



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José dos Campos  
Instituto de Ciência e Tecnologia

**FELIPE DE CAMARGO RIBEIRO**

**INFLUÊNCIA DE *Lactobacillus rhamnosus* NA  
PATOGENICIDADE E NA EXPRESSÃO DE GENES DE  
VIRULÊNCIA DE *Candida albicans*: estudo *in vitro* e *in vivo***

2015

**FELIPE DE CAMARGO RIBEIRO**

**INFLUÊNCIA DE *Lactobacillus rhamnosus* NA PATOGENICIDADE E  
NA EXPRESSÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA DE *Candida albicans*:  
estudo *in vitro* e *in vivo***

Dissertação apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia / Imunologia.

Orientador: Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge  
Co-orientador: Profa. Dra. Mariella Vieira Pereira Leão

São José dos Campos

2015

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:  
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para  
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos  
Campos: ICT/UNESP; 2016.

Ribeiro, Felipe de Camargo

Influência de *Lactobacillus rhamnosus* na patogenicidade e na  
expressão de genes de virulência de *Candida albicans*: estudo in  
vitro e in vivo / Felipe de Camargo Ribeiro. - São José dos Campos  
: [s.n.], 2015.  
73 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em  
Biopatologia Bucal - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José  
dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2015.

Orientador: Antonio Olavo Cardoso Jorge

Co-orientador: Mariella Vieira Pereira Leão.

1. *Candida albicans*. 2. *Lactobacillus rhamnosus*. 3. PCR em Tempo  
Real. 4. *Galleria mellonella*. 5. Biofilmes. I. Jorge, Antonio Olavo  
Cardoso, orient. II. Leão, Mariella Vieira Pereira, co-orient. III.  
Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP -  
Univ Estadual Paulista. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio  
de Mesquita Filho'. V. UNESP - Univ Estadual Paulista. VI. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática,  
ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

## AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer  
meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 10 de dezembro de 2015

E-mail: felipe\_c\_ribeiro@hotmail.com

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge (Orientador)**

Instituto de Ciência e Tecnologia  
UNESP- Univ. Estadual Paulista  
Campus de São José dos Campos

**Prof. Adj. Juliana Campos Junqueira**

Instituto de Ciência e Tecnologia  
UNESP- Univ. Estadual Paulista  
Campus de São José dos Campos

**Prof. Dr. Aguinaldo Silva Garcez Segundo**

São Leopoldo Mandic  
Campus de Campinas

**São José dos Campos, 10 de dezembro de 2015**

## **AGRADECIMENTOS**

*Aos meus pais por todo apoio, paciência, carinho, e incentivo no desenvolvimento da presente pesquisa.*

*Ao meu orientador Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge por me proporcionar à oportunidade de realizar esse trabalho e acreditar no meu potencial. Por sua incrível sabedoria, paciência, disponibilidade para esclarecimentos e incentivo durante todo o andamento da pesquisa.*

*A Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira por toda sua sabedoria e brilhantes idéias para a pesquisa.*

*A Profa Dra. Mariella Vieira Pereira Leão que me acolheu e com quem tive o primeiro contato com a pesquisa. Por ser um modelo de pessoa e pesquisadora que carregarei por toda a vida.*

*A Dra. Patrícia Pimentel de Barros, por todo convívio e ajuda no laboratório. Por ser um modelo de profissional que me ensinou sempre perseverar e nunca desistir.*

*A Leileane Cohn, por todo seu companheirismo, conversas, ajuda e seu exemplo de força de vontade.*

*À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus de São José dos Campos, na pessoa do diretor Prof. Tit. Estevão Tomomitsu Kimpara e do vice-diretora Profa Adj. Rebeca Di Nicoló.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira e vice-coordenadora Profa. Dra. Ana Lia Anbinder.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Mestrado (processo 2014/07791-6).*

*Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia, Sérgio Giovanni Alves e Domingos Gonçalves Pontes, por todos os conselhos e ajuda no laboratório.*

*Aos meus colegas da Pós-Graduação, pelo convívio, pois pude aprender um pouco com cada um.*

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

(Charles Chaplin)

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
<b>2.1 <i>Candida albicans</i></b> .....	15
<b>2.2 Biofilmes</b> .....	19
<b>2.3 Probióticos</b> .....	20
<b>2.4 <i>Galleria mellonella</i></b> .....	24
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	28
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
<b>4.1 Cepas de micro-organismos</b> .....	29
4.1.1 Preparo da suspensão padronizada de <i>C. albicans</i> e <i>L. rhamnosus</i> ...	29
4.1.2 Preparo da cultura do sobrenadante de <i>L. rhamnosus</i> .....	30
<b>4.2 Formação do biofilme de <i>C. albicans</i></b> .....	30
4.2.1 Determinação do número de UFC/mL de <i>C. albicans</i> .....	31
4.2.2 Avaliação da atividade metabólica (XTT) .....	32
<b>4.4 Interação de <i>C. albicans</i> com <i>L. rhamnosus</i> em modelo experimental de <i>Galleria mellonella</i></b> .....	34
<b>4.5 Expressão de genes de <i>C. albicans</i> após associação com <i>L. rhamnosus</i></b> .....	37
4.5.1 Avaliação da expressão gênica de <i>C. albicans</i> .....	38
4.5.2 Extração de RNA .....	39
<b>4.6 Avaliação da expressão gênica</b> .....	39
4.6.1 Tratamento do RNA .....	39
4.6.2 Reação de transcrição reversa (RT – PCR) .....	39
4.6.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real .....	40
<b>4.7 Análise estatística</b> .....	41



<b>5 RESULTADOS</b> .....	42
<b>5.1 Biofilme: contagem de UFC/mL</b> .....	42
<b>5.2 Biofilme: ensaio colorimétrico de XTT</b> .....	43
<b>5.3 Filamentação de <i>C. albicans</i></b> .....	44
<b>5.4 Curva de sobrevivência de <i>G. mellonella</i></b> .....	46
<b>5.5 Expressão gênica de <i>C. albicans</i></b> .....	48
5.5.1 Expressão de genes de <i>C. albicans</i> .....	48
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	51
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	61
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	62
<b>ANEXO</b> .....	73

Ribeiro FC. Influência de *Lactobacillus rhamnosus* na patogenicidade e na expressão de genes de virulência de *Candida albicans*: estudo *in vitro* e *in vivo* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2015.

## RESUMO

A alta incidência de candidoses causadas por *Candida albicans* e a capacidade de adaptação desta espécie, assim como resistência aos antifúngicos impulsionam o desenvolvimento de pesquisas com terapias alternativas para controle dessa infecção. O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência de *Lactobacillus rhamnosus* e produtos do seu metabolismo contra *C. albicans*, avaliando-se a patogenicidade e a expressão de genes que regulam a formação do biofilme de *C. albicans*, *in vitro* e *in vivo* em modelo invertebrado de *Galleria mellonella*. Foram utilizadas cepas de *C. albicans* ATCC 18804 e *L. rhamnosus* ATCC 9595 (provenientes do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências e Tecnologia de São José dos Campos / UNESP). Para o estudo foram preparadas duas suspensões de *L. rhamnosus*, uma contendo a porção celular e a outra com o sobrenadante da cultura, livre de células. O estudo da patogenicidade *in vitro* de *C. albicans* foi avaliado pelos testes de formação de biofilme e quantificação de UFC/mL de *C. albicans*, análise da atividade metabólica pelo método do XTT e filamentação de *C. albicans*. A análise da curva de sobrevivência de *Galleria mellonella* foi utilizada para a avaliação *in vivo* da influência de *L. rhamnosus* na infecção causada por *C. albicans*. Os genes, *BCR1*, *EFG1*, *CPH1*, *HWP1*, *ALS1* e *ALS3* de *C. albicans* foram quantificados pela RT-PCR após a interação em modelo de biofilme. No estudo *in vitro* *L. rhamnosus* foi capaz de inibir a formação do biofilme, filamentação e reduzir a atividade metabólica de *C. albicans*. Esses efeitos também foram observados quando utilizado a suspensão do sobrenadante da cultura de *L. rhamnosus*, apontando possível produção de substâncias com efeito inibitório. Os resultados obtidos *in vivo* apontam que *L. rhamnosus* e seu sobrenadante protegeram *G. mellonella* da infecção por *C. albicans*, porém a suspensão do sobrenadante apresentou melhores resultados, visto que aumentou a sobrevivência da lagarta *G. mellonella*. Os resultados da expressão gênica demonstraram que *L. rhamnosus* regulou negativamente os genes *CPH1*, *HWP1* e *ALS3* enquanto o sobrenadante da cultura de *L. rhamnosus* regulou negativamente dos genes *BCR1*, *EFG1*, *CPH1*, *HWP1* e *ALS3*. Concluiu-se que a bactéria probiótica *L. rhamnosus* ATCC 9595 foi capaz de inibir a formação do biofilme de *C. albicans* assim como reduzir sua atividade metabólica e filamentação,

reduzindo também a expressão de importantes genes de virulência de *C. albicans* e por fim foi capaz de proteger o modelo experimental de *G. mellonella* durante a infecção causada por *C. albicans*.

Palavras-chave: *Candida albicans*. *Lactobacillus rhamnosus*. PCR Tempo Real. Probióticos. *Galleria mellonella*. Biofilmes.

Ribeiro FC. Influence of Lactobacillus rhamnosus on pathogenicity and the expression of virulence genes of Candida albicans: a study in vitro and in vivo [dissertation]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2015.

## ABSTRACT

The high incidence of candidiasis caused by Candida albicans and the adaptability of this species, as well as resistance to antifungal drive the development of research on alternative therapies to control this infection. The aim of this study was to evaluate the influence of Lactobacillus rhamnosus and products of their metabolism against C. albicans, evaluating the pathogenicity and the expression of genes that regulate the formation of C. albicans biofilms in vitro and in vivo in invertebrate model Galleria mellonella. Strains of C. albicans ATCC 18804 and L. rhamnosus ATCC 9595 were used (from the Microbiology Laboratory of the Institute of Science and Technology of São José dos Campos / UNESP). For the study were prepared from L. rhamnosus two suspensions, one containing the serving cell and the other with the culture supernatant free cells. The study of in vitro pathogenicity of C. albicans was assessed by biofilm formation testing and quantitation of CFU / ml of C. albicans, analysis of metabolic activity by XTT method and C. albicans filamentation. The analysis of the Galleria mellonella survival curve was used to evaluate in vivo the influence of L. rhamnosus in infection caused by C. albicans. Genes, BCR1, EFG1, CPH1, HWP1, ALS1 and ALS3 of C. albicans were quantified by RT-PCR after interacting in biofilm model. In vitro evaluation L. rhamnosus was able to inhibit biofilm formation, filamentation and reduce the metabolic activity of C. albicans. These effects were also observed when using the suspension culture supernatant of L. rhamnosus, indicating the possible of production substances with inhibiting effect. The results obtained in vivo indicate that L. rhamnosus and its supernatant protected G. mellonella of C. albicans infection, but the suspension of the supernatant showed better results, as it increased the survival caterpillar G. mellonella. The results of gene expression have shown that L. rhamnosus negatively regulated the genes CPH1, HWP1 and ALS3, while the culture supernatant of L. rhamnosus negatively regulated genes BCR1, EFG1, CPH1, HWP1 and ALS3. It was concluded that the probiotic bacteria L. rhamnosus ATCC 9595 was able to inhibit the formation of C. albicans biofilm as well as reducing its metabolic activity and filamentation while also reducing the expression of important virulence genes of C.

*albicans, and finally was able to protect the experimental model of the G. mellonella during infection caused by C. albicans.*

*Keywords: Candida albicans. Lactobacillus rhamnosus. Real Time PCR. Probiotics. Galleria mellonella. Biofilms.*

## 1 INTRODUÇÃO

Infecções causadas por leveduras do gênero *Candida* tem aumentado cada vez mais, sendo *Candida albicans* a espécie prevalente. Nestas infecções *C. albicans* é caracterizada como micro-organismo causador de infecções em hospedeiros que possuem sistema imune debilitado, devido ao seu caráter oportunista. Essa prevalência tem sido relacionada com sua resistência aos antifúngicos e com a capacidade de adaptação a fatores adversos, como o sistema imune, por meio de seus fatores de virulência. Devido a essas características tem ocorrido um aumento no surgimento de cepas resistentes aos antifúngicos, elevando assim as taxas de mortalidade por candidoses (Berberi et al., 2015; Hedayati et al., 2015).

A adaptabilidade de *C. albicans* ao meio ambiente, está na sua capacidade de realizar rápidas alterações na expressão gênica. Seus genes relacionados a fatores de virulência são regulados por uma rede complexa onde um gene pode ser regulado por um ou mais genes, pois quando ocorre à falta ou a supressão deste gene, o fenótipo de *C. albicans* poderá ser afetado de maneira drástica ou mais branda. Os genes pertencentes a essa rede podem assumir parcialmente o papel de outro que foi inibido, gerando um fenótipo defeituoso, porém sem desaparecimento da característica fenotípica (Fox et al., 2015).

Um dos principais fatores de virulência de *C. albicans* é a formação de biofilme, que são estruturas complexas e dinâmicas que proporcionam maior resistência aos antifúngicos para as leveduras, assim como maior escape dos mecanismos do sistema imune. Na natureza o biofilme raramente é composto apenas por uma espécie de micro-organismo, podendo ser formado por várias espécies que vão interagir

entre si. Essas interações podem ser benéficas aos micro-organismos que o compõem, porém em alguns casos podem ser prejudiciais, pois uma espécie pode inibir o crescimento da outra (El-Azizi et al., 2015; Morales et al., 2013).

Dentre essas interações antagonistas podemos destacar a que ocorre entre *C. albicans* e algumas bactérias do gênero *Lactobacillus*, que são amplamente utilizadas em produtos probióticos. Essas bactérias são capazes de trazer benefícios para seu hospedeiro pela ativação do sistema imune promovendo ativação celular via citocinas, produção de bacteriocinas, produção de substâncias tóxicas para outros micro-organismos, alteração do meio através da produção e secreção de moléculas decorrentes do metabolismo como ácido lático e peróxido de hidrogênio, ou até mesmo por inibição mecânica, pela competição pelos receptores de aderência. A interação entre *C. albicans* e bactérias probióticas tem sido foco de estudo na literatura, pois as bactérias probióticas apresentam a capacidade de inibir o crescimento de *C. albicans*, sendo uma característica cepa dependente. Lactobacilos de uma mesma espécie, mas de cepas diferentes, podem apresentar resultados diferentes (Mendonça et al., 2012; Shibasaki et al., 2014; Roy et al., 2015).

*L. rhamnosus* é umas das espécies amplamente empregadas em produtos alimentícios. Trabalhos recentes apontam resultados promissores dessa espécie no tratamento de infecções vaginais, infecções no trato gastrointestinal, antagonismo no crescimento de alguns micro-organismos e sua ótima capacidade de imuno modulação, devido suas propriedades probióticas (Pendharkar et al., 2015; Tomasik et al., 2015).

Estudos *in vivo* são importantes para entendimento de como os micro-organismos probióticos irão interagir entre si e com o hospedeiro. Quando os micro-organismos estão em um hospedeiro, inúmeros fatores podem influenciar no equilíbrio de suas relações. Para

estudos *in vivo* modelos de mamíferos são utilizados para uma melhor representação de um hospedeiro, porém esses modelos implicam em uma série de exigências e normas. Recentemente a utilização de modelos invertebrados tem se mostrado uma ótima alternativa para a substituição do modelo mamífero (Ishijima et al., 2014; Brunke et al., 2015; McMillan et al., 2015; Rossoni et al., 2015).

A utilização de *Galleria mellonella* como modelo invertebrado experimental para o estudo de associações entre micro-organismos apresenta vantagens pelo seu fácil manuseio, sobrevivência a temperatura de 37°C e possibilitar de inoculação de concentrações padronizadas do número de células de micro-organismos, já que estes são inoculados através de injeção. O uso desse modelo tem se mostrado uma boa alternativa para as pesquisas de patogenicidade de micro-organismo (Li et al., 2013; Perdoni et al., 2014).

O presente trabalho deverá contribuir para melhor entendimento sobre os mecanismos da influência de *Lactobacillus rhamnosus* sobre *Candida albicans*, assim como elucidar o comportamento de genes de expressão de fatores de virulência de *C. albicans* que estão relacionados à sua patogenicidade *in vitro* e *in vivo*.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Candida albicans*

As leveduras do gênero *Candida* estão amplamente distribuídas pela natureza, algumas espécies vivem como saprófitas ou parasitas em animais homeotermos e seres humanos. Podem ser encontradas na orofaringe, na boca, nas dobras da pele, na secreção brônquica, na vagina, urina e nas fezes humanas, e são responsáveis por infecções micóticas oportunistas (Jorge, 2012).

O número de infecções causadas por essas leveduras tem aumentado exponencialmente, principalmente pela espécie *Candida albicans*, porém espécies não-*albicans* tem sido frequentemente isoladas em infecções mono ou multi – espécies, dentre elas podemos citar: *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis* e *C. guilliermondii* (Macêdo et al., 2009; Wcislo et al., 2009; Kamikawa et al. 2014).

As infecções causadas por *Candida* podem ser divididas em infecções superficiais de epitélio e mucosas, e as infecções invasivas. A candidose vulvovaginal é uma infecção superficial que acomete o órgão genital feminino, ocasionando desconforto intenso para as portadoras dessa infecção, pois ela pode se desenvolver uma única vez ou apresentar caráter recorrente (Falagas et al. 2006). Outra infecção superficial de grande importância e prevalência é a candidose bucal, causando lesões extensas, principalmente em pacientes hospitalizados

ou portadores de próteses dentárias parciais ou totais (Gemaque et al., 2014).

Infecções fúngicas por *Candida* spp. tem sido foco de vários estudos na literatura, uma vez que sua incidência tem aumentando, principalmente em indivíduos que possuem o sistema imunológico comprometido, como por exemplo, indivíduos que fazem uso de imunossupressores ou que possuam doenças que afetem o sistema imune como as doenças autoimunes ou AIDS (Furlaneto et al., 2011; Junqueira et al., 2011; Romeo et al., 2011). Junqueira et al. (2012) demonstraram em seu estudo que pacientes HIV-positivos podem estar colonizados por uma ou várias espécies de *Candida*, e estas em sua maioria apresentaram resistência aos antifúngicos fluconazol ou anfotericina B, que são comumente utilizados para o tratamento de candidemias.

*C. albicans* representa a espécie mais patogênica do gênero, e este fato está diretamente correlacionado com sua grande adaptabilidade metabólica frente a fatores adversos e a sua patogenicidade. *C. albicans* é um fungo dimórfico apresentando tanto forma leveduriforme quanto micelial composta por pseudo-hifas e hifas verdadeiras. O processo de transição de levedura para hifa chama-se morfogênese. Sua forma leveduriforme tem sido relacionada ao aumento de sua capacidade de disseminação, já a produção de hifas, aumenta sua capacidade invasiva, sua resistência à fagocitose e são consideradas importantes fatores de virulência (Mayer et al., 2013).

Outro fator de virulência relevante de *C. albicans* é a secreção de enzimas hidrolíticas, como as fosfolipases que produzem degradação dos fosfolipídios das células do hospedeiro, proporcionando uma maior invasão da levedura. As proteinases são enzimas que atuam sobre albumina, matriz extracelular e imunoglobulinas do hospedeiro, que ajudam *C. albicans* na obtenção de substrato para seu metabolismo (Silva-Rocha et al., 2015).

As glicoproteínas de adesão celular e as proteínas da parede celular das hifas são consideradas importantes adesinas, moléculas que possuem a função de aderência ao substrato. Estudos realizados com mutantes de *C. albicans* que sofreram deleção de genes que codificam essas proteínas tiveram sua adesão prejudicada, dificultando e reduzindo a formação do biofilme (Dwivedi et al., 2011; Uwamahoro et al., 2012; Alsteens et al., 2013).

Os fatores de virulência citados acima são de grande importância para a formação do biofilme, que é considerado o fator de virulência mais importante de *C. albicans*. A formação de biofilme confere grande resistência aos antimicrobianos e permitem a colonização de superfícies como cateteres, próteses dentárias totais ou removíveis e células de superfície das mucosas. Os biofilmes são caracterizados como complexas comunidades microbianas embebidas em uma matriz extracelular aglutinante, fortemente aderido a uma superfície sólida. Essa conformação proporciona aos micro-organismos que ali se encontram uma proteção adicional contra o sistema imune de seu hospedeiro (Jorge, 2012; Mayer et al. 2013).

A formação do biofilme de *C. albicans* ocorre em três estágios, primeiramente ocorre à fase de adesão das leveduras a superfície do substrato por meio das adesinas. Após esse processo de adesão irá ocorrer a maturação do biofilme, que consiste na proliferação celular das leveduras, acentuada produção de hifas e intensa produção de matriz extracelular, gerando um biofilme denso e de conformação tridimensional. A última fase consiste na dispersão celular, onde as células leveduriformes se desprendem do biofilme para possível colonização de outros sítios (Blankenship, Mitchell 2006; Chen, Lan 2015).

O biofilme proporciona adaptabilidade de *C. albicans*, e esta é determinada por rápidas alterações em sua expressão gênica frente a estímulos ambientais, respostas do sistema imunológico do

hospedeiro ou até mesmo baixa disponibilidade de nutrientes. Essas alterações podem ser monitoradas por detecção molecular como *microarrays* ou PCR em Tempo Real (Wilson et al., 2009). Vários trabalhos identificaram, utilizando-se destas técnicas, inúmeros genes associados à formação dos biofilmes *in vitro* e *in vivo*. Na fase precoce de formação do biofilme, que varia de 30 min até 6 h, detectou-se a presença de genes como *EFG1/CPH1* que são fatores transcricionais (Lewis et al. 2002; Ramage et al. 2002), genes relacionados a resistência antifúngicos: *CDR1/CDR2/MDR1* (Mukherjee et al. 2003; Mateus et al. 2004), e *MAP* kinase (*Mkc1*) responsável pelo desenvolvimento do biofilme e invasão das hifas (Kumamoto, 2005). Na fase intermediária, de 6 até 24 h, os genes mais expressos estavam envolvidos na formação de pseudo-hifas e hifas, como: *BCR1* (Nobile, Mitchell, 2005; Nobile et al., 2006), *Ywp1/Pga24* (Granger et al., 2005), *HWP1* (Garcia-Sanchez et al., 2004), *ALS* (família de genes que codificam aglutinina) (Nobile et al., 2006) e alguns genes de expressão de enzimas como a *SAP*, *LIB* e *PL* (Naglik et al., 2003). Na fase tardia, de 24 até 48 h ou mais, todos os genes acima são expressos, porém em menores quantidades

No trabalho realizado por Fox e Nobile (2012) com mutantes de *C. albicans* que sofreram deleções em regiões específicas de seu gene demonstraram uma importante rede de regulação de genes formadores de biofilme, que vão regular desde produção de proteínas de parede celular até mesmo os próprios genes que compõem essa rede. Essas deleções acarretaram na formação deficiente do biofilme.

## 2.2 Biofilmes

Biofilme é caracterizado por uma população microbiana aderida a uma superfície sólida embebida por uma matriz extracelular polissacarídica (Costerton et al., 1995).

Na natureza, devida a grande quantidade e diversidade de espécies de micro-organismos que coexistem em um mesmo hábitat, o biofilme raramente é composto por uma única espécie de micro-organismo. No processo evolutivo microbiano as interações entre as espécies foram ocorrendo de diferentes formas. Algumas espécies desenvolveram relações mutualística ou sinérgica o que favorece e facilita a convivência em superfícies de células epiteliais resultando na expressão de diversos fenótipos de virulência, imunomodulação, ou combinação de ambos. Esse processo em biofilmes mistos leva a proteção das espécies contra ação da resposta imune ou ações antimicrobianas. Essa interação entre os micro-organismos ocorrem pelo contato célula a célula ou por meio da produção de substâncias no *quorum sensing*, gerando um cooperativismo metabólico. Por outro lado, outras espécies desenvolveram relações antagônicas ou competitivas. Interações antagônicas entre fungos e bactérias têm sido associadas à liberação de toxinas no ambiente, a secreção de moléculas antimicrobianas ou pela escassez de nutrientes (Peleg et al. 2010; Peters et al. 2012).

Koo e Bowen (2014) demonstraram relação de sinergismo entre *C. albicans* e *Streptococcus mutans* na cárie precoce na infância, e relataram que esta interação ocorre de maneira complexa e extremamente organizada. Quando *C. albicans* está presente no biofilme dentário, os glucanos presente em sua parede celular auxiliam na adesão de *S. mutans*. Uma vez aderidas, na presença de sacarose *S. mutans* inicia intensa produção de polissacarídeos extracelulares insolúveis, o que proporciona *C. albicans* a capacidade de se aderir na superfície da

hidroxiapatita. Com a crescente densidade populacional do biofilme e produção da matriz extracelular ocorre um aumento da proteção de ações do ambiente externo contra o biofilme, principalmente camadas mais internas, como por exemplo, a ação da saliva que é um importante fator para o balanceamento da desmineralização dos dentes causado por *S. mutans*.

Moléculas produzidas por micro-organismos quando em biofilme, tem grande importância nas interações entre os mesmos. Rossi et al. (2014) descreveram inibição de *C. albicans* causada pelo micro-organismo *Stenotrophomonas maltophilia*. Este bacilo Gram-negativo foi capaz de inibir a filamentação e a formação do biofilme de *C. albicans* através da produção de um fator de difusão via moléculas do *quorum sensing*. Essa molécula é homóloga ao ácido fanerosóico, que tem a capacidade de inibir a filamentação de *C. albicans*. Bhattacharyya et al. (2014) estudaram a interferência de *Staphylococcus epidermidis* sobre *C. albicans*, e relataram a ocorrência de inibição na formação do biofilme e na produção de lipase.

Diversas interações inibitórias entre micro-organismos podem ser encontradas na literatura. Dentro das relações antagônicas pode-se salientar as que ocorrem entre *C. albicans* com bactérias probióticas, que por meio da produção de metabólitos antimicrobianos, alteração do meio ou por competição direta por sítios de adesão influenciam negativamente o crescimento de *C. albicans* (Vestman et al., 2013; Al Kassaa et al., 2014).

### **2.3 Probióticos**

Probióticos são preparações ou produtos que contenham micro-organismos viáveis que em concentrações adequadas

proporcionam benefícios para seu hospedeiro. Para um micro-organismo ser considerado probiótico deverá vencer intacto a barreira gástrica e ser residente da microbiota humana, pois só assim ele irá colonizar o intestino e proporcionar seus benefícios (Sanders, 2008).

Os principais micro-organismos probióticos são bactérias Gram-positivas que possuem parede celular espessa, composta por várias camadas de peptídeoglicano, onde estão inseridas moléculas como lipoproteínas, polissacarídeos, glicolipídeos e ácidos teicóicos. Essas estruturas são importantes sinalizadores que são reconhecidos por receptores específicos e irão desenvolver uma série de respostas no hospedeiro. Mokrozub et al. (2015) demonstraram que a parede celular de bactérias probióticas são mais elásticas e são mais facilmente digeridas pelos macrófagos e os ativam mais rapidamente na produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio. Entretanto quando a parede celular da bactéria for mais rígida a digestão feita pelos macrófagos é mais lenta e a sua ativação ocorre pela produção de citocinas. Essa diferença na ativação dos macrófagos é gerada pela diferença na interação das moléculas pertencentes na parede celular do micro-organismo.

Dentre os gêneros que se destacam no grupo de micro-organismos probióticos temos *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Esses micro-organismos regulam as populações de patógenos pela produção de antimicrobianos, estimulando e modulando o sistema imune e proporcionando um aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas (Chiang et al., 2015). Estimulam a imunidade do hospedeiro, aumentando os níveis de anticorpos (principalmente IgA) e de citocinas, aumentam a atividade das células “natural killer”, dos macrófagos e dos linfócitos B, sem o desenvolvimento de uma resposta inflamatória prejudicial ao hospedeiro (Kopp-Hoolihan, 2001). Esses micro-organismos competem diretamente com os patógenos pela adesão aos receptores das células epiteliais, dificultando ou até mesmo impedindo que micro-

organismos patogênicos consigam aderir a uma célula hospedeira e iniciar infecção (Coudeyras et al., 2008).

*Lactobacillus* são amplamente utilizadas em alimentos e suplementos probióticos. Sua ótima ação antagonista frente a infecções microbianas está relacionada à sua produção de peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos produzidos em seu metabolismo e na sua ação imunomoduladora, que consiste na regulação da resposta inflamatória e na estimulação das células do sistema imune na produção de citocinas como: IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-18 e INF alfa. As espécies de lactobacilos mais utilizadas são: *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* Shirota e *Lactobacillus gasserii* (Elahi et al., 2005; Tomáz et. al., 2011; Cortés-Zavaleta et. al., 2014).

Várias espécies de lactobacilos têm sido estudadas acerca de suas propriedades inibitórias frente *C. albicans* como, por exemplo: *L. crispatus*, *L. brevis*, *L. rhamnosus* e *L. plantarum*. Essas bactérias lácticas apresentam diferentes mecanismos de inibição, podendo atuar com apenas um mecanismo de inibição ou com vários ao mesmo tempo. Quando *in vivo* essas interações podem ser ainda mais complexas, pois essas bactérias irão sofrer múltiplas interações com os micro-organismos ali presentes e as células de seu hospedeiro, podendo apresentar resultados diferentes dos obtidos *in vitro* (Francavilla et al., 2012; Georgieva et al., 2015). Em seu estudo, Drago et al. (2010), avaliando quatro cepas diferentes de *L. salivarius* determinaram que esses efeitos probióticos são estritamente cepa dependentes e podem ser alterados dependendo do meio, demonstrando assim a importância de estudos *in vitro* e *in vivo* dos efeitos probióticos dos lactobacilos.

Bermudez-Brito et al. (2014), demonstraram a capacidade imunomoduladora de *L. rhamnosus* vivos e seu sobrenadante livre de células, através da estimulação ou inibição de citocinas pró-inflamatórias na presença e ausência de *Escherichia coli* em células dendríticas



humanas. Pithva et al. (2014) avaliaram as propriedades antimicrobianas de várias cepas de *L. rhamnosus* utilizando diversas espécies de micro-organismos, dentre eles bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e alguns fungos. Os resultados obtidos a partir desse estudo apontam atividades antibacteriana e antifúngica de todas as cepas de *L. rhamnosus*. Do mesmo modo, foi demonstrada alta viabilidade celular das cepas probióticas após exposição à lisozima, bile, fenol e pH ácido, simulando assim seu trânsito através da cavidade oral e trato gastrointestinal.

Wagner e Johnson (2012) avaliaram o potencial imunomodulador de *L. rhamnosus* GR-1<sup>®</sup> e *L. reuteri* RC-14<sup>®</sup> em células epiteliais vaginais após serem desafiados por *C. albicans*. As duas espécies foram capazes de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e ainda aumentaram o recrutamento de células efectoras, melhorando a resposta imune e controlando os efeitos nocivos da inflamação exagerada.

Köhler et al. (2012), estudaram o potencial inibitório das mesmas espécies de lactobacilos, *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14, contra *C. albicans*. Ambas as espécies apresentaram forte inibição contra *C. albicans*, tanto na cultura dos micro-organismos juntos ou quando utilizado a suspensão livre de células de lactobacilos. Porém, quando o pH das interações foi neutralizado a inibição de *C. albicans* foi reduzida significativamente, demonstrando que o principal fator inibitório foi a produção de ácidos orgânicos pelos lactobacilos. A secreção de ácidos orgânicos é uma das principais vias de inibição, porém não a única.

Parolin et al. (2015) avaliaram várias cepas de três espécies de lactobacilos, *L. crispatus*, *L. gasseri* e *L. vaginalis*, isolados da cavidade vaginal, na inibição de *C. albicans* pela produção de peróxido de hidrogênio e da adesão, entretanto cada cepa apresentou resultados diferentes, sendo que algumas cepas não inibiram o crescimento de *C. albicans*.

Hasslöf et al. (2010), avaliaram o potencial inibitório de bactérias probióticas isoladas de produtos utilizados na dieta contra 5 isolados de *C. albicans* sendo 2 deles cepas de referências e 3 isolados clínicos. Todas as espécies apresentaram características inibitórias, porém com grande variação entre elas. Não houve diferença entre os isolados clínicos quando comparada com cepas padrões de *C. albicans*.

Com o aumento da resistência dos micro-organismos aos agentes antimicrobianos, as bactérias probióticas podem ser uma alternativa no tratamento das infecções, por meio da inibição ativa dos micro-organismos ou estimulação do sistema imune. Os micro-organismos probióticos podem ser utilizados concomitantemente com agentes antimicrobianos para a potencialização do efeito de ambas as terapias. Entretanto são necessários estudos *in vivo*, pois quando todos esses fatores estão associados a um organismo vivo, inúmeras interações podem ocorrer, não somente para os micro-organismos que estão envolvidos na infecção, mas também para seu hospedeiro e sua microbiota residente (Aminnezhad et al., 2015).

## **2.4 *Galleria mellonella***

*Galleria mellonella*, inseto popularmente conhecido como lagarta do bicho da cera, tem sido amplamente utilizado em estudos das respostas dos hospedeiros frente à infecção por patógenos, como modelo alternativo aos mamíferos. A patogenicidade de vários micro-organismos já foram estudados em modelos invertebrados de, *G. mellonella*, *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster* (Desbois et al, 2011; Abranches et al., 2011; Olsen et al., 2011, Junqueira et al., 2011; Chibebe et al., 2013).

O uso de insetos como modelo de hospedeiro invertebrado para o estudo da patogenicidade microbiana apresenta certas vantagens quando comparado ao modelo vertebrado: a) não existem implicações ou restrições legais e éticas em sua utilização; b) não precisa ser anestesiado; c) pode ser utilizado em larga escala, gerando grande número de amostras por grupo; d) não exigem cuidados especiais com alimentação e alojamento; e) são relativamente de baixo custo (Fuchs et al., 2010; Desbois, Cote, 2011).

*G. mellonella* apresenta outra característica de relevância para o estudo de patogenicidade. Seu sistema imune inato apresenta função e estrutura similar a dos mamíferos, com componentes celulares e humorais. Sua resposta celular é composta principalmente por seis tipos diferentes de hemócitos, que vão fazer desde o reconhecimento dos patógenos através de receptores específicos até sua eliminação através de liberação de enzimas líticas e espécies reativas de oxigênio. No sistema imune de *G. mellonella* também foram relatados a secreção de peptídeos antimicrobianos e proteínas homólogas as humanas (Arvanitis et. al., 2013; Jacobsen, 2014).

*G. mellonella* quando comparada a outros modelos invertebrados, *D. melanogaster* ou *C. elegans*, apresenta tamanho maior, sendo de fácil manipulação para sua criação e utilização na pesquisa, o que permite a inoculação de um número padronizado de micro-organismos, pois estes são injetados através de seringa. Outra característica interessante dessa lagarta é a temperatura de desenvolvimento que se assemelha à temperatura corpórea dos humanos, 37°C, o que a torna um excelente modelo para o estudo de patogenicidade de micro-organismo que se desenvolvem nessa temperatura. Apesar de todas essas vantagens, seu genoma ainda não foi totalmente sequenciado, impedindo a criação de mutantes com características específicas para o estudo da resposta imune (Desbois, McMillan, 2015).

*G. mellonella* vem sendo utilizado também para estudar os fatores de virulência de micro-organismos de mesma espécie, porém de cepas diferentes. Wand et al. (2015) estudaram a patogenicidade de vários isolados de *Klebsiella pneumoniae* em *G. mellonella*, e demonstraram que *G. mellonella* respondia de maneiras distintas aos isolados, revelando maior ou menor patogenicidade das cepas avaliadas. Ciesielczuk et al. (2015), avaliaram as diferenças na patogenicidade de isolados de *Escherichia coli* na lagarta de *G. mellonella* e também revelaram diferentes respostas dependendo da cepa inoculada.

Amorim-Vaz et al. (2015) identificaram fatores transcricionais de virulência de *C. albicans* em *G. mellonella* e em camundongos. Em seu trabalho os autores comparam os dois modelos na infecção causada por mutantes de *C. albicans* para estimar o quanto *G. mellonella* apresenta de semelhança com o modelo mamífero. O modelo invertebrado apresentou semelhança ao modelo mamífero, podendo ser usado como triagem para os estudos de virulência de *C. albicans*.

A lagarta de *G. mellonella* também é utilizada na avaliação de novas substâncias antimicrobianas. Rajendran et al. (2015), utilizaram *G. mellonella* como modelo para o esclarecimento da interferência da acetilcolina na infecção causada por *C. albicans*, pois o seu papel ainda não encontra-se bem esclarecido. Os resultados obtidos no trabalho demonstraram a capacidade de inibição da formação do biofilme de *C. albicans* pela acetilcolina e a sua capacidade de melhorar a função do sistema imune através da ativação dos hemócitos de *G. mellonella*.

*G. mellonella* ganhou grande atenção após da descoberta de sua utilização na patogenicidade de micro-organismos, e o presente trabalho poderá proporcionar uma melhor compreensão da patogenicidade e dos genes relacionados aos fatores de virulência de *C. albicans* após interação com *L. rhamnosus*, em modelo *in vitro* e *in vivo*,

podendo futuramente propor terapias alternativas no tratamento das infecções fúngicas causadas por *C. albicans*.

### 3 PROPOSIÇÃO

#### 3.1 Objetivo geral:

Avaliar *in vitro* e *in vivo* a influência de *L. rhamnosus* na patogenicidade e expressão de genes de fatores de virulência de *C. albicans* após interação em biofilme.

#### 3.2 Objetivos específicos:

- a) avaliar a influência da suspensão de células de *L. rhamnosus* e suspensão de seu sobrenadante frente *C. albicans* em biofilme, avaliando-se a contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml) e avaliação da atividade celular pelo ensaio colorimétrico XTT;
- b) avaliar a patogenicidade de *C. albicans* após interação com a suspensão de células de *L. rhamnosus* e suspensão de seu sobrenadante no modelo experimental invertebrado *Galleria mellonella*;
- c) avaliar expressão dos genes de fatores de virulência (*BCR1*, *EFG1*, *CPH1*, *HWP1*, *ALS1* e *ALS3*) de *C. albicans* após interação com suspensão de células de *L. rhamnosus* e suspensão de seu sobrenadante.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Cepas de micro-organismos

Foram utilizadas cepas padrão de *Candida albicans* (ATCC 18804) e *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 9595) mantidas em freezer -70°C no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São Jose dos Campos/ UNESP.

Para ativação desses micro-organismos, a cepa de *C. albicans* foi cultivada em meio de cultura agar Sabouraud Dextrose (Himedia Laboratories, Mumbai, India) por 48 h a 37°C em estufa bacteriológica e a cepa de *L. rhamnosus* foi cultivada em agar Lactobacilli MRS (Himedia, Mumbai, India) por 4 dias a 37°C sob condições de microaerofilia (5% de CO<sub>2</sub>).

#### 4.1.1 Preparo da suspensão padronizada de *C. albicans* e *L. rhamnosus*

*C. albicans* foi cultivada a 37°C por 18 h em caldo *Yeast Nitrogen Base* (YNB- Difco, Detroit, USA) suplementado com glicose na concentração de 100 mM. *L. rhamnosus* foi cultivado em caldo Lactobacilli MRS a 37°C por 24 h em estufa bacteriológica sob condição de microaerofilia (5% de CO<sub>2</sub>). Posteriormente, as células microbianas foram centrifugadas (2000 Xg por 10 min), o sobrenadante foi desprezado e o

sedimento suspenso em 6 mL de solução fisiológica tamponada com fosfato (PBS). Esse procedimento foi repetido mais uma vez. A contagem do número de células da suspensão foi realizado em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) obtendo-se suspensão com concentração de  $10^7$  micro-organismos/mL. Os parâmetros de densidade óptica e comprimento de onda utilizados foram 0,381 e 530 nm para *C. albicans*, 0,400 e 540 nm para *L. rhamnosus*.

#### 4.1.2 Preparo da cultura do sobrenadante de *L. rhamnosus*

Para o preparo do sobrenadante de *L. rhamnosus*, a cepa foi semeada em caldo MRS e incubada a 37°C por 24 h sob condição de microaerofilia (5% de CO<sub>2</sub>). Após este período foi realizado a suspensão padronizada de  $10^7$  células por mL conforme descrito anteriormente. Um volume de 1 mL da suspensão padronizada foi transferido para um tubo falcon contendo 6 mL de caldo MRS e foi incubada a 37°C por 24 h. Após este período, o caldo foi centrifugado (2000 Xg por 10 min) e filtrado em membrana com poros de diâmetro de 0,22 µm (MFS, Dublin, EUA).

#### 4.2 Formação do biofilme de *C. albicans*

Os biofilmes foram formados no fundo da placa de microtitulação de 96 poços (Costar Corning, Nova York, EUA). Para isso, inicialmente foram inoculados 100 µL da suspensão padronizada de células de *C. albicans* ( $10^7$  células/mL) em caldo *Yeast Nitrogen Base*. A placa foi incubada em agitação a uma rotação de 75 rpm (Quimis,



Diadema, São Paulo) a 37°C por 90 min para promover adesão inicial de *C. albicans*. A seguir, a suspensão de células foi aspirada e cada poço foi lavado duas vezes com solução fisiológica estéril para remover células não aderidas.

Em cada poço da placa de 96 poços, foram inoculados 50 µL da suspensão padronizada de *L. rhamnosus* ou 50 µL do sobrenadante respectivamente. No grupo controle foi utilizado 50 µL de PBS.

Para a promoção do crescimento do biofilme, 70 µL de YNB acrescido de 100 mM de glicose e 30 µL de caldo BHI foram adicionados a cada poço. O caldo foi trocado transcorrido 24 h.

#### 4.2.1 Determinação do número de UFC/mL de *C. albicans*

Após 48 h, cada poço contendo biofilme foi lavado duas vezes com PBS. Em seguida, 100 µL de PBS foram transferidos para cada poço, os quais foram homogeneizados por 30 s, utilizando homogeneizador multicanal ultra-sônico (Vibra Cell VCX 130, Sonics) com potência de 50 W para romper os agregados microbianos. A partir da solução obtida foram realizadas diluições decimais da suspensão do biofilme, as quais foram semeadas em placas contendo agar Sabouraud Dextrose. As placas foram incubadas a 37°C por 48 h. Após incubação, as colônias foram contadas para o cálculo de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL).

#### 4.2.2 Avaliação da atividade metabólica (XTT)

O ensaio colorimétrico com XTT foi realizado de acordo com o seguinte protocolo: XTT (sodium 2,3,-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-tetrazolium)(Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, EUA) foi dissolvido em PBS (tampão fosfato 0,1M e pH 7,2) na concentração final de 1 mg/mL. A solução foi esterilizada por filtração em membrana com poros de diâmetro de 0,22 µm (Millipore, São Paulo, Brasil) e estocada a -70°C. Solução de menadiona (0,4 mM) (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, EUA) foi preparada e filtrada imediatamente antes dos ensaios. A solução de XTT foi descongelada e misturada à solução de menadiona na proporção de 20:1, quando da realização do experimento.

Em placas de 96 poços foram formados os biofilmes de acordo com o modelo descrito no item 4.2. Os biofilmes foram lavados duas vezes e em seguida Foram adicionados 197,5 µL de PBS, 50 µL da solução pura XTT e 2,5 µL de menadiona em cada poço da placa. Após o período de incubação no escuro a 37°C/3 h, 100 µL da solução foi transferida para um novo poço, e a mudança colorimétrica foi medida usando leitor de microplaca (Thermo Plate, TP Reader NM) a 492 nm. O resultado da leitura foi expresso em valor de absorbância (Abs) final, obtida através da seguinte equação: Abs final= Abs obtida – Abs controle negativo.

#### **4.3 Estudo dos efeitos de *L. rhamnosus* sobre a filamentação de *C. albicans*.**

Para o estudo da filamentação *in vitro* foram realizados ensaios com os seguintes grupos experimentais: interação *C. albicans* e célula de *L. rhamnosus*, interação *C. albicans* e sobrenadante de *L.*

*rhamnosus*, controle *C. albicans* e PBS e controle *C. albicans* e caldo MRS.

Para a realização do experimento, após o crescimento em caldo, as cepas de *L. rhamnosus* e *C. albicans* foram centrifugadas para o preparo de suspensões padronizadas de  $10^7$  células por mL conforme descrito no item 4.1.1. Foi preparado também o sobrenadante da cultura de *L. rhamnosus* de acordo com o item 4.1.2.

Em uma placa de cultura de células de 24 poços (Costar Corning, Nova York, EUA) foi colocado 1 mL de água destilada suplementada com 10% de soro fetal bovino e 100  $\mu$ L da suspensão padronizada de *C. albicans*

A seguir, em cada poço foi colocado 50  $\mu$ L da suspensão padronizada de *L. rhamnosus* ou 50  $\mu$ L do sobrenadante da cultura de *L. rhamnosus*. Nos grupos controle, foi colocado em cada poço 50  $\mu$ L de PBS ou 50  $\mu$ L de caldo MRS.

As placas foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica. Após 24 h, 50  $\mu$ L do inóculo contido em cada poço da placa foi disperso sobre lâmina de vidro com campos de 1 cm de largura previamente demarcados no verso da lâmina (Figura 1).

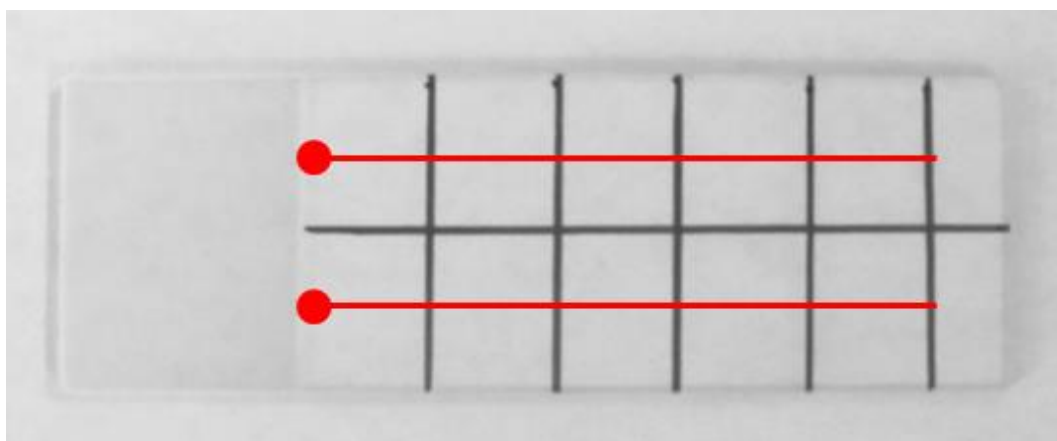


Figura 1 - Visualização da lâmina utilizada para a análise da filamentação de *C. albicans in vitro* com a demarcação dos campos para a contagem do número de hifas presentes. A linha vermelha corresponde aonde foi feito o arraste para a leitura dos campos.

O material sobre a lâmina foi recoberto por lamínula e as lâminas de microscopia observadas em microscópio ótico com aumento de 400x, sendo que foi padronizado ponto médio do primeiro campo e foi realizada leitura em arraste da esquerda para a direita em todos os campos. Foram realizados 10 ensaios para cada grupo experimental. Os ensaios foram repetidos mais uma vez em momentos distintos.

As imagens foram analisadas sob o aspecto morfológico e quantitativo. Para quantificação das hifas presentes, foram analisados 10 campos microscópios em cada lâmina. Em cada campo microscópio foi atribuído um escore, de acordo com o número de hifas presentes (Quadro 1).

Quadro 1 - Escores utilizados para a contagem de número de hifas presentes em cada campo observado através da microscopia óptica.

<b>Escore</b>	<b>Quantidade de hifas</b>
0	ausência
1	1 a 10
2	11 a 20
3	21 a 30
4	31 a 40
5	mais de 41

#### **4.4 Interação de *C. albicans* com *L. rhamnosus* em modelo experimental de *Galleria mellonella***

Foram utilizadas *G. mellonella* em estágio final da fase larval, as quais foram criadas no Laboratório de Microbiologia e

Imunologia do Curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia do Campus de São José dos Campos/UNESP.

Para a inoculação dos micro-organismos nas lagartas de *G. mellonella* foi utilizado a metodologia descrita por Vilela et al. (2015) com algumas modificações. A suspensão de *C. albicans* foi preparado a partir de cultura 18 h em 6 mL de caldo YNB (1% de extrato de levedura, 1% de dextrose e 2% de peptona) a 37°C por 18 h. A seguir, as células foram centrifugadas a 2000 Xg por 10 min, sendo o sobrenadante descartado. O depósito foi ressuspendido em PBS e misturado em agitador de tubos (vortex) por 30 s. A lavagem das células foi repetida por mais 2 vezes. Para a determinação da dose letal de *C. albicans* em *G. mellonella*, foi realizada a inoculação de suspensões padronizadas nas concentrações de  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  e  $10^4$  micro-organismos/mL e avaliação da susceptibilidade da infecção em *G. mellonella* por *L. rhamnosus* foi realizado da mesma maneira, utilizando as concentrações de  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  e  $10^4$  micro-organismos/mL.

A quantidade de células de *C. albicans* foi ajustada em  $10^8$  células/mL por meio de hemocítômetro. A suspensão de *L. rhamnosus* foi padronizado na concentração de  $10^8$  células/mL com o auxílio do espectrofotômetro. O sobrenadante da cultura de *L. rhamnosus* foi realizado conforme o item 4.1.2. Após as interações, foi realizado a análise da curva de sobrevivência da *G. mellonella* conforme descrito a seguir.



Figura 2 - Imagem do último estágio larval do modelo experimental *G. mellonella*.

Inóculo de 10  $\mu$ L da suspensão padronizada de *C. albicans* foi injetado na hemolinfa de cada lagarta através da última prolegue esquerda e 10  $\mu$ L da suspensão padronizada de células ou do sobrenadante da cultura de *L. rhamnosus*, na última prolegue direita utilizando seringa de precisão (Hamilton Inc., EUA) (Figura 03). Em todo o experimento foi realizado dois grupos controles, um inoculando apenas PBS para avaliar a qualidade da inoculação, e outro sem a inoculação para o acompanhamento do estado de saúde de *G. mellonella*. Após a inoculação, as lagartas foram armazenadas em placa de Petri e incubadas a 37°C em estufa e o número de *G. mellonella* mortas foi anotado diariamente durante 7 dias. As lagartas foram consideradas mortas quando não apresentaram nenhum movimento ao toque. A morte de todas as lagartas do grupo experimental ou a transição para a forma de pupa determinará o término do experimento. A seguir, foi realizada a curva de sobrevivência e estimativa das diferenças pelo método de Log-rank (Mantel-Cox) utilizando o Programa *Graph Pad Prism*.

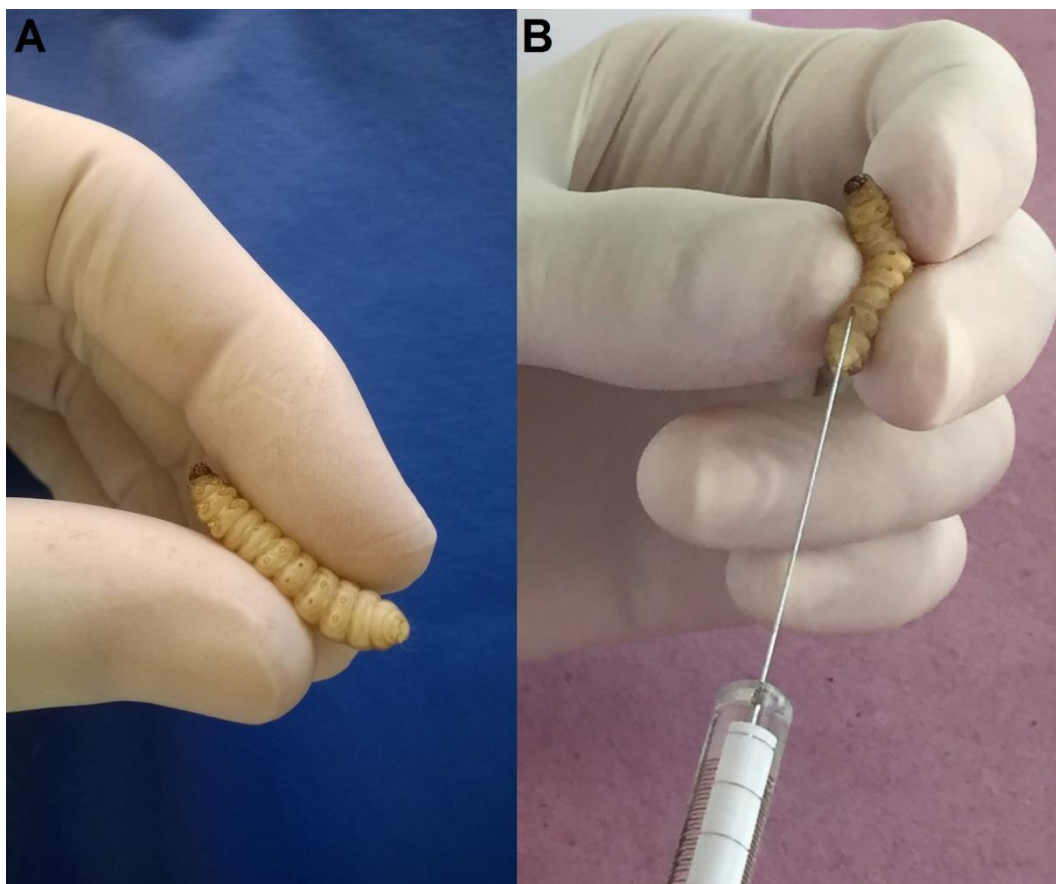


Figura 3 - Imagem do modelo experimental *G. mellonella*: A) detalhamento das prolegues de *G. mellonella*; B) demonstração da injeção de micro-organismo com auxilio da seringa de Hamilton.

#### **4.5 Expressão de genes de *C. albicans* após associa o com *L. rhamnosus***

Para a forma o dos biofilmes heterot picos foi utilizado a metodologia descrita no item 4.2. Os biofilmes foram preparados com as associa es microbianas de *C. albicans* ATCC 18804 com as diferentes suspensões de *L. rhamnosus* ATCC 9595. Para controle positivo do experimento foi obtido biofilme monotípico de *C. albicans* ATCC 18804 no intervalo de tempo de 48 h.

#### 4.5.1 Avaliação da expressão gênica de *C. albicans*

As amostras de biofilme heterotípicos descritas acima foram submetidas à avaliação da expressão dos genes *EFG1*, *BCR1*, *CPH1*, *HWP1*, *ALS1* e *ALS3*, em relação à concentração dos genes endógenos *PMA*, *RIP1*, *RPP2B* e *LSC2*, também denominados de genes normalizadores.

Quadro 2 - Genes de *C. albicans* cuja expressão foi avaliada após interações de *C. albicans* com as suspensões de *L. rhamnosus* contendo células vivas ou seu sobrenadante após formação de biofilme de 48 h

GENE	LOCALIZAÇÃO	FUNÇÃO	REFERÊNCIA
<i>PMA1*</i>	orf 19.5383	ATPase da membrana plasmática	Nailis et al. (2006)
<i>RIP1*</i>	orf 19.5893	Enzima, ubiquinol-citocromo c redutase.	Nailis et al. (2006)
<i>LSC2*</i>	orf 19.8329	$\beta$ - Subunidade da Succinil CoA sintetase.	Nailis et al. (2006)
<i>RPP2B*</i>	orf 19.5928	Constituinte estrutural do ribossomo.	Nailis et al. (2006)
<i>EFG1</i>	orf 19.610	Principal regulador transcricional envolvido na morfogênese.	Hnisz et al. (2012)
<i>BCR1</i>	orf 19.723	Regula a formação de biofilme e parede celular	Hnisz et al. (2012)
<i>HWP1</i>	orf 19.1321	Proteína de parede celular das hifas.	Hnisz et al. (2012)
<i>CPH1</i>	orf 19.4433	Fator transcricional da filamentação.	Nailis et al. (2010)
<i>ALS1</i>	orf 19.5741	Adesina-aderência à célula hospedeira.	Nailis et al. (2010)
<i>ALS3</i>	orf 19.9891	Adesina- aderência à célula hospedeira.	Nailis et al. (2010)

\* Genes normalizadores



#### 4.5.2 Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada utilizando-se o Kit Trizol (Ambion, Inc, AM1926), conforme protocolo recomendado pelo fabricante. Este reagente é composto por uma solução monofásica contendo fenol, isotiocianato de guanidina e outros componentes que permitirão o isolamento de RNA. Após extração, a concentração de RNA foi quantificada pelo aparelho Nanodrop 2000c UV- Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific), e os produtos obtidos armazenados em freezer a -70°C.

### 4.6 Avaliação da expressão gênica

#### 4.6.1 Tratamento do RNA

O RNA total extraído foi tratado com DNase I, (Amplification Grade, Cat. nº. 18068-015, INVITROGEN), conforme recomendações do fabricante, para que o DNA contaminante seja removido.

#### 4.6.2 Reação de transcrição reversa (RT – PCR)

O RNA total após o tratamento com DNase foi transcrito para cDNA utilizando o Kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis Super

Mix for qRT-PCR (Cat. nº. 11752-050, INVITROGEN), onde 1 a 2 µg de RNA foi adicionado a um microtubo de 200 µL contendo 10 µL de mix RT (2X), 2 µL de enzima mix e água ultra pura Depec obtendo-se volume final de 20 µL. Esta mistura foi incubada em termociclador (Mastercycler-Eppendorf) com ciclo de: 20 min à 25°C, 50°C por 30 min e 85°C por 5 min. Transcorrido esse ciclo, os tubos foram colocados no gelo e foi adicionado 1 µL de RNase H e incubados por mais 30 min à 37°C. O cDNA obtido foi armazenado à -20°C.

#### 4.6.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

Os produtos da RT-PCR foram amplificados para a quantificação relativa da expressão dos genes citados acima. As reações de quantificação foram realizadas de acordo com as condições e parâmetros previamente descritos para cada um dos genes alvo. A expressão genética é apresentada como o *ratio* da concentração dos genes alvo, em relação à concentração do gene normalizador (*PMA*, *RIP1*, *RPP2B* ou *LSC2*) e representam a expressão média obtida de reações distintas de PCR em Tempo Real. Neste trabalho foram testados quatro genes normalizadores, sendo que, o gene normalizador escolhido apresentou Ct (*cycle threshold* - ou limiar) similar aos genes alvos analisados. O Ct é o ponto correspondente ao número de ciclos a partir do qual amplificação atinge um dado limiar que permite a análise quantitativa da expressão do gene alvo avaliado. As médias dos valores de Ct, medidas em triplicata, foram utilizadas para calcular a expressão dos genes alvo com normalização a um controle interno. Os resultados foram obtidos como valores relativos da expressão gênica (com base na

fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) em comparação a um alvo-interno de referência, previamente selecionado, e que resultou em valor 1.

O método qRT-PCR avaliou a quantidade do produto cDNA na fase exponencial da reação de amplificação. Para o sistema de detecção, foi utilizado o fluoróforo SYBR® Green (Kit Platinum® SYBR® Green qPCR Super Mix-UDG - Invitrogen) que consistiu na seguinte reação: em um microtubo de 200 µL, foi colocado 12,5 µL de Supermix Platinum SYBR Green, 1 µL de ROX (corante de referência), 10 µM de primer forward, 10 µM de primer reverse, solução de cDNA alvo e água Depec para o volume final de 25 µL. Os microtubos foram incubados em um termociclador (StepOnePlus, Applied Biosystems) com os seguintes ciclos: 50°C por 2 min, seguido de desnaturação inicial a 95°C por 2 min e mais 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 30 s. A detecção da fluorescência, no fim da etapa de cada ciclo da PCR, permitirá a monitoração da quantidade crescente de cDNA amplificado, sendo os dados obtidos analisados no Software do equipamento de real-time.

#### **4.7 Análise estatística**

Para a análise estatística foi avaliada a normalidade dos resultados e após isso foi utilizado teste ANOVA com pós-teste de Tukey para os ensaios de UFC/mL e XTT. Os resultados da obtidos na filamentação de *C. albicans* foram analisados pelo teste de Mann-Whitney. O método de Log-rank (Mantel – Cox) foi utilizado para a análise da curva de sobrevivência de *G. mellonella*. Os testes estatísticos foram realizados no Programa *Graph Pad Prism* adotando nível de significância de 5%.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Biofilme: contagem de UFC/mL

A contagem de UFC/mL dos biofilmes após a interação com as suspensões de *L. rhamnosus* apontou uma maior redução no crescimento de *C. albicans* quando foi utilizada suspensão de *L. rhamnosus* comparada com o controle. Também pode-se observar uma redução quando foi utilizado o sobrenadante de *L. rhamnosus*. O controle utilizando o caldo MRS também foi incluído nos ensaios, e se verificou que o meio de cultura não interferiu no estudo. Os resultados em UFC/mL (Log) estão apresentados na figura 4 e os resultados em percentuais na figura 5.

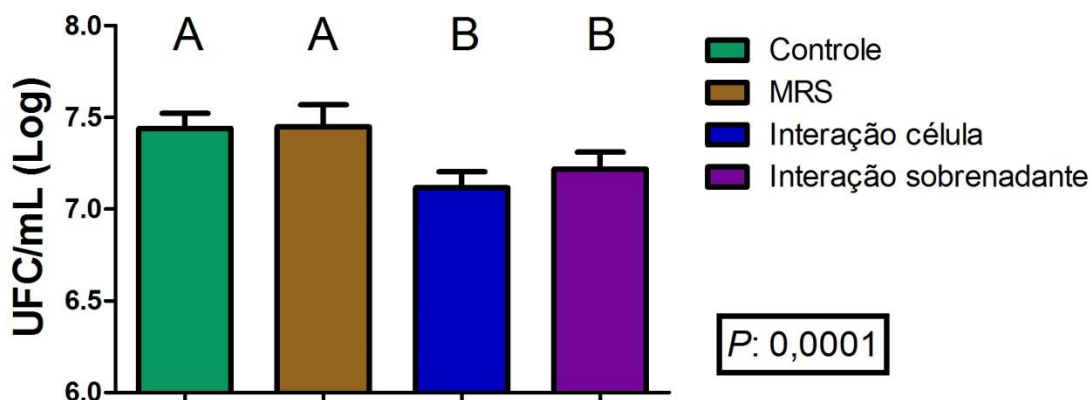


Figura 4 - Contagem de UFC/mL de *C. albicans* após interação utilizando as diferentes suspensões: suspensão de células viáveis de *L. rhamnosus* e suspensão contendo sobrenadante de *L. rhamnosus*. Os controles foram compostos de *C. albicans* com PBS e *C. albicans* com caldo MRS. Letras diferentes correspondem diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ )

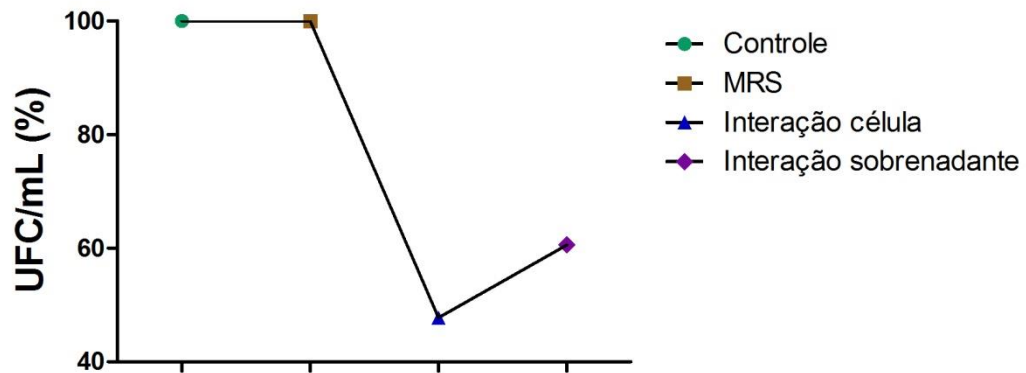


Figura 5 - Porcentagem de crescimento de *C. albicans* após interação utilizando diferentes suspensões: suspensão de células viáveis de *L. rhamnosus*, suspensão contendo sobrenadante de *L. rhamnosus*, controle de *C. albicans* com PBS e controle de *C. albicans* com caldo MRS.

## 5.2 Biofilme: ensaio colorimétrico de XTT

Os resultados obtidos nesse ensaio foram semelhantes aos encontrados na contagem de UFC/mL dos biofilmes (Figura 6). Foi realizado biofilme de *L. rhamnosus* onde não foi detectado valores significativos de densidade óptica, apontando a não redução do XTT.

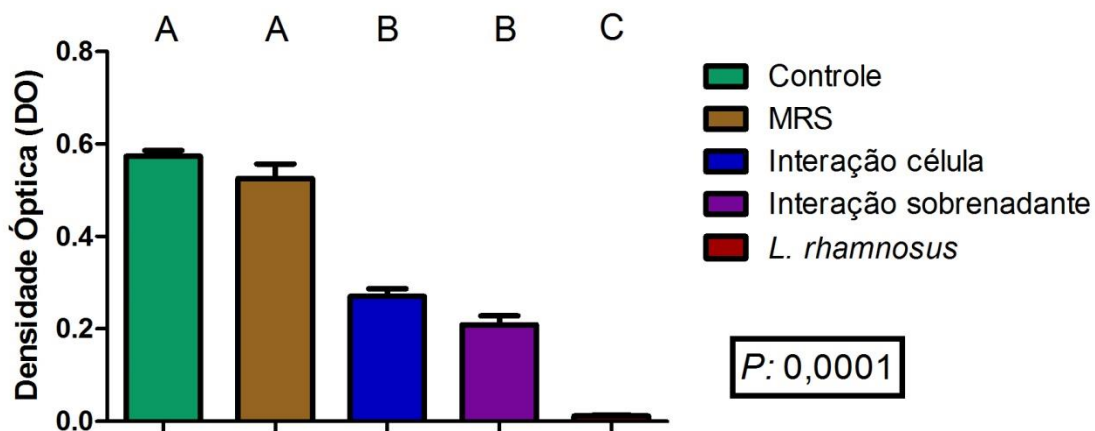


Figura 6 - Análise da atividade metabólica do biofilme de *L. rhamnosus* sozinho e dos biofilmes *C. albicans* através do ensaio de XTT utilizando diferentes suspensões: suspensão de células viáveis de *L. rhamnosus*, suspensão contendo sobrenadante de *L. rhamnosus*, controle de *C. albicans* com PBS e controle de *C. albicans* com caldo MRS. Letras diferentes corresponde diferença estatística.

### 5.3 Filamentação de *C. albicans*

Os dados obtidos no ensaio da filamentação de *C. albicans* demonstraram que a suspensão de células de *L. rhamnosus* foi capaz de inibir a filamentação de *C. albicans* ( $p=0,01$ ), assim como a suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus*, o qual apresentou maior potencial inibitório ( $p=0,002$ ) (Figura 07). O controle MRS não apresentou diferença estatística em relação ao controle ( $p=0,89$ ) (Figura 8). Dados de percentual de filamentação podem ser observados na figura 09.

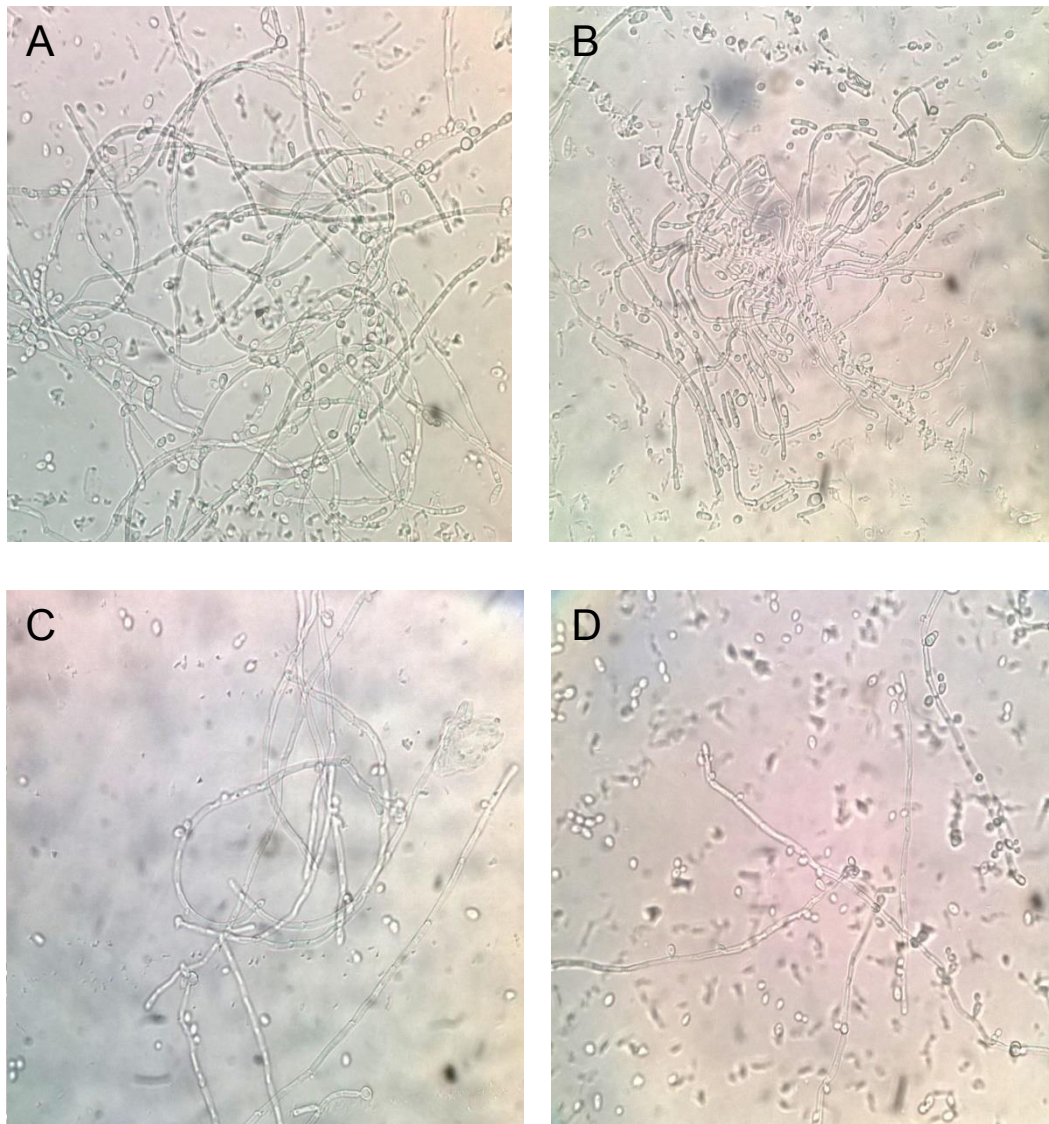


Figura 7 - Morfologia das hifas em microscópio óptico das seguintes interações: A) Controle *C. albicans*; B) Controle MRS; C) *C. albicans* + suspensão de células de *L. rhamnosus*; D) *C. albicans* + suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus*. Pode-se observar uma discreta redução de hifas na figura C, e uma grande redução na figura D.

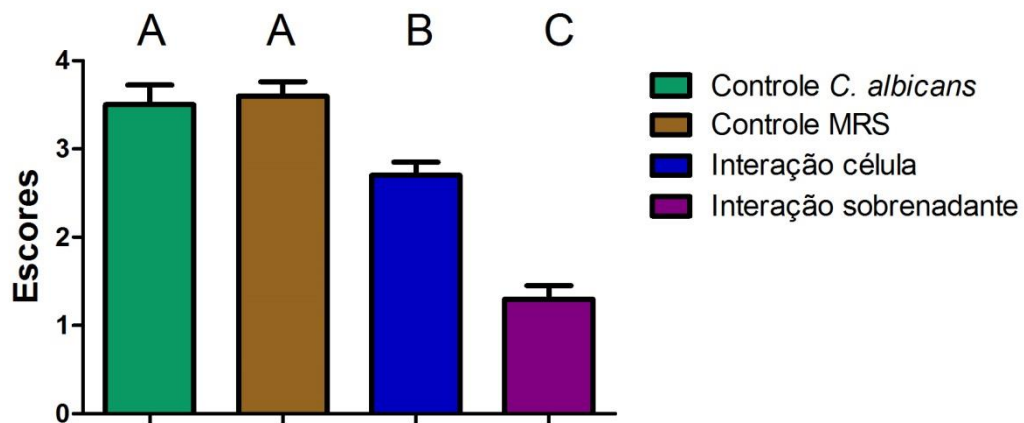


Figura 8 - Análise da inibição da filamentação de *C. albicans* após 24 h da interação com a suspensão de células de *L. rhamnosus* e a suspensão de seu sobrenadante. Letras diferentes corresponde diferença estatística.

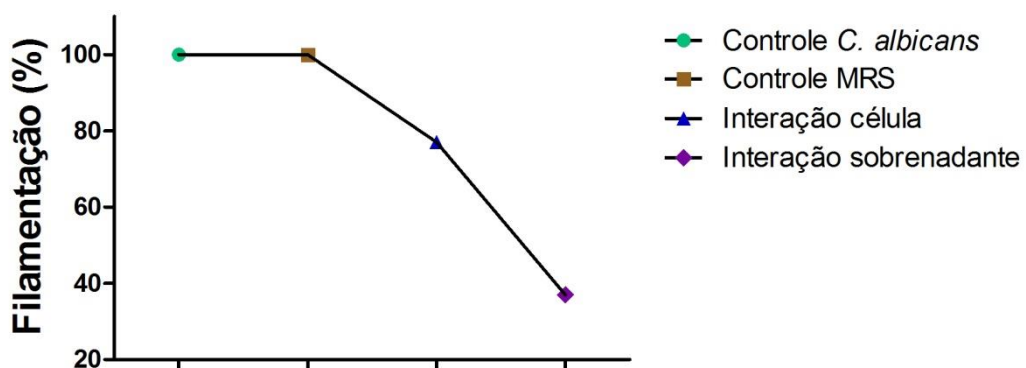


Figura 9 - Porcentagem de filamentação do controle de *C. albicans* (100%), controle MRS (100%), interação com a suspensão de células de *L. rhamnosus* (77%) e interação com a suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus* (37%).

#### 5.4 Curva de sobrevivência de *G. mellonella*

A partir do resultado obtido a suspensão de *C. albicans* que matou 100% dos indivíduos foi a suspensão de  $10^8$  micro-



organismos/mL, sendo esta utilizada para curva de sobrevivência da lagarta.

Nenhuma das concentrações utilizadas da suspensão de *L. rhamnosus* foi patogênica para o inseto, e a suspensão de *L. rhamnosus* escolhida para trabalho foi a suspensão de  $10^8$  micro-organismos/mL.

De acordo com os resultados obtidos o grupo *C. albicans* – PBS foi o mais virulento, pois houve morte de 100% das lagartas no período de até 72 h. O grupo interação *C. albicans* com as células de *L. rhamnosus* apontou um moderado aumento na sobrevida das lagartas pois ocorreu a morte de 90% das lagartas em até 168 h, apresentando diferença estatística quando comparado com o grupo *C. albicans* – PBS ( $p=0,03$ ). No grupo onde foi utilizado o sobrenadante de *L. rhamnosus* ocorreu maior aumento na sobrevida das lagartas ( $p=0,00$ ), apresentando um percentual de morte de apenas 20%. Os grupos controles não apresentaram morte de nenhuma lagarta (Figura 10).

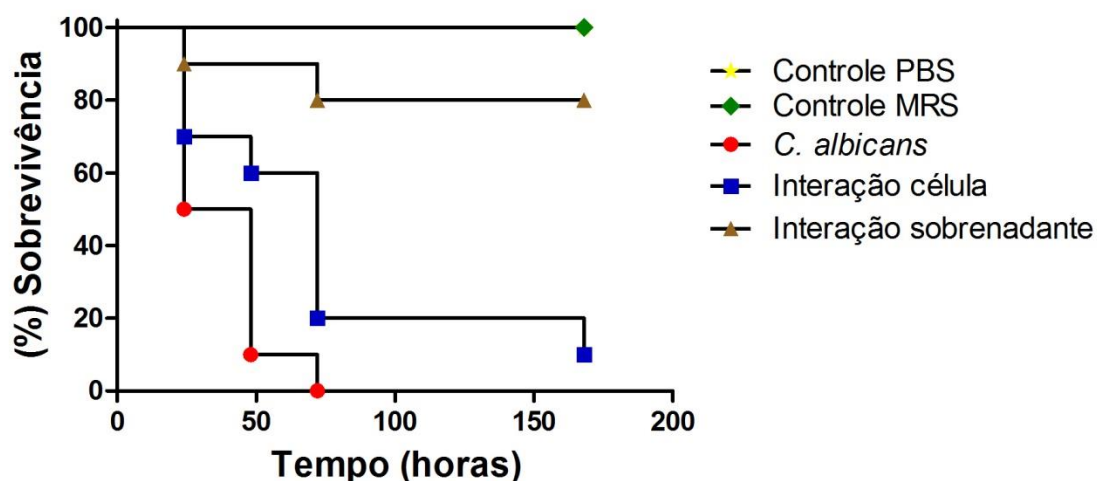


Figura 10 - Curva de sobrevivência em *G. mellonella* nos diferentes grupos experimentais. O percentual de sobrevivência das lagartas foi: 10%, 80% e 100% para os grupos, interação *C. albicans* e células de *L. rhamnosus*, interação *C. albicans* e sobrenadante de *L. rhamnosus*, controle PBS e controle do caldo MRS – PBS, respectivamente.

## 5.5 Expressão gênica de *C. albicans*

### 5.5.1 Expressão de genes de *C. albicans*

O gene normalizador utilizado no trabalho foi o *RPP2B* (Anexo) e após sua escolha os genes alvos foram avaliados quanto a sua expressão relativa. O gene *BCR1* foi regulado negativamente quando a suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus* foi utilizada, o mesmo ocorreu com o gene *EFG1*, porém quando este gene foi avaliado após o uso da suspensão de células de *L. rhamnosus*, sofreu um leve aumento em sua expressão. Da mesma maneira o gene *CPH1* sofreu regulação negativa quando foram utilizadas as duas suspensões (Figura 11).

A expressão relativa dos genes *HWP1* e *ALS3* também sofreram uma regulação negativa frente as duas suspensões utilizadas. Porém o gene *ALS1* foi regulado positivamente, ou seja, apresentou aumento na sua expressão gênica (Figura 12).

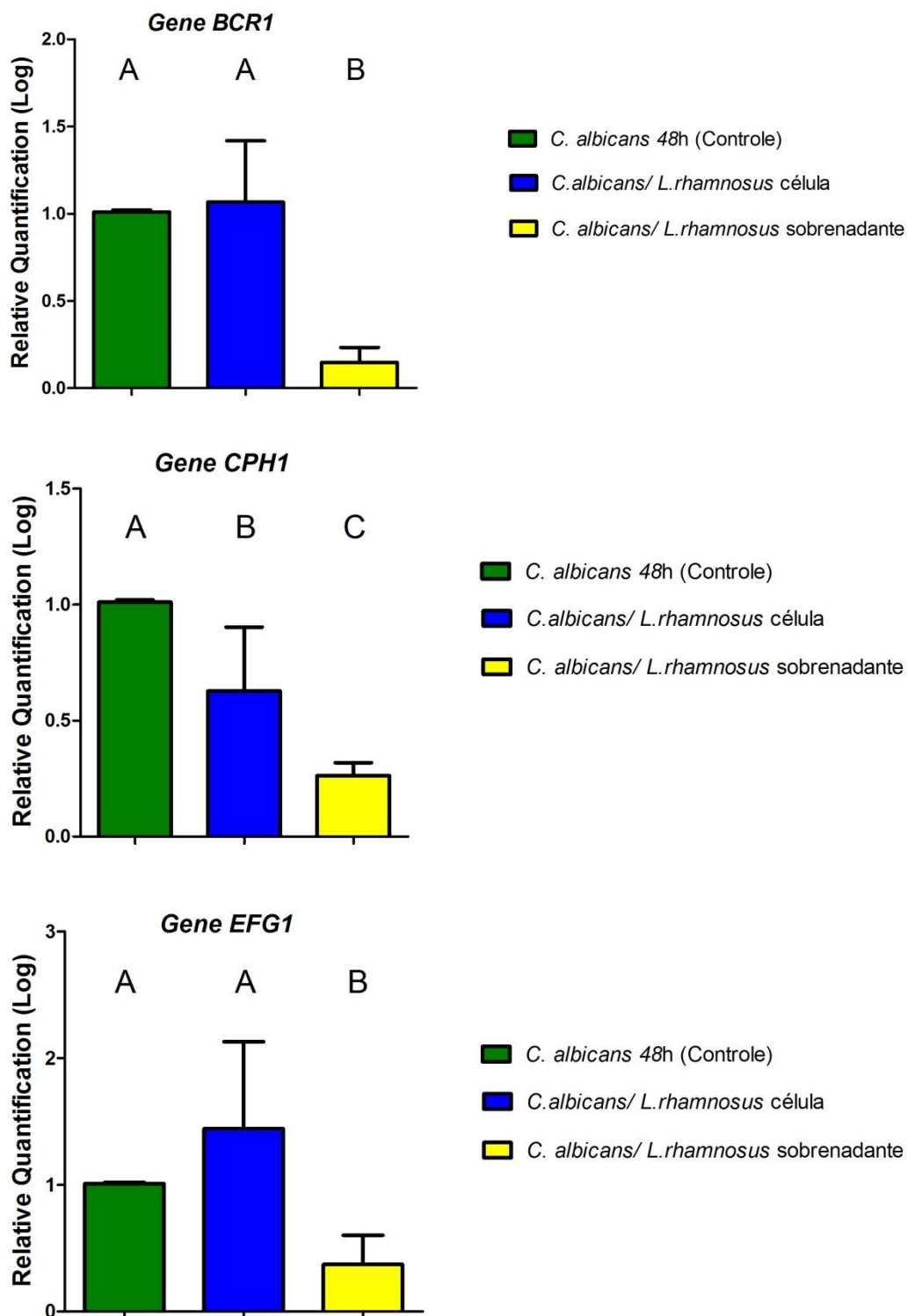


Figura 10 - Expressão relativa dos genes *BCR1*, *EFG1* e *CPH1* após 48 h da formação do biofilme de *C. albicans* utilizando a suspensão de células viáveis de *L. rhamnosus* e suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus*.

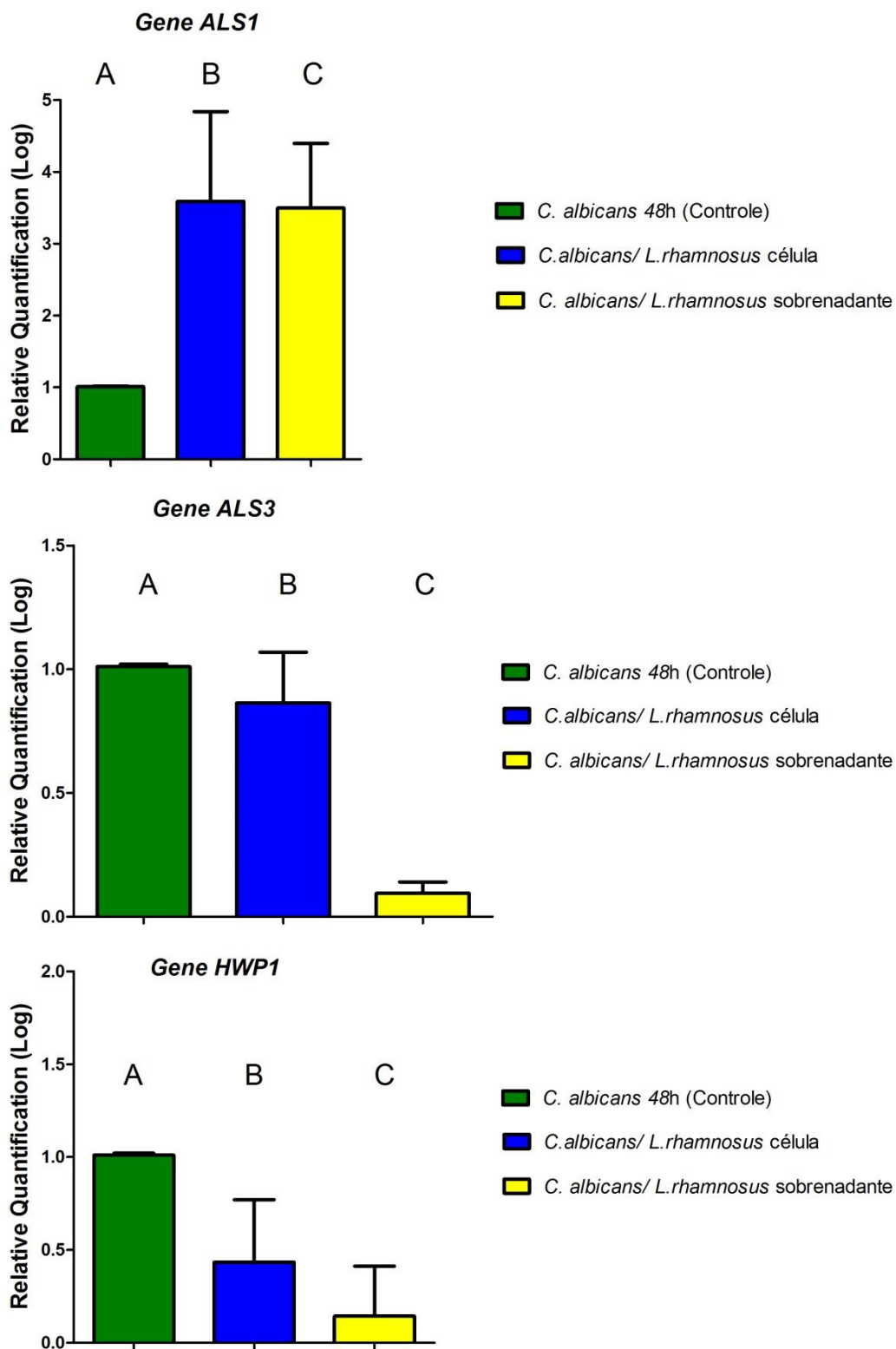


Figura 11 - Expressão relativa dos genes *ALS1*, *ALS3* e *HWP1* após 48 h da formação do biofilme de *C. albicans* utilizando a suspensão de células viáveis de *L. rhamnosus* e suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus*.

## 6 DISCUSSÃO

O biofilme é considerado como uma comunidade microbiana complexa composta por mecanismos e interações dinâmicas entre as espécies que o compõem. Essa estrutura fornece aos micro-organismos algumas vantagens como resistência as terapias antimicrobianas e as defesas do sistema imune. Um biofilme, em sua maioria, é composto por mais de uma espécie de micro-organismos, que vão interagir entre si e apresentar relações que poderão favorecer ou inibir o crescimento de uma espécie ou ambas. No presente trabalho foi realizado a avaliação da interação de *C. albicans*, que forma biofilme, com a bactéria probiótica, *L. rhamnosus*, na tentativa de um melhor entendimento de como essa bactéria probiótica poderia interferir no crescimento de *C. albicans*.

Na presente pesquisa o crescimento de *C. albicans* em biofilme sofreu uma redução de aproximadamente 52,2% quando utilizado a suspensão contendo as células de *L. rhamnosus* vivos, e aproximadamente 39,4% quando utilizado seu sobrenadante. Essa redução parece estar associada a inibição direta e indireta do *L. rhamnosus*. Em seu trabalho Zakaria Gomaa (2013) estudaram 10 espécies de lactobacilos isolados no Egíto, quanto sua atividade antimicrobina e anti-adesiva contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e uma cepa de *C. albicans*. As espécies isoladas foram: *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *Lactobacillus* spp., *L. reuteri* e *L. brevis*. Todas as espécies apresentaram inibição no crescimento de *C. albicans*, porém cada espécie apresentou resultados diferentes entre si. Os autores observaram também grande potencial de auto-agregação e co-agregação de todas as

espécies, porém algumas espécies apresentaram melhores resultados quando comparadas entre si.

As características de auto-agregação e co-agregação interferem diretamente com a adesão, pois quanto maior a taxa de auto-agregação as bactérias probióticas agregam rapidamente entre si e ao substrato, ocupando fisicamente esta região. As altas taxas de co-agregação irão resultar em uma agregação das bactérias probióticas e leveduras recobrando toda a sua superfície, impedindo que as leveduras se liguem a outros substratos pois estas não terão sítios de adesão livre. Essas características irão proporcionar a formação de barreiras de proteção compostas por bactérias probióticas, impedindo a adesão de outros micro-organismos. Porém em nosso trabalho essa influência não teve efeito, pois *C. albicans* foi aderida primeiramente por um período de 90 minutos e após esse tempo a suspensão de células de *L. rhamnosus* e a suspensão de seu sobrenadante foram adicionadas.

Outro mecanismo de inibição direta é a competição pelos nutrientes existentes, pois, uma vez que estes micro-organismos se encontram metabolicamente ativos, eles estão consumindo nutrientes ativamente para suas funções vitais, como produção de energia, multiplicação, produção de metabólitos, entre outros, resultando no esgotamento dos nutrientes e a modificação do meio.

A produção de moléculas resultantes do metabolismo de *L. rhamnosus* poderá resultar na alteração do meio e algumas delas podem apresentar ação bactericida. A produção de bacteriocinas também tem ação indireta sobre o crescimento de outros micro-organismos, pois são secretadas decorrentes de alguma via metabólica necessária para sobrevivência da bactéria probiótica. A utilização do sobrenadante livre de células em nosso trabalho visou analisar se somente as moléculas produzidas pelo *L. rhamnosus* seriam capazes de interferir no crescimento e na formação do biofilme de *C. albicans*. Assim, como pode ser observado em nossos resultados o sobrenadante de *L. rhamnosus*

também foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans*, porém essa capacidade foi menor quando comparada com a suspensão de células de *L. rhamnosus* vivos.

A inibição pode também ser decorrente da produção de ácidos orgânicos produzidos pelo *L. rhamnosus*, pois esse micro-organismo é acidogênico e acidúrico, ou seja, capaz de produzir ácido e de sobreviver em pH ácido. Um dos principais ácidos que essa bactéria produz é o ácido láctico, que é decorrente do seu metabolismo fermentativo. Esses produtos irão tornar o meio ácido e, portanto tóxico para *C. albicans*, dificultando a realização de vários processos vitais, como por exemplo, as trocas iônicas. Estudando o potencial probiótico de cinco espécies diferentes de lactobacilos, *L. casei* Shirota, *L. casei* LC01, *L. plantarum* ST-III, *L. paracasei* Lpc-37 e *L. rhamnosus* HN001, no crescimento e formação de biofilme de *Streptococcus mutans*, Lin et al (2015) demonstram que essas cinco espécies foram capazes de reduzir o crescimento e a formação do biofilme de *S. mutans*. Em seu trabalho, também foi testado o potencial inibitório do sobrenadante da cultura das cinco espécies, antes e depois da neutralização do pH, para um melhor esclarecimento da inibição proveniente da acidificação do meio. Antes da neutralização do pH todas as espécies apresentaram potencial inibitório, porém, após a neutralização do pH apenas duas espécies, *L. casei* Shirota e *L. rhamnosus* HN001, continuaram inibindo *S. mutans*, apontando que a produção ácida foi o principal fator inibitório para as espécies utilizadas no trabalho, porém não o único.

No presente estudo, a suspensão contendo células vivas de *L. rhamnosus* apresentou maior inibição do biofilme quando comparada com a suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus*. Essa diferença pode estar relacionada à presença do *L. rhamnosus* vivo, pois a presença de uma população metabolicamente ativa, crescendo, consumindo nutrientes e em constante produção de metabólitos pode ter exercido interferência gradativa e dinâmica, contrastando a uma condição

constante, onde as moléculas foram adicionadas ao biofilme em uma única vez. Comam et al. (2015) avaliaram a atividade antimicrobiana de duas espécies de lactobacilos e de seus metabólitos utilizando dois métodos de estria modificada e um de agar difusão. As espécies de estudo foram, *L. rhamnosus* IMC 501<sup>®</sup>, *L. paracasei* IMC 502<sup>®</sup> e uma combinação das duas chamada SYN BIO<sup>®</sup>, contra seis bactérias Gram-positivas, nove isolados clínicos Gram-negativas e oito espécies de *Candida*. Em todos os métodos a maioria dos micro-organismos foram inibidos pelas duas espécies e a sua combinação. Este trabalho apresentou resultados semelhantes aos do presente estudo, pois quando foi utilizado o método de agar difusão, avaliação do efeito inibitório do sobrenadante livre de células, também foi observado uma redução da inibição dos patógenos quando comparado com a utilização dos lactobacilos vivos.

O ensaio de XTT quantifica a atividade metabólica através da redução do sal tetrazolium em compostos de formazam por enzimas mitocondriais que a partir dessa reação irá gerar um produto colorido que pode ser quantificado por espectrofotometria. O resultado obtido no presente trabalho confirmou a inibição do biofilme de *C. albicans* pelas diferentes suspensões de *L. rhamnosus*. Pode ser observado que a suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus* proporcionou menor atividade metabólica de *C. albicans*. Esse motivo pode estar relacionado por existirem moléculas produzidas pelo *L. rhamnosus* que interfiram diretamente no metabolismo de *C. albicans*, gerando assim uma menor atividade mitocondrial da levedura.

Para os dois testes utilizados foi adicionado um controle contendo somente meio MRS, para a exclusão da possibilidade de que o meio de cultura pudesse interferir no crescimento de *C. albicans*, pois a suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus* foi preparada em caldo MRS. Os resultados demonstraram que não houve interferência do meio de cultura, pois não houve diferença estatística entre os dois controles.



A morfogênese de *C. albicans* é um de seus importantes fatores de virulência sendo caracterizada pela mudança da forma leveduriforme para a forma hifal. Essa mudança é de grande importância para a manutenção da infecção, pois as hifas irão ajudar na formação do biofilme. Estudos na literatura demonstram a importância da produção de hifas, pois quando estas são inibidas, a formação do biofilme se torna deficiente (Bandara et al., 2013; Yu et al., 2015; Sun et al., 2015). Estudando as interações de *C. albicans* com *C. krusei* e *C. glabrata* em modelo *in vitro* e *in vivo* (lagartas de *G. mellonella* e camundongo), Rossoni et al. (2015) demonstraram que tanto *C. glabrata* quanto *C. krusei* foram capazes de reduzir a formação de biofilme e produção de hifas *in vitro* e *in vivo*, aumentando a expectativa de vida dos animais e reduzindo o grau de infecção causada por *C. albicans*. Nos experimentos com a filamentação de *C. albicans* no presente estudo foi demonstrado que *L. rhamnosus* foi capaz de reduzir a formação de hifas em até 90% quando foi utilizado o sobrenadante de *L. rhamnosus*, e em 10% quando na presença da suspensão de células viáveis de *L. rhamnosus*.

Tem sido relatado na literatura que a produção de metabólitos de espécies do gênero *Lactobacillus* apresentaram potencial de reduzir o biofilme e a produção de hifas e potencializar as células do sistema imune do hospedeiro (Nguyen et al., 2011; Rizzo et al., 2015). Em nosso estudo, a maior inibição da filamentação de *C. albicans* ocorreu quando o sobrenadante de *L. rhamnosus* foi utilizado. Este fato pode estar relacionado a produção de moléculas de seu metabolismo que apresentaram a função de bacteriocina, ou também pelo baixo pH gerado através da produção de ácidos orgânicos pelo *L. rhamnosus*, visto que, o baixo pH reduz a formação de hifas. No presente trabalho foi realizado um grupo controle com o caldo MRS para avaliar se esse meio de cultura iria interferir na produção de hifas, pois o sobrenadante de *L. rhamnosus* foi mantido em caldo MRS. Os resultados obtidos da filamentação de *C. albicans* com o caldo MRS não apresentou diferença estatística quando

comparado com o controle PBS, mostrando assim que o meio de cultura não apresentou inibição na filamentação de *C. albicans*, reafirmando que é necessária a presença das células e do sobrenadante de *L. rhamnosus* para ocorrer à inibição da filamentação de *C. albicans*.

A análise *in vivo* da influência de *L. rhamnosus* e produtos do seu metabolismo foi realizada através da análise da curva de sobrevivência do modelo invertebrado *G. mellonella*. Até o presente momento não foi encontrado na literatura nenhuma trabalho que utilize *G. mellonella* como modelo experimental para *L. rhamnosus*. Como nosso estudo tem como foco avaliar a influência de *L. rhamnosus* na infecção causada por *C. albicans*, primeiramente foi analisado a susceptibilidade de infecção de *L. rhamnosus*, foi então testado várias suspensões de *L. rhamnosus* com diferentes concentrações ( $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  micro-organismos/mL). Em nenhuma das concentrações *L. rhamnosus* causou a morte das lagartas, ou seja, não foi patogênico para o modelo experimental.

No ensaio realizado com a suspensão de células de *L. rhamnosus* houve um aumento na sobrevivência da lagarta sendo diferente estatisticamente do controle *C. albicans*, porém esse aumento foi moderado uma vez que em 24 h do experimento cerca de 70% dos indivíduos haviam morrido. Rybalchenko et al. (2015), demonstraram a capacidade de *L. fermentum* de inibir o crescimento de vários micro-organismos patogênicos, dentre eles *C. albicans*, através da análise de microscopia de transmissão, onde foi comprovado que na presença das células de *L. fermentum* os micro-organismos patogênicos tiveram danos em sua paredes celular e a formação de poros em seu citoplasma levando ao rompimento e morte das células microbianas. Assim pode-se supor que em nosso trabalho essa destruição das células fúngicas possa ter ocorrido, liberando assim seu conteúdo citoplasmático e em grandes quantidades sendo essas moléculas tóxicas para a lagarta, causado assim sua morte acentuada.

Quando utilizada a suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus* ocorreu aumento na sobrevivência da *G. mellonella*, apresentando um percentual de 80% na sua sobrevivência. Essa taxa pode estar relacionada a presença de bacteriocinas ou moléculas resultantes do metabolismo de *L. rhamnosus*. Segundo Inglin et al. (2015), essas moléculas tem vários mecanismos de ação, dentre eles, o bloqueio da biossíntese da parede celular, alteração do meio, inibição de vias metabólicas, dentre outros. Estudando a estabilidade da bacteriocina produzida pelo *L. plantarum* sp. TN635, Smaoui et al. (2010) demonstraram que esse molécula faz parte do complexo protéico, pois eles avaliaram sua estabilidade e funcionalidade quando a resistência ao calor, solventes orgânicos, surfactantes, pH e ação enzimática, onde a bacteriocina foi totalmente inativada somente quando exposta a ação protéica.

Os resultados encontrados em nosso trabalho corroboram com os de Vilela et al. (2015) que avaliaram a influência de *L. acidophilus* na formação do biofilme de *C. albicans*, e também relataram uma redução da filamentação de *C. albicans* quando foi utilizado tanto a suspensão de células quanto o sobrenadante de *L. acidophilus*.

A análise da expressão gênica de *C. albicans* foi realizada através da técnica de PCR em tempo real, que permite a quantificação relativa da expressão dos genes utilizados no trabalho. Primeiramente foi feito a escolha do gene normalizador e para isto foram analisados a expressão de quatro genes de referência após as interações propostas no presente estudo, os genes foram: *PMA*, *RIP1*, *RPP2B* e *LSC2*. Esses genes foram avaliados por cinco *softwares* (*Comprehensive gene stability*, *Genorm*, *Delta CT*, *normFinder* e *BestKeeper*) diferentes que analisam a estabilidade do gene, porém cada um deles usa propriedades matemáticas diferentes para sua analize. Com base nos resultado obtidos dos cinco *softwares* o gene escolhido como normalizado foi o *RPP2B*.

Após a escolha do gene normalizador, foi realizada a analize dos genes alvos: *BCR1*, *EFG1*, *CPH1*, *ALS1*, *ALS3* e *HWP1*.

Quando a suspensão de células de *L. rhamnosus* foi utilizada os genes *CPH1*, *ALS3* e *HWP1* foram regulados negativamente, ou seja, tiveram sua expressão reduzida. Já o gene *BCR1* não sofreu alteração, sua expressão ficou semelhante ao controle. Em contraste os genes *EFG1* e *ALS1* foram regulados positivamente em comparação com o controle.

Utilizando a suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus* os genes *BCR1*, *EFG1*, *CPH1*, *ALS3* e *HWP1* foram regulados negativamente, e somente o gene *ALS1* foi regulado positivamente. Esses resultados obtidos na expressão gênica confirmam os resultados obtidos em todos os outros testes realizados no presente trabalho.

O gene *BCR1* é um importante fator de transcrição do biofilme, regulando a formação do biofilme e da matriz extracelular, e é responsável pelas características de impermeabilidade, impenetrabilidade e resistência a antimicrobianos do biofilme. Sua deleção resulta em um biofilme defeituoso, com pouca matriz extracelular e mais permeável a moléculas. Possui também um importante papel na regulação de outros genes, como por exemplo *ALS3* (Fanning et al., 2012; Srikantha et al., 2013). Com a sua inibição no presente trabalho através do sobrenadante de *L. rhamnosus*, o biofilme de *C. albicans* possivelmente ficou mais permeável à moléculas, e essas substâncias difundiram-se mais rapidamente, alcançando camadas mais internas do biofilme. Outro importante fator de transcrição do biofilme é o gene *EFG1*, que possui várias funções na regulação de outros genes como, regulação da morfogênese das hifas, resposta imune do hospedeiro, crescimento do biofilme, entre outros (Langford et al.; 2013; Saputo et al., 2014). No presente trabalho o gene *EFG1* foi regulado negativamente quando foi utilizado a suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus*, essa regulação negativa poderia gerar uma deficiência em vários outros processos, visto que este gene é de grande importância para a cadeia regulatória de *C. albicans*. Entretanto o contrário ocorreu quando as células de *L. rhamnosus* foram usadas, ou seja, o gene *EFG1* foi regulado

positivamente. Uma hipótese para o aumento na expressão desse gene por ser dada pela presença das células de *L. rhamnosus*, essa presença poderia ter exercido uma competição resultando em danos para *C. albicans*, que por sua vez aumentou a expressão desse gene, pois quando esse gene está sendo expresso em altos níveis, o mesmo aumenta a resistência de *C. albicans* ao sistema imune de seu hospedeiro, podendo assim aumentar a resistência da influência de *L. rhamnosus* (Pierce, Kumamoto, 2012; Pierce et al., 2013). Porém mais estudos relacionados a este mecanismo precisam ser realizados.

Na rede de regulação gênica de *C. albicans*, o gene *EFG1* regula muitos outros, dentre eles o gene *CPH1* que tem sua função relacionada com processos de filamentação, formação do clamidoconídeo e na sensibilidade para os compostos que interferem a formação da parede celular. Em trabalhos recentes que estudaram os efeitos da deleção desse genes em *C. albicans*, demonstraram que quando o *CPH1* está ausente, ocorre grande redução da formação de hifas ou a sua não formação (Staniszewska et al., 2013; Wartenberg et al., 2014; Maiti et al., 2015). O gene *CPH1* em nosso estudo foi regulado negativamente após a utilização das suspensões de células de *L. rhamnosus* e de seu sobrenadante, sendo a suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus* mais eficiente na sua inibição.

A adesão de um micro-organismo é um dos fatores determinantes para sua colonização em determinada área. Em *C. albicans* os genes *ALS1* e *ALS3* são pertencentes da família *ALS* (*Agglutinin-like sequence*) que codificam as aglutininas, proteínas localizadas na superfície celular de *C. albicans* responsáveis pela sua adesão. Trabalhos na literatura estudando a importância desses genes na formação do biofilme de *C. albicans* relataram que a sua inibição ou deleção irá resultar em um biofilme desestruturado e fracamente aderido, reduzindo assim sua virulência (Tian et al., 2013; Ding et al., 2014). A regulação negativa do gene *ALS3* em nosso trabalho ocorreu quando a

suspensão de células e a suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus* foi utilizada, entretanto *ALS1* sofreu uma regulação positiva. Uma possível hipótese para essa regulação pode ser relacionada a função de cada gene, pois *ALS1* é altamente expresso quando está ocorrendo o processo de co-agregação, ou seja, a presença da célula bacteriana ou a produção de alguma molécula de *L. rhamnosus* possa ter estimulado esse gene (Hoyer et al., 2014).

No presente trabalho o gene *HWP1* foi regulado negativamente pelas suspensões de *L. rhamnosus*, sendo a suspensão do sobrenadante de *L. rhamnosus* a mais eficiente em sua regulação. Esse gene codifica proteínas da parede celular das hifas e é de grande importância para a manutenção da estrutura tridimensional do biofilme. Sua regulação negativa irá gerar um biofilme com sua estrutura desorganizada, pouco aderido e com seu potencial de invasão reduzido (Staab et al., 2013). Orsi et al. (2014), estudando a formação do biofilme de mutantes de *C. albicans* para o gene *HWP1* e a sua susceptibilidade frente a células da micróglia, demonstraram que os mutantes que apresentavam mutação para o *HWP1* formaram menos biofilme e sofreram mais danos pelas células da micróglia. A inibição gerada pelo *L. rhamnosus* poderá deixar *C. albicans* menos virulenta e mais susceptível ao sistema imune do hospedeiro.

A interação entre *L. rhamnosus* e *C. albicans* parece ser extremamente complexa, pelo fato de que vários mecanismos estão envolvidos na inibição de *C. albicans*. Mais estudos devem ser realizados, verificando-se outros genes pois estes podem estar sendo inibidos, regulando ou sendo regulados, e essa avaliação gênica poderá gerar um panorama dos processos de *C. albicans* que estão sofrendo influência de *L. rhamnosus*. Estudos *in vivo* também devem ser realizados, pois *L. rhamnosus* é capaz de interagir com o sistema imune de seu hospedeiro gerando uma influência ainda maior nas infecções causadas por *C. albicans*.

## 7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos conclui-se que:

- a) *L. rhamnosus* e o sobrenadante de sua cultura foram capazes de inibir a formação do biofilme, atividade metabólica e filamentação de *C. albicans*;
- b) o sobrenadante da cultura de *L. rhamnosus* também apresentou efeito inibitório, sugerindo que ele possa produzir substâncias com ação anti-*Candida*;
- c) a inoculação de *L. rhamnosus* e do sobrenadante de sua cultura aumentou a sobrevivência de *G. mellonella*;
- d) *L. rhamnosus* viáveis foram capazes de inibir os genes *HWP1*, *ALS3* e *CPH1*.
- e) o sobrenadante da cultura de *L. rhamnosus* foi capaz de inibir os genes *BCR1*, *EFG1*, *CPH1*, *HWP1* e *ALS3*.

## 8 REFERÊNCIAS\*

Abranches J, Miller JH, Martinez AR, Simpson-Haidaris PJ, Burne RA, Lemos JA. The collagenbinding protein Cnm is required for *Streptococcus mutans* adherence to and intracellular invasion of human coronary artery endothelial cells. *Infect Immun*. 2011 Jul;79(6):2277-8.

Al Kassaa I, Hamze M, Hober D, Chihib NE, Drider D. Identification of vaginal Lactobacilli with potential probiotic properties isolated from women in north Lebanon. *Microb Ecol*. 2014 Abr;1-13.

Alsteens D, Von Dijck P, Lipke PN, Deufrêne YF. Quantifying the forces driving cell-cell adhesion in a fungal pathogen. *Langmuir*. 2013 Nov;13473-80.

Amisnnezhad S, Kermanshahi RK, Ranjbar R. Evaluation of synergistic interactions between cell-free supernatant of *Lactobacillus* strains and amikacin and genetamicin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Jundishapur J Microbiol*. 2015 Apr;8(4):1-9.

Amorim-Vaz S, Delarze E, Ischer F, Sanglard D, Coste AT. Examining the virulence of *Candida albicans* transcription factor mutants using *Galleria mellonella* and mouse infection models. *Front Microbiol*. 2015 May;6:1-14.

Arvanitis M, Glavis-Bloom J, Mylonakis E. Invertebrate models of fungal infection. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Sep;1378-83.

Bandara HM, K Cheung BP, Watt RM, Jin LJ, Samaranyake LP. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide inhibits *Candida albicans* hyphae formation and alters gene expression during biofilm development. *Mol Oral Microbiol*. 2013 Feb;28(1):54-69.

Berberi A, Noujeim Z, Aoun G. Epidemiology of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus/acquired immune deficiency syndrome patients and CD4+ counts. *J Int Oral Health*. 2015 Mar;7(3):20-3.

Bermudez-Brito M, Muñoz-Quezada S, Gomez-Llorente C, Romero F, Gil A. *Lactobacillus rhamnosus* and its cell-free culture supernatant differentially modulate inflammatory biomarkers in *Escherichia coli*-challenged human dendritic cells. *Br J Nutr*. 2014 May;1-11.

\* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)



Bhattacharyya S, Gupta P, Banerjee G, Jain A, Singh M. Inhibition of biofilm formation and lipase in *Candida albicans* by culture filtrate of *Staphylococcus epidermidis* *in vitro*. Int J Appl Basic Med Res. 2014 Sep;4(1):1-4.

Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. Curr Opin Microbiol. 2006 Dec;9:588-94.

Brunke S, Quintin J, Kasper L, Jacobsen ID, Richter ME, Hiller E et al. Of mice, flies – and men? Comparing fungal infection models for large-scale screening efforts. Dis Model Mech 2015 May;8:473-86.

Chen HF, Lan CY. Role of *SFP1* in the regulation of *Candida albicans* biofilm formation. PLoS One. 2015 Jun;10(6):1-18.

Chiang ML, Chen HC, Chen KN, Lin YC, Lin YT, Chen MJ. Optimizing production of two potential probiotic Lactobacilli strains isolated from piglet feces as feed additives for weaned piglets. Asian Australas J Anim Sci. 2015 Aug;28(8):1-8.

Chibebe Junior J, Fuchs BB, Sabino CP, Junqueira JC, Jorge AO, Ribeiro MS, et al. Photodynamic and antibiotic therapy impair the pathogenesis of *Enterococcus faecium* in a whole animal insect model. PLoS One. 2013 Feb;8(2):1-10.

Ciesielczuk H, Bettes J, Phee L, Doumith M, Hope R, Woodford N, Wareham DW. Comparative virulence of urinary and bloodstream isolates of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* in a *Galleria mellonella* model. Virulence. 2015 Apr;6(2):1-8.

Coman MM, Verdenelli MC, Cecchini C, Silvi S, Orpianesi C, Caspani M, et al. In vitro evaluation on HeLa cells of protective mechanisms of probiotic lactobacilli against *Candida* clinical isolates. J Appl Microbiol. 2015 Nov;119(5):1383-9.

Cortés-Zavaleta O, López-Malo A, Hernández-Mendoza A, García HS. Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production. Int J Food Microbiol. 2014 Mar;30-5.

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms [review]. Annu Rev Microbiol. 1995 Feb;49:711-45.

Coudeyras S, Jugie G, Vermerie M, Forestier C. Adhesion of human probiotic *Lactobacillus rhamnosus* to cervical and vaginal cells and interaction with vaginosis-associated pathogens. Infect Dis Obstet Gynecol. 2008 Dec ;1-5.

Desbois AP, Cootte PJ. Wax moth larva (*Galleria mellonella*): an in vivo model for assessing the efficacy of antistaphylococcal agents. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Aug;66(8):1785-90.

Desbois AP, McMillan S. Paving the way to acceptance of *Galleria mellonella* as a new model insect. *Virulence.* 2015 Apr;6(5):1-3.

Desbois AP, Tschörner D, Cootte PJ. Survey of small antifungal peptides with chemotherapeutic potential. *Curr Pharm Biotechnol.* 2011 Aug;12(8):1263-91.

Ding X, Liu Z, Su J, Yan D. Human serum inhibits adhesion and biofilm formation in *Candida albicans*. *BMC Microbiol.* 2014 Mar;80(14):1-9.

Drago L, Nicola L, Iemoli E, Banfi G, De Vecchi E. Strain-dependent release of cytokines modulated by *Lactobacillus salivarius* human isolates in an *in vitro* model. *BMC Research Notes.* 2010; 3(25): 1-5.

Dwivedi P, Thompson A, Xie Z, Kashleva H, Ganguly S, Mitchell AP, et al. Role of Bcr1-Activated Genes Hwp1 and Hyr1 in *Candida albicans* Oral Mucosal Biofilms and Neutrophil Evasion. *PLoS One.* 2011 Jan;6(1):1-9.

Elahi S, Pang G, Ashman R, Clancy R. Enhanced clearance of *Candida albicans* from the oral cavities of mice following oral administration of *Lactobacillus acidophilus*. *Clin Exp Immunol.* 2005 Jul;29-36.

El-Azizi M, Farag N, Khardori N. Antifungal activity of amphotericin B and voriconazole against the biofilms and biofilm-dispersed cells of *Candida albicans* employing a newly developed *in vitro* pharmacokinetic model. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2015 Apr:1-9.

Falagas ME, Betsil GI, Anthanasiou S. Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Aug;58(2):266-72.

Fanning S, Xu W, Solis N, Woolford CA, Filler SG, Mitchell AP. Divergent targets of *Candida albicans* biofilm regulator *Bcr1* *in vitro* and *in vivo*. *Eukaryot Cell.* 2012 Jul;11(7):896-904.

Francavilla R, Fontana C, Cristoforo F. Letter: identification of probiotics by specific strain name. *Aliment Pharm Therap.* 2012 Apr;35(7):859-65.

Fox EP, Bui CK, Nett JE, Hartooni N, Mui MM, Andes DR, et al. An expanded regulatory network temporally controls *Candida albicans* biofilm formation. *Mol Microbiol.* 2015 Jun;96(6):1-22.

Fox EP, Noblie CJ. A sticky situation: untangling the transcriptional network controlling biofilm development in *Candida albicans*. *Transcription*. 2012 Nov;3(6):315-22.

Fuchs BB, Eby J, Nobile CJ, El Khoury JB, Mitchell AP, Mylonakis E. Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*. *Microbes Infect*. 2010 Jun;12(6):488-96.

Furlaneto MC, Rota JF, Quesada RM, Furlaneto-Maia LF, Rodrigues R, Oda S, et al. Species distribution and *in vitro* fluconazole susceptibility of clinical *Candida* isolates in a Brazilian tertiary-care hospital over a 3-year period. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011 Oct;44(5):595-9.

Garcia-Sanchez S, Aubert S, Iraqui I, Janbon G, Ghigo JM, d'Enfert C. *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot Cell*. 2004 Apr;5:36-45.

Gemaque K, Giacomelli Nascimento G, Junqueira JL, Araújo VC, Furuse C. Prevalence of oral lesions in hospitalized patients with infectious diseases in northern Brazil. *Scientific World*. 2014 Jan;1-5.

Georgieva R, Yocheva L, Tserovska L, Zhelezova G, Stefanova N, Atanasova A, et al. E. Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp intended for use as starter and probiotic cultures. *Biotechnol Equip*. 2015 Jan;29(1):84-91.

Granger BL, Flenniken ML, Davis DA, Mitchell AP, Cutler JE. Yeast wall protein 1 of *Candida albicans*. *Microbiology*. 2005 May;151:1631-44.

Hasslöf P, Hedberg M, Twetman S, Stecksén-Bliscks C. Growth inhibition of oral mutans streptococci and candida by commercial probiotic lactobacilli: an *in vitro* study. 2010 Jul;10(18):1-6.

Hedayati MT, Taheri Z, Galanimoghadam T, Aghili SR, Cherati JY, Mosayebi E. Isolation of different species of *Candida* in patients with vulvovaginal candidiasis from Sari, Iran. *Jundishapur J Microbiol*. 2015 Abr;8(4):1-5.

Hnisz D, Bardet AF, Nobile CJ, Petryshyn A, Glaser W, Shöck U, et al. A histone deacetylase adjusts transcription kinetics at coding sequences during *Candida albicans* morphogenesis. *PLoS Genet*. 2012 Dec;8(12):1-13.

Hoyer LL, Oh SH, Jones R, Cota E. A proposed mechanism for the interaction between the *Candida albicans* Als3 adhesin and streptococcal cell wall proteins. *Front Microbiol*. 2014 Nov;5(4):564.

Inglin RC, Stevens MJ, Meile L, Lacroix C, Meile L. High-throughput screening assays for antibacterial and antifungal activities of *Lactobacillus* species. J Microbiol Methods. 2015 Jul;114:26-9.

Ishijima SA, Hayama K, Ninomiya K, Iwasa M, Yamazaki M, Abe S. Protection of mice from oral candidiasis by heat-killed *Enterococcus faecalis*, possibly through its direct binding to *Candida albicans*. Med. Mycol. J. 2014 Oct;55(1):1-11.

Jacobsen ID. *Galleria mellonella* as a model host to study virulence of *Candida*. Virulence. 2014 Feb;5(2):237-9

Jorge AOC. Microbiologia e imunologia oral. São Paulo: Elsevier; 2012. 384 p.

Juárez Tomás MS, Duhart CIS, Gregorio PRD, Pingitore EV, Nader-Macías ME. Urogenital pathogen inhibition and compatibility between vaginal *Lactobacillus* strains to be considered as probiotic candidates. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2011 Dec;399-6.

Junqueira JC, Fuchs BB, Muhammed M, Coleman JJ, Suleiman JM, Vilela SFG, et al. Oral *Candida albicans* from HIV-positive individuals have similar in vitro biofilm-forming ability and pathogenicity as invasive *Candida* isolates. BMC Microbiol. 2011 Nov;11:1-9.

Junqueira JC, Vilela SF, Rossoni RD, Barbosa JO, Costa ACBP, et al. Oral colonization by yeasts in HIV-positive patients in Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2012 Jan-Feb;54(1):17-24.

Kamikawa Y, Mori Y, Nagayama T, Fujisaki J, Hirabayashi D, Sakamoto R, et al. Frequency of clinically isolated strains of oral *Candida* species at Kagoshima University Hospital, Japan, and their susceptibility to antifungal drugs in 2006-2007 and 2012-2013. BMC Oral Health. 2014 Feb;14(14):1-18.

Köhler GA, Assefa S, Reid G. Probiotic interference of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 with opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. Infect Dis Obstet Gynecol. 2012 Feb:1-15.

Koo H, Bowen WH. *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*: a potential synergistic alliance to cause virulent tooth decay in children. Future Microbiol. 2014;9(12):1295-7.

Kopp-Hoolihan, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. J Am Diet Assoc. 2001 Feb;229-41.

Kumamoto, CA. A contact-activated kinase signals *Candida albicans* invasive growth and biofilm development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 Apr;5576-81.

Langford ML, Hargarten JC, Patefield KD, Marta E, Blankenship JR, Fanning S, et al. *Candida albicans* *Czf1* and *Efg1* coordinate the response to farnesol during *quorum sensing*, white-opaque thermal dimorphism, and cell death. *Eukaryot Cell*. 2013 Sep;12(9):1281-92.

Lewis RE, Lo HJ, Raad II, Kontoyiannis DP. Lack of catheter infection by the *efg1/efg1 cph1/ cph1* double-null mutant, a *Candida albicans* strain that is defective in filamentous growth. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Apr;46(6):1153-5.

Li DD, Deng L, Hu GH, Zhao LX, Hu DD, Jiang YY, Wang Y. Using *Galleria mellonella-Candida albicans* infection model to evaluate antifungal agents. *Biol Pharm Bull*. 2013 Jun;36(9):1482-7.

Lin X, Chen X, Chen Y, Jiang W, Chen H. The effect of five probiotic lactobacilli strains on the growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Oral Dis*. 2015 Jan;21(1):1-7.

Macêdo PC, Farias AMA, Lima RGN, Silva VKA, Leal AFG, Neves RP. Opportunistic yeast infections and enzymatic profile of the etiological agents. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009 Mar-Apr;42(2):188-91.

Maiti P, Ghorai P, Ghosh S, Kamthan M, Tyagi RK, Datta A. Mapping of functional domains and characterization of the transcription factor *Cph1* that mediate morphogenesis in *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol*. 2015 Oct;83:45-57.

Mateus C, Crow SA, Ahearn DG. Adherence of *Candida albicans* to silicone induces immediate enhanced tolerance to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Sep;3358-66.

Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013 Feb;4(2):119-28.

McMillan S, Verner-Jeffreys D, Weeks J, Austin B, Desbois AP. Larva of the greater wax moth, *Galleria mellonella*, is a suitable alternative host for studying virulence of fish pathogenic *Vibrio anguillarum*. *BMC Microbiol*. 2015 Jun;15:1-10.

Mendonça FH, Santos SS, Faria Ida S, Gonçalves e Silva CR, Jorge AO, Leão MV. Effects of probiotic bacteria on *Candida* presence and IgA Anti-*Candida* in the oral cavity of elderly. *Braz Dent J*. 2012 Sep-Oct;23(5):534-8.

Ming L, Zhang Q, Yang L, Huang JA. Comparison of antibacterial effects between antimicrobial peptide and bacteriocins isolated from *Lactobacillus plantarum* on three common pathogenic bacteria. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Apr;8(4):5806-11.

Mokrozub VV, Lazarenko LM, Sichel LM, Babenko LP, Lytvyn PM, Demchenko OM, et al. The role of beneficial bacteria wall elasticity in regulating innate immune response. *EPMA J*. 2015 Jun;13(6):1-15.

Morales DK, Grahl N, Okegbe C, Dietrich LEP, Jacobs NJ, Hogan DA. Control of *Candida albicans* metabolism and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* phagezines. *MBio*. 2013 Jan;4(1):1-9.

Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, Ghannoum MA. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect Immun*. 2003 Aug;43:333-40.

Naglik JR, Rodgers CA, Shirlaw PJ, Dobbie JL, Fernandes-Naglik LL, Greenspan D, et al. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in human correlates with active oral and vaginal infections. *J Infect Dis*. 2003 Aug;469-79.

Nailis H, Coenye T, Van Nieuwerburgh F, Deforce D, Nelis HJ. Development and evaluation of different normalization strategies for gene expression studies in *Candida albicans* biofilms by real-time PCR. *BMC Mol Biol*. 2006 Aug;7:25.

Nailis H, Kucharíkavá S, Rídicová M, Van Dijck P, Deforce D, Nelis HJ, Coenye T. Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and-independent gene expression. *BMC Microbiol*. 2010 Apr;10:114.

Nguyen LN, Lopes LC, Cordero RJ, Nosanchuk JD. Sodium butyrate inhibits pathogenic yeast growth and enhances the functions of macrophages. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Nov;66(11):2573-80.

Nobile CJ, Andes DR, Nett JE, Smith FJ, Yu F, Phan Q, et al. Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation *in vitro* and *in vivo*. *Plos Pathog*. 2006 Jul;2(7):1-14.

Nobile C J, Mitchell A P. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiol.* 2006 Sep;8(9):1382-91.

Nobile CJ, Mitchell AP. Regulation of cell surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1p. *Curr Biol.* 2005 Jul;15:5-5.

Olsen RJ, Watkins ME, Cantu CC, Beres SB, Musser JM. Virulence of serotype M3 Group A *Streptococcus* strains in wax worms (*Galleria mellonella* larvae). *Landes Bioscience.* 2011 Mar-Apr;2(2):111-9.

Orsi CF, Borghi E, Colombari B, Neglia RG, Quaglino D, Ardizzoni A, et al. Impact of *Candida albicans* hyphal wall protein 1 (*HWP1*) genotype on biofilm production and fungal susceptibility to microglial cells. *Microb Pathog.* 2014 Mar-Apr;69(70):20-7.

Parolin C, Marangoni A, Laghi L, Foschi C, Palomino RAN, Calonghi N, et al. Isolation of vaginal Lactobacilli and characterization of anti-*Candida* activity. *PLoS One.* 2015 Jan;10(6):1-17.

Peleg AY, Hogan DA, Mylonakis E. Medically important bacterial- fungal interactions. *Nat Rev Microbiol.* 2010 May;8(5):340-9.

Pendharkar S, Brandsborg E, Hammrström L, Marcotte H, Larsson PG. Vaginal colonization by probiotic lactobacilli and clinical outcome in women conventionally treated for bacterial vaginosis and yeast infection. *BMC Infect Dis.* 2015 Jul;15:1-12.

Perdoni F, Falleni M, Tosi D, Cirasola D, Romagnoli S, Braidotti P, et al. A histological procedure to study fungal infection in the wax moth *Galleria mellonella*. *Eur J Histochem.* 2014 Sep;58:1-5.

Peters BM, Jabra-Rizk MA, O'May GA, Costerton JW, Shirtliff ME. Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease. *Clin Microbiol Rev.* 2012 Jan;19:3-213.

Pierce JV, Dignard D, Whiteway M, Kumamoto CA. Normal adaptation of *Candida albicans* to the murine gastrointestinal tract requires *Efg1p*-dependent regulation of metabolic and host defense genes. *Eukaryot Cell.* 2013 Jan;12(1):37-49.

Pierce JV, Kumamoto CA. Variation in *Candida albicans* EFG1 expression enables host-dependent changes in colonizing fungal populations. *MBio.* 2012 Jul;3(4):1-8.

Pithva S, Shekh S, Dave J, Vyas BRM. Probiotic attributes of autochthonous *Lactobacillus rhamnosus* strains of human origin. Appl Biochem Biotechnol. 2014 May;173(1):259-77.

Rajendran R, Borghi E, Falleni M, Perdoni F, Tosi D, et al. Acetylcholine protects against *Candida albicans* infection by inhibiting biofilm formation and promoting haemocyte function in a *Galleria mellonella* infection model. Eukaryot Cell. 2015 Aug;1-43.

Ramage G, VandeWalle K, Lopez-Ribot JL, Wickes B. The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. FEMS Microbiol Lett. 2002 Aug;95-100.

Rizzo A, Fiorentino M, Buommino E, Donnarumma G, Losacco A, Bevilacqua N. *Lactobacillus crispatus* mediates anti-inflammatory cytokine interleukin-10 induction in response to *Chlamydia trachomatis* infection in vitro. Int J Med Microbiol. 2015 Dec; 305(8): 815-27.

Romeo MG, Romeo DM, Trovato L, Oliveri S, Palermo F, Costa F, Betta P. Role of probiotics in the prevention of the enteric colonization by *Candida* in preterm newborns: incidence of late-onset sepsis and neurological outcome. J Perinatol. 2011 Jan;31(1):63-9.

Rossi BP, García C, Alcaraz E, Franco M. *Stenotrophomonas maltophilia* interferes via the DFS-mediated *quorum sensing* system with *Candida albicans* filamentation and its planktonic and biofilm modes of growth. Rev Argent Microbiol. 2014 Oct-Dez;46(4):288-97.

Rossoni RD, Barbosa JO, Vilela SFG, Santos JD, Barros PP, Prata MCA, et al. Competitive interactions between *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei* during biofilm formation and development of experimental candidiasis. PLoS One. 2015 Jul;10(7):1-23.

Roy A, Chaudhruri J, Sarkar D, Ghosh P, Chakraborty S. Role of enteric supplementation of probiotics on late-onset sepsis by *Candida* species in preterm low birth weight neonates: a randomized, double blind, placebo-controlled trial. N Am J Med Sci. 2015 Jun;6(1):1-8.

Rybalchenko OV, Bondarenko VM, Orlova OG, Markov AG, Amasheh S. Inhibitory effects of *Lactobacillus fermentum* on microbial growth and biofilm formation. Arch Microbiol. 2015 Oct;197(8):1027-32.

Sanders ME. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. Clin Infect Dis. 2008 Feb;46:1-4.



Saputo S, Kumar A, Krysan DJ. *Efg1* directly regulates *ACE2* expression to mediate cross talk between the cAMP/PKA and RAM pathways during *Candida albicans* morphogenesis. *Eukaryot Cell*. 2014 Sep;13(9):1169-80.

Shibasaki S, Karasaki M, Taduku S, Aoki W, Sewaki T, Ueda M. Oral immunization against Candidiasis using *Lactobacillus casei* displaying enolase 1 from *Candida albicans*. *Sci Pharm*. 2014 Jul;82:697-708.

Silva-Rocha WP, Lemos VLB, Ferreira MRA, Soares LAL, Svidzinski TIE, Milan EP, et al. Effect of the crude extract *Eufenia uniflora* in morphogenesis and secretion of hydrolytic enzymes in *Candida albicans* from the oral cavity of kidney transplant recipients. *BMC Complement Altern M*. 2015;15(6) Feb:1-15.

Smaoui S, Elleuch L, Bejar W, Karray-Rebai I, Ayadi I, Jaouadi B, et al. Inhibition of fungi and gram-negative bacteria by bacteriocin BacTN635 produced by *Lactobacillus plantarum* sp. TN635. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010 Oct;162(4):1132-46.

Srikantha T, Daniels KJ, Pujol C, Kim E, Soll DR. Identification of genes upregulated by the transcription factor *Bcr1* that are involved in impermeability, impenetrability, and drug resistance of *Candida albicans*  $\alpha/\alpha$  biofilms. *Eukaryot Cell*. 2013 Jun;12(6):875-88.

Staab JF, Datta K, Rhee P. Niche-specific requirement for hyphal wall protein 1 in virulence of *Candida albicans*. *PLoS One*. 2013 Nov;8(11):1-12.

Staniszewska M, Bondaryk M, Swoboda-Kopec E, Siennicka K, Sygitowicz G, Kurzatkowski W. *Candida albicans* morphologies revealed by scanning electron microscopy analysis. *Braz J Microbiol*. 2013 Dec;44(3):813-21.

Sun L, Liao K, Wang D. Effects of Magnolol and Honokiol on adhesion, yeast-hyphal transition, and formation of biofilm by *Candida albicans*. *PLoS One*. 2015 Feb;10(2):1-20.

Tian J, Weng LX, Zhang YQ, Wang LH. BDSF inhibits *Candida albicans* adherence to urinary catheters. *Microb Pathog*. 2013 Nov;64:33-8.

Tomasik J, Yolken RH, Bahn S, Dickerson FB. Immunomodulatory effects of probiotic supplementation in schizophrenia patients: a randomized, placebo-controlled trial. *Biomarker Insights*. 2015 Jun;10:1-8.

Uwamahoro N, Qu Y, Jelacic B, Lo TL, Beaurepaire C, Bantun F, et al. The functions of mediator in *Candida albicans* support a role in shaping species-specific gene expression. PLoS Genet. 2012 Apr;8(4):1-18.

Vestman NR, Timby N, Holgerson PL, Kressirer CA, Claesson R, Domellöf M, et al. Characterization and in vitro properties of oral lactobacilli in breastfed infants. BMC Microbiol. 2013 Aug;1-12

Vilela SF, Barbosa JO, Rossoni RD, Santos JD, Prata MC, Anbinder AL, et al. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 inhibits biofilm formation by *C. albicans* and attenuates the experimental candidiasis in *Galleria mellonella*. Virulence. 2015 Feb;6(1):29-39.

Wagner RD, Johnson SJ. Probiotic *lactobacillus* and estrogen effects on vaginal epithelial gene expression responses to *Candida albicans*. J Biomed Sci. 2012 Jun;19:1-8.

Wand ME, Baker KS, Benthall, McGregor H, McCowen JWI, Deheer-Graham A, et al. Characterization of pre-antibiotic era *Klebsiella pneumoniae* isolates with respect to antibiotic/disinfectant susceptibility and virulence in *Galleria mellonella*. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Jul;59(7):1-7.

Wartenberg A, Linde J, Martin R, Schreiner M, Horn F, Jacobsen ID, et al. Microevolution of *Candida albicans* in macrophages restores filamentation in a nonfilamentous mutant. PLoS Genet. 2014 Dec;10(12):1-18.

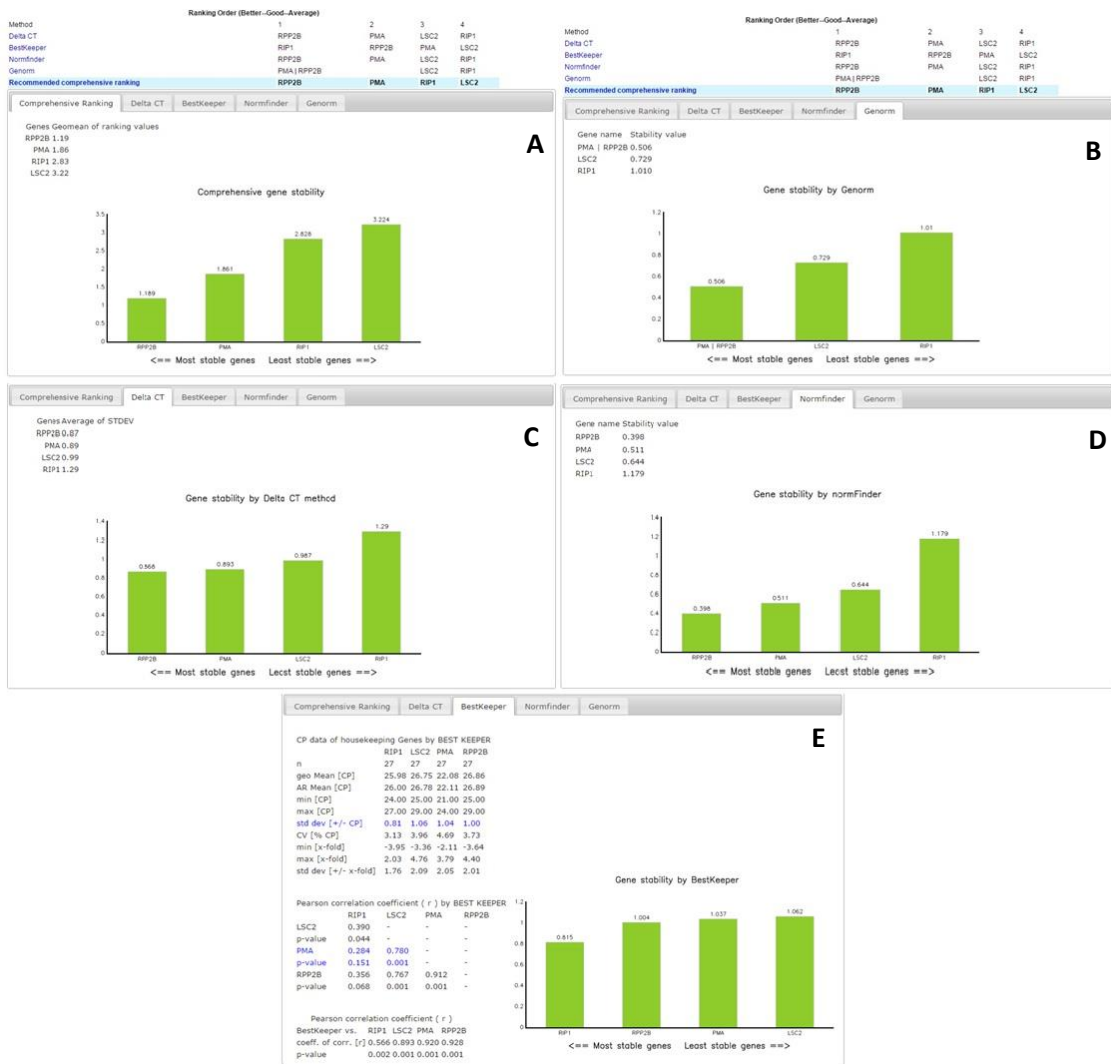
Wcislo MZ, Brozozowski T, Budak A, Kwiecien S, Sliwowski Z, Drozdowicz D, et al. Effect of *Candida* colonization on human ulcerative colitis and the healing of inflammatory changes of the colon in the experimental model of Colitis ulcerosa. J Physiol Pharmacol. 2009 Mar;60(1):107-18.

Wilson D, Thewes S, Zakikhany K, Fradin C, Albrech A, Almeida R, et al. Identifying infection associated genes of *Candida albicans* in the post genomic era. FEMS Yeast Res. 2009;Aug;9(5)688-700.

Yu Q, Zhang B, Ma F, Jia C, Xiao C, Zhang B, et al. Novel mechanisms of surfactants against *Candida albicans* growth and morphogenesis. Chem Biol Interact. 2015 Feb;227:1-6.

Zakaria Gomaa E. Antimicrobial and anti-adhesive properties of biosurfactant procuded by lactobacilli isolates, biofilm formation and aggregation ability. J. Gen. Appl. Microbiol. 2013 Aug;54(6):425-36.

**ANEXO – Análise dos genes normalizadores utilizando os métodos: A) Comprehensive Ranking; B) Genorm; C) Delta CT; D) normFinder; E) BestKeeper.**



**References**

- BestKeeper:** Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper—Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters* 26:509-515.
- NormFinder:** Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research* 64:5245-5250.
- Genorm:** Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3:RESEARCH0034.
- The comparative delta-Ct method:** Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL. 2006. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC molecular biology* 7:33.