



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS
NATURAIS

VINÍCIUS JOSÉ BARROS DE OLIVEIRA

CONSTRUÇÃO DE MOLÉCULA DE RNA DE INTERFERÊNCIA PARA
SILENCIAR GENES QUE PROMOVEM A FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR
BACTÉRIAS DO GÊNERO *Staphylococcus*.

FORTALEZA

2017

VINÍCIUS JOSÉ BARROS DE OLIVEIRA

CONSTRUÇÃO DE MOLÉCULA DE RNA DE INTERFERÊNCIA PARA
SILENCIAR GENES QUE PROMOVEM A FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR
BACTÉRIAS DO GÊNERO *Staphylococcus*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Matias

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- O52c Oliveira, Vinícius José Barros de.
Construção de molécula de RNA de interferência para silenciar genes que promovem a formação de biofilmes por bactérias do gênero *Staphylococcus*. / Vinícius José Barros de Oliveira. – 2017.
46 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva.
Coorientação: Prof. Dr. Fernanda Matias.
1. *siHybrids*. 2. Silenciamento gênico. 3. *Staphylococcus*. 4. *icaA*. 5. *agr*. I. Título.

CDD 664

VINÍCIUS JOSÉ BARROS DE OLIVEIRA

CONSTRUÇÃO DE MOLÉCULA DE RNA DE INTERFERÊNCIA PARA
SILENCIAR GENES QUE PROMOVEM A FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR
BACTÉRIAS DO GÊNERO *Staphylococcus*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Aprovada em: 24 / 07 / 2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^{da}. Dr^a. Fernanda Matias (Co-orientadora)
Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA)

Prof. Dr. Bartolomeu Warlene de Silva Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Luiz Ferreira Aguiar Ponte
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

A minha mãe, Margarete, por todo
esforço para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Ao conquistar esta importante etapa em minha vida, gostaria de agradecer que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho.

À minha mãe, Margarete, responsável pelo o que eu sou e por tudo que eu tenho. Obrigado por todo amor, dedicação, apoio, paciência, carinho e por todo esforço que me fez chegar até aqui.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva, pela compreensão, por ter aceitado me orientar, e por ter contribuindo para o meu crescimento intelectual e profissional.

À minha co-orientadora, Prof^ª Dra Fernanda Matias, pela oportunidade que me ofereceu e pela confiança depositada em mim para realização deste projeto. Por todo conhecimento transmitido, contribuindo para o meu crescimento intelectual e profissional. Agradeço a dedicação, paciência, disponibilidade e por ser esse profissional exemplar.

Ao Prof. Dr. Pedro Alves d’Azevedo e a todos do Laboratório de Cocos Gram Positivos (LCGP) – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), que cederam as linhagens utilizadas no trabalho e me treinaram para usá-las corretamente.

À minha família, por sempre me incentivar e apoiar.

À todos os meu amigos, especialmente Rackel, Sara, Anna Luísa e Janaína, pela amizade, incentivo, paciência e apoio. Obrigado pelos bons momentos e por facilitarem de alguma forma essa caminhada tão árdua. Não poderia desejar amigos melhores.

Aos meus colegas do Laboratório de Biorreatores Nanobiotecnologia e inovação (LABIN), pela amizade, por colaborarem com o desenvolvimento desse projeto e por tornarem o ambiente de trabalho mais agradável.

Aos meus colegas do programa de Pós-graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, pelo companheirismo durante o primeiro ano.

Ao Prof. Dr. Bartolomeu Warlene de Silva Souza e ao Prof. Dr. Luiz Ferreira Aguiar Ponte, por aceitar o convite para participar da banca avaliadora.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela bolsa concedida.

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação (PROPPG) e a Reitoria da

Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) pela disponibilização de todos os insumos necessários para a realização desse projeto.

RESUMO

Staphylococcus aureus e *Staphylococcus epidermidis* são agentes causadores de infecções comuns em seres humanos e são importantes patógenos responsáveis por infecções nosocomiais associadas ao uso de dispositivos implantáveis. Um dos seus principais fatores de virulência é o biofilme. A formação do biofilme é regulada por uma maquinaria genética complexa, sendo os gene *sarA*, operon *ica* e *agr*, os mais estudados. O uso indiscriminado de antibióticos ao longo dos tempos tem gerado uma explosão de “superbactérias”, especialmente bactérias do gênero *Staphylococcus*, multirresistentes a diversos antibióticos. Atualmente, muitos estudos vêm documentando estratégias de combate aos mecanismos de resistência em microorganismos. RNA de interferência é um processo biológico que causa silenciamento de moléculas de mRNA específicas e tem sido utilizado como uma ferramenta tanto para o estudo das funções dos genes como para o silenciamento de genes. Apesar das várias barreiras que impedem a aplicação dessa técnica ao uso clínico, pesquisadores conseguiram superar alguns desses problemas a partir do uso de moléculas híbridas de RNA-DNA, chamadas *siHybrids*. Esse trabalho teve como objetivo a construção de moléculas híbridas de RNA-DNA (*siHybrids*) para silenciar a ação do gene *icaA* e do gene *agr*, impedindo assim a formação de biofilme. Os resultados mostraram que os *siHybrids* foram eficientes no silenciamento gênico pós-transcricional em variadas concentrações, portanto os *siHybrids* podem ser utilizados como uma nova estratégia terapêutica para a inibição da formação de biofilme. Este estudo é um dos primeiros a anunciar a eficácia de híbridos de RNA:DNA contra biofilmes de *Staphylococcus* spp.

Palavras-chave: *SiHybrids*. Silenciamento gênico. *Staphylococcus*. *IcaA*. *Agr*.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus and *Staphylococcus epidermidis* are causative agents of common infections in humans and are important pathogens responsible for nosocomial infections associated with the use of implantable devices. One of its main factors of virulence and biofilm. Biofilm formation is regulated by a complex genetic machine, with *sarA*, operon *ica* and *agr* genes being the most studied. The indiscriminate use of antibiotics over time has generated an explosion of "superbugs", especially bacteria of the genus *Staphylococcus*, multiresistant to various antibiotics. Currently, many studies have documented the strategy to combat mechanisms of resistance in microorganisms. Interference RNA is a biological process that causes silencing of specific mRNA molecules and has been used as a tool for both the study of gene functions and gene silencing. Despite the many barriers that prevent the application of the technique to clinical use, researchers have overcome some problems from the use of hybrid RNA-DNA molecules, called *siHybrids*. This work aimed to construct hybrid RNA-DNA molecules (*siHybrids*) to silence an action of the *icaA* gene and the *agr* gene, thus preventing a biofilm formation. The results showed that biofilm production systems as the new therapeutic strategy for the inhibition of biofilm formation. This study is a program of efficacy of RNA: DNA hybrids against *Staphylococcus* spp.

Keywords: *SiHybrids*. Gene silencing. *Staphylococcus*. *IcaA*. *Agr*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Microscopia eletrônica de células de <i>Staphylococcus</i> spp.....	16
Figura 2 - Etapas da formação do biofilme	19
Figura 3 - Organização estrutural do operon <i>ica</i>	21
Figura 4 - Sistema quorum sensing agr em <i>Staphylococcus</i> sp.	23
Figura 5 - Mecanismo de silenciamento por RNAi em <i>C. elegans</i>	25
Figura 6- Sequência da molécula de siRNA apresentando 100% de similaridade com <i>Staphylococcus</i> no BLAST.	30

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1- Comparação das médias dos controles com as médias dos tratamentos com *icaA1* nas diferentes linhagens de *Staphylococcus* 32
- Gráfico 2 - Comparação das médias dos controles com as médias dos tratamentos com *icaA2* nas diferentes linhagens de *Staphylococcus* 32
- Gráfico 3 - Comparação das médias dos controles com as médias dos tratamentos com *agrA1* nas diferentes linhagens de *Staphylococcus*..... 33
- Gráfico 4 - Comparação das médias dos controles com as médias dos tratamentos com *agrA2* nas diferentes linhagens de *Staphylococcus*..... 33
- Gráfico 5 - Representação das medidas de dispersão das médias dos tratamentos com *icaA1* em cada uma das linhagens de *Staphylococcus*. 34
- Gráfico 6 - Representação das medidas de dispersão das médias dos tratamentos com *icaA2* em cada uma das linhagens de *Staphylococcus*. 34
- Gráfico 7 - Representação das medidas de dispersão das médias dos tratamentos com *agrA1* em cada uma das linhagens de *Staphylococcus*. 35
- Gráfico 8 - Representação das medidas de dispersão das médias dos tratamentos com *agrA2* em cada uma das linhagens de *Staphylococcus*. 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Linhagens de bactérias formadoras de biofilmes.....	27
Tabela 2 - Fórmula do meio de cultivo TSA	28

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Gênero <i>Staphylococcus</i>	16
2.2	Biofilme Microbianos	17
2.3	Formação do biofilme.....	18
2.4	Regulação do biofilme em bactérias do gênero <i>Staphylococcus</i>	21
2.5	RNA de interferência.....	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	Bioinformática.....	27
3.1.1	<i>Construção do RNA de interferência</i>	27
3.2	Microbiologia	27
3.2.1	<i>Linhagens estudadas</i>	27
3.2.2	<i>Cultivo e manutenção das linhagens</i>	27
3.2.4	<i>Formação do biofilme e teste in vitro dos siHybrids</i>	28
3.3	Análise Estatística.....	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5	CONCLUSÃO.....	38
	REFERÊNCIAS.....	39
	ANEXO A – SEQUÊNCIAS CONTIGS 0, 1 E 2	45

1. INTRODUÇÃO

Infecções, causadas por agentes etiológicos amplamente resistentes aos antimicrobianos, representam um dos grandes desafios atuais da saúde pública, acarretando em altas taxas de morbidade e mortalidade, aumento no tempo de internação e nos gastos do sistema de saúde (NEIDELL et al., 2012). Dentre esses agentes, o gênero *Staphylococcus* é o que desperta maior interesse por possuir no grupo representantes causadores de doenças em todo o mundo. As doenças causadas pelas bactérias desse gênero variam de infecções na pele a infecções pulmonares e/ou generalizadas até óbitos. *S. aureus* e *S. epidermidis* são agentes causadores de infecções comuns em seres humanos. Tanto em *S. aureus* como em *S. epidermidis*, o que facilita o desenvolvimento de infecções, é a capacidade de aderência e fixação dessas bactérias em superfícies na forma de biofilmes (MORALES et al., 2004; NILSDOTTER-AUGUSTINSSON et al., 2005). Para formar as camadas bacterianas que irão formar o biofilme, as células vão se ligando umas às outras através do PIA (polissacarídeo de adesão intercelular), considerado a principal molécula responsável pela adesão intercelular (NILSDOTTER-AUGUSTINSSON et al., 2005).

A produção do PIA é mediada por produtos do gene cromossomal *ica* (*intercelular adhesion*), organizados em uma estrutura de operon. E o biofilme é considerado um importante fator de virulência das bactérias e sua formação depende da combinação e expressão de uma variedade de genes, a qual é influenciada por fatores ambientais como condições de crescimento, suplementação de carboidratos, concentração sub-inibitória de antimicrobianos e alta osmolaridade. Para esta regulação as bactérias utilizam um sistema de comunicação chamado de *quorum sensing* que funciona como um sensor de densidade populacional (CUCARELLA et al., 2001; VADYVALOO; OTTO, 2005). Os sistemas *quorum sensing* descritos em *Staphylococcus* spp. parecem estar relacionados com a formação de biofilme, sendo o gene regulador acessório (*agr*) o mais conhecido (NOVICK, 2003).

Em poucos anos a resistência bacteriana se tornou um problema de saúde pública e mundial. Ao longo dos tempos houve uma grande explosão de “superbactérias” multirresistentes devido ao uso indiscriminado de antibióticos, que induzem a disseminação de genes de resistências a populações de micro-organismos residentes no ambiente.

Os esforços para remediar a resistência aos antibióticos incluem estudos genéticos para identificar novos alvos de fármacos e o desenvolvimento de antimicrobianos a partir de

classes de compostos para os quais não existem traços de resistência específicos na natureza. É chamado de terapia gênica o processo que envolve a introdução de material genético dentro da célula de um organismo, visando manipular, substituir, introduzir ou suprimir genes para o tratamento de patologias. Os produtos gênicos bacterianos, são responsáveis por grande parte das doenças humanas, o que os tornam alvos importantes para a terapêutica. Sendo assim, técnicas de silenciamento da expressão gênica – como o RNA antissenso e RNA de interferência (RNAi) – surgem como ferramentas promissoras no desenvolvimento de novas terapias (MARTIMPREY et al., 2009; PEREIRA, 2005).

RNAi se baseia em pequenos RNAs de dupla fita (siRNA) que, após serem introduzidos em uma célula-alvo, são incorporados a um Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC), que o direciona para a clivagem de um RNAm alvo complementar no citoplasma, inibindo a tradução deste em uma proteína (ARAÚJO, 2008; DEPIERI, 2012).

Há muitos desafios envolvidos na terapêutica baseada em Silenciamento Gênico como a degradação por nucleases plasmáticas, dificuldade em direcionar oligonucleotídeos efetores para os tecidos alvo, dificuldade em atingir o RNAm alvo específico, riscos de indução de respostas inflamatórias, sem contar os inconvenientes no que diz respeito à liberação de fármacos no local desejado (AAGARD; ROSSI, 2007).

Pesquisadores conseguiram superar os problemas de entrega e a duração da eficácia ao alterar a composição molecular das moléculas de RNA de cadeia dupla convencionais usadas no siRNA. Eles combinaram uma única cadeia de RNA com uma única cadeia complementar de DNA para criar moléculas de RNA-DNA híbridas curtas, chamadas *siHybrids* (SHERMAN, 2004). Por definição os *siHybrids* são moléculas compostas por uma cadeia não modificada Antissenso-RNA e uma cadeia completamente modificada como DNA (HOGREFE et al., 2006).

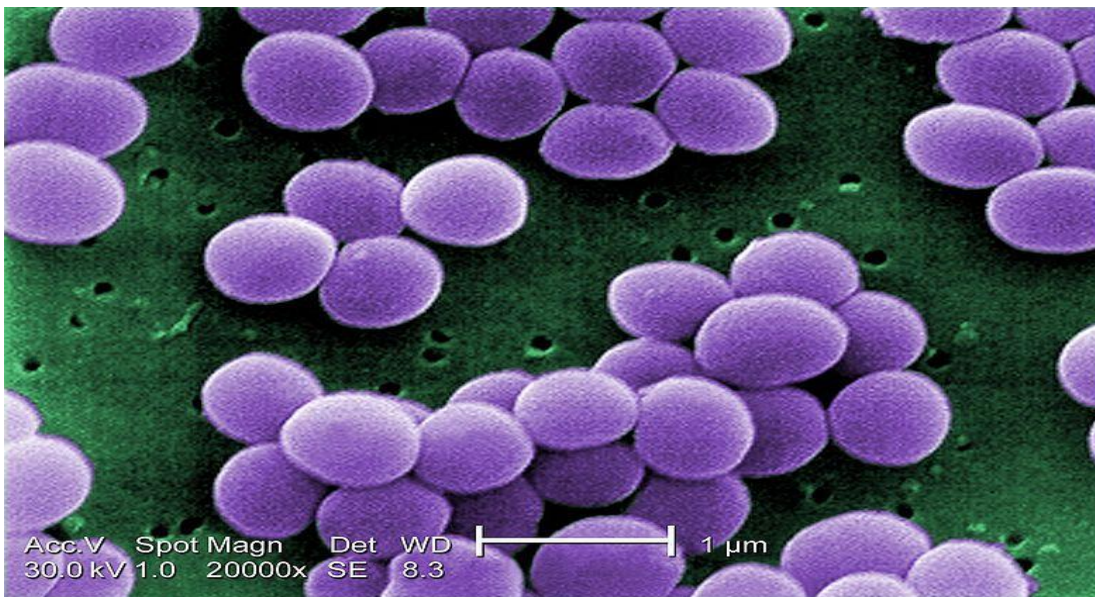
Nesse contexto, esse estudo busca um produto ativo que seja passível de ser utilizado como uma alternativa à profilaxia de pacientes em condições favoráveis às infecções por bactérias do gênero *Staphylococcus*. Neste estudo foram avaliados os genes *agrA* e *icaA* com o uso de uma molécula híbrida de RNA-DNA (*SiHybrid*) buscando silenciar a produção de biofilme.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Gênero *Staphylococcus*

Staphylococcus (figura 1) compreende cocos Gram-positivos pertencentes à família *Staphylococcaceae*. Geralmente são encontrados na forma de aglomerados, mas também podem estar dispostos como células isoladas, aos pares ou cadeias curtas. Esses micro-organismos possuem de 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, são catalase-positivo, não formadores de esporos, imóveis e anaeróbios facultativos, são capazes de crescer em meios contendo alta concentração de sal e a temperaturas que variam de 18 °C a 40 °C. Estes micro-organismos podem ser encontrados como parte integrante da microbiota da pele e das membranas mucosas dos seres humanos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2011).

Figura1: Microscopia eletrônica de células de *Staphylococcus* spp.



Fonte: http://www.redorbit.com/reference/staphylococcus_aureus/

O gênero *Staphylococcus* é composto por 48 espécies, 17 das quais podem ser isoladas de amostras biológicas humanas, sendo dividido em dois grandes grupos: os *Staphylococcus* coagulase positiva, onde o principal representante é o *S. aureus* e os *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), onde o principal representante é o *S. epidermidis*. Os SCN foram previamente considerados não patogênicos ou somente parte da microbiota normal da pele humana. No entanto, recentemente eles têm sido detectados em uma enorme variedade de infecções tanto em hospedeiros imunodebilitados quanto em pessoas saudáveis. Tais infecções incluem as do trato urinário, endocardites bacterianas subagudas, bacteriemia após

implantação de dispositivos cardíacos artificiais e outras infecções mono e polimicrobianas (SILVA; LINS; CRUZ, 2006).

Staphylococcus apresenta uma grande variedade de fatores de virulência que permitem a colonização, persistência, disseminação pelo hospedeiro e evasão do sistema imune (ROSSATTO, 2015). Dentre esses fatores estão a presença de cápsula, a secreção de enzimas como catalase, nucleases, proteases, lípases, hialuronidases, fibrinolisinases, coagulase (em algumas espécies) e quatro hemolisinas (alfa, beta, delta e gama). Além disso, algumas linhagens também produzem uma ou mais exoproteínas tóxicas, que incluem a toxina da síndrome do choque tóxico (*toxic shock syndrome toxin* – TSST-1) e as enterotoxinas estafilocócicas (*staphylococcal enterotoxin* – SE), que podem causar intoxicações alimentares (DINGES; ORWIN; SCHLIEVERT, 2000). O principal fator de virulência dos *Staphylococcus* spp. está associado à formação do biofilme que propicia a adesão destes às superfícies. A aderência é mediada por uma adesina intracelular polissacarídica (PIA) composto por N-acetilglucosamina β -1,6-glicosídeo, e sintetizado pela enzima N-acetilglucosaminiltransferase (MACK et al., 2002).

2.2. Biofilmes Microbianos

Biofilmes são conceitualmente definidos como uma comunidade complexa e estruturada de micro-organismos envoltos em uma matriz extracelular composta por substâncias poliméricas, a qual possibilita a aderência irreversível a superfícies bióticas ou abióticas (COSTERTON et al., 1995). A capacidade dos micro-organismos em aderir a superfícies fornece uma vantagem evolutiva que permite a maturação, o aumento da taxa de sobrevivência e o estabelecimento das relações simbióticas dentro do ambiente do biofilme. Além disso, fatores ambientais, tais como pH, temperatura, osmolaridade, níveis de O₂, composição de nutrientes e a presença de outras bactérias, também desempenham um papel importante no processo de formação de biofilme (LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2013; GIAOURIS et al., 2014).

A formação de biofilme é uma antiga adaptação procariótica e representa um modo de crescimento que permite que as bactérias sobrevivam em ambientes hostis e colonizem novos nichos por vários mecanismos de dispersão. As bactérias formadoras de biofilme demonstram um comportamento coordenado com a formação de estruturas tridimensionais (3D) complexas e comunidades bacterianas funcionalmente heterogêneas (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009). Os micro-organismos em um biofilme apresentam diferentes níveis metabólicos e de expressão gênica ao longo de suas camadas e estabelecem uma série de

processos de comunicação celular (DONLAN, 2002). Além disso, exibem diferenças na expressão de moléculas de superfície, resistência a antibióticos, utilização de nutrientes e de fatores de virulência. Estas bactérias empregam a comunicação célula-célula através da secreção de sinais químicos chamada de “quorum sensing” e esta sinalização intercelular permite que as mesmas respondam fenotipicamente às mudanças ambientais. Esta excelente capacidade de adaptação permite que bactérias em biofilmes (células sésseis) resistam a diferentes condições estressantes, o que aumenta sua persistência no meio ambiente (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009).

Após o estabelecimento de uma infecção e a formação do biofilme, terapias com antibióticos são menos eficazes e muitas vezes comparando com as respectivas populações planctônicas, o modo de crescimento sésil está associado a um importante aumento na resistência aos antibióticos (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). A concentração de antibiótico necessária para eliminar bactérias produtoras de biofilme é de 100 a 1000 vezes maior que a necessária para eliminar as mesmas espécies em estado planctônico (STEWART, COSTERTON, 2001). Isto provavelmente ocorre devido a dificuldade de alguns antibióticos difundirem através da camada polissacarídica ou porque células dentro de biofilme diferem fisiologicamente de células planctônicas. A proximidade dos micro-organismos dentro de um biofilme também facilita a disseminação dos vários determinantes de resistência à antibióticos, através da transferência horizontal de genes (DONLAN, 2001).

A emergência da resistência aos antibióticos e a dificuldade na identificação de novas classes de agentes antimicrobianos têm impulsionado a investigação de novas estratégias terapêuticas, como o uso de moléculas capazes de silenciar genes de virulência (LAZZAROTTO, 2010).

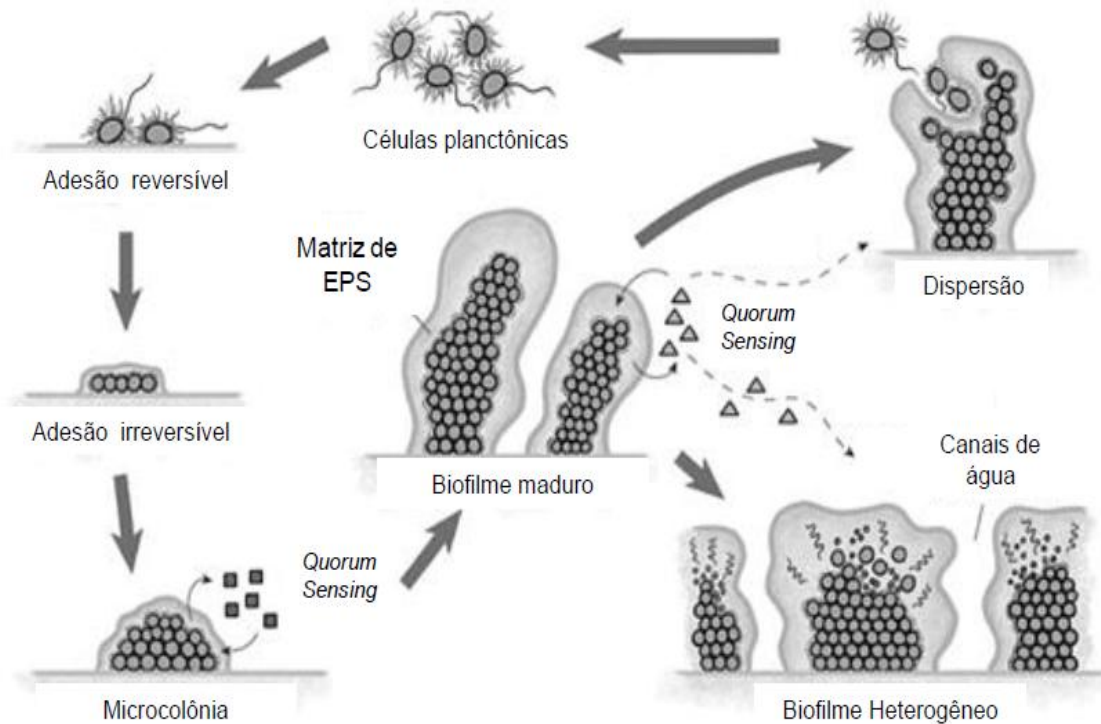
2.3. Formação do biofilme

Um biofilme é constituído tipicamente pelas células microbianas e pela matriz polimérica extracelular. A matriz, por sua vez, é composta basicamente por polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular, e corresponde aproximadamente 50 a 90% da matéria orgânica do biofilme. As substâncias poliméricas produzidas pelos micro-organismos servem para manter as células sésseis unidas, bem como propiciam um ambiente de troca de material genético e formam a estrutura tridimensional do biofilme (CZACZYK; MYSZKA, 2007; ABDALLAH et al., 2014; GIAOURIS et al., 2014).

A formação do biofilme é um processo dinâmico e envolve as seguintes etapas (figura 2): adesão reversível, adesão irreversível, início do desenvolvimento da disposição do

biofilme, maturação e dispersão.

Figura 2: Etapas da formação do biofilme



Fonte: adaptado de: <http://www.becscreen.com/about/about-biofilms>

A adesão inicial pode ocorrer em superfícies bióticas, como o tecido humano, ou abióticas, como dispositivos médicos e superfícies metálicas e plásticas de indústrias de alimentos. Nessa etapa, a adesão é mediada por fatores inespecíficos, como interações eletrostáticas e hidrofóbicas, e específicos, como moléculas de superfícies, chamadas de MSCRAMM (OTTO, 2013). O depósito de material orgânico proveniente de alimentos, também favorece a formação de um biofilme condicionante que facilita a adesão microbiana (DUFOUR; LEUNG; LÉVESQUE, 2012). As superfícies ásperas parecem ser mais suscetíveis à formação de biofilme e isto se deve provavelmente à redução das forças de cisalhamento e maior área de superfície de contato. Alguns estudos indicam que os biofilmes também têm uma tendência a se formar com maior facilidade em materiais hidrofóbicos, como teflon e outros plásticos, do que no vidro e metal. A ligação inicial que ocorre nessa etapa de formação do biofilme é reversível e durante esta fase as células bacterianas apresentam uma taxa de crescimento logarítmica (APARNA; YADAV, 2008). A adesão passiva depende da gravidade, da difusão e da dinâmica do fluido. Na adesão ativa, há a

participação de flagelos, que facilitam o movimento da célula bacteriana a um sítio específico. Além disso, a síntese de adesinas, pili, polissacarídeos e a formação de agregados também podem influenciar o processo de fixação inicial a um substrato (KUMAR; ANAND, 1998).

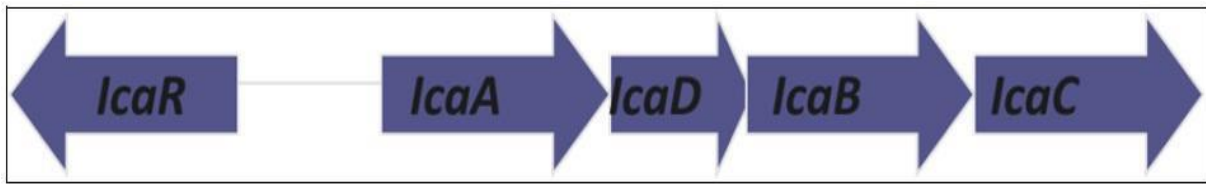
Após a adesão inicial, as células começam a replicar em micro colônias. Então, a adesão reversível torna-se irreversível principalmente por causa da secreção de EPS, que forma a matriz do biofilme (ABDALLAH et al., 2014). Após a ligação irreversível, torna-se bastante complexa a remoção do biofilme, uma vez que ligações químicas muito fortes estão envolvidas nesse processo (PALMER; FLINT; BROOKS, 2007; SREY; JAHID; HA, 2013).

A terceira etapa da formação do biofilme é quando ocorre a maturação, que é caracterizada pela presença de macro colônias rodeadas por canais de água que auxiliam a distribuir os nutrientes e moléculas sinalizadoras (DUFOUR; LEUNG; LÉVESQUE, 2012). Nesta fase são produzidas as adesinas, que mediam o contato célula-célula, em *Staphylococcus*. Uma das mais importantes moléculas adesivas é a adesina intercelular polissacarídica (PIA) (ROSSATTO, 2015).

Quimicamente, PIA é um homopolímero linear composto de aproximadamente 130 resíduos de N-acetilglicosamina unidos por ligações β -1,6, das quais 15 a 20% são desacetiladas, contendo éster ligado a succinato e resíduos de fosfato, introduzindo simultaneamente cargas negativas e positivas ao polissacarídeo (MACK et al., 1996). A ocorrência conjunta de cargas negativas e positivas pode explicar a sua função na ligação estável de diferentes células em um biofilme (ROHDE et al., 2006).

A PIA é codificada pelo operon *icaADBC* (figura 3), composto de quatro genes *icaA*, *icaD*, *icaC*, *icaB*, e uma região promotora denominada *icaR*. Foi apresentado um modelo de biossíntese de PIA, combinando pesquisas prévias sobre o papel de cada gene *ica*. O *icaD* sozinho não induz atividade enzimática de transferase, enquanto que o *icaA* isolado induz pouca atividade. Entretanto, quando *icaA* e *icaD* são expressos conjuntamente, a atividade enzimática é aumentada, formando oligômeros de até 20 resíduos, sintetizando maior quantidade de PIA. Também se constatou que o gene *icaC* é necessário para a síntese de oligômeros de N-acetilglicosamina, por aumentar o tamanho destes para 130 resíduos e também pela exportação a cadeia nascente de PIA. Ainda se conhece pouco da função do *icaB*, mas o que se sabe é que este participa como um catalizador da desacetilação da molécula de PIA. Assim, os genes *icaA* e *icaD* são essenciais para a produção do PIA, mas quando presentes o *icaC* e *icaB* auxiliam na síntese de longos oligômeros, estando envolvidos na biossíntese do PIA completo (CAFISO et al., 2004; MORALES et al., 2004).

Figura 3: Organização estrutural do operon *ica*.



Fonte: ROCCHETTI (2014).

A dispersão é a última etapa do ciclo de formação de biofilme, e que permite que as células (individualmente ou em grupos) revertam-se para a sua forma planctônicas (SREY; JAHID; HA, 2013). A dispersão de biofilme é o resultado de vários eventos ambientais, tais como alterações na disponibilidade de nutrientes, consumo de oxigênio, e outras condições de estresse, que promovem a expressão de genes envolvidos na dispersão (ABDALLAH *et al.*, 2014), evento que desencadeia a contaminação de outras áreas (SREY; JAHID; HA, 2013).

2.4. Regulação do biofilme em bactérias do gênero *Staphylococcus*

Para que uma infecção se estabeleça a bactéria tem que regular a expressão de um grupo de moléculas que determinam a patogenicidade, conhecidas como fatores de virulência. A coordenação desses fatores, normalmente espécie-específica, é crucial para a sobrevivência do patógeno e da bem-sucedida invasão ao hospedeiro. Assim, os patógenos desenvolveram sofisticados sistemas de regulação para adaptar a expressão dos genes de virulência às mudanças das condições ambientais durante a infecção (KONG; VUONG; OTTO, 2006). Essa regulação é frequentemente realizada por um sistema de intercomunicação bacteriano que controla a expressão de vários genes em resposta a densidade populacional – *quorum sensing* (XU *et al.*, 2006). A expressão coordenada dos genes sob o controle do sistema *quorum sensing* permitem: (1) tropismo dos micro-organismos por determinados sítios; (2) acúmulo de células bacterianas em estruturas organizadas protegidas por polissacarídeos; e (3) o rompimento do biofilme após as células alcançarem sua densidade máxima e propagação da infecção através da dispersão de células planctônicas (LAZZAROTTO, 2010). Alguns sistemas de *quorum sensing* em *Staphylococcus* spp. parecem ter influência na formação de biofilme, o mais conhecido é o gene regulador acessório (*agr*).

O sistema *agr*, é responsável pela diminuição da expressão de diversas proteínas de superfície celular e pelo aumento da expressão de muitos fatores de virulência, principalmente na transição da fase exponencial para a estacionária (YARWOOD; SCHLIEVERT, 2003).

O locus *agr* é composto por dois operons divergentes expressos pelos promotores P2 e P3. O operon P2 contém os genes *agrABCD*. Já o operon P3 conduz a transcrição do RNA

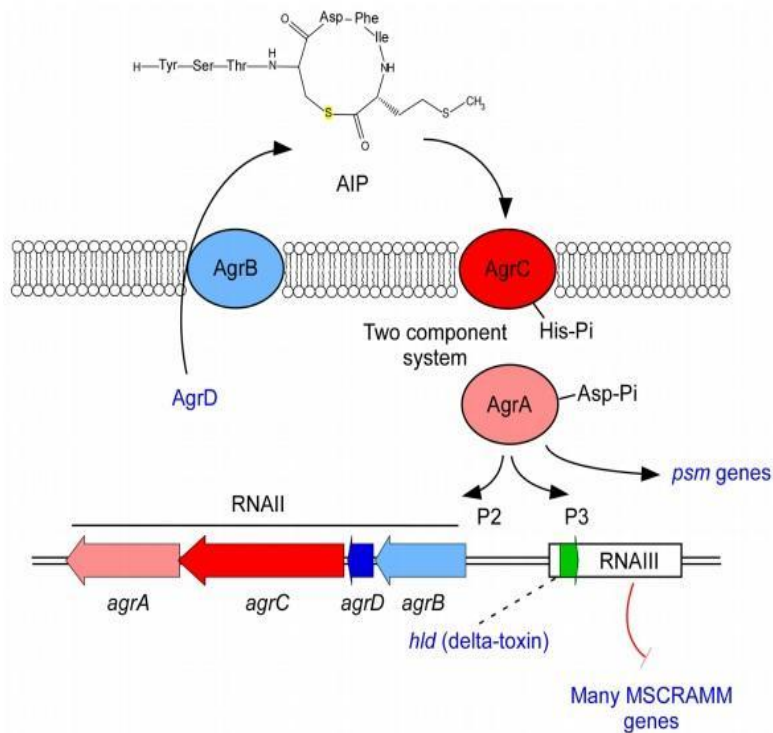
III, a molécula efetora do *locus agr* (YARWOOD et al., 2004). A ação combinada dos produtos dos genes *agrD* e *agrB* é responsável pela síntese do peptídeo auto indutor (PAI). O *agrD* codifica a sequência do PAI, e *agrB*, uma endopeptidase transmembrana, que atua no processamento e excreção do PAI. Quando o peptídeo auto indutor atinge uma concentração limiar em uma determinada densidade celular, há a ligação deste com uma histidina-quinase transmembrana, codificada pelo gene *agrC*. A proteína AgrC ativa, por sua vez, a resposta reguladora AgrA, codificada pelo gene *agrA*, que se liga a dois promotores, ativando a transcrição do operon *agr* em um processo de retroalimentação, e do RNAlII, o efetor intracelular do sistema. Em adição, o gene *agrA* pode ativar diretamente a expressão de operons que codificam as Modulinas Fenol Solúvel – PSM (*Phenol Soluble Modulin*) (figura 4) (OTTO, 2013). As PSM têm um papel importante durante o desenvolvimento do biofilme, com a formação de canais, contribuição na formação da estrutura tridimensional e no desprendimento do aglomerado de biofilme (OLIVEIRA, 2014).

O sistema *agr* está intrinsicamente relacionado com biofilmes, principalmente durante a fase de dispersão das células microbianas. Estudos reportam que *Staphylococcus* sp. que utilizam o sistema *agr* na forma de vida sésil possuem camadas de biofilme mais finas do que mutantes *agr*-negativos devido à habilidade de se destacar do biofilme maduro (VUONG et al., 2004).

Além do sistema *agr*, há um certo número de outros fatores principais que governam a expressão de biofilmes em células de *Staphylococcus*. Nesse contexto, uma função relevante é desempenhada pelos reguladores de transcrição pertencentes a família *sarA* (ARCIOLA et al., 2012).

O regulador global *sarA* é uma proteína dimérica ligada ao DNA, que regula vários fatores de virulência e atua como um agente de transcrição. Ensaios demonstraram que *sarA* foi capaz de ligar-se com afinidade à região promotora do *ica*, indicando uma regulação direta na expressão de PIA (VADYVALOO; OTTO, 2005). O gene *sarA* afeta a transcrição de *icaADBC* independentemente de *icaR* (CONLON; HUMPHREYS; O’GARA, 2004; TORMO et al., 2005).

Figura 4: Sistema quorum sensing agr em *Staphylococcus* sp.



Fonte: JOO; OTTO(2012)

2.5. RNA de interferência

O silenciamento genético pós-transcricional (PTGS) é um mecanismo de controle genético que opera ao nível da degradação de uma sequência específica de RNA e age contra transgenes, genes endógenos e vírus.

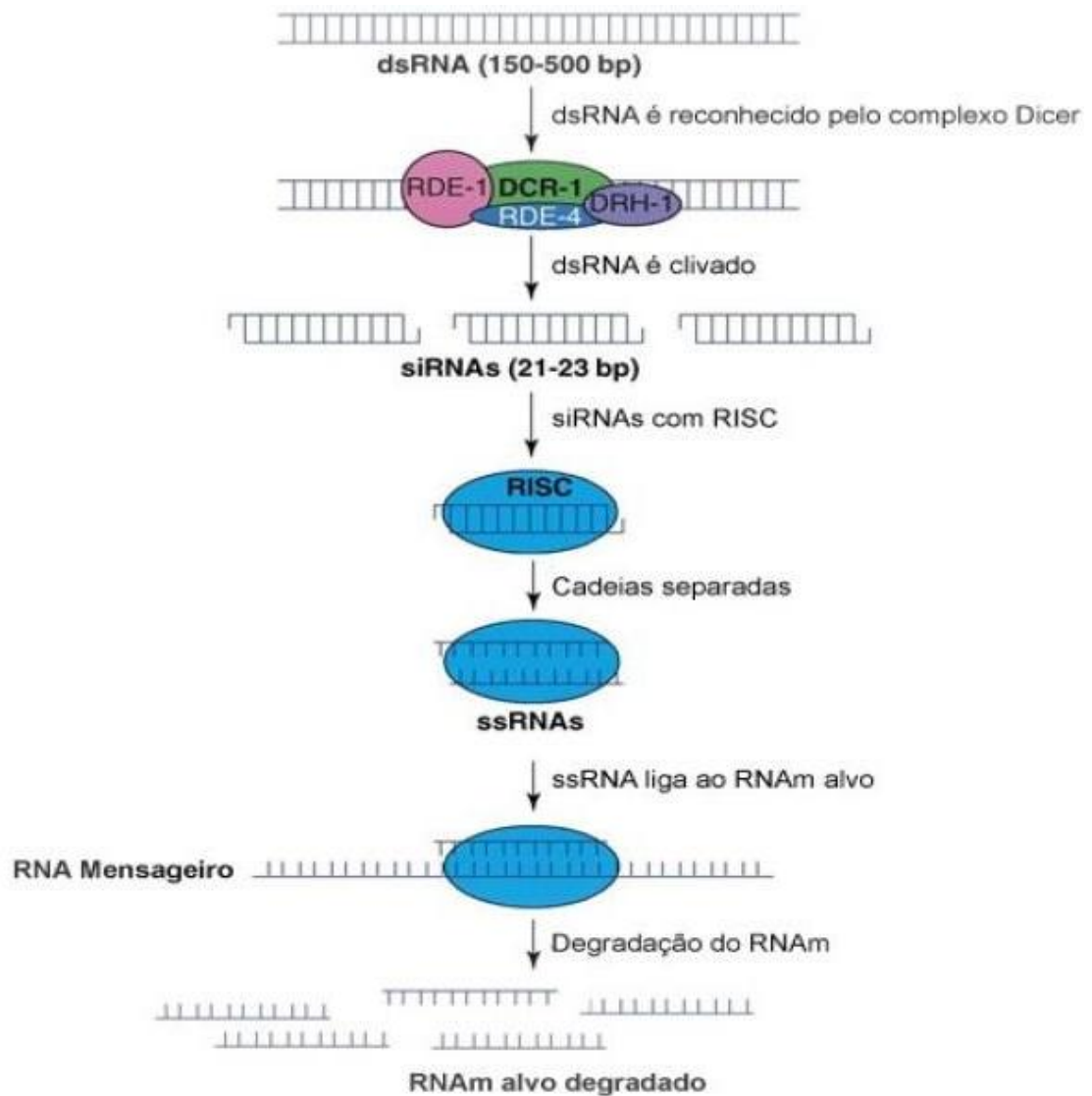
A inativação de genes por deleção genética ou por bloqueio da tradução de seus transcritos (silenciamento) constitui uma estratégia extremamente importante tanto para atribuir função aos genes como para mapear a inter-relação dos diferentes componentes das vias regulatórias intracelulares. Um dos meios para se obter o silenciamento pós-transcrição consiste na ativação de um mecanismo mediado por RNAs fita-dupla (*doubled-stranded RNA* - dsRNA) conhecido como interferência de RNA (RNAi). Esse fenômeno foi descrito pela primeira vez no nemátodeo *Caenorhabditis elegans*, quando se observou que a presença de apenas algumas poucas moléculas de RNA dupla-fita (dsRNA) eram capazes de abolir a expressão de um determinado gene com sequência similar àquele dsRNA (FIRE et al., 1998). Dentre as vantagens de utilização do RNAi podemos citar: silenciamento múltiplo e simultâneo de genes com sequências semelhantes e, também, a produção de diferentes níveis de silenciamento. A maquinaria necessária ao silenciamento gênico através da interferência

pelo RNA já foi descrita em várias espécies de plantas, fungos, protozoários, helmintos, insetos e células de mamíferos (PADDISON et al., 2002; PAUL et al., 2002).

O RNA dupla-fita é importante no processo de silenciamento porque ele é clivado dentro da célula em fragmentos de 21-25 nucleotídeos por uma nuclease conhecida como *Dicer*. Os pequenos fragmentos de dsRNA, conhecidos como *small interfering RNAs* (*siRNAs*), correspondem às fitas *sense* e *antisense* do RNA alvo e se associam a proteínas celulares formando um complexo multimérico chamado *RISC* (*RNA Interference Specificity Complex*). Uma helicase presente no complexo abre a dupla-fita dos siRNAs, de forma que a fita *antisense* do duplex guia o complexo até o mRNA alvo (figura 5) (BARBOSA; LIN, 2004). Uma endorribonuclease, também presente no complexo, cliva o referido mRNA, degradando-o e, conseqüentemente, ocorre o silenciamento (MARTINEZ et al., 2002).

A interferência mediada por RNA é um fenômeno que naturalmente ocorre nos organismos eucariotos e parece exercer, primordialmente, um papel na eliminação de RNAs mensageiros anômalos e na defesa do organismo contra parasitas moleculares como transposons e vírus. Durante a replicação, vírus de RNA de plantas geram RNAs dupla-fita como intermediários. Essas moléculas são clivadas pela *Dicer* de forma que, quando a infecção se estabelece de fato, o complexo *RISC* ataca os RNA mensageiros virais e a replicação cai. Em contrapartida, os vírus podem produzir proteínas que neutralizam o silenciamento do RNA, o que explica a existência de algumas cepas altamente virulentas (BARBOSA; LIN, 2004).

Figura 5: Mecanismo de silenciamento por RNAi em *C. elegans*.



Fonte: adaptado de GRISHOK (2005)

No entanto, várias barreiras impedem a aplicação das técnicas de siRNA à pesquisa e o uso clínico. As moléculas atuais de siRNA podem não funcionar em bactérias, que são amplamente utilizadas em experimentos de pesquisa biológica. As moléculas siRNA também podem não ser entregues em células sem interromper as células, e os genes não permanecem suprimidos por muito tempo. Pesquisadores conseguiram superar os problemas de entrega e a duração da eficácia ao alterar a composição molecular das moléculas de RNA de cadeia dupla convencionais usadas no siRNA. Eles combinaram uma única cadeia de RNA com uma única cadeia complementar de DNA para criar moléculas de RNA-DNA híbridas curtas, chamadas *siHybrids* (SHERMAN, 2004). Por definição os *siHybrids* são moléculas compostas por uma cadeia não modificada Antisenso-RNA e uma cadeia completamente modificada como DNA

(HOGREFE et al., 2006). Os *siHybrids* são inerentemente mais estáveis do que siRNAs. Eles passivamente entram nas células através de um mecanismo ainda não compreendido e permanecem estáveis na presença das enzimas em uma célula. Como resultado, as moléculas híbridas têm uma eficiência mais robusta do que o siRNA, e os seus efeitos duram até 10 vezes mais do que os das moléculas convencionais. Além disso, *siHybrids* custa metade do preço para produzir, e ao contrário siRNA, eles são eficazes em bactérias (SHERMAN, 2004).

Para usar os *siHybrids*, é necessário primeiro identificar a sequência de nucleotídeos que compõem o gene alvo. Em seguida, um pedaço de híbrido RNA-DNA com cerca de 20 nucleótidos é sintetizado para corresponder à parte da sequência genética identificada. Quando esta molécula híbrida inibidora é inserida numa célula, degrada seletivamente o RNA mensageiro da sequência alvo, o que desativa a capacidade do gene para fabricar o seu produto. A tecnologia dos *siHybrids* podem ter inúmeras aplicações. Por exemplo, virtualmente todos os distúrbios genéticos - de doenças neonatais e neurodegenerativas a imunodeficiências - são causados pela expressão genética mutada, que pode ser interrompida ou diminuída com o tratamento com *siHybrid*. Esta tecnologia também pode ser eficaz contra a infecção bacteriana, pois o organismo tratado não irá desenvolver uma resistência ao *siHybrids*. Além disso, várias aplicações são possíveis em áreas como agricultura, toxicologia, farmacologia, imunologia, medicina veterinária, embriologia, ciência ambiental e antiterrorismo (SHERMAN, 2004).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Bioinformática

3.1.1. Construção do RNA de interferência

Foi feita uma busca em bancos de dados genômicos (*Genbank*) do gene alvo (*operon ica*) em *S. aureus* e *S. epidermidis* com o *Basic Local Alignment and Search Tool* (BLAST). As sequências de DNA mais representativas foram selecionadas e alinhadas no programa Bioedit (HALL, 1999), sendo posteriormente formadas sequências únicas contíguas, que são sequências resultantes da remontagem de pequenos fragmentos do DNA, e correspondem a identidade das sequências, as quais foram utilizadas para construção dos RNAs de interferência no site IDT (<http://www.idtdna.com/site>). Os siRNAs gerados foram colocados no BLAST para verificar similaridade apenas com *Staphylococcus*. As moléculas positivas foram avaliadas também quanto ao local de hibridação, buscando-se aquelas que hibridizavam em regiões mais conservadas tanto de *S. aureus* quanto de *S. epidermidis*.

A construção da molécula de interferência correspondente ao gene *agr* foi feita num trabalho anterior.

3.2. Microbiologia

3.2.1. Linhagens estudadas

As linhagens formadoras de biofilmes (tabela 1) foram cedidas pelo Laboratório de Cocos Gram-positivos (LCGP) da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

Tabela 1 – Linhagens de bactérias formadoras de biofilmes

Linhagens	ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	35984
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Isolado clínico também formadora de biofilme (LCGP)

3.3.1. Cultivo e manutenção das linhagens

Para cultivo e manutenção foi utilizado o meio TSA (tabela 2). As linhagens foram cultivadas por 24h a 36 °C.

Tabela 2 - Fórmula do meio de cultivo TSA

Componentes do meio	Quantidade
TSB (<i>Tryptic Soy Broth</i>)	20 g
Ágar	20 g
Água destilada	1000 mL

As linhagens de *Staphylococcus* spp. utilizadas foram mantidas a -15 °C em tubos de criopreservação contendo 600 µl do meio TSB suplementado com 400 µl glicerol (50% v/v). Antes da utilização, cada linhagem foi semeada em placas/tubos com TSA e incubada durante 24 horas a 36 °C.

3.2.4. Formação do biofilme e teste *in vitro* dos *siHybrids*

As análises de formação de biofilme foram feitas em placas de 96 poços e ocorreram durante três dias. No primeiro dia foi adicionado em cada poço: 180 µL de TSB suplementado com 1% de glicose, depois foi acrescentado 20 µL da suspensão bacteriana, com absorbância variando entre 0,08 e 0,1 em 580 nm, que corresponde a escala de MacFarland 0,5%, e o *siHybrids* em diferentes volumes (variando entre 0,5 a 6 µL) e concentrações (variando entre 0,25 a 3 mM). Após esse procedimento, as placas foram colocadas em uma estufa durante 24 horas, com temperatura aproximadamente a 35°C. No segundo dia os poços foram lavados com solução salina 0,9% em triplicata descartando o lavado. Realizou-se a inversão da placa para retirar o excesso de solução salina. Posteriormente foi realizada a fixação com 150 µL de metanol durante 20 minutos. Desprezou-se o metanol e a placa foi deixada invertida e aberta para secar *overnight*. No terceiro dia a placa foi corada com 150 µL de Cristal Violeta 0,5% deixando por 15 minutos. O excesso de corante foi retirado invertendo a placa e posteriormente lavando-a em água até que não haja mais corante no lavado. Deixa secar por alguns minutos em temperatura ambiente. A ressuspensão do biofilme corado no fundo dos poços foi feita com 150 µL de etanol 96% deixando repousar por 30 minutos. Depois, por fim, a placa foi lida em leitora de ELISA com filtro 492 nm.

3.3. Análise Estatística

A normalidade dos dados obtidos foi analisada a partir do teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$). Após serem identificados como paramétricos, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) utilizando como parâmetro de comparação, o teste T de Tukey

($p < 0,05$). As análises foram realizadas no *software* Past e a planilha eletrônica Microsoft® Excel® 2013.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao alinharmos as sequências mais representativas do gene *icaA* no BioEdit, houve a geração de três sequências únicas que correspondiam à similaridade das sequências dispostas nos bancos de dados, as quais foram chamadas de Contigs 0, 1 e 2 (Anexo 1).

As sequências híbridas criadas a partir do molde dos contigs selecionados foram as seguintes:

Oligo de DNA Senso - 5' - TTAGACAACGTATCTTCAA -3'

RNA antisenso - 3' - UUGAAGAUACGUUGUCUAA-3'

Os 19 pares de base da molécula de RNA de interferência *icaA* foram confirmados usando o BLAST, mostrando 100% de similaridade com *Staphylococcus* (Figura 6). De acordo com Jackson *et al.* (2003), essa similaridade aumenta a confiança com a qual os dados observados e o padrão de expressão pode ser ligado ao silenciamento dos genes alvos e, desta forma, o perfil de expressão em conjunto com o silenciamento de genes por RNAi proporcionará um meio eficaz para identificar e caracterizar a função de genes, identificar alvos de drogas e desenvolver terapias mais específicas.

Figura 6: Sequência da molécula de siRNA apresentando 100% de similaridade com *Staphylococcus* no BLAST.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
38.2 bits(19)	1.0	19/19(100%)	0/19(0%)	Plus/Plus
Query 1	TTAGACAACGTATCTTCAA	19		
Sbjct 2127141	TTAGACAACGTATCTTCAA	2127159		

Fonte: adaptado de: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Para determinar a inibição de biofilme pelos *siHybrids* avaliamos a sua formação após a adição das moléculas híbridas. A expressão do biofilme foi inibida independente da concentração.

Utilizando o gene *icaA1* foi possível notar uma inibição significativa para a linhagem *S. aureus* ATCC 29213 apenas na concentração de 0,5 mM. Já na linhagem *S. epidermidis* ATCC 35984, o híbrido *icaA1* apresentou uma atividade inibitória em todas as concentrações, com exceção da concentração de 2 mM. Para linhagem *S. epidermidis* LCGP não foi apresentada nenhuma atividade em nenhuma concentração. E com a utilização do *icaA2*, houve uma inibição significativa para a linhagem *S. epidermidis* ATCC 35984, com a concentração 0,375 mM.

Com o híbrido *agrA1* foi apresentada uma melhor atividade inibitória para a linhagem

S. aureus ATCC 29213, principalmente na concentração de 1mM. Para a linhagem *S. epidermidis* ATCC 35984, houve uma melhor inibição na concentração de 0,375 e 1 mM. De modo semelhante, para linhagem *S. epidermidis* LCGP, a concentração onde houve uma melhor inibição foi a de 1mM. O *agrA2* também mostrou uma atividade inibitória mais significativa para *S. aureus* ATCC 29213, principalmente nas concentrações de 0,5, 1 e 2mM. Para *S. epidermidis* ATCC 35984, a melhor concentração inibitória foi a de 0,25 mM. Já para linhagem *S. epidermidis* LCGP, foi apresentada uma inibição nas concentrações de 0,5, 1,5, 2 e 3 mM.

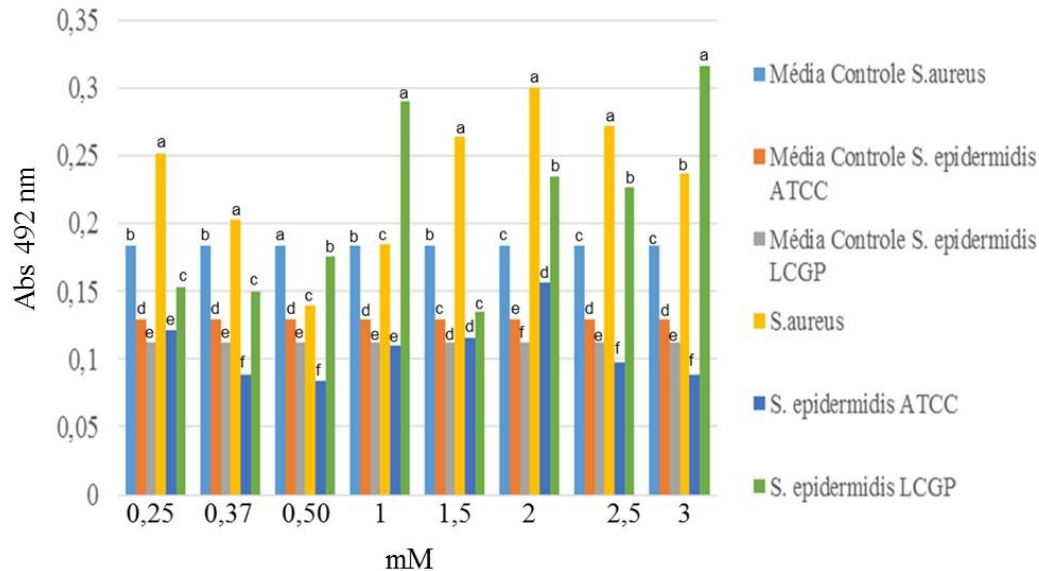
De acordo com o teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$) todos os dados foram considerados paramétricos. Depois os dados foram submetidos ao teste T de Tukey ($p < 0,05$). A partir dos resultados obtidos foram feitos gráficos comparando as médias, onde o eixo vertical representa os valores da espectrofotometria obtida com o filtro de 492 nm, e o eixo horizontal representa as concentrações das moléculas híbridas que foram testados.

Na comparação das médias do *icaA1*, que está representada no gráfico 1, com as médias do *agrA1* (gráfico 3) percebe-se que o híbrido *icaA1* não apresentou atividade significativa contra *S. aureus* ATCC 29213 como o *agrA1*, já para a linhagem de *S. epidermidis* ATCC 35984 podemos perceber o contrário, *icaA1* apresentou uma atividade inibitória maior que a do *agrA1*. Porém para a linhagem *S. epidermidis* LCGP a melhor atividade inibitória foi do híbrido *agrA1*.

Em relação a linhagem *S. epidermidis* LCGP com o híbrido *icaA1*, não foi observada atividade inibitória em nenhuma das concentrações utilizadas. Uma das hipóteses para isso ter acontecido é o fato dessa linhagem ter sido obtida a partir de um isolado clínico e é possível que o mesmo apresente algum tipo de resistência. A mesma coisa se repete com o híbrido *icaA2* (gráfico 2).

S. epidermidis faz parte da microbiota normal da pele em humanos, e foi considerado de baixa virulência e sem grande importância clínica até algumas décadas atrás. Porém, com o aumento do uso de materiais implantáveis, esses micro-organismos assumiram um papel importante nos processos infecciosos, principalmente hospitalares (THEISEN, 2010). A multiresistência aos antimicrobianos é uma das principais características observadas entre estes isolados hospitalares (SANTOS *et al.*, 1997). A capacidade desses micro-organismos em albergar vários marcadores de resistência demonstra sua importância como reservatório de genes de resistência, que podem ser transmitidos para outras espécies e gêneros de micro-organismos (THEISEN, 2010).

Gráfico 1- Comparação das médias dos controles com as médias dos tratamentos com *icaA1* nas diferentes linhagens de *Staphylococcus*. As médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Comparando as médias do *icaA2* (gráfico 2) com as médias do *agrA2* (gráfico 4) pode-se perceber que o híbrido *agrA2* apresentou uma melhor atividade inibitória contra a linhagem *S. aureus* ATCC 29213. Para a linhagem *S. epidermidis* ATCC 35984 os dois híbridos, tanto o *icaA2* como o *agrA2*, apresentaram atividade inibitória mas em concentrações diferentes, e para a linhagem *S. epidermidis* LCGP, o híbrido *agrA2* também se mostrou mais eficiente que o *icaA2*.

Gráfico 2 - Comparação das médias dos controles com as médias dos tratamentos com *icaA2* nas diferentes linhagens de *Staphylococcus*. As médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

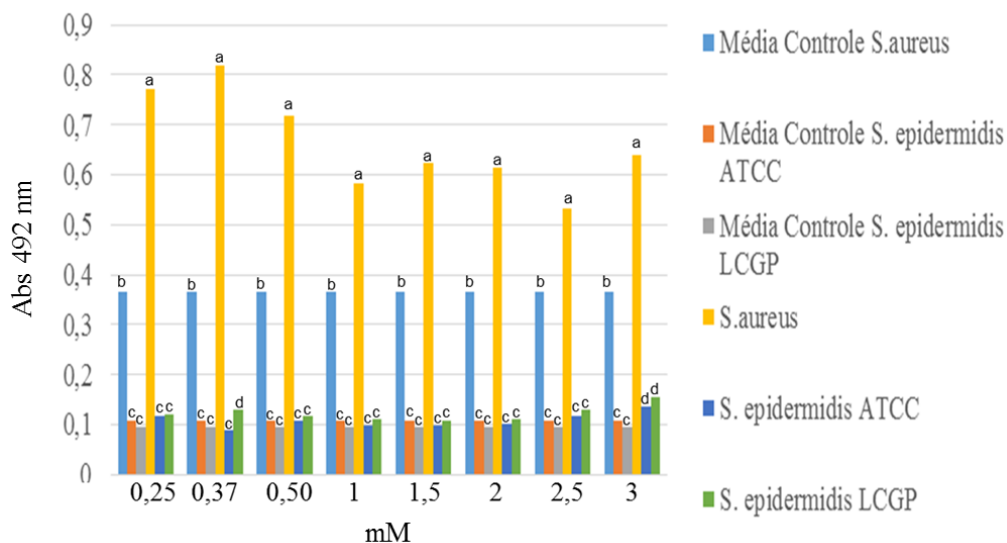


Gráfico 3 - Comparação das médias dos controles com as médias dos tratamentos com *agrA1* nas diferentes linhagens de *Staphylococcus*. As médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

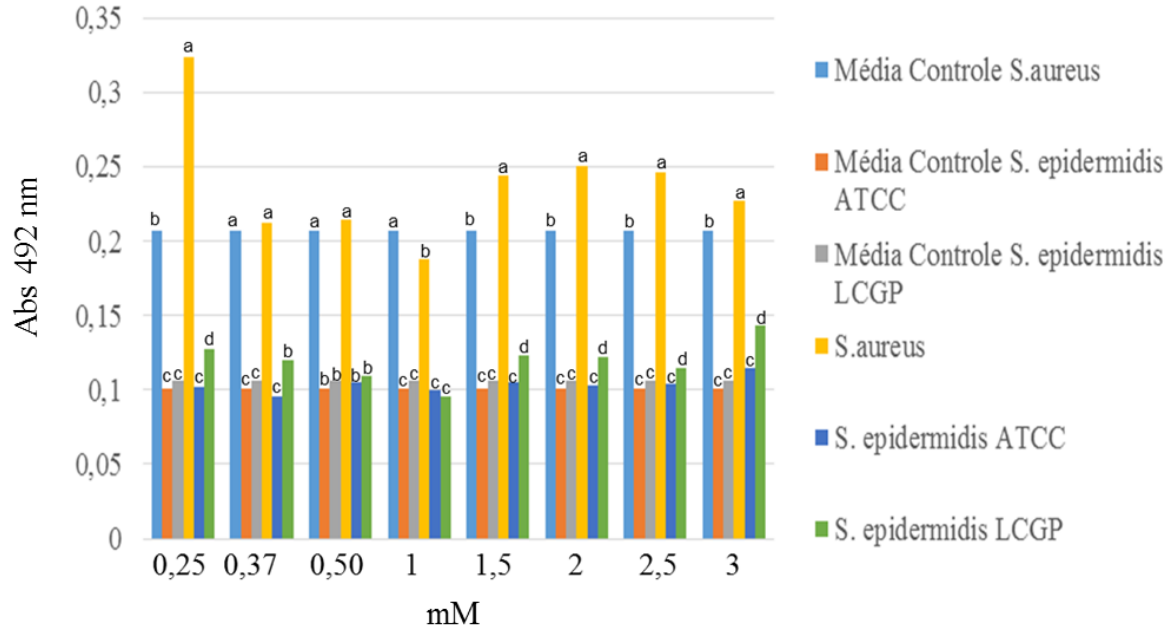
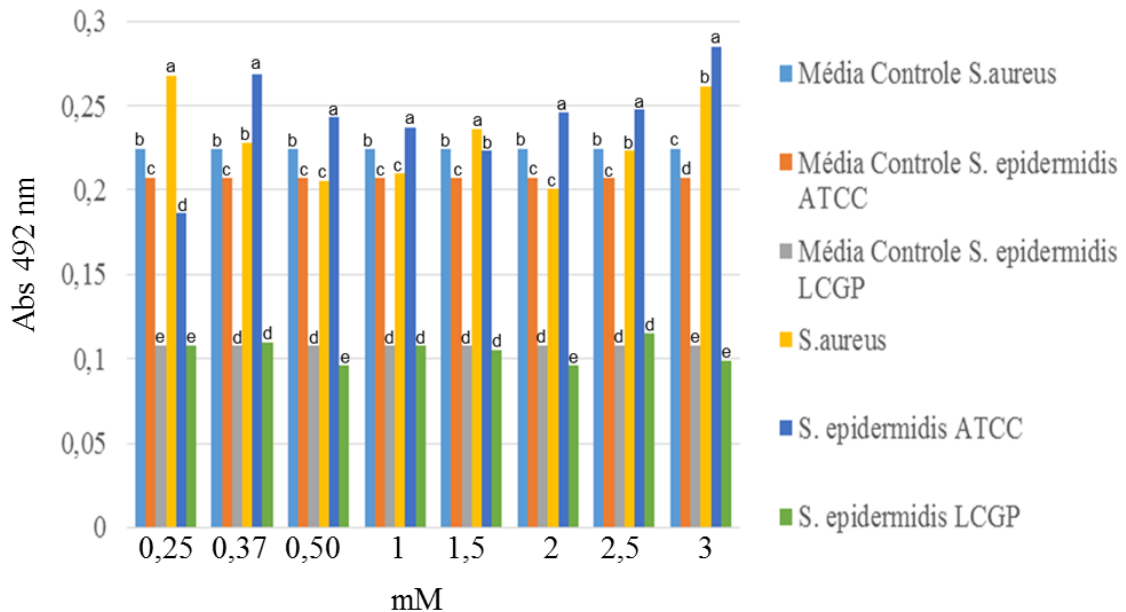


Gráfico 4 - Comparação das médias dos controles com as médias dos tratamentos com *agrA2* nas diferentes linhagens de *Staphylococcus*. As médias seguidas de mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).



Mais estudos são necessários para estabelecer uma dose/resposta entre a concentração clara de dsRNA e a eficiência do silenciamento, e com maior precisão determinar a sensibilidade do RNAi (TERENIUS *et al.*, 2011). Uma perspectiva futura para esse trabalho seria fazer o teste de silenciamento do gene/formação de biofilme com as moléculas híbridas

(*agr* e *ica*) juntas, analisando se o potencial delas em conjunto seria mais eficiente do que elas isoladas.

De acordo com os gráficos de desvio padrão, os dados referentes as médias dos tratamentos do *S. epidermidis* com o híbrido *icaA1*, tanto a linhagem ATCC quanto a LCGP, tiveram pouca variação (gráfico 5), diferentemente do desvio padrão do *S. aureus*. O mesmo foi observado com o híbrido *icaA2* (gráfico 6).

Gráfico 5 - Representação das medidas de dispersão das médias dos tratamentos com *icaA1* em cada uma das linhagens de *Staphylococcus*.

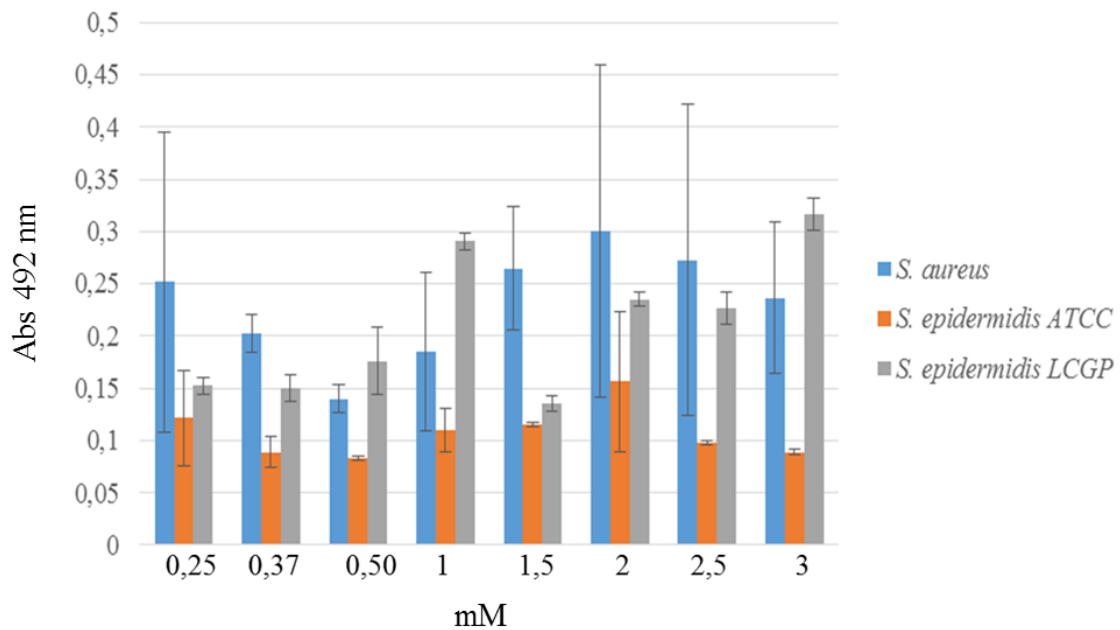
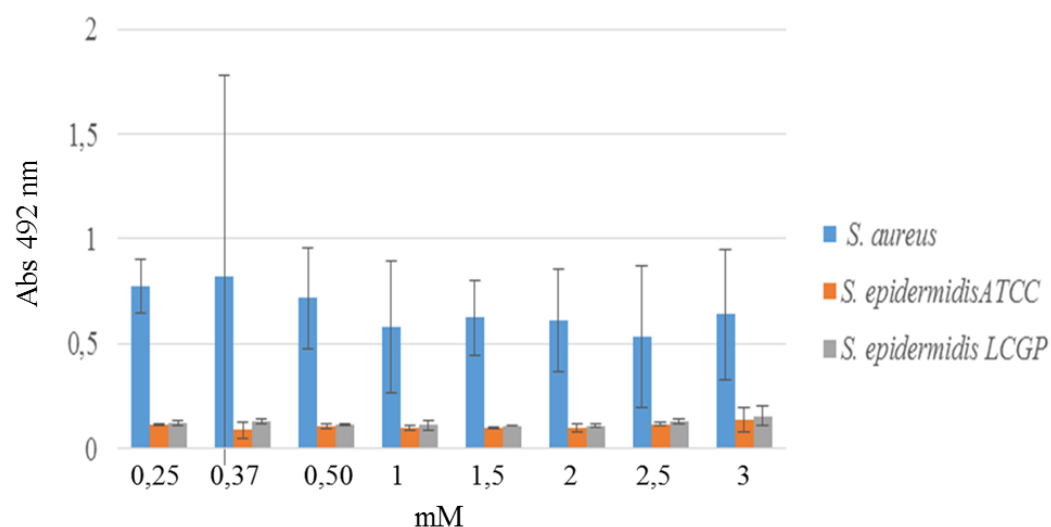


Gráfico 6 - Representação das medidas de dispersão das médias dos tratamentos com *icaA2* em cada uma das linhagens de *Staphylococcus*.



Em relação aos híbridos *icaA1* e *icaA2*, os híbridos *agrA1* e *agrA2* apresentaram um desvio padrão menor em todas as linhagens (gráficos 7 e 8, respectivamente). Isso indica que

esses tratamentos foram melhores estatisticamente.

Gráfico 7 - Representação das medidas de dispersão das médias dos tratamentos com *agrA1* em cada uma das linhagens de *Staphylococcus*.

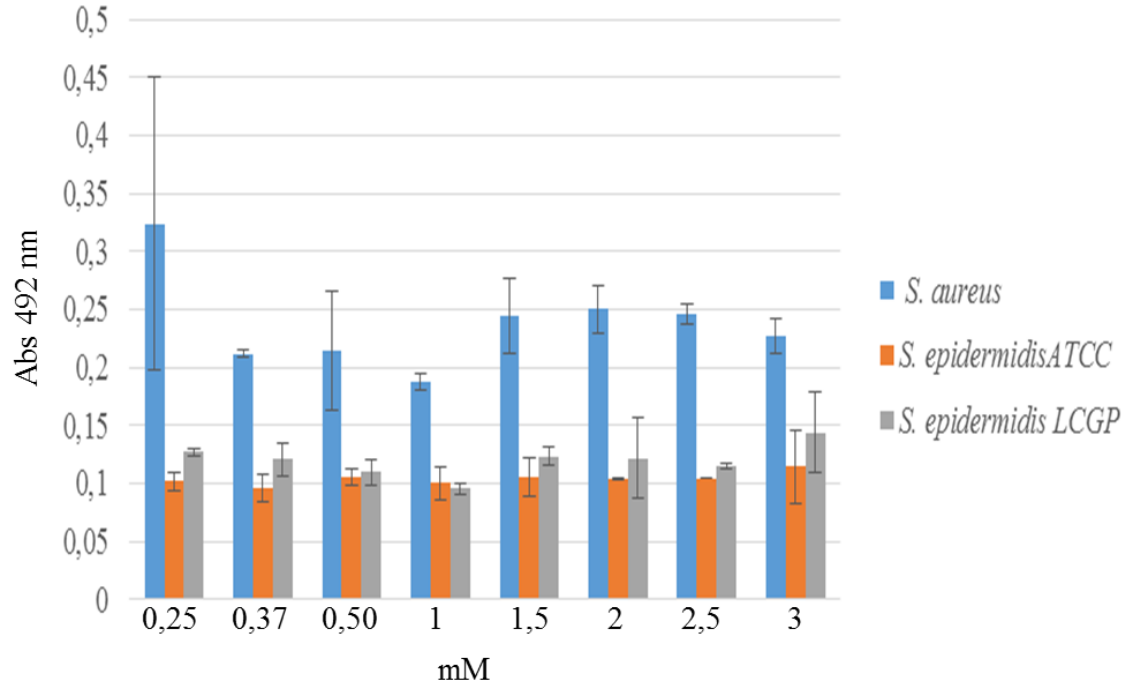
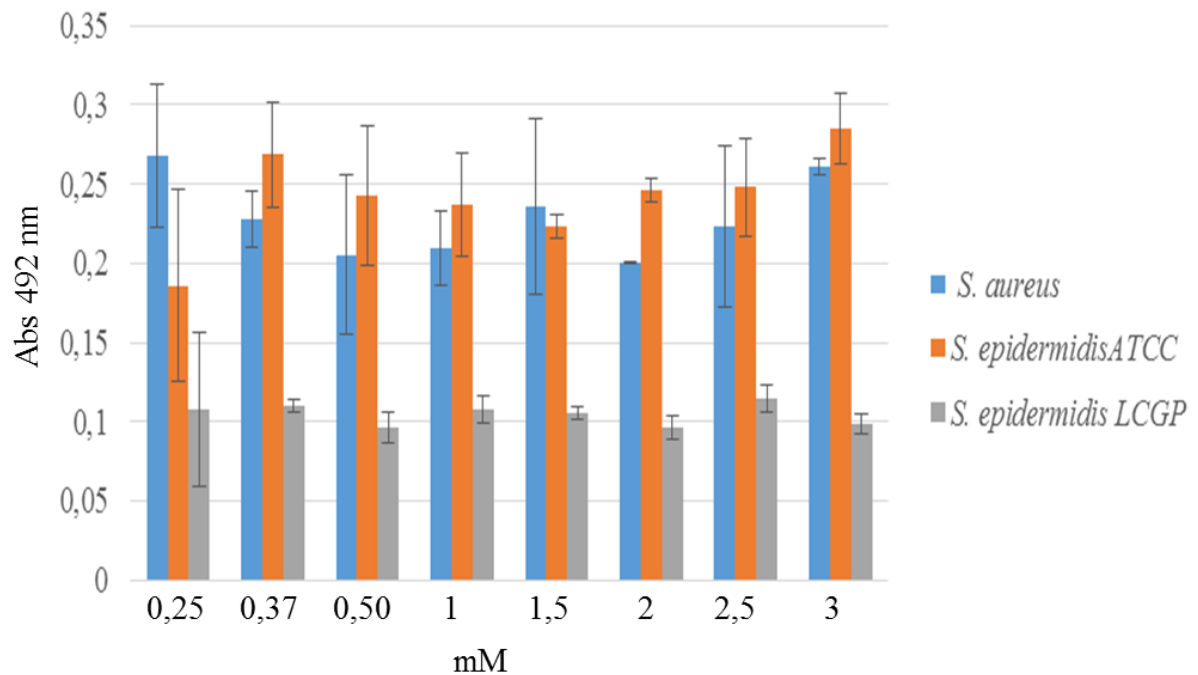


Gráfico 8: Representação das medidas de dispersão das médias dos tratamentos com *agrA2* em cada uma das linhagens de *Staphylococcus*.



O processo de silenciamento gênico pode corresponder à interação entre sequências homólogas de ácidos nucleicos. Sabe-se que o RNA pode estar envolvido em duas classes de

Silenciamento Gênico dependente de homologia, que são o SGPT (Silenciamento gênico pós-transcricional) e o SGT (Silenciamento gênico transcricional). No SGPT, a degradação de RNAs homólogos, ou pareados, no citoplasma levaria a não-tradução de um determinado produto gênico. Já o SGT está relacionado à repressão da transcrição induzida por um RNA antissenso derivado do próprio DNA, que promoveria uma metilação na região promotora – a nível nuclear – e a homologia para a metilação dirigida ocorreria nas regiões transcritas (FAGARD; VAUCHERET, 2000; VAUCHERET; BÉCLIN; FAGARD, 2001). A metilação pode ser induzida pelo pareamento por complementaridade de bases de regiões homólogas do DNA ou ainda DNA-RNA. Esse pareamento corresponde ao primeiro passo para o SGPT, que promoveria uma metilação no éxon do transgene, levando a uma prematura finalização da transcrição. Por fim, um RNA aberrante (RNAab) poderia ser formado a partir dessa síntese irregular de mRNA (WASSENEGGER; PÉLISSIER, 1998; MATZKE *et al.*, 2001). Porém, segundo Lippman e Martienssen (2004) os siRNAs não estão restritos ao SGPT, eles podem induzir a formação de heterocromatina na levedura *Schizosaccharomyces pombe*. Apesar da descoberta de muitos fatores que contribuem para a formação de heterocromatina dirigida por RNAi em levedura, o mecanismo pelo qual o RNAi ativo recruta modificadores de cromatina permaneceu enigmático (BAYNE *et al.*, 2010).

Segundo Lamberton e Christian (2003) as moléculas de siRNA trabalham com o auxílio de enzimas intracelulares desconhecidas para causar a degradação de transcritos de mRNA que possuem uma sequência idêntica à do siRNA, que então causa efeitos pós-transcricionais transientes de silenciamento de genes.

O acesso a mRNAs usando RNAi tornou-se uma área ativa da pesquisa em biotecnologia e de acordo com Mccaffrey *et al.* (2003), houve um interesse considerável no uso da terapêutica com siRNA para tratar uma ampla gama de doenças, pois ele pode, teoricamente, ser direcionado para clivar qualquer mRNA alvo, fornecendo uma metodologia única para o desenho racional de drogas para muitas doenças diferentes. Por esta razão, o RNAi gerou interesse substancial. Mccaffrey *et al.* (2003) percebeu no seu estudo que a inibição da replicação viral por siRNA em mamíferos era viável. Já, de acordo com Yanagihara *et al.* (2006) o efeito só foi observado 24 horas após a inserção da molécula. Porém, Lamberton e Christian (2003) afirmaram que moléculas interferentes curtas não precisam necessariamente ser compostas de RNA, moléculas compostas de DNA e RNA fornecem efeitos de silenciamento de genes de vários graus e persistências e mostraram o uso potencial desta aplicação em células de mamíferos.

Existe uma correlação geral entre a estabilidade relativa das moléculas de interferência curtas e o grau e duração dos efeitos de silenciamento de genes. A energia de ligação elevada das moléculas híbridas de RNA:DNA podem resultar em maior estabilidade intracelular, permitindo que permaneçam na célula por períodos mais longos. Isso poderia permitir que as moléculas híbridas fornecessem efeitos de silenciamento de genes a longo prazo (LAMBERTON; CHRISTIAN, 2003). Isso pode ter influenciado no resultado deste trabalho, pois a formação do biofilme durou apenas 24 horas, e talvez a molécula híbrida necessitasse mais do que esse tempo para fornecer um melhor resultado.

Hogrefe *et al.* (2006) confirmaram que os *siHybrids* são mais potentes que siRNAs convencionais para o gene HER-2, que é um proto-oncogene, e acreditam que esses análogos representam uma nova e intrigante classe de “imitadores” do siRNA para estudo posterior.

Contudo podemos perceber que os *SiHybrids* são candidatos ideais para agentes farmacêuticos e terapêuticos para o tratamento de doenças causadas por um gene excessivamente expresso ou um gene cancerígeno. Eles também podem ser usados como antibióticos quando direcionados a um gene bacteriano vital e único. *SiHybrids* pode ser usado como agentes antivirais, fungicidas, herbicidas ou pesticidas. Um *siHybrid* apropriado pode ser projetado para silenciar qualquer gene em qualquer célula de qualquer organismo (CHRISTIAN; LAMBERTON, 2004).

A partir deste trabalho podemos perceber que os *siHybrids* possuem uma atividade inibitória para a formação de biofilme em *Staphylococcus*. Este estudo é um dos primeiros a anunciar a eficácia de híbridos de RNA:DNA contra biofilmes de *Staphylococcus* spp. Examinamos o efeito de híbridos de DNA:RNA (*siHybrids*) contra genes de formação de biofilme em bactérias do gênero *Staphylococcus*, e nossos resultados indicam que esses híbridos podem apresentar uma nova opção terapêutica contra bactérias formadoras de biofilmes do gênero *Staphylococcus*. Especificamente, mostramos que os *siHybrids* reduziram a formação de biofilme em algumas linhagens de *Staphylococcus* em diferentes concentrações.

5. CONCLUSÃO

Acreditamos que nossas descobertas apoiem novas alterações no modelo proposto, porque mostramos que as moléculas de interferência curtas não precisam necessariamente ser compostas por RNA, moléculas interferentes curtas compostas de DNA e RNA fornecem efeitos de silenciamento de genes de graus e persistências variáveis.

As moléculas híbridas de RNA-DNA construídas possuem uma potencial aplicação para silenciamento de genes que promovem a formação de biofilme em algumas linhagens de *Staphylococcus*. Os *siHybrids agr*, A1 e A2, se mostraram mais eficientes em comparação com os *siHybrids ica* (A1 e A2), uma vez que eles induziram a inibição na maioria das concentrações utilizadas. Com o híbrido *icaA1*, para as linhagem *S. aureus* ATCC 29213 e *S. epidermidis* ATCC 35984, a melhor concentração para a inibição foi de 0,5 mM. A melhor concentração de *icaA2* para a inibição da linhagem *S. epidermidis* ATCC 35984 foi de 0,375 mM. Com o híbrido *agrA1* a melhor concentração para inibição das linhagens *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 35984 e *S. epidermidis* LCGP, são respectivamente, de 1 mM, 0,375 mM e 1 mM. O *agrA2* mostrou uma atividade inibitória mais significativa para *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 35984 e *S. epidermidis* LCGP, principalmente nas concentrações, respectivamente de 2, 0,25 e 0,5 mM.

REFERÊNCIAS

- AAGAARD, Lars; ROSSI, John J.. RNAi Therapeutics: Principles, Prospects and Challenges. **Adv Drug Deliv Rev**, Usa, v. 59, p.75-86, 2007.
- ABDALLAH, Marwan; BENOLIEL, Corinne; DRIDER, Djamel; DHULSTER, Pascal; CHIHIB, Nour-Eddine. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. **Arch Microbiol**, Germany, v. 196, n. 7, p.453-472, 2014.
- Allen Christian; Janelle Lamberton. **Short interfering nucleic acid hybrids and methods thereof**. US nº US 20040053289 A1, 08 abr. 2003, 18 mar. 2004.
- APARNA, Madhu Sharma; YADAV, Sarita. Biofilms: Microbes and Disease. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, India, v. 12, n. 6, p.526-530, 2008.
- ARAÚJO, Patrícia Aline Oliveira Ribeiro de Aguiar. **Análise de expressão do gene Lgi1 durante o desenvolvimento do sistema nervoso central e seu silenciamento utilizando a técnica de interferência por RNA**. 2008. 217 f. Tese (Doutorado) - Curso de Fisiopatologia Médica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- ARCIOLA, Carla Renata; CAMPOCCIA, Davide; SPEZIALE, Pietro; MONTANARO, Lucio; COSTERTON, John William. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. **Biomaterials**, Netherlands, v. 33, p.5967-5982, 2012.
- BARBOSA, Angela Silva; LIN, Chin Jia. Silenciamento de Genes Com RNA Interferência: Um Novo Instrumento Para Investigação da Fisiologia e Fisiopatologia do Córtex Adrenal. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo, v. 48, n. 5, p.612-619, out. 2004.
- BAYNE, Elizabeth H.; WHITE, Sharon A.; KAGANSKY, Alexander; BIJOS, Dominika A.; SANCHEZ-PULIDO, Luis; HOE, Kwang-Lae; KIM, Dong-Uk; Park, HAN-OH; PONTING, Chris P.; RAPPSILBER, Juri; ALLSHIRE, Robin C. Stc1: A Critical Link between RNAi and Chromatin Modification Required for Heterochromatin Integrity. **Cell**, Scotland, Uk, v. 140, p.666-677, 2010.
- BECScreen (United States). **About Biofilms**. Disponível em: <<http://www.becscreen.com/about/about-biofilms>>. Acesso em: 21 set. 2016.
- CAFISO, V.; BERTUCCIO, T.; CAMPANILE, F.; AMICOSANTE, G.; PERILLI, M.G.; SELAN, L.; ARTINI, M.; NICOLETTI, G.; STEFANI S. Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. **Clin Microbiol Infect**, Italy, n. 10, p.1081-1088, 2004.
- CONLON, Kevin M.; HUMPHREYS, Hilary; O'GARA, James P. Inactivations of *rsbU* and *sarA* by IS256 Represent Novel Mechanisms of Biofilm Phenotypic Variation in *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Bacteriology**, Ireland, v. 186, n. 18, p.6208-6219, 2004.
- COSTERTON, J. William; LEWANDOWSKI, Zbigniew; CALDWELL, Douglas E.; KORBER, Darren R.; LAPPIN-SCOTT, Hilary M.. MICROBIAL BIOFILMS. **Annu. Rev.**

Microbial, United States, v. 49, p.711-745, 1995.

COSTERTON, J. W.; STEWART, Philip S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, United States, v. 284, p.1318-1322, 1999.

CUCARELLA, Carme; SOLANO, Cristina; VALLE, Jaione; AMORENA, Beatriz; LASA, Iñigo; PENADÉS, José R. Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation. **Journal of Bacteriology**, Spain, v. 183, n. 9, p.2888-2896, 2001.

CZACZYK, K.; MYSZKA, K. Biosynthesis of Extracellular Polymeric Substances (EPS) and Its Role in Microbial Biofilm Formation. **Polish J. of Environ. Stud.**, Poland, v. 16, n. 6, p.799-806, 2007.

DEPIERI, Livia Vieira. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação tópica a base de cristais líquidos para veiculação de siRNA na terapia gênica**. 2012. 91 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

DINGES, Martin M.; ORWIN, Paul M.; SCHLIEVERT, Patrick M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, United States, v. 13, n. 1, p.16-34, 2000.

DONLAN, Rodney M. Biofilms and Device-Associated Infections. **Emerging Infectious Diseases**, United States, v. 7, n. 2, p.277-281, 2001.

DONLAN, Rodney M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, United States, v. 8, n. 9, p.881-890, 2002.

DUFOUR, Delphine; LEUNG, Vincent; LÉVESQUE, Céline M. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. **Endodontic Topics**, France, v. 22, n. 1, p.2-16, 2012.

FAGARD, M.; VAUCHERET, H. (TRANS)GENE SILENCING IN PLANTS: How Many Mechanisms? **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Versailles, France, v. 51, p.167-194, 2000.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**. v. 391, n. 6669, p. 806-811, 1998.

GIAOURIS, Efstathios; HEIR, Even; HÉBRAUD, Michel; CHORIANOPOULOS, Nikos; LANGSRUD, Solveig; MØRETRØ, Trond; HABIMANA, Olivier; DESVAUX, Mickaël; RENIER, Sandra; NYCHAS, George-John. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. **Meat Science**, England, v. 97, n. 3, p.298-309, 2014.

GRISHOK, A. RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. **FEBS Letters**. v. 579, n.26, p. 5932-5939, 2005.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp**. v. 41, p. 95-98, 1999.

- HALL-STOODLEY, Luanne; STOODLEY, Paul. Evolving concepts in biofilm infections. **Cellular Microbiology**, United States, v. 11, n. 7, p.1034-1043, 2009.
- HOGREFE, Richard I.; LEBEDEV, Alexandre V.; ZON, Gerald; PIROLLO, Kathleen F.; RAIT, Antonina; ZHOU, Qi; YU, Wei; Chang, Esther H.. Chemically modified short interfering hybrids (*siHYBRIDS*): nanoimmunoliposome delivery in vitro and in vivo for RNAi of HER-2. **Nucleosides, Nucleotides, And Nucleic Acids**, United States, v. 25, p.889-907, 2006.
- JACKSON, Aimee L; BARTZ, Steven R; SCHELTER, Janell. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. **Nature Biotechnology**, Usa, v. 21, n. 6, p.635-638, jun. 2003.
- JOO, Hwang-soo; OTTO, Michael. Molecular basis of in-vivo biofilm formation by bacterial pathogens. **Chem Biol.**, United States, v. 19, n. 12, p.1503-1513, 2012.
- KONG, Kok-fai; VUONG, Cuong; OTTO, Michael. *Staphylococcus quorum sensing* in biofilm formation and infection. **International Journal of Medical Microbiology**, United States, v. 296, p.133-139, 2006.
- KUMAR, C. Ganesh; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, India, v. 42, p.9-27, 1998.
- LAMBERTON, Janelle S.; CHRISTIAN, Allen T. Varying the Nucleic Acid Composition of siRNA Molecules Dramatically Varies the Duration and Degree of Gene Silencing. **Molecular Biotechnology**, Califórnia, v. 24, p.111-119, 2003.
- LAVERTY, Garry; GORMAN, Sean P.; GILMORE, Brendan F. Biomolecular mechanisms of staphylococcal biofilm formation. **Future Microbiology**, England, v. 8, n. 4, p.509-524, 2013.
- LAZZAROTTO, Cyntia. **Formação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* isolado de cateter venoso central através de métodos fenotípicos e genotípicos**. 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- LIPPMAN, Zachary; MARTIENSSEN, Rob. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. **Nature**, New York, Usa, v. 431, p.364-370, 16 set. 2004.
- MACK, Dietrich; FISCHER, Werner; KROKOTSCH, Andreas; LEOPOLD, Klaus; HARTMANN, Rudolf; EGGE, Heinz; LAUFS, Rainer. The Intercellular Adhesin Involved in Biofilm Accumulation of *Staphylococcus epidermidis* Is a Linear b-1,6-Linked Glucosaminoglycan: Purification and Structural Analysis. **Journal of Bacteriology**, Germany, v. 178, n. 1, p.175-183, 1996.
- MACK, Dietrich; SABOTTKE, Axel; DOBINSKY, Sabine; ROHDE Holger, HORSTKOTTE, A. Matthias; KNOBLOCH, K. M. Differential Expression of Methicillin Resistance by Different Biofilm-Negative *Staphylococcus epidermidis* Transposon Mutant Classes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Germany, v. 46, n. 1, p.178-183, 2002.

MARTIMPREY, H. de; VAUTHIER, C.; MALVY, C; Couvreur, P. Polymer nanocarriers for the delivery of small fragments of nucleic acids: Oligonucleotides and siRNA. **European Journal of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, France, v. 71, p.490-504, 2009.

MARTINEZ, J., PATKANIOWSKA, A., URLAUB, H., LÜHRMANN, R., TUSCHL, T. Single-Stranded Antisense siRNAs Guide Target RNA Cleavage in RNAi. **Cell**. v. 110, p.563-574, 2002

MATZKE, Marjori A; MATZKE, Antonius Jm; PRUSS, Gail J; VANCE, Vicki B; RNA-based silencing strategies in plants. **Current Opinion In Genetics And Development**, Salzburg, Austria, v. 11, p.221-227, 2001.

MCCAFFREY, Anton P; NAKAI, Hiroyuki; PANDEY, Kusum; HUANG, Zan; SALAZAR, Felix H; XU, Hui; WIELAND, Stefan F; MARION, Patricia L; KAY, Mark A. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. **Nature Biotechnology**, Califórnia, v. 21, n. 6, p.639-644, jun. 2003.

MORALES, Manuel; MENDEZ-ALVAREZ, Sebastián; MARTIN-LOPEZ, J.V.; MRRERO, Carmem; FREYTES, César O. Biofilm: the microbial “bunker” for intravascular catheter-related infection. **Support Care Cancer**, Spain, v. 1, n. 12, p.701-707, 2004.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. **Microbiologia Médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 948 p.

NEIDELL, Matthew J.; COHEN, Bevin; FURUYA, Yoko; HILL, Jennifer; JEON, Christie Y.; GLIED, Sherry; LARSON, Elaine L. Costs of Healthcare- and Community-Associated Infections With Antimicrobial-Resistant Versus Antimicrobial-Susceptible Organisms. **Clinical Infectious Diseases**, New York, v. 55, n. 6, p.807-815, 2012.

NILSDOTTER-AUGUSTINSSON, Åsa; CLAESSION, Carina; LINDGREN, Per-eric; LUNDQVIST-GUSTAFSSON, Helen; ÖHMAN, Lena. Adherence of Staphylococcus epidermidis to extracellular matrix proteins and effects of fibrinogen-bound bacteria on oxidase activity and apoptosis in neutrophils. **Apms**, Sweden, v. 113, p.361-373, 2005.

NOVICK, Richard P. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. **Molecular Microbiology**, New York, v. 48, n. 6, p.1429-1449, 2003.

OLIVEIRA, Adilson de. **Biofilme estafilocócico: prevenção, detecção da produção e determinação do perfil de resistência a antimicrobianos**. 2014. 144 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada, Unesp, Botucatu, 2014.

OTTO, Michael. Staphylococcal Infections: Mechanisms of Biofilm Maturation and Detachment as Critical Determinants of Pathogenicity. **Annu. Rev. Med**, United States, v. 64, p.175-188, 2013.

PADDISON, P. J.; CAUDY, A. A.; BERNSTEIN, E.; HANNON, G. J.; CONKLIN, D. S. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. **Genes Dev**. v.16, p.948–958, 2002.

- PALMER, Jon; FLINT, Steve; BROOKS, John. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **J Ind Microbiol Biotechnol**, England, v. 34, n. 9, p.577-588, 2007.
- PAUL, C. P.; GOOD, P. D.; WINER, I.; ENGELKE, D. R. Effective expression of small interfering RNA in human cells. **Nature Biotechnol.** v. 20, p.505–508, 2002.
- PEREIRA, Tiago Campos. **Estudos de possíveis aplicações médicas da Interferência por RNA.** 2005. 197 f. Tese (Doutorado) - Curso de Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- REDORBIT (United States). *Staphylococcus aureus*. Disponível em: <http://www.redorbit.com/reference/staphylococcus_aureus/>. Acesso em: 2 out. 2016.
- ROHDE, Holger; MACK, Dietrich; CHRISTNER, Martin; Burdelski, Christoph; Franke, Gefion; Knobloch, Johannes K.-M. Pathogenesis of staphylococcal device-related infections: from basic science to new diagnostic, therapeutic and prophylactic approaches. **Reviews In Medical Microbiology**, Germany, v. 17, p.45-54, 2006.
- ROCCHETTI, Taisa Trevizani. **Detecção do operon ica da produção de biofilme, gene mecA de resistência à oxacilina e identificação de espécies de *Staphylococcus spp.* diretamente dos frascos de hemoculturas pela técnica de PCR multiplex.**2014. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.
- ROSSATTO, Fernanda Cristina Possamai. **Avaliação da formação de biofilme por *Staphylococcus sp.* E diversidade genética de estafilococos coagulase-negativos.** 2015. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.
- SANTOS, K. R. N.; FONSECA, L. S.; NETO, B. G. R.; GONTIJO FILHO, P. P. Surgical site infection: rates, etiology and resistance patterns to antimicrobials among strains isolated at Rio de Janeiro University Hospital. **Infection**, Rio de Janeiro, v. 25, p. 217-220, 1997.
- SHERMAN, Maurina S. Shutting down genes in cancer, bacteria, and viruses. **Science & Technology Review**, United States, p.10-11, 2004.
- SILVA, Carlos Henrique Pessôa de Menezes e; LINS, Alessandro Pereira; CRUZ, Caroline Sathler Oliveira da. Avaliação do sistema staph-id para a identificação de *Staphylococcus* isolados a partir de espécimes clínicos humanos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Espírito Santo, v. 38, p.7-9, 2006.
- SREY, Sokunrotanak; JAHID, Iqbal Kabir; HA, Sang-do. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, England, v. 31, p.572-585, 2013.
- STEWART, Philip S; COSTERTON, J William. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet**, United States, v. 258, p.135-138, 2001.
- TERENIUS, Olle et al. RNA interference in *Lepidoptera*: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. **Journal Of Insect Physiology**, Uppsala, Swede, v. 15, p.231-245, 2011.

THEISEN, Juliana. **Suscetibilidade de *Staphylococcus epidermidis* à vancomicina, rifampicina, azitromicina e eritromicina.** 2010. 28 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

TORMO, María Ángeles; MARTÍ, Miguel; VALLE, Jaione; MANNA, Adhar C.; Cheung, Ambrose L.; LASA, Iñigo; PENADÉS, José R. SarA Is an Essential Positive Regulator of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Development. **Journal of Bacteriology**, Spain, v. 187, n. 7, p.2348-2356, 2005.

VADYVALOO, Viveka; OTTO, Michael. Molecular genetics of *Staphylococcus epidermidis* biofilms on indwelling medical devices. **The International Journal of Artificial Organs**, United States, v. 28, n. 11, p.1069-1078, 2005.

VAUCHERET, Hervé; BÉCLIN, Christophe; FAGARD, Mathilde. Post-transcriptional gene silencing in plants. **Journal Of Cell Science**, Versailles, France, v. 114, p.3083-3091, 2001.

WASSENEGGER, M.; PÉLISSIER, T. A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. **Plant Molecular Biology**, Germany, v. 37, p.349-362, 1998.

VUONG, Cuong; DÜRR, Manuela; CARMODY, Aaron B.; PESCHEL, Andreas; KLEBANOFF, Seymour J.; OTTO, Michael. Regulated expression of pathogen-associated molecular pattern molecules in *Staphylococcus epidermidis*: *quorum-sensing* determines pro-inflammatory capacity and production of phenol-soluble modulins. **Cellular Microbiology**, United States, v. 8, n. 6, p.753-759, 2004.

XU, Lin; LI, Hualin; VUONG, Cuong; VADYVALOO, Viveka; WANG, Jianping; YAO, Yufeng; OTTO, Michael; GAO, Qian. Role of the luxS Quorum-Sensing System in Biofilm Formation and Virulence of *Staphylococcus epidermidis*. **Infection And Immunity**, China, v. 74, n. 1, p.488-496, 2006.

YANAGIHARA, Katsunori; TASHIRO, Miwa; FUKUDA, Yuichi; OHNO, Hideaki; HIGASHIYAMA, Yasuhito; MIYAZAKI, Yoshitsugu; HIRAKATA, Yoichi; TOMONO, Kazunori; MIZUTA, Yohei; TSUKAMOTO, Kazuhiro; KOHNO, Shigeru. Effects of short interfering RNA against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* coagulase in vitro and in vivo. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Nagasaki, Japan, v. 57, p.122-126, 2006.

YARWOOD, Jeremy M.; SCHLIEVERT, Patrick M. *Quorum sensing* in *Staphylococcus* infections. **The Journal of Clinical Investigation**, United States, v. 112, n. 11, p.1620-1625, 2003.

YARWOOD, Jeremy M.; BARTELS, Douglas J.; VOLPER, Esther M.; GREENBERG, E. Peter. Quorum Sensing in *Staphylococcus aureus* Biofilms. **Journal of Bacteriology**, United States, v. 186, n. 6, p.1838-1850, 2004.

ANEXO A - SEQUÊNCIAS CONTIGS 0, 1 E 2

>Contig-0

TTAGCGTTGGG-TA-TTC---CCTCTGTCTGGGCTTGACCATGTTGCGTAAC-
CACCTTTCTTACGTTTAAATGCTTTTGGAAATGCGACAAGAATA-CTG-CT---
GCGTT-AATAATCCAGTATACTGTCTGGATACCAACTTAC--AAA-
TATGAGTCCAGCCATATTC-
TTTTTCTCGTAGCGACTATCAATAAAGAGTGCGACTGT-AAATTGAATA-ACGT-TT-
ATAAAAGTCATAGTAA--AT-GATGATAGTAGA--AATATTGAAAAACT-ATA-
TGTCATAAATGTATAGTCTAAGAAGTTTGCTGTTA-TGA-A-C-A-
AATAGCCTAAATATAGAAGCACTAT--A-T-ATACCCATAA--
AATTGAGATGATTTGCTCAAACATCAAATATA--TAAA-GGA--AACCT-
TTTCGTTTTTCATTGTGCTAAAAAGTCTCGTAGT-A-ATACTTCGTGTCCC-
CCTTGAGCCATCTCACG-CGTTGCTTCCA-AAGACC---TCCCAAT-
GTTTCTGGAACCAA-CATCCAACACA-TG-
GCAAGCGGTTCACTTAATACGATATCCACGT----AA-ATGCAATTTCCAAGAAA-
CTGCAATATCTTCGGTAATCATATCAG-TATCCCAGT-AGCCAACGTCGA-CAA-
CTGCACTTTTTTTAAATAGAGTGAAGACAC-CC-GAAATAGTATTGAC-
TGCGCCAGC-AA-G-
TGTCTGACTTCGCTTAATACAGCCAATTAAACTTGCATATTCTATCGTTTGAATTT
TACCTAAAATAGAACT-CTTATTTGAATTCTAGGATTACCTGTAAGTCA-
CCAAGTTTTGGATCAT-GTTTGAATTCTC-AATCAT-
ATAATATGGTGCATCTTGATCAACGATAG-TATCTGCATCCAA-GCACATTACATA-
ATCATAT-GAAGCCT-GTTAATGCCTTGATTGA-GTGCCTTGGCTTTACCTCTG-
TTTTCTTGTAATCGACGAAA-T-AAAGTCATTAT-TTCTTTG-AT-TT-
TATAGATGAGTTCTGCTGTATTATCTGAACTTCCATCATTAAATGATAATAATTTCT
TTCTTCTCGTAT-T-TGA-GTG-CAAGAACATTAGACAA-
CGTATCTTCAATCGTTTCACTT--TCGTTATAACA-
GGCAAGTAAAAATGTAATGCCTTCTAATTCATCC-A---CATTTATGTCAGGCTTC-
TTGTTCAATGAATATCTAATTTCTCTGGTAAAATAGAA-ATAAATTGAACCGA-C--
A--ATCCAGTAA-ATAGACAT-AAATACAGGATA-A-AA—
AAGCAAAAAGTTAAAAAATTGCAAT

>Contig-1

ATGCATGGATATTTTACTGATTCTGCTGTTATATCCT-TTAT-T----
TATGTCTATTTATTGGATAGTCGGCA-C-ACTGTTATTATGCTCTTT--TA-TT-AT-
GAA--A---T--AA--GA-C-T--A-A--A--A-AA-GGCGCCGAAT-AT-AAC--AATA--TTGG-
GGAGGACGGTATTT-CATTT-TTAATTCAT-GAT-TT-TA-AC-GAA-GCTGATA-C-
GA-TAG-CT-GATACGATTA-AAAGTATTGTAGC-GT-TAGAATTTCCA-AATAA-A--

GA-AA---TCATCGTGATTAATGATGGGAGTTCTGACAACT-CG-GCAGAAATGC-
 TTTATCGACTTCAA-AATACAT-TA-GATTTTATA--TTTGTTG--ATT--TGCCAGAA---
 AA--TA-ATGGAAAAGCAAA-TGCAT-TAAATC-AAGGACT-AAA-ATATGCAAC-
 ATATGATT-ATGTA-ATGGGGAT-TAGATGCGGATAC-GATGATTGAT-A--
 ATGACGGACCGT-ATTT-TATGCTGGAACA-TTTCAAAA-AGAA-TCCAAAACCTCG-
 CTGCAG-TT-A-C--AG-GTAATCCGC-GTATTCGCAATAAACGCGC-A-CTGTT--
 AGGAA--AA-ATACAGGCTATTGA-ATATGCCA-GTATGGT-CGGAAGTATTA--
 AAAGG--GCCCAG-T-CTA-T-TAT-GC-G-GAA-AATCAACACTATT-TCAGGTG-TGTT-
 T-ACATTATTTT-CGTAAAAGCGCAA-TTGAGGCTGTAGG-GCA-TTGGGATATTGA-
 TA-TG-ATT-ACT---GAAGATATCGCAATT--TCGTG---G-AAGTTCCAT-TTAC-ACG---
 GCTAC--C-ACATTAATAACGAGCCACGTGCTCTAT-GT-TGGATGCTT-
 GTCCCCGAA-AC-AGT--
 TTCAGGTTTATGGAAACAACGAATACGGTGGGCACAAGGTGGGCAAGAGGTGCT
 CA-TTCAGCGA-TG--GTTT---AA-AAGGA--ACT--GAAATCG-ATGA-ACCCCGC-T-
 TT-ATATATGCT--TGTAT-T-CGAGC-AAATTTTC-T--CGCA-TC-ATT---TGG-G--
 TGTAT-T-GGA-T-TGTCATTT--C-TTTATT-G--T--TGGCATTTTTG--AAC-TCT-A-
 ATTTTC-TAG-ATATTTATTA-TCTTCAATA-TC---AC-TT--TT-CAA-TCATTA-TA-TTT-
 ATCGGCACTT-ATTTTAACGTTT-ATCAAT-ATTG-TGCA-G-TTTACGGT-
 GTCTTTAATCATCGATTCA--CGTT-ATGAAA-A-ACAAAAT--A---T-GT-T-T--A-
 CACT-ATT---T-TA-TT-TAAGCTGGTACCCCA-C-TATCTATTG---G-GTT-C-T-CAAT--
 GCC-CACTTGT----AGCGATGT-TAGCATTT--C---CGAAA-GC-A-TTGCTC-AGA-
 AAGAAAGGTGAATATGCAACATGGTC-AAG--TCCAG-ACAGA-GG-AA-AT--AA----
 AAGATTGAGGGTAAAAAAGTAAAAAGTTAAAAAATTGCAA

>Contig-2

ATGAGAACCAACGATAAAGTGTTACTTGAAAATATTAACGATTACTTTAGCCACA
 AAGGGATGGCACCTAATTTAATCGATGATATAAAAGAAAATTTGCGCAATGATT
 GAAAAGGTCTGAATCAAAGATGAAGATTATTTAGATTATCGTGGCAAATCTCCA
 GCACAAATTATTTTGATTATTCAACGAAATTTATTCGGTTTACAAACGAATCCTGT
 TATTTTCTTTATTATGAATTTTATCTTAATATCATATCTTTATGATAAGCAATATGT
 GCCATTTCAAGCGGCTACAGCAATTTCTATATTCTATTGTATAATCATTTTTCCAT
 TATCGATTTTTATTAATATTCGTATTGATAAGAAGAAGTTTCTATATAGCAATCGT
 TTTGAAATGATACTAGGATATATCGTTGCGATAATTGCACTAATTTAATCATTAT
 GCGTGCTTTTAATCTAAATTGGGGAATCATTCCCATCACTATTTATAGTCATCAAG
 TCGTTTTTTTTATAGGTATTATACTAAGCTTGATCGGTGTCTTTTTTAAAAAATA
 GAGTACACAGCAATTGGTTTATTATTCTGTCAAAGACGATTGATGCAGTAGTGA
 CAAAACCTGAAATTGCACAAATCATTTCTCTTATTATATGGATCATGATAGTGGC
 ATTGATCGTTTTTTTATACAATTAATTATCATCAAGGACGAGGGTGTA