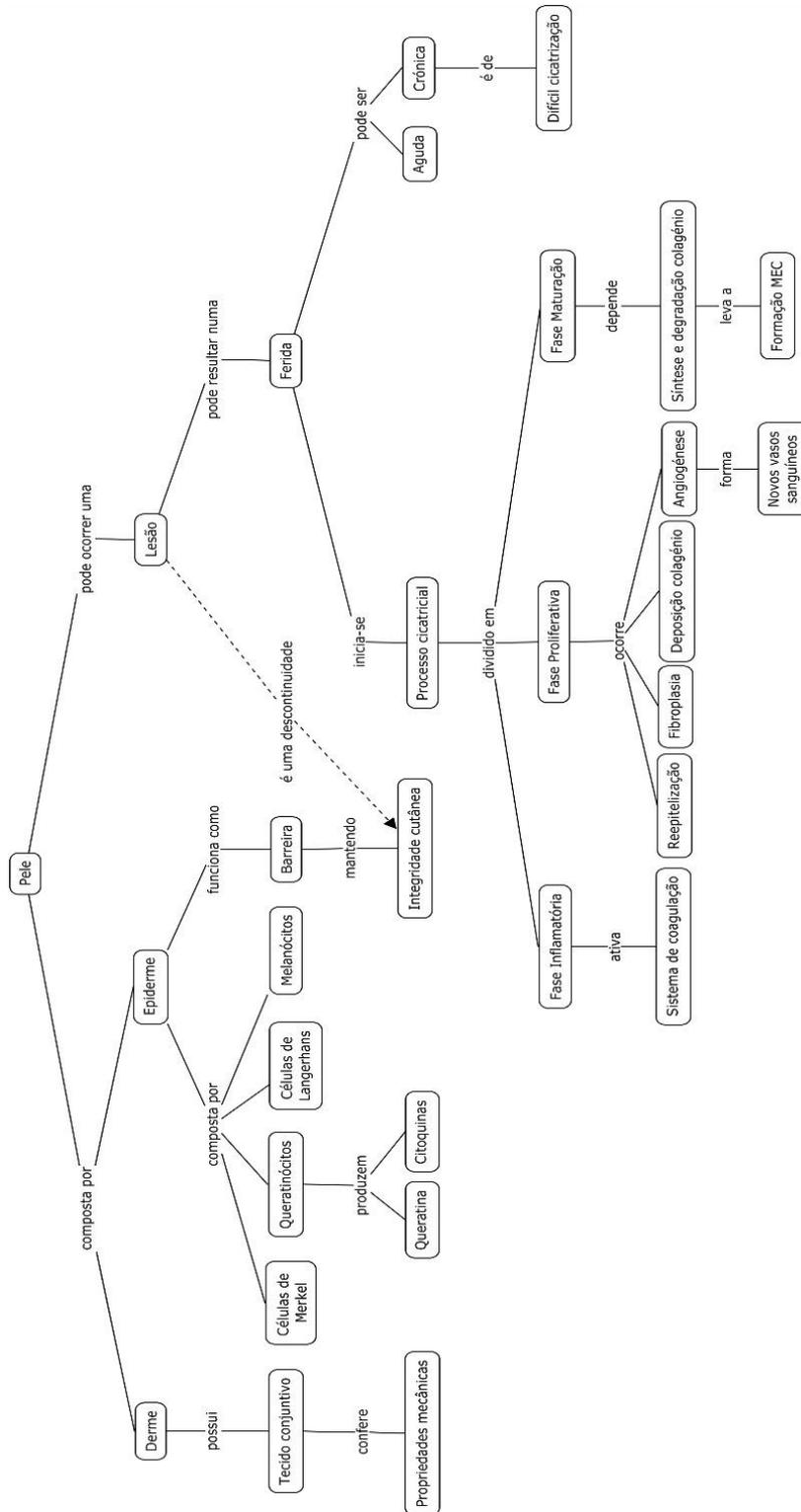
Zhao, G., Usui, M. L., Lippman, S. I., et al. (2013). Biofilms and inflammation in chronic wounds. *Advances in Wound Care*, 2(7), pp. 389-399.

V. Anexos

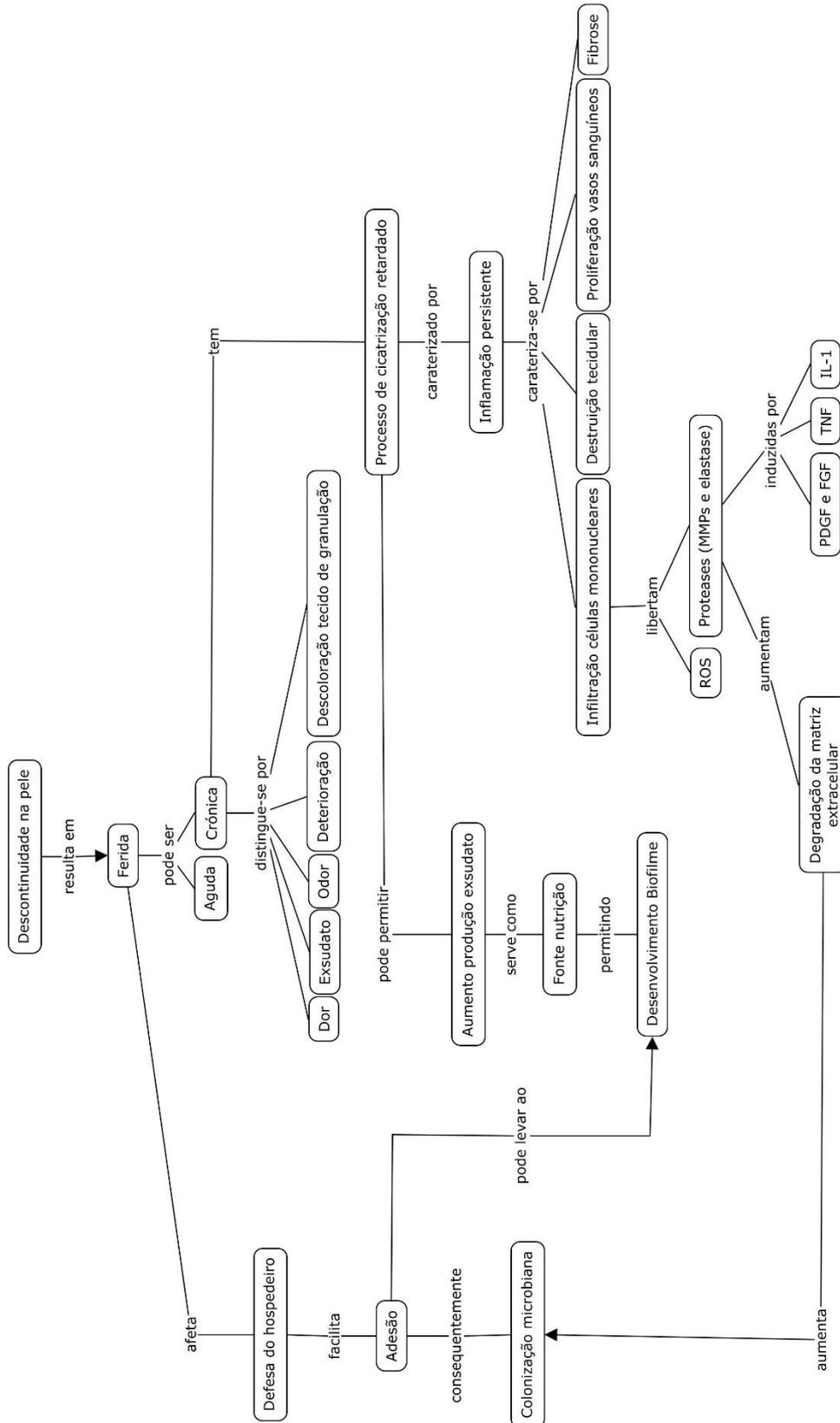
Anexo 1



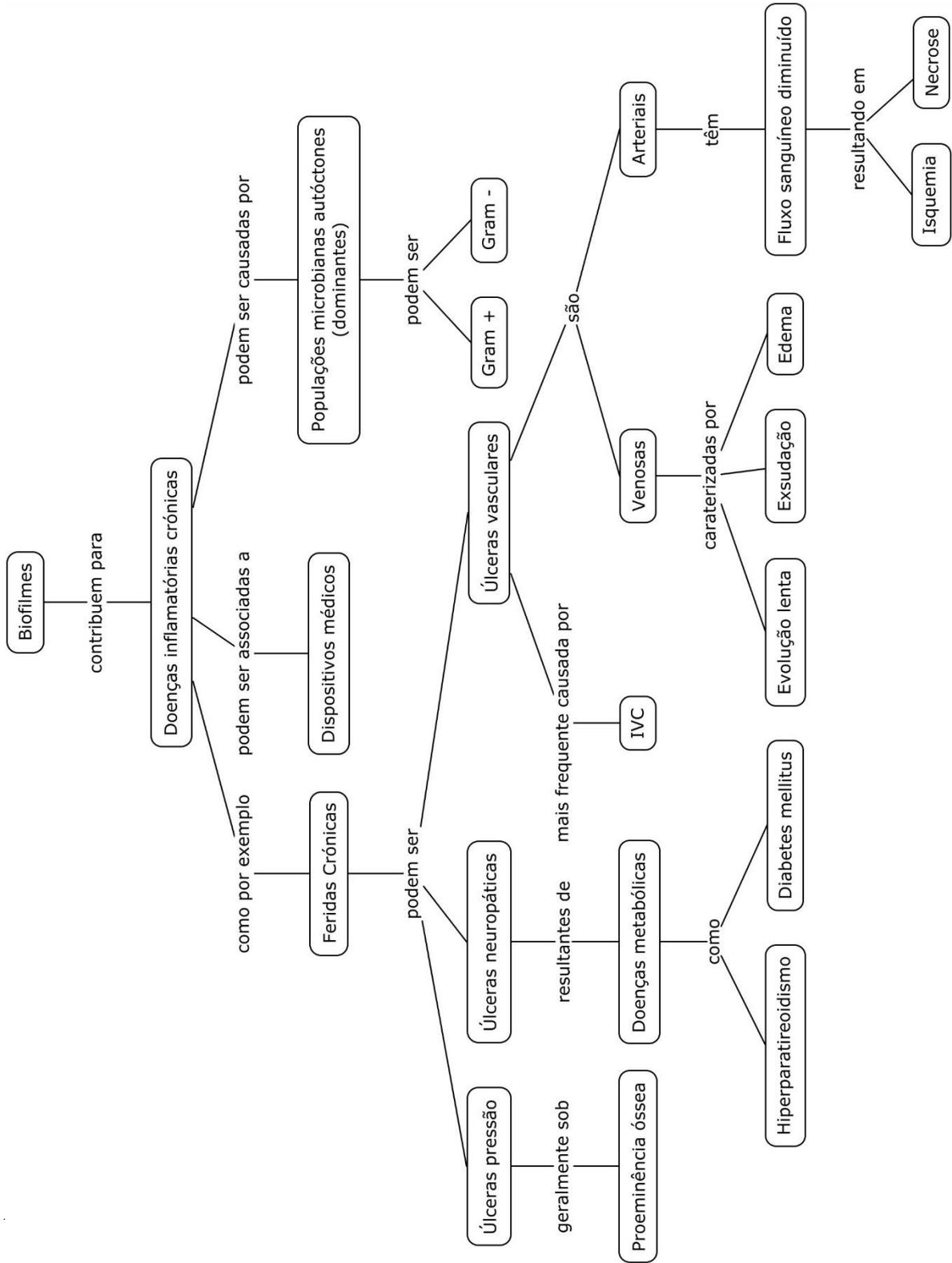
Anexo 2



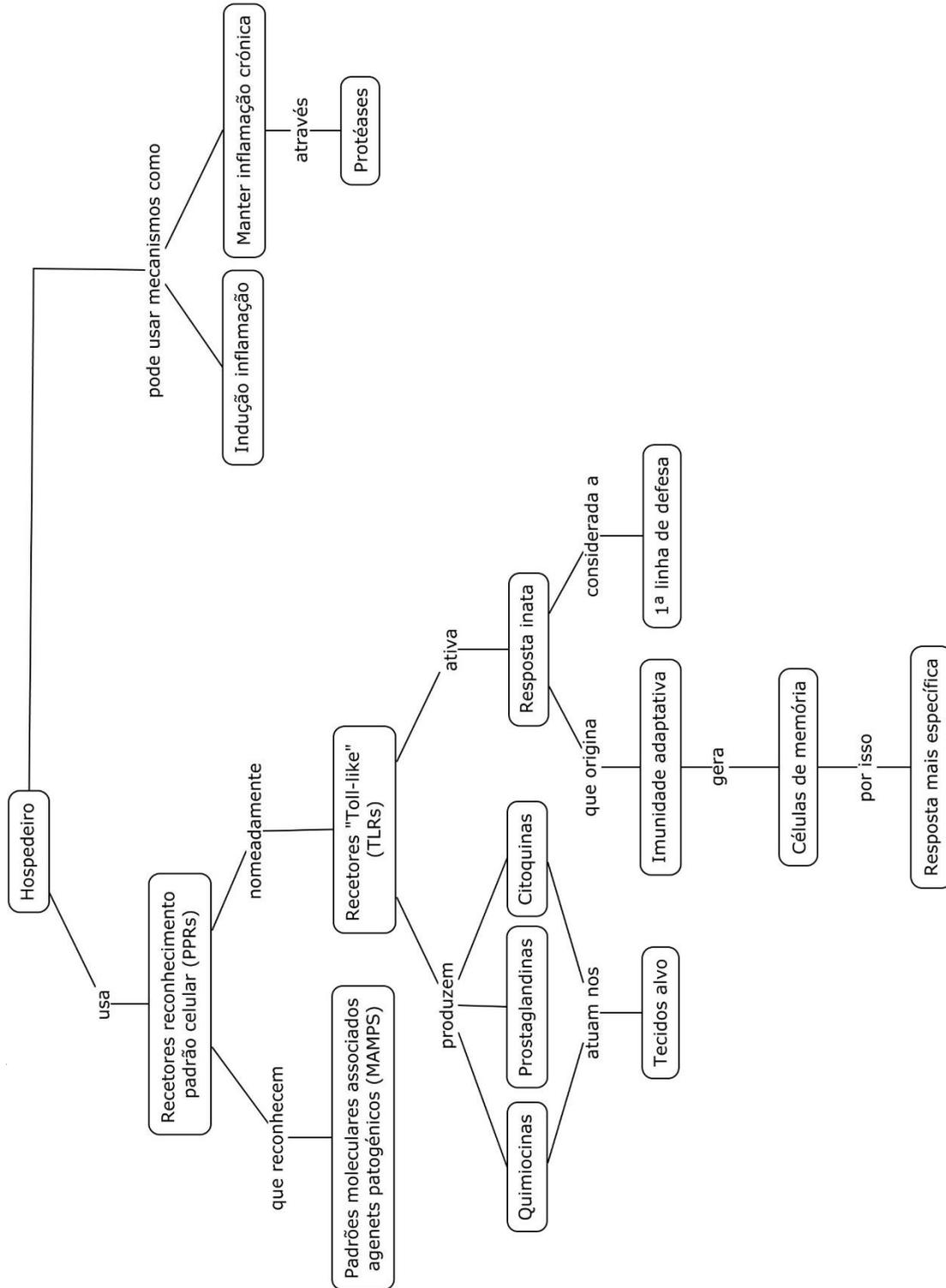
Anexo 3



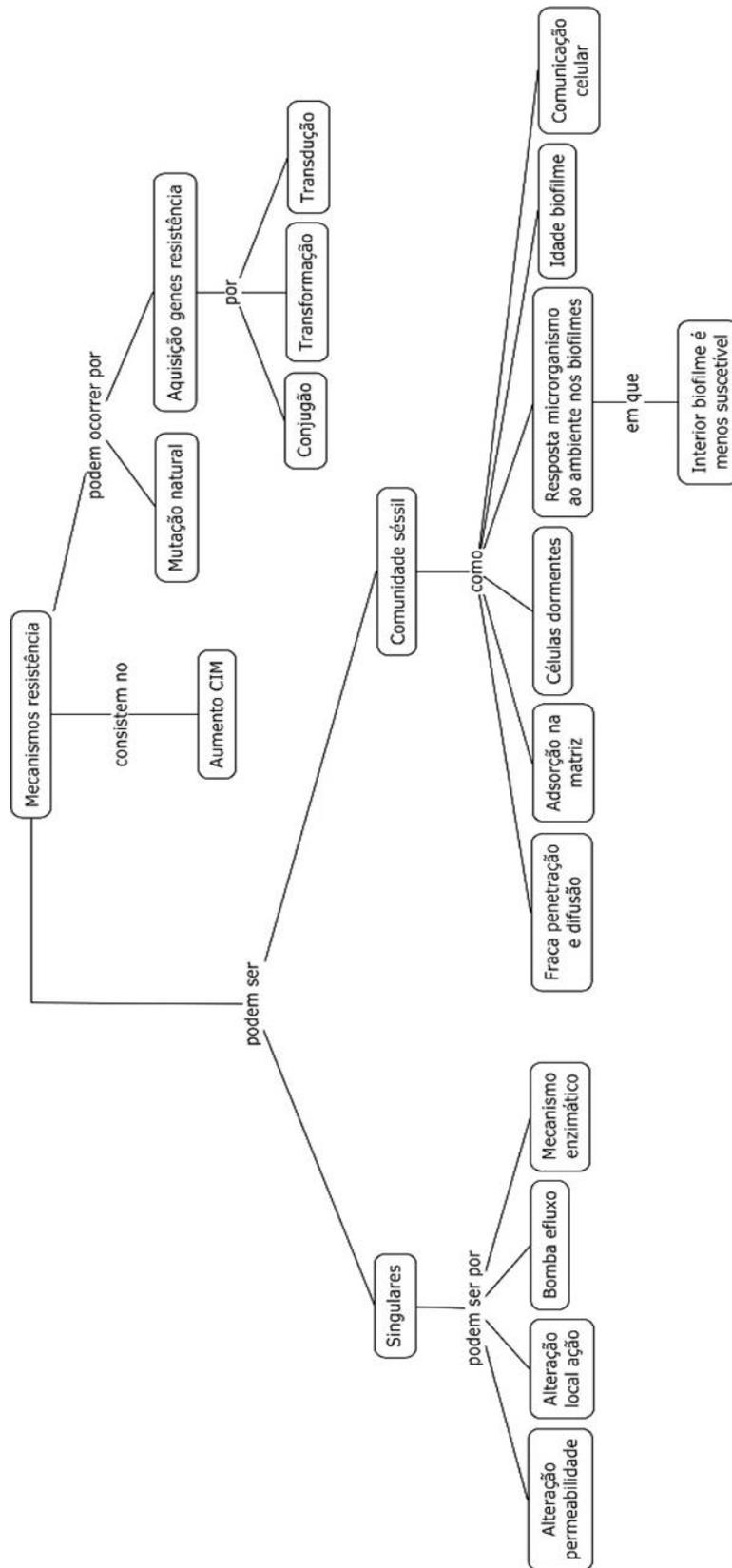
Anexo 4



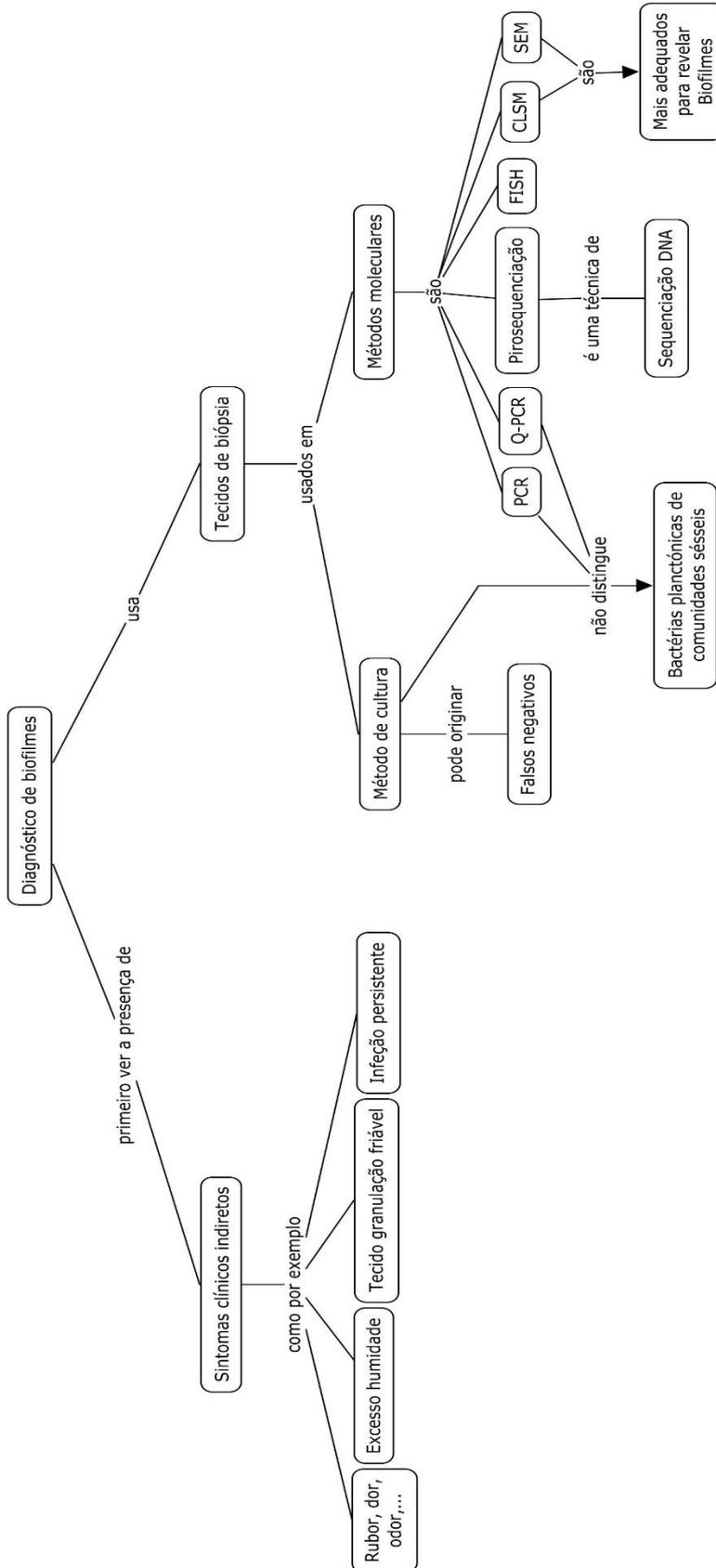
Anexo 5



Anexo 6



Anexo 7



Anexo 8

