



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

SIMONE FURGERI GODINHO VILELA

**INFLUÊNCIA DE *Lactobacillus acidophilus* SOBRE
BIOFILME FORMADO POR *Candida albicans in vitro* E
INFECÇÃO EM MODELO DE INVERTEBRADO**

2013

SIMONE FURGERI GODINHO VILELA

**INFLUÊNCIA DE *Lactobacillus acidophilus* SOBRE BIOFILME
FORMADO POR *Candida albicans in vitro* E INFECÇÃO EM MODELO
DE INVERTEBRADO**

Tese 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 obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós- Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia / Imunologia.

Orientadora: Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira

São José dos Campos

2013

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. ampl. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2013.

V711i Vilela, Simone Furgeri Godinho
Influência de *Lactobacillus acidophilus* sobre biofilme formado por *Candida albicans* in vitro e infecção em modelo de invertebrado / Simone Furgeri. Godinho
Vilela - São José dos Campos: [s.n.], 2013.
115 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) – Instituto de Ciência e Tecnologia de
São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2013.
Orientador: Profa. Juliana Campos Junqueira.

1. *Candida albicans* 2. *Lactobacillus acidophilus* 3. *Galleria mellonella*. I.
Junqueira, Juliana Campos. II. Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos
Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. III. Universidade Estadual Paulista “Julio
de Mesquita Filho”. IV. UNESP – Univ Estadual Paulista. V. Título

tD17

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do
Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP

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, 28 de Maio de 2013 .

Assinatura:

E-mail: simonefurgeri@gmail.com

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adjunta Juliana Campos Junqueira (Orientadora)
Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos
UNESP - Univ Estadual Paulista

Prof. Titular Olavo Cardoso Jorge
Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos
UNESP - Univ Estadual Paulista

Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
UNESP - Univ Estadual Paulista

Profa.Dra. Mariella Vieira Pereira Leão
Instituto Básico de Biociências
Universidade de Taubaté – UNITAU

Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira
Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos
UNESP - Univ Estadual Paulista

São José dos Campos, 29 de julho de 2013.

DEDICATÓRIA

A Deus, acima de tudo e de todos, pela sua presença constante em minha vida e em meu trabalho.

Aos meus pais pelas incansáveis horas de dedicação durante todas as etapas de minha vida.

Ao meu esposo Mário, que esteve sempre ao meu lado, pelo apoio, compreensão, conselhos, amizade e colaboração em praticamente todas as fases deste trabalho.

A minha filha Giulia que veio iluminar minha vida, amor único e especial.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira, primeiramente pelo convite para desenvolver esse trabalho, por apostar na minha capacidade, desafiar meus limites e por oferecer todos os meios e estruturas necessárias no desenvolvimento desse trabalho. Por sua paciência, dedicação, amizade, por seu exemplo como pessoa e profissional, meu eterno agradecimento.

Ao Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge por quem tenho uma grande admiração, por seus ensinamentos tão preciosos, pelas palavras de incentivo e oportunidades que me proporcionou durante todo este período, meu agradecimento.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Ciência e Tecnologia, Campus de São José dos Campos, na pessoa do diretor Prof. Carlos Augusto Pavanelli e do vice-diretor Prof. Dr. Estevão Tomomitsu Kimpara.

Ao Programa de Pós- graduação em Biopatologia Bucal, coordenadora Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira e vice-coordenadora Profa. Dra. Ana Lia Anbinder, pelo apoio constante para a realização desse trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP pela concessão do Auxílio à Pesquisa que possibilitou aquisição dos materiais necessários para a realização deste projeto (processo 2012/19915-6).

A todos os professores pelo convívio durante a realização dos créditos pela amizade, apoio e ensinamentos.

A Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira com sorriso sempre doce, pronta para responder e ajudar em qualquer questionamento ou dúvida.

À Profa Dra. Ana Lia Anbinder, pela sua disponibilidade e auxílio na interpretação dos cortes histológicos.

À Dra. Thais Cachuté Paradella pela ajuda e maravilhosas fotos obtidas a partir da microscopia eletrônica de varredura.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA de Juiz de Fora, na pessoa da pesquisadora Márcia Prata, pelo envio das lagartas sem as quais este trabalho não teria êxito.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia, Sérgio Giovanny Alves e Domingos Gonçalves Pontes, que foram essenciais para qualidade da pesquisa.

Ao laboratório Cebape, na pessoa da Profa. Adjunta Mônica Fernandes Gomes, pela disponibilidade do espaço para o preparo das lâminas histológicas.

Ao técnico do laboratório de patologia Walter Cruz, pelo cuidado e auxílio na preparação dos cortes histológicos.

Aos secretários da Seção da Pós Graduação, Rosemary de Fatima Salgado, Bruno Shiguemitsu Marques Tanaka, Erena Michie Hasegawa e Ivan Oliveira Damasceno pela amizade e ajuda durante este tempo.

A todos os funcionários da biblioteca, em especial Renata Aparecida de Oliveira Couto e Silvana Alvarez, pelo auxílio constante na coleta de dados e na finalização do trabalho.

Aos caros colegas de pós-graduação em especial, Rodnei Dennis Rossoni e Júnia Oliveira Barbosa, pelos momentos de descontração, amizade e ajuda imprescindível para conclusão dos experimentos.

A todos os colegas de Pós-Graduação do mestrado e doutorado pelo companheirismo e boa convivência que tivemos durante o curso.

A querida aluna de iniciação Científica, Jéssica Diane dos Santos pela disponibilidade, pelo imenso auxílio durante todo este tempo.

A minha cara amiga Elisabete Piva, por nossos devaneios microbiológicos nas primeiras horas do dia antes do trabalho na prefeitura. Por sua compreensão, ajuda e ombro amigo em todas as horas.

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram para a concretização deste trabalho, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

“Cada sonho que você deixa para trás é um pedaço do seu futuro que deixa de existir”

(Steve Jobs)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	17
RESUMO.....	19
ABSTRACT.....	21
1 INTRODUÇÃO.....	23
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	27
2.1 <i>Candida albicans</i>	27
2.2 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	34
2.3 Modelo experimental de invertebrado - <i>Galleria mellonella</i>	40
3 PROPOSIÇÃO.....	51
4 MATERIAL E MÉTODO.....	52
4.1 Cepas de Micro-organismos.....	52
4.2 Interação de <i>Candida albicans</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> em modelos <i>in vitro</i>	52
4.2.1 Grupos experimentais.....	52
4.2.2 Estudo dos efeitos de <i>Lactobacillus acidophilus</i> sobre biofilmes de <i>C. albicans</i>	54
4.2.2.1 Preparo da suspensão padronizada de <i>Candida albicans</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i>	54
4.2.2.2 Preparo do sobrenadante da cultura de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	55
4.2.2.3 Formação dos biofilmes de <i>Candida albicans</i>	55
4.2.2.4 Determinação do número de UFC/mL.....	56
4.2.2.5 Efeitos de <i>Lactobacillus acidophilus</i> sobre biofilmes de <i>C. albicans</i> : análise por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	57

4.2.3 Estudo dos efeitos de <i>L. acidophilus</i> sobre a filamentação de <i>Candida albicans</i>	58
4.3 Interação de <i>Lactobacillus acidophilus</i> com <i>Candida albicans</i> em modelo experimental de <i>Galleria mellonella</i>.....	60
4.3.1 Grupos experimentais	60
4.3.2 <i>Galleria mellonella</i>	61
4.3.3 Verificação da susceptibilidade de <i>Galleria mellonella</i> à infecção por <i>Lactobacillus acidophilus</i>	62
4.3.4 Efeitos de <i>Lactobacillus acidophilus</i> na candidose experimental em <i>Galleria mellonella</i>	62
4.3.4.1 Preparo da suspensão de <i>Candida albicans</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i>	62
4.3.4.2 Injeção de micro-organismos em <i>Galleria mellonella</i>	63
4.3.4.3 Determinação da curva de sobrevivência de <i>Galleria mellonella</i>	64
4.3.4.4 Estudo de cultura de tecidos - Contagem de UFC/mL.....	65
4.3.4.5 Análise histológica de <i>G. mellonella</i>	67
4.4 Análise estatística.....	69
5 RESULTADOS.....	70
5.1 Interação de <i>C. albicans</i> e <i>L. acidophilus</i> em modelos <i>in vitro</i>.	70
5.1.1 Efeito de <i>Lactobacillus acidophilus</i> sobre biofilmes de <i>C. albicans</i> quanto a contagem de UFC/mL.....	70
5.1.2 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	73
5.1.3 Efeitos de <i>L. acidophilus</i> sobre a filamentação de <i>C. albicans</i>	77
5.2 Interação de <i>Lactobacillus acidophilus</i> com <i>Candida albicans</i> em modelo experimental de <i>Galleria mellonella</i>.....	81
5.2.1 Curva de sobrevivência da <i>Galleria mellonella</i>	81
5.2.2 Estudo de cultura de tecidos - Contagem de UFC/ mL.....	84
5.2.3 Análise histológica de <i>G. mellonella</i>	87
6 DISCUSSÃO.....	94

7 CONCLUSÃO	104
8 REFERÊNCIAS	105
ANEXO	115

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Visualização da lâmina utilizada para análise da filamentação de *C. albicans in vitro* com a demarcação dos campos para a contagem do número de hifas presentes. Os pontos brancos representam o local onde foi realizada a contagem do número de hifas presentes em cada campo 59
- Figura 2 - Imagem do modelo experimental de *G. mellonella*. A) *G. mellonella* em posição ventral com detalhamento das prolegues; B) demonstração da injeção de micro-organismo em *G. mellonella* utilizando seringa de Hamilton 64
- Figura 3 - Imagem do modelo experimental de *G. mellonella*. A) lagarta posicionada para retirada da hemolinfa. Seta representa a sequência das incisões para retirada da hemolinfa. Incisão feita logo abaixo da última prolegue esquerda e posteriormente seguindo a linha mediana da lagarta até sua região caudal; B) hemolinfa sendo retirada após a incisão; C) tubo *ependorf* com a quantidade de hemolinfa referente ao *pool* de 6 lagartas 66
- Figura 4 - Sequência da retirada do corpo de gordura da lagarta *G. mellonella*. A) corte transversal realizado na parte ventral da lagarta (seta); B) pressão lateral realizada na lagarta para remoção do corpo de gordura; C) visualização do corpo de gordura após ter sido retirado da lagarta ; D) comparação do corpo de gordura em relação ao tamanho da lagarta 68
- Figura 5- Média e desvio padrão (Log_{10}) de UFC/mL de *L. acidophilus* do grupo interação *C. albicans* e célula de *L.*

acidophilus nos tempos de crescimento da cultura de *L. acidophilus* 4, 6, 18 e 24h. Verificou-se o comportamento semelhante entre os tempos testados, sem diferença estatisticamente significativa (Teste de ANOVA, $p \leq 0,05$) 72

Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura do grupo controle *C. albicans* e PBS. A) Verifica-se a aderência de *C. albicans* ao corpo de prova de poliestireno e a presença de pseudohifas, aumento original: 2000x; B) Presença de hifa, leveduras, aumento original: 10000x 74

Figura 7 - Microscopia eletrônica de varredura do grupo interação *C. albicans* e célula de *L. acidophilus*. A) Verifica-se a aderência de *C. albicans* e *L. acidophilus* ao corpo de prova de poliestireno, com predomínio de leveduras de *C. albicans*. Presença de células de *L. acidophilus* aderidas às hifas e leveduras de *C. albicans*, aumento original: 2000x; B) Verifica-se íntima interação entre *C. albicans* e *L. acidophilus*, aumento original: 10000x..... 75

Figura 8 - Microscopia eletrônica de varredura do grupo interação *C. albicans* e sobrenadante de *L. acidophilus*. A) Verifica-se aderência de *C. albicans* ao corpo de prova de poliestireno com predomínio de leveduras sem presença de hifas, aumento original: 2000x. B) Presença de várias leveduras. Aumento original: 10000x..... 76

Figura 9 - Microscopia óptica com a visualização da filamentação de *C. albicans in vitro*. A) Grupo controle *C. albicans* e PBS; B) Grupo interação *C. albicans* e célula de *L. acidophilus*. C) Grupo interação *C. albicans* e sobrenadante de *L. acidophilus*; D) Grupo controle *C. albicans* e caldo MRS. Verifica-se nas imagens A e B morfologia semelhante com presença predominante de hifas e nas

imagens C e D presença de hifas e leveduras, aumento original:
400x 78

Figura 10 - Quantificação de hifas nos testes de filamentação de *C. albicans in vitro*. Mediana e valor de p dos escores atribuídos aos diversos grupos experimentais. A) Comparação entre grupo controle *C. albicans* e PBS e grupo interação *C. albicans* e célula de *L. acidophilus*. Verifica-se a presença de uma quantidade menor de hifas no grupo da interação ao ser comparado ao grupo controle, valor de $p= 0,0002$; B) Comparação entre grupo controle *C. albicans* e PBS e grupo interação *C. albicans* e sobrenadante de *L. acidophilus*. Verifica-se a presença de um número menor de hifas no grupo da interação ao ser comparado ao grupo controle, valor de $p= 0,0002$; C) Comparação entre grupo controle *C. albicans* e PBS e grupo controle *C. albicans* e caldo MRS. Não ocorreu redução estatisticamente significativa na quantidade de hifas presentes na comparação dos dois grupos, $p= 0,3445$ (teste estatístico Mann-Whitney)..... 80

Figura 11 - Curva de sobrevivência em *G. mellonella* dos diferentes grupos experimentais. Verificou-se que no grupo controle PBS não ocorreu morte de nenhuma lagarta. Para os grupos controle *C. albicans* e PBS ou caldo MRS, profilático ou terapêutico, houve morte de 100% das lagartas em até 48 h 82

Figura 12 - Média e desvio padrão (Log_{10}) dos diferentes grupos experimentais nos tempos de 0, 4, 8, 12, 18 e 24 h. A) Controle *C. albicans* e caldo MRS.; B) Interação *C. albicans* e célula *L. acidophilus*; C) Interação *C. albicans* e sobrenadante *L. acidophilus*. Verifica-se o comportamento semelhante dos grupos em relação ao crescimento de *C. albicans* nos diferentes tempos da infecção..... 85

Figura 13 - Média e desvio padrão (Log_{10}) de UFC/mL de <i>L. acidophilus</i> do grupo da interação <i>C. albicans</i> e célula de <i>L. acidophilus</i> nos tempos de 0, 4, 8, 12, 18 e 24 h. Verificou-se o comportamento semelhante entre os tempos testados, sem diferença estatisticamente significativa (Teste de ANOVA, $p \leq 0,05$)...	87
Figura 14 - Corte histológico do corpo do gordura de <i>G. mellonella</i> do grupo controle PBS. Observa-se a presença dos túbulos de Malpighi (tm), parte do intestino (int) e trofócitos (t) HE; aumento original: 100x	88
Figura 15 - Corte histológico do corpo do gordura de <i>G. mellonella</i> do grupo controle PBS. Observa-se a presença da traquéia (tr) envolvida pelos trofócitos do corpo de gordura. HE; aumento original: 630x	89
Figura 16 - Corte histológico do corpo do gordura de <i>G. mellonella</i> do grupo controle PBS. Observa-se a presença do túbulo de Malpighi (tm) responsável pela remoção dos excretas presentes na hemolinfa, HE; aumento original: 630x	89
Figura 17 - Corte histológico do corpo do gordura de <i>G. mellonella</i> do grupo controle PBS. Observa-se a presença de trofócitos (t) com os núcleos irregulares e os enócitos (e). HE; aumento original: 630x	90
Figura 18 - Média e desvio padrão (Log_{10}) da área ocupada por hifas e/ou leveduras dos diferentes grupos experimentais após 18h de infecção. (Teste ANOVA , $p \leq 0,05$)	91
Figura 19 - Corte histológico do corpo do gordura de <i>G. mellonella</i> do grupo controle PBS. A) Aspecto normal do corpo de gordura. PAS; aumento original: 100x; B) Setas destacam as principais	

células presentes no corpo de gordura da lagarta, trofócitos (t) e enócitos (en). PAS; aumento original: 1000x 91

Figura 20 - Corte histológico do corpo do gordura de *G. mellonella* do grupo interação *C. albicans* e célula de *L. acidophilus*. A) Observar-se parte do intestino da lagarta (int) e nas setas escuras a presença dos agrupamentos de hifas e leveduras. PAS; aumento original: 100x; B) Observa-se a presença de hifas e leveduras. PAS; aumento original: 1000x 92

Figura 21 - Corte histológico do corpo do gordura de *G. mellonella* do grupo interação *C. albicans* e sobrenadante de *L. acidophilus*. A) Observa-se nas setas escura a presença aglomerados de hifas e leveduras. PAS; aumento original: 100x; B) Observa-se a presença de hifas e leveduras em maior aumento. PAS; aumento original: 1000x 92

Figura 22 - Corte histológico do corpo do gordura de *G. mellonella* do grupo controle *C. albicans* e PBS. A) Observa-se na seta escura a presença aglomerados de hifas e leveduras. PAS; aumento original: 100x; B) Observa-se a presença de hifas e leveduras em maior aumento. PAS; aumento original: 1000x 93

Figura 23 - Corte histológico do corpo do gordura de *G. mellonella* do grupo controle *C. albicans* e caldo MRS. A) Observa-se nas setas escuras a presença de aglomerados hifas e leveduras. PAS; aumento original: 100x; B) Observa-se a presença de hifas e leveduras em maior aumento. PAS; aumento original: 1000x 93

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Número de ensaios realizados em cada grupo experimental para o estudo dos efeitos de <i>L. acidophilus</i> sobre o biofilme de <i>C. albicans</i>	53
Quadro 2 - Número de ensaios realizados em cada grupo experimental para o estudo dos efeitos de <i>L. acidophilus</i> sobre a filamentação de <i>C. albicans</i>	54
Quadro 3 - Escores utilizados para a contagem de número de hifas presentes em cada campo observado através da microscopia óptica.	60
Quadro 4 - Grupos experimentais e número de lagartas utilizadas por experimento em modelo de <i>G. mellonella</i>	61
Tabela 1 - Média e desvio padrão do número de UFC/mL (\log_{10}) obtidos a partir da contagem de <i>C. albicans</i> nos biofilmes do Grupo controle <i>C. albicans</i> e PBS e Grupo Interação <i>C. albicans</i> e célula de <i>L. acidophilus</i> nas diferentes fases de crescimento da cultura de <i>L. acidophilus</i>	70
Tabela 2 - Média e desvio padrão do número de UFC/mL (\log_{10}) obtidos a partir da contagem de <i>C. albicans</i> nos biofilmes do Grupo controle <i>C. albicans</i> e PBS e Grupo Interação <i>C. albicans</i> e sobrenadante de <i>L. acidophilus</i> no tempo de 24h de crescimento da cultura de <i>L. acidophilus</i>	71
Tabela 3 - Média e desvio padrão do número de UFC/mL (\log_{10}) obtidos a partir da contagem de <i>C. albicans</i> nos biofilmes do grupo	

Controle <i>C. albicans</i> e PBS e Controle <i>C. albicans</i> e caldo MRS no tempo de 24h de crescimento da cultura de <i>L. acidophilus</i>	72
Tabela 4 - Média, desvio-padrão (DP) e mediana obtidos a partir da contagem do número de hifas de <i>C. albicans</i> presentes após 24 h da indução da filamentação <i>in vitro</i> do grupo controle <i>C. albicans</i> e PBS e grupo Interação <i>C. albicans</i> e célula de <i>L. acidophilus</i>	79
Tabela 5 - Média, desvio-padrão (DP) e mediana obtidos a partir da contagem do número de hifas de <i>C. albicans</i> presentes após 24 h da indução da filamentação <i>in vitro</i> do grupo Controle <i>C. albicans</i> e PBS e grupo Interação <i>C. albicans</i> e sobrenadante de <i>L. acidophilus</i>	79
Tabela 6 - Média, desvio-padrão (DP) e mediana obtidos a partir da contagem do número de hifas de <i>C. albicans</i> presentes após 24 h da indução da filamentação <i>in vitro</i> do grupo controle <i>C. albicans</i> e PBS e grupo controle <i>C. albicans</i> e caldo MRS.....	79
Tabela 7 - Valores de p comparando os grupos do experimento da curva de sobrevivência em <i>G. mellonella</i>	84
Tabela 8 - Médias e desvio-padrão dos números de UFC/mL de <i>C. albicans</i> (Log10) obtidos nos ensaios realizados, nas diferentes condições experimentais.....	86
Tabela 9 - Valores de p relativos à contagem de UFC/mL após 24h de infecção em <i>G. mellonella</i>	86

Vilela SFG. Influência de *Lactobacillus acidophilus* sobre biofilme formado por *Candida albicans in vitro* e infecção em modelo de invertebrado [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2013.

RESUMO

As interações entre fungos e bactérias são abundantes na natureza e tem importância médica e ambiental. O desenvolvimento adequado de modelos *in vitro* e *in vivo* para caracterizar essas interações é essencial para o entendimento do desenvolvimento da doença e descoberta de novas estratégias terapêuticas. O objetivo desse estudo foi avaliar as interações entre *Lactobacillus acidophilus* e *Candida albicans* em modelos de estudo *in vitro* e em modelo experimental de invertebrado. No estudo *in vitro*, foram avaliados os efeitos de *L. acidophilus* sobre a formação de biofilme por *C. albicans* e sobre a capacidade de filamentação de *C. albicans*. Em ambos os testes, foram avaliados os efeitos diretos das células de *L. acidophilus* sobre *C. albicans* e também os efeitos indiretos, utilizando apenas o sobrenadante da cultura de Lactobacilos. Além disso, foram testados os efeitos de *L. acidophilus* sobre *C. albicans* em diferentes fases de crescimento da cultura bacteriana (4, 6, 18 e 24 h). Para a realização do estudo *in vivo*, as cepas de *L. acidophilus* foram inoculadas juntamente com *C. albicans* em lagartas de *Galleria mellonella* para indução de infecção experimental. Os efeitos de *L. acidophilus* sobre a candidose experimental foram avaliados pela análise de curva de sobrevivência de *G. mellonella*, quantificação de UFC/mL de *C. albicans* e avaliação histológica da filamentação de *C. albicans* nos tecidos do hospedeiro. Os resultados dos testes *in vitro* e da contagem de UFC/mL em *G. mellonella* foram submetidos à Análise de Variância e teste de Tukey. Os dados obtidos na curva de sobrevivência de *G. mellonella* foram analisados pelo método de Log-rank. ($P \leq 0,05$). Os resultados *in vitro* demonstraram que a cultura de 24 h de *L. acidophilus* foi capaz de inibir a formação de biofilme e a filamentação por *C. albicans*. Esses efeitos inibitórios também foram observados quando o sobrenadante da cultura de *L. acidophilus* foi colocado em contato com *C. albicans*, sugerindo que a ação inibitória ocorreu pela secreção de substâncias bacterianas. No estudo *in vivo*, verificou-se que a injeção de *L. acidophilus* em lagartas de *G. mellonella* infectadas por *C. albicans* aumentou significativamente a sobrevivência desses animais. Além disso, o número de UFC/ mL de *C. albicans* na hemolinfa das lagartas com

candidose experimental foi menor no grupo que recebeu inoculação de *L. acidophilus* em relação ao grupo controle. Entretanto, não foi possível observar ação inibitória de *L. acidophilus* sobre a filamantação de *C. albicans* nos tecidos de *G. mellonella*. Concluiu-se que *L. acidophilus* inibiu a formação de biofilme por *C. albicans* in vitro e protegeu *G. mellonella* da candidose experimental *in vivo*. Além disso, *G. mellonella* mostrou ser um modelo adequado para o estudo da interação entre essas duas espécies estudadas.

Palavras-chave: *Candida albicans*. *Lactobacillus acidophilus*. *Galleria mellonella*.

Vilela SFG. *Interactions between Candida albicans and Lactobacillus acidophilus: biofilm formation in vitro and study in invertebrates models [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2013.*

ABSTRACT

Interactions between fungi and bacteria are abundant in nature and are of medical and environmental importance. The developments of adequate models in vitro and in vivo to characterize these interactions are essential to understand diseases and to discover new therapeutic strategies. The aim of this study was to evaluate the microbial interactions between Lactobacillus acidophilus and Candida albicans on in vitro study models and experimental models of invertebrates. In the in vitro study, we analyzed the effects of L. acidophilus on C. albicans biofilm formation as well as its filamentation ability. On both tests, the direct effects of L. acidophilus cells and indirect effects of the supernatant culture of L. acidophilus were evaluated, as well as the L. acidophilus effects on C. albicans at different bacterial culture growth stages (4, 6, 18 and 24h). To perform the in vivo study, L. acidophilus and C. albicans strains were inoculated in Galleria mellonella model to induce experimental infection. The L. acidophilus effects on experimental candidosis have been evaluated by the analysis of the survival killing curve of G. mellonella, quantify C. albicans colony forming units per millimeter (CFU/mL) and through histological evaluation of C. albicans filamentation ability on the host tissues. The in vitro test results and the CFU/mL number in G. mellonella were submitted to ANOVA and Tukey's test. The obtained data on G. mellonella killing curves have been analyzed using the long-rank test method. A 5% significance level has been considered on all tests. The in vitro results showed that the L. acidophilus 24 hour culture was able to inhibit the formation of biofilm and filamentation by C. albicans. These inhibitory effects were also observed when the supernatant of the L. acidophilus culture was placed in contact with C. albicans, suggesting that the inhibitory action occurred by the secretion of bacterial substances. It was found in the in vivo study that the injection of L. acidophilus in G. mellonella larvae infected by C. albicans significantly increased the survival of these animals. Moreover, the number of CFU/mL of C. albicans in the hemolymph of caterpillars with experimental candidosis was lower in the group that received L. acidophilus inoculation when compared to the control group. However, it has not been possible to observe inhibitory

action of L. acidophilus on the filamentation of C. albicans in the G. mellonella tissues. It was concluded that L. acidophilus inhibited biofilm formation by C. albicans in vitro and protected G. mellonella from the in vivo experimental candidosis. Furthermore, G. mellonella has proved to be a suitable model for the study of the interaction between these two species studied.

Keywords: Candida albicans. Lactobacillus acidophilus. Galleria mellonella.

1 INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é colonizada por diferentes espécies microbianas que normalmente encontram-se organizadas em biofilmes (Jarosz et al., 2009). Os biofilmes são estruturas tri-dimensionais de comunidades microbianas aderidas a uma superfície sólida (Harriott, Noverr, 2011; Zijngge et al., 2010) e inseridas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares mostrando características fenotípicas que a diferenciam da forma planctônica (Seneviratne et al., 2008).

A presença da matriz extracelular é uma das características determinantes dos biofilmes bacterianos e fúngicos. Este material complexo defende os micro-organismos contra as células fagocíticas, serve como sustentação para a manutenção da integridade do biofilme e para limitar a difusão de substâncias tóxicas (Blankenship, Mitchell, 2006; Nadell et al., 2009). Segundo dados recentes, estima-se que pelo menos 80% de todas as infecções humanas estejam relacionadas com biofilmes microbianos (Harriott, Noverr, 2011) que possuem alta resistência aos agentes antimicrobianos em comparação com os seus homólogos planctônicos (Ten Cate et al., 2009; Thein et al., 2009)

Doenças infecciosas estão geralmente relacionadas a biofilmes polimicrobianos o que torna o tratamento mais difícil. Antimicrobianos administrados para uma determinada espécie em um biofilme heterotípico, muitas vezes pode facilitar organismos não alvo a se desenvolverem e continuarem a infecção (Thein et al., 2009).

A elucidação dos mecanismos de interação entre diferentes espécies microbianas é extremamente importante para a

compreensão das doenças infecciosas e para o desenvolvimento de novos medicamentos. Apesar da abundante interação entre fungos e bactérias na natureza, nosso conhecimento sobre os mecanismos moleculares que determinam essas interações e sua importância na saúde humana ainda é escasso. Os micro-organismos possuem mecanismos complexos para garantir sua sobrevivência, que os defendem não apenas das condições ambientais adversas, mas também contra micro-organismos competidores (Peleg et al., 2010).

As interações entre as diferentes espécies podem ser de natureza competitiva, neutra ou benéfica e a presença de uma segunda espécie pode influenciar na formação do biofilme da primeira (van Merode et al., 2007). Bactérias e fungos podem influenciar uns aos outros pela secreção de moléculas extracelulares, por interações físicas de contato celular ou agregação. A interação de bactérias com leveduras e hifas em biofilmes tem sido associada com redução da viabilidade fúngica, que pode ser atribuída à secreção de moléculas antifúngicas por bactérias, pela transferência direta de toxinas das bactérias para as células fúngicas ou pela depleção de nutrientes. Outro mecanismo de interação entre bactérias e fungos é a modificação nas condições ambientais, como a mudança no pH, que pode influenciar a formação de hifas por *C. albicans*. Além das interações antagônicas, interações mutuamente benéficas em biofilmes polimicrobianos têm sido também observadas, nas quais as diferentes espécies podem fornecer proteção uma para outra contra o sistema imunológico ou aos agentes antimicrobianos (Peleg et al., 2010).

Candida é um patógeno humano, que além de causar candidose bucal, pode provocar várias doenças polimicrobianas devido à sua capacidade em formar biofilmes multi-espécies (Pukkila-Worley et al., 2009). *Candida albicans* é a espécie mais prevalente na formação de biofilme fúngico podendo causar tanto infecções superficiais com sistêmicas (Harriott, Noverr, 2011).

O estudo de espécies de *Candida* é importante, pois este

micro-organismo é o quarto agente nosocomial de infecções da corrente sanguínea, sendo que as taxas de mortalidade de infecções por *Candida* são superiores a 50%. *C. albicans* é responsável por 62% das infecções de candidose invasiva geralmente isolado a partir da cavidade oral, trato gastrointestinal e da vagina (Silverman et al., 2010). A presença desse fungo na cavidade bucal funciona como um reservatório para a inoculação e infecções em outras partes do corpo (Ten Cate et al., 2009). Quando penetra no epitélio e invade os tecidos do hospedeiro, pode atingir a corrente sanguínea e levar a infecções sistêmicas (Pfaller, Diekema, 2007).

Foi demonstrado que nas interações entre *Candida* e *Lactobacillus*, as células de *Lactobacillus* apresentam efeitos inibitórios sobre as leveduras do gênero *Candida* (Fitzsimmons et al., 1994; Thein et al., 2006). Este princípio é amplamente usado nos tratamentos ou técnicas com probióticos, nos quais Lactobacilos utilizados em alimentos ou medicamentos são administrados para aliviar infecções fúngicas do trato gastrointestinal (Thein et al., 2006; Hasslof et al., 2010).

Trabalhos de interação entre bactérias bucais e *Candida albicans* tem sido realizados principalmente em modelos de biofilme *in vitro*. Modelos *in vivo* para o estudo de infecções microbianas são escassos e restritos a ratos e camundongos. Recentemente, modelos de infecção em invertebrados foram desenvolvidos por apresentarem inúmeras vantagens em relação aos modelos de mamíferos, como baixo custo, facilidade de manuseio e possibilidade de trabalho em grande escala (Cotter et al., 2000; Pukkila-Worley et al., 2009; Rowan et al., 2009; Fuchs et al., 2010b). Entre os vários modelos de invertebrados podemos citar a lagarta da mariposa *Galleria mellonella*, que tem sido utilizada para estudos de patogênese e virulência de micro-organismos, como as leveduras do gênero *Candida*.

O desenvolvimento apropriado de modelos *in vitro* e *in vivo* para caracterizar as interações microbianas é imperativo (Peleg et al.,

2010). A busca de modelos alternativos *in vivo* para o estudo das interações microbianas com a possibilidade do uso de um número maior de espécimes antes da realização de experimentos em modelos de vertebrados é atualmente uma possibilidade real e interessante a ser desenvolvida.

Portanto, diante do exposto, a proposta desse trabalho foi estudar a influência de *Lactobacillus acidophilus* sobre biofilme formado por *Candida albicans in vitro* e infecção em modelo de *Galleria mellonella*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Candida albicans*

Candida albicans é um fungo que coloniza as superfícies mucosas dos seres humanos, persistindo nestes nichos como comensais em até 60% dos indivíduos saudáveis (Diaz et al., 2012). Alterações na imunidade do hospedeiro, microbiota bacteriana, fatores ambientais ou locais, podem resultar na transição para fase patogênica, permitindo que qualquer órgão do corpo humano seja afetado, podendo resultar em infecções graves (Lu et al., 2006; Williams et al., 2011). *C. albicans* é o patógeno mais prevalente na formação de biofilme fúngico e pode causar tanto infecções superficiais como sistêmicas (Harriott, Noverr, 2011).

A espécie *C. albicans* possui uma variedade de fatores de virulência, como a aderência, que permite iniciar a colonização nas superfícies sólidas dos tecidos bucais e a formação de hifas, que facilita a adesão às superfícies hospedeiras (Waltimo et al., 2004).

Em biofilmes fúngicos o passo inicial da formação do biofilme consiste na adesão de células na forma de levedura ao substrato. É seguido por uma fase de filamentação e proliferação celular, o que resulta na formação de múltiplas camadas de células de diferentes morfologias, incluindo pseuhifas, leveduras e hifas. O próximo passo é a maturação que resulta em uma rede complexa de células incorporada ao material extracelular polimérico, composto de hidratos de carbono, proteínas, hexosamina, fósforo e ácido urônico, bem como constituintes do hospedeiro. Existem evidências de que glicoproteínas do hospedeiro, ácidos nucleicos e células, tais como neutrófilos, podem participar na

maturação da matriz do biofilme, principalmente em sítios da mucosa (Tournu, Van Dijck, 2012).

Os biofilmes microbianos têm sido amplamente estudados na literatura e diferentes técnicas para formação de biofilme *in vitro* já foram propostas (Hawser, Douglas, 1995; Bandara et al., 2010; Jin et al., 2004; Thein et al., 2007; Pereira et al., 2011; Pereira et al., 2012; Anami et al., 2012; Costa et al., 2012; Junqueira et al., 2011; Junqueira et al., 2012). O modo de desenvolvimento do biofilme *in vitro* pode influenciar no perfil da sensibilidade das leveduras sendo que o biofilme formado em agitação suave produz mais substância polimérica extracelular do que o biofilme formado em condições estáticas, além de assemelhar-se com o que acontece *in vivo* (Hawser, Douglas, 1995; Blankenship, Mitchell, 2006).

A aderência às células do hospedeiro é o primeiro passo para o estabelecimento de uma infecção. As proteínas da parede celular dos fungos são importantes para a estabilidade e atuam como fatores de virulência e determinantes antigênicos. Entre as proteínas da parede celular de *C. albicans* encontram-se as proteínas PIR1 e PIR32. A proteína PIR1 está envolvida na rigidez da parede celular e PIR32 parece ser importante no contato com macrófagos. Bahnan et al. (2012) realizaram um estudo para caracterizar a proteína PIR32 em relação à capacidade de filamentação, resistência ao estresse oxidativo e agentes antimicrobianos, capacidade de adesão, formação de biofilme, virulência em modelo de camundongo e quantidade de quitina presente na parede celular. Utilizou-se nesse experimento uma cepa geneticamente modificada sem a presença da proteína e uma cepa padrão contendo PIR32. Não houve diferença estatística entre as cepas estudadas quanto à filamentação em ágar, filamentação em soro fetal bovino, sensibilidade antifúngica ao fluconazol, anfotericina B, caspofungina e ao choque térmico. Entretanto, a cepa mutante foi mais resistente ao estresse oxidativo do que a cepa padrão. A cepa mutante também apresentou

menor aderência às células epiteliais, incapacidade de formar biofilme *in vitro* e menor virulência em camundongos. Além disso, foi verificado um aumento de duas vezes na quantidade de quitina na parede celular da cepa mutante em comparação com a cepa padrão. Os autores relataram que a deleção de PIR32 na cepa mutante estimulou a produção de quitina tornando a parede celular mais resistente, provavelmente devido à presença de mecanismos compensatórios.

Martins et al. (2007) realizaram um estudo para avaliar o efeito de sobrenadantes obtidos a partir de culturas de *C. albicans* e *C. dubliniensis* sobre a morfogênese dessas espécies. Inicialmente foi realizada a cromatografia gasosa dos sobrenadantes, verificando que as duas espécies possuíam basicamente os mesmos componentes: álcool isoamílico, 2-feniletanol, E-nerolidol, e E-farnesol. Em seguida, testaram o efeito destas substâncias sobre células planctônicas e biofilmes formados por *C. albicans* ou *C. dubliniensis*, observando que esses alcoóis inibiram a transição da forma de levedura para a forma filamentosa em até 50%. Sendo assim, os autores concluíram que essas moléculas de sinalização secretadas por espécies de *Candida* em diferentes condições de crescimento (planctônico e biofilme), interferem nas interações inter e intra espécies de *Candida*.

O butirato é um ácido graxo de cadeia curta produzido por várias bactérias humanas comensais, tais como espécies de *Lactobacillus*, que inibem o crescimento fúngico e reduzem a adesão de *C. albicans*. Nguyen et al. (2011) avaliaram a atividade antifúngica de butirato de sódio sobre cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*. As características de crescimento e virulência das leveduras foram testadas *in vitro* e durante a interação com macrófagos. Para testar a capacidade do butirato de sódio em inibir o crescimento, as células de levedura foram cultivadas em YNB com ou sem adição desse ácido. Verificou-se que houve inibição significativa do crescimento das leveduras que foi dependente da concentração testada,

sendo que 60 mM de butirato de sódio resultaram em redução de 33 a 57% de *C. albicans* e *C. parapsilosis* e 60 a 82% de *C. neoformans*. Além disso, a presença de butirato de sódio inibiu a filamentação de *C. albicans*, a formação da cápsula de melanina por *C. neoformans* e a formação de biofilme por *C. neoformans*, *C. parapsilosis* e *C. albicans*. Foi avaliado também o sinergismo com antifúngicos, no qual butirato de sódio a 40 mM resultou em um aumento significativo da susceptibilidade de todas as leveduras ao fluconazol. Para avaliar o efeito na viabilidade de macrófagos, foi realizado o ensaio de redução MTT. Verificou-se que a presença do butirato de sódio fortaleceu a viabilidade de macrófagos durante a infecção e aumentou as funções efetoras dessas células. Estes resultados demonstraram que o butirato de sódio exerce atividade antifúngica significativa em leveduras patogênicas e melhora a ação antimicrobiana dos macrófagos.

Silverman et al. (2011) investigaram o papel da Als3p no estágio inicial da formação de biofilmes de *C. albicans* e na interação com *Streptococcus gordonii*. Als3p é uma glicoproteína hifa-específica envolvida na adesão de *Candida* aos tecidos do hospedeiro sendo necessária para a formação do biofilme maduro. Essa glicoproteína pertence a uma das principais famílias de adesinas em *C. albicans*, conhecidas como *agglutinin-like sequence* (Als). No estudo de Silverman et al. (2011), lamínulas de vidro foram revestidas com proteínas salivares humanas e incubadas em suspensões de *C. albicans* selvagem ou mutante com deleção de Als3p. Em intervalos, ao longo de 6 h, os biofilmes foram corados com cristal de violeta e visualizados por microscopia de luz. Verificou-se que no período entre uma a três horas após a incubação não houve diferença na formação das hifas. Após 6 h, a cepa selvagem de *C. albicans* formou um biofilme denso composto por emaranhados de hifas, leveduras e pseudohifas. No entanto, a cepa mutante não apresentou formação de biofilme maduro, sendo que apenas algumas hifas e leveduras permaneciam ligadas à superfície da película

revestida por proteínas salivares. Estes resultados sugerem que, embora a formação de biofilme tenha sido iniciada na cepa mutante, as células de *Candida* não permaneceram ligadas à superfície devido à deleção de *Alsp3*.

Nas mucosas, *C. albicans* co-existe com uma microbiota bacteriana altamente diversificada. A formação de biofilmes nas mucosas leva a interação destes fungos com várias espécies bacterianas (Diaz et al., 2012). Há evidências claras de que as interações polimicrobianas têm um papel central no contexto da doença humana (Tournu, Van Dijck et al., 2012). É importante ressaltar que a constituição destes biofilmes pode ser de difícil diagnóstico e tratamento, necessitando algumas vezes da administração de um complexo de fármacos ou de diferentes estratégias de tratamento (Harriott, Noverr, 2011).

Estudos de revisão de literatura mostram inúmeros artigos publicados sobre biofilmes de *Candida* nas últimas duas décadas. No entanto, a maioria destes dados estão baseados em monoespécies, sendo que os estudos sobre biofilmes mistos de espécies de *Candida* ou combinados com bactérias ainda são escassos (Thein et al., 2009; Harriott, Noverr, 2011). Em estudos de biofilmes contendo bactérias associadas com *C. albicans* foram demonstradas interações desses micro-organismos, que variaram desde uma relação de ajuda mútua até antagonismo entre seus componentes (Morales, Hogan, 2010).

As bactérias podem interagir com *C. albicans* dentro de biofilmes mistos e em particular com as células das hifas (Tournu, Van Dijck, 2012). Algumas bactérias estimulam a formação de hifas, o que pode promover maior invasão dos tecidos do hospedeiro e com isto uma maior virulência (Morales, Hogan, 2010; Bahnan et al., 2012).

Peters et al. (2010) investigaram a estrutura de biofilmes formados pela interação de *S. aureus* e *C. albicans* com microscopia confocal a laser. As análises revelaram uma arquitetura única do biofilme com *S. aureus* geralmente associado às hifas. Essa interação física pode

proporcionar maior poder de invasão para estafilococos, aumentando a virulência durante a co-infecção. Através da eletroforese em gel foram identificadas 27 proteínas nestes biofilmes polimicrobianos. Entre elas, proteínas importantes para o crescimento, metabolismo e virulência de ambas as espécies. Estes resultados demonstram que a virulência de *S. aureus* além de ser influenciada pelas interações físicas com as hifas de *Candida*, pode ser também regulada por proteínas específicas formadas durante o crescimento microbiano. Segundo esses autores, essas relações microbianas são complexas e envolvem a atuação conjunta de vários fatores.

Na cavidade bucal, tem sido demonstrado que *C. albicans* consegue coagregar com uma variedade de espécies de *Streptococcus* bucais. Partindo do princípio que os estreptococos são os primeiros colonizadores das superfícies da cavidade bucal, essa coagregação pode favorecer a colonização dos fungos do gênero *Candida*, sendo também importantes para o desenvolvimento de biofilmes polimicrobianos em superfícies protéticas (Bamford et al., 2009).

Entre as infecções bucais, sabe-se que a estomatite protética é provocada por espécies de *Candida* associadas a diferentes bactérias, incluindo *S. aureus*, *E. coli* e *Klebsiella*. A queilite angular também é uma infecção oral de etiologia mista, na qual *C. albicans* está associada à *S. aureus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *E. coli*, *Klebsiella* e *Pseudomonas*. Na periodontite, *Candida* coexiste com outros micro-organismos do biofilme dentário, como *Staphylococcus*, bacilos entéricos, *Pseudomonas* e com vários micro-organismos anaeróbios (Thein et al., 2009).

Dongari-Bagtzoglou et al. (2009) realizaram estudo com o objetivo de caracterizar a estrutura e composição de biofilmes de *Candida* formado sobre a mucosa bucal em modelo de camundongo imunossuprimido. Verificou-se que os biofilmes de *Candida* eram constituídos por leveduras, hifas e bactérias comensais, com queratina

dispersa nos espaços intercelulares e presença de neutrófilos no interior do biofilme. Os autores concluíram que *C. albicans* formam biofilmes complexos nas mucosas bucais com a presença de bactérias comensais e componentes do hospedeiro.

Vários estudos demonstram que a associação entre *C. albicans* e bactérias orais, tais como *Streptococcus*, *Actinomyces* e *Fusobacterium* levam a interações físicas que contribuem para colonização de espécies de *Candida* em próteses totais. Em contraste, as bactérias que produzem ácido láctico, competem com *C. albicans* na adesão e secretam substâncias que inibem sua fixação. O desequilíbrio na microbiota bacteriana normal causada por tratamento com antibióticos de largo espectro é um fator predisponente associado com a colonização de *C. albicans* em pacientes imunocomprometidos provavelmente devido à diminuição do número de bactérias concorrentes (Morales, Hogan, 2010).

Outro exemplo de interação microbiana é a interação cooperativa entre *C. albicans* e *E. coli*. *E. coli* favorece a adesão de *C. albicans* à mucosa e aumenta a probabilidade de infecções fúngicas. Em contraste, as bactérias comensais que habitam o trato gastrointestinal e aparelho reprodutor feminino, tais como *Lactobacillus* spp., inibem potencialmente o crescimento e virulência de *C. albicans* através da secreção de ácidos orgânicos e produção de peróxido de hidrogênio (Morales, Hogan, 2010).

Diaz et al. (2012) projetaram um sistema para simular o ambiente da cavidade bucal com a presença de fluxo salivar e realizaram experimentos com a formação de biofilmes sobre superfícies abióticas e tecido análogo à mucosa oral e esofágica. Para a formação dos biofilmes foram utilizadas cepas de *C. albicans* associados a estreptococos bucais comensais (*Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus gordonii*). Foi observado que a interação entre as espécies foi sinérgica, na qual a presença de estreptococos aumentou a

capacidade de *C. albicans* para invadir a mucosa oral e esofágica, mesmo na presença de fluxo salivar.

2.2 *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus são bacilos Gram-positivos, anaeróbios facultativos encontrados na microbiota normal do trato gastrointestinal de aves e mamíferos, trato genitourinário e na cavidade bucal humana (Jorge, 2012; Salvana, Frank, 2006).

O gênero *Lactobacillus* foi considerado o principal agente etiológico da doença cárie devido a sua capacidade de produzir grande quantidade de ácido na presença de carboidratos e sobreviver em pH extremamente baixo. Entretanto, atualmente sabe-se que *Lactobacillus* não se acumula em grande quantidade no biofilme dental, estando associado mais com a progressão da cárie dentária (Loesche, 1986; Shivakumar et al., 2009).

Lactobacilos estão também envolvidos na manutenção da microbiota vaginal normal, impedindo o crescimento de organismos patogênicos e oportunistas. Atuam na manutenção da microbiota por meio da ativação do sistema imunológico, competição com outros micro-organismos pela adesão ao epitélio, produção de bacteriocinas, ácido láctico e peróxido de hidrogênio (Chassot et al., 2010). Certos *Lactobacillus* se coagregam com micro-organismos uropatogênicos, fator importante no estabelecimento e manutenção de uma microbiota saudável. Por esta razão, a capacidade de coagregação é considerada um parâmetro importante na seleção de espécies probióticas para uso vaginal (Ekmekci et al., 2009).

Wagner et al. (1997) realizaram estudo em camundongos com candidose bucal e sistêmica, nos quais foram inoculados quatro

espécies de bactérias probióticas, incluindo *L. acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium animalis*. Foi verificado que a presença das bactérias probióticas no trato gastrointestinal prolongou a sobrevivência dos animais testados.

Falagas et al. (2006) realizaram revisão da literatura de 1975 a 2006 para avaliar a utilização de probióticos na prevenção de candidose vulvovaginal recorrente. Concluíram que alguns estudos *in vitro* e ensaios clínicos tiveram resultados positivos sobre a eficácia de determinadas espécies de Lactobacilos sobre *C. albicans*. O resultado foi diferente dependendo da espécie de probiótico testado, dosagem e duração do tratamento. Dentre todos os estudos citados, os autores concluíram que *L. acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum*, podem ser considerados como agentes preventivos em episódios frequentes de candidose vulvovaginal recorrente.

Ekmekci et al. (2009) realizaram estudo *in vitro* para avaliar a capacidade de coagregação de 30 cepas de *Lactobacillus* isoladas do aparelho genital feminino com cepas clínicas e ATCC de *C. albicans* e *C. krusei*. Foi avaliado o grau de coagregação macroscópica e microscopia em diferentes temperaturas de incubação. Todas as cepas de *Lactobacillus* mostraram coagregação com as leveduras. Quanto à temperatura, a melhor coagregação ocorreu na temperatura ambiente e o tratamento térmico de *Lactobacillus* reduziu a coagregação. Os autores concluíram que há poucas evidências de que os probióticos possam efetivamente curar uma vaginite sintomática causada por fungos, no entanto podem ser utilizados para proteger o epitélio vaginal através do mecanismo de coagregação.

Chassot et al. (2010) realizaram estudo para avaliar a influência de *L. acidophilus* sobre a capacidade de adesão de *C. albicans* em anel vaginal contraceptivo. Para o estudo foram utilizados dois isolados vaginais de *C. albicans* e uma cepa ATCC de *L. acidophilus*. Leveduras isoladas e associadas a bactérias foram empregadas nos

ensaios de aderência ao anel e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Neste estudo os isolados de leveduras e lactobacilos aderiram fortemente ao anel após o período de 1 h. Após a coagregação, houve um aumento na capacidade de adesão das leveduras e uma adesão reduzida dos lactobacilos. A microscopia eletrônica de varredura mostrou que os micro-organismos isolados e coagregados se ligaram intimamente às irregularidades do anel. Concluiu-se que o uso de probióticos com base em *L. acidophilus* ou a sua presença na microbiota vaginal não protege contra a adesão de *C. albicans*, o que difere da maioria dos estudos encontrados na literatura. Segundo os autores, isto pode ter ocorrido devido à diferença dos mecanismos de adesão entre as superfícies celulares e inertes. Um dos grandes desafios da pesquisa é coincidir as condições experimentais *in vitro*, tanto quanto possível, com o que ocorre *in vivo*.

Keller et al. (2011) realizaram estudo para investigar a capacidade *in vitro* de Lactobacilos probióticos inibirem o crescimento de coagregados de *S. mutans* coletados da cavidade oral de pacientes com níveis contrastantes de cáries (livres de cárie, susceptíveis a cárie e com lesões de cárie tratadas). Para o experimento, foram utilizadas oito cepas de Lactobacilos probióticos disponíveis comercialmente (*L. plantarum* 931, *L. plantarum* 299v, *L. paracasei* F19, *L. rhamnosus* GG., *L. rhamnosus* LB21, *L. reuteri* DSM17938, *L. reuteri* ATCC PTA 5289 e *L. acidophilus* LA5). A coagregação foi determinada através da avaliação da densidade óptica em períodos de tempo determinados (1, 2, 3 e 4 h após a inoculação) com o auxílio do espectrofotômetro e a inibição do crescimento com a técnica de difusão em ágar. Todos Lactobacilos probióticos apresentaram capacidade de coagregação com as cepas de *S. mutans*. Os Lactobacilos inibiram o crescimento *S. mutans*, mas a capacidade variou entre as cepas com relação ao pH. Quanto maior o pH menor foi a inibição encontrada. A inibição do crescimento foi também dependente da concentração de células. O crescimento de *S. mutans* foi

totalmente inibido pelos Lactobacilos probióticos na concentração de 10^7 células/mL.

Um modelo de cultura contínua simulando a microbiota do trato gastrointestinal superior de pacientes que necessitam de alimentação enteral foi utilizado para investigar os efeitos de um simbiótico contendo *L. acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium lactis*. Neste estudo, realizado por Smith et al. (2012), houve supressão de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. albicans* e *C. famata* durante o uso do simbiótico. Estes resultados indicam que a utilização de um simbiótico tem o potencial de reduzir a colonização de determinados patógenos em superfícies, diminuindo assim a incidência de biofilmes relacionados com complicações infecciosas.

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar o poder inibitório dos *Lactobacillus* sobre o crescimento e virulência de *C. albicans*, incluindo a produção de peróxido de hidrogênio ou a secreção de ácidos orgânicos (Peleg et al., 2010; Morales, Hogan, 2010).

Sabe-se que os micro-organismos competem diretamente uns com os outros pela produção de vários compostos antimicrobianos, incluindo enzimas bacteriolíticas, bacteriocinas ou biossurfactantes. Estes compostos podem alterar as condições físicas e químicas do ambiente onde os biofilmes estão se desenvolvendo. Lactobacilos constituem uma parte importante da microbiota natural e são reconhecidos como bactérias que produzem agentes antimicrobianos, assim, a prevenção da formação de biofilme por tais derivados naturais é uma abordagem possível, sendo uma estratégia terapêutica atualmente testada (Walencka et al., 2008; Sadowska et al, 2010).

Walencka et al. (2008) realizaram estudo para avaliar se derivados de biossurfactantes de *L. acidophilus* poderiam ser considerados agentes eficazes contra a formação de biofilmes formados por *S. aureus* e *S. epidermidis*. Para preparação do biossurfactante a suspensão de *L. acidophilus* foi centrifugada e o sobrenadante filtrado e

dialisado com água desmineralizada a 4°C. Antes do início dos experimentos, os sobrenadantes foram testados quanto à presença de biossurfactante através da técnica gota colapso. Foi verificada a redução na capacidade de adesão dos biofilmes de *Staphylococcus* na presença da substância. O efeito foi dependente da dose e concentração, sendo que redução mais eficaz na adesão bacteriana ocorreu quando utilizada concentração de 100 µg/mL (56%). A atividade anti-biofilme dos surfactantes foi avaliada por meio de microscopia confocal. A presença desse componente levou a formação de biofilmes que cobriram uma menor área da superfície, com uma diminuição no volume e espessura total. O modo pelo qual os biossurfactantes influenciam as interações da superfície bacteriana parece estar estreitamente relacionado com as alterações na tensão de superfície e carga da parede celular bacteriana. Como resultado, a superfície fica menos favorável para a deposição bacteriana, influenciando a sua capacidade de adesão ou coagregação. O tratamento da superfície do biofilme com biossurfactante pode ser uma forma alternativa para controlar o desenvolvimento do biofilme influenciando a capacidade de adesão de patógenos bacterianos.

Sadowska et al. (2010) realizaram estudo para determinar se isolados clínicos e cepas ATCC de *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *L. acidophilus* poderiam influenciar, direta ou indiretamente, a adesão e a formação de biofilme de *S. aureus*. Foi utilizado neste experimento o método de placa de duas camadas de meio de cultura que mostrou que, dentro dos grupos de bactérias examinadas, apenas *P. aeruginosa* e *L. acidophilus* foram capazes de produzir a substância "*bacteriocin-like inhibitory substance*" (BLIS) limitando significativamente o crescimento de todas as cepas de *S. aureus* testadas. A adesão e o crescimento do biofilme de *S. aureus* foi também inibida pelo sobrenadante de *L. acidophilus*. Além disso, interações competitivas diretas foram observadas entre estafilococos e as demais bactérias, que influenciou a formação de agregados na superfície.

Tomás et al. (2011) avaliaram a ação de substâncias produzidas por Lactobacilos vaginais (*Lactobacillus gasseri*) sobre bactérias uropatogênicas e a sua compatibilidade para o uso como probióticos. Trinta e oito cepas vaginais de *Lactobacillus* foram testadas contra patógenos urogenitais por meio do método de difusão em meio sólido, utilizando o sobrenadante de *Lactobacillus*. Verificaram que 45% dos sobrenadantes inibiram o crescimento de pelo menos um dos microorganismos testados (*S. saprophyticus*, *S. agalactiae*, *Enterococcus* sp., *K. pneumoniae*, *E. coli*), exceto *C. albicans* que não foi inibida nessa metodologia utilizada. Os autores relataram que em outros trabalhos semelhantes ocorreu a inibição do crescimento de cepas de *C. albicans* em meio líquido na presença de *Lactobacillus*, mas não em meios de cultura sólidos. Apesar de 71% das cepas de *Lactobacillus* terem produzido peróxido de hidrogênio, o efeito antimicrobiano oxidativo não foi detectado. A inibição foi alcançada apenas em cepas isoladas de pacientes saudáveis. Estes resultados sugerem que os Lactobacilos presentes na microbiota vaginal infectada podem expressar algumas características diferentes daquelas presentes em um ecossistema vaginal equilibrado, o que poderia estar relacionado com os mecanismos de exclusão competitiva entre bactérias comensais.

As interações entre *Candida* spp. e *Lactobacillus*, normalmente encontradas nas superfícies mucosas do intestino e aparelho reprodutor feminino, tem sido estudadas devido à importância clínica desta relação. Por exemplo, efeitos complicadores no uso de antibióticos sistêmicos, com atividade contra *Lactobacillus*, muitas vezes levam a vaginite causada por espécies de *Candida* (Peleg et al., 2010).

Dentro das duas últimas décadas o conceito de vacinas vivas gerou um grande interesse devido à compreensão imunológica aumentada e a disponibilidade de várias técnicas que tornam o desenvolvimento das vacinas vivas mais seguro. Os probióticos são agentes microbianos viáveis que afetam benéficamente o hospedeiro,

melhorando o equilíbrio de suas comunidades microbianas. O uso de bactérias para induzir uma resposta imune é uma estratégia de vacina interessante. *Lactobacillus* podem ser utilizados em vacinas vivas uma vez que são capazes de interagir com células epiteliais do intestino e células do sistema imunológico que liberam citocinas e regulam a resposta imune (Amdekar et al., 2010).

Estudos utilizando modelos de cultura de células têm também levado pesquisadores a propor que algumas espécies de *Lactobacillus* podem modular a virulência de *C. albicans* através dos efeitos das bactérias na resposta imune do hospedeiro (Peleg et al., 2010). O potencial de Lactobacilos em desempenhar um papel na proteção contra a infecção fúngica é extremamente interessante e merece esforços adicionais de pesquisa.

2.3 Modelo experimental de invertebrado - *Galleria mellonella*

Na literatura foram desenvolvidos vários trabalhos em animais a fim de estudar a ação de fatores predisponentes para a candidose e o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento (Samaranayake Y, Samaranayake L, 2001; Junqueira et al., 2005; Junqueira et al., 2009; Costa et al., 2012). Os modelos *in vivo* mais estudados de infecções microbianas são os ratos e camundongos. Numerosos modelos de infecção, incluindo diferentes animais, como os invertebrados, têm sido utilizados nas últimas décadas para estudar a base molecular da patogenicidade microbiana e interações patógeno-hospedeiro. Estes modelos têm proporcionado notável conhecimento em diferentes aspectos da infecção microbiana (Fedhila et al., 2010).

Os modelos de infecção em invertebrados foram desenvolvidos por apresentarem inúmeras vantagens em relação aos

modelos de mamíferos, como baixo custo, facilidade de manuseio e possibilidade de trabalho em larga escala (Cotter et al., 2000; Pukkila-Worley et al., 2009; Rowan et al., 2009; Fuchs et al., 2010b).

Entre os vários modelos de invertebrados podemos citar a lagarta da mariposa *Galleria mellonella*. O habitat natural desse inseto são as colméias, onde eles se alimentam de pólen, mel e cera de abelha. Dentro de seu ambiente natural, *G. mellonella* tem contato com vários micro-organismos, que são responsáveis pelo desenvolvimento do sistema imune nesses animais. Sua receptividade à infecção, bem como a capacidade de montar uma resposta de defesa faz com que *G. mellonella* seja um modelo interessante de estudo da patogênese microbiana (Fuchs et al., 2010b).

G. mellonella tem sido utilizada com sucesso como modelo para a patogênese de *Candida*, pois apresenta tamanho suficiente para injeção de um inóculo padronizado de micro-organismo. Além disso, as lagartas de *G. mellonella* apresentam hemolinfa com vários tipos de hemócitos, incluindo plasmócitos e granulócitos, que possuem um papel importante na defesa contra patógenos (Mylonakis, 2008). A densidade do hemócito e a sobrevivência da lagarta são indicadores utilizados para verificar a patogenicidade do micro-organismo. Os hemócitos possuem proteínas semelhantes as de neutrófilos humanos, que podem participar no estresse oxidativo que leva a morte do micro-organismo no interior da célula hospedeira (Fuchs, Mylonakis, 2006).

Bergin et al. (2005) realizaram estudo com o objetivo de comparar o mecanismo de fagocitose de cepas de *S. aureus* e *C. albicans* por hemócitos de *G. mellonella* e neutrófilos humanos. Verificou-se que os hemócitos de *G. mellonella* são capazes de fagocitar bactérias e fungos e que a cinética da fagocitose e morte microbiana são semelhantes nos hemócitos de insetos e neutrófilos humanos com a produção de superperóxido e a presença de proteínas homólogas.

Estes modelos experimentais não exigem instalações especializadas para realização dos experimentos e o desenvolvimento da infecção letal é mais rápido do que nas infecções fúngicas em modelos de mamíferos. A maior desvantagem é a ausência de métodos para análise genética e carência de informação sobre o seu genoma, que ainda não foi sequenciado (Mylonakis, Aballay, 2005; Fuchs, Mylonakis, 2006; Mylonakis, 2008).

Destaca-se, porém, dos outros modelos de invertebrados por apresentar diversas formas de introdução do inóculo patogênico. A inoculação pode se feita através de três métodos: aplicação tópica, administração oral e injeção. A aplicação tópica é de fácil execução, entretanto possui como desvantagem a dificuldade de estimar o número de células que penetraram para promover a infecção (Fuchs et al. 2010b). A administração oral é um método que proporciona a entrada do patógeno pela via natural e, portanto, avalia-se o processo de defesa completo do hospedeiro. Este método tem sido utilizado em experimentos com algumas espécies de bactérias que causam intoxicação alimentar (Fedhila et al., 2010; Stenfors Arnesen et al., 2011). O método mais utilizado é a injeção feita diretamente na hemolinfa da lagarta, inoculando-se uma quantidade padronizada de patógeno tanto para estudo da patogênese bacteriana como fúngica (Mylonakis, Aballay, 2005; Fuchs, Mylonakis, 2006; Mylonakis, 2008; Fuchs et al., 2010a).

Outra vantagem deste modelo experimental é a possibilidade da realização dos experimentos com temperaturas que variam entre 25 a 37°C, condições que simulam o ambiente natural dos hospedeiros mamíferos. Outros modelos de invertebrados, tais como *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster* não podem ser mantidos a 37°C e assim os fungos não são estudados na condição térmica em que são patogênicos para os hospedeiros humanos, fator que pode afetar também a expressão gênica do micro-organismo (Fuchs et al., 2010b).

Tem-se mostrado um modelo interessante para comprovação *in vivo* da patogenicidade de espécies de leveduras como *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e de espécies de bactérias como *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *E. coli* e *Bacillus cereus* (Cotter et al., 2000). São modelos úteis para avaliar a virulência de fungos que causam doenças em humanos, uma vez que manifestam resposta imune semelhante à resposta imune inata de mamíferos (Mowlds et al., 2009).

Cotter et al. (2000) testaram a patogenicidade de leveduras do gênero *Candida* em modelos experimentais utilizando *G. mellonella*. Foram inoculadas suspensões microbianas padronizadas na hemolinfa das lagartas e após 72 h as taxas de mortalidade foram quantificadas. *C. albicans* foi a espécie mais patogênica causando morte em 90% das lagartas, enquanto que a taxa de mortalidade para as outras espécies foram proporcionalmente menores, o que está de acordo com estudos realizados em mamíferos.

Brennan et al. (2002) estudaram a patogenicidade de cepas de *C. albicans* mutantes em lagartas de *G. mellonella* e em camundongos. Os autores verificaram que o sistema imune dos insetos e mamíferos compartilham um alto grau de similaridade em termos da resposta imune inata, importante defesa contra infecções fúngicas. Esses dados indicam a possibilidade de redução da utilização de mamíferos em trabalhos experimentais, empregando lagartas de *Galleria* como um mecanismo de triagem primária.

Fuchs et al. (2010a) estudaram o papel da filamentação na virulência de *C. albicans* em modelo experimental de *G. mellonella*. Neste experimento foram utilizadas cinco cepas de *C. albicans* com genes mutantes responsáveis pela filamentação (BCR1, FLO8, KEM1, SUV3 e TEC1). Estudos anteriores relacionados com a indução da filamentação *in vitro* demonstraram que inserção do gene mutante *kem1/kem1* levou a formação apenas de pseudohifas e que a inserção do mutante

surv3/surv3 levou a formação de uma fina camada leveduras (Richard et al, 2005), enquanto a deleção do gene *flo8/flo8* tornou a cepa incapaz da formação de hifas após sua indução (Cao et al, 2006). Estudos anteriores em biofilmes *in vitro* também demonstraram que a inserção do gene mutante *tec1/tec1* levou a formação de hifas defeituosas o que resultou numa fina camada de biofilme enquanto a inserção de *bcr1/bcr1* produziu hifas sem a capacidade de adesão (Nobile, Michell, 2005). No estudo de Fuchs et al. (2010a) a mutação presente nestas cepas resultou também na incapacidade da formação de hifas e alterações na formação de biofilmes *in vitro*. Porém, tanto as cepas virulentas usadas como controle, como as mutantes, produziram leveduras e hifas no interior de *G. mellonella*. Apenas a cepa mutante com a deleção do gene *flo8/flo8*, não formou filamentos e apresentou uma virulência reduzida em *G. mellonella*. Para determinar se estas mutações afetavam as interações entre *C. albicans* e do sistema imune de *G. mellonella*, foi testada a associação, *in vitro*, entre os hemócitos e as cepas mutantes de *C. albicans*. Verificou-se que todas as cepas mutantes e controle tiveram a capacidade de associar-se com hemócitos da hemolinfa de *G. mellonella* (Fuchs et al., 2010a).

No modelo de *G. mellonella* o estudo da filamentação é feito através de cortes histológicos do corpo de gordura da lagarta. O corpo gorduroso é um órgão amorfo, formado por um conjunto de células que constituem camadas ou lóbulos. Essas estruturas estão suspensas na hemocele pela lâmina basal, músculos e traquéias, e estão em contato direto com a hemolinfa, o que facilita o intercâmbio de substâncias com os demais órgãos (Ferreira et al., 2011). Suas células estão fracamente aderidas umas as outras e, dessa forma, tem um grande contato com a hemolinfa, o que possibilita maiores trocas metabólicas entre ambos (Souza, 2009).

O corpo gorduroso dos insetos é um órgão de múltiplas funções, participa diretamente do metabolismo de lipídeos, carboidratos e

proteínas. Analogamente, é semelhante ao fígado nos seres humanos sendo responsável pela remoção substâncias da hemolinfa que serão posteriormente excretadas pelos túbulos de Malpighi (Carvalho, 2008). Apresenta-se em duas formas: a perivisceral, que envolve os órgãos internos da lagarta e na região parietal, localizada próximo ao tegumento (Roma et al., 2006). Diferentes tipos celulares podem estar presentes, porém, as mais comuns são os trofócitos (ou adipócitos) e enócitos, funcionalmente diversificados e capazes de armazenar glicogênio, lipídeos e proteínas. Além disso, são responsáveis pela excreção de substâncias tóxicas absorvidas pela lagarta (Roma et al., 2006, Ferreira et al., 2011).

Junqueira et al. (2011) realizaram estudo para comparar a patogenicidade das diferentes espécies de *Candida* em modelos de infecção com *G. mellonella*. Foram utilizados neste estudo cepas de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. norvegensis*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae* e *C. kefyr* provenientes de isolados orais de saliva e de lesões orofaríngeas de candidose em pacientes HIV positivos. A virulência *in vivo* foi dependente da espécie analisada. *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* foram as espécies mais virulentas em *G. mellonella* com 100% de mortalidade, seguido por *C. lusitaniae* (87%), *C. norvegensis* (37%), *C. krusei* (25%), *C. glabrata* (20%), e *C. kefyr* (12%).

A pesquisa de novos medicamentos é um campo em que os modelos de invertebrados são utilizados. Entre eles destacamos o estudo de McCann et al. (2012), que testaram as propriedades antimicrobianas e a citotoxicidade *in vivo* de um composto de cetoconazol contendo nanopartículas de prata sobre cepas de *C. albicans*. Foram realizados dois experimentos distintos em *G. mellonella*. No primeiro, foi realizado o tratamento profilático e terapêutico das lagartas infectadas. No tratamento profilático, o composto testado foi administrado 1 h antes da infecção com uma dose letal de células patogênicas de *C. albicans* e para

o tratamento da infecção o composto foi administrado após 1 h. No segundo experimento, altas doses do composto testado foram administradas para avaliar a citotoxicidade. Em cada caso, a sobrevivência das lagartas foi avaliada após um intervalo de 72 h. Os resultados mostraram que este composto promoveu tanto a proteção terapêutica e profilática à infecção quando foi administrada uma dose letal de células patogênicas de *C. albicans*. Além disso, *G. mellonella* sobreviveu a doses elevadas dos complexos antimicrobianos administrados.

Há evidências de que o sistema imunológico de *G. mellonella*, também é capaz de distinguir diferentes classes de micro-organismos e responder ao agente invasor. Em estudo realizado por Mak et al. (2010), lagartas de *G. mellonella* foram inoculadas com bactérias Gram-negativas (*E. coli*) e Gram-positivas (*Micrococcus luteus*), bem como com fungos filamentosos e leveduriformes (*C. albicans*, *Fusarium oxysporum*). O estudo demonstrou evidências de que *G. mellonella* distinguiu as diferentes classes de micro-organismos com o aumento de peptídeos específicos na hemolinfa da lagarta dependendo do micro-organismo inoculado.

Inúmeros trabalhos têm sido desenvolvidos em bactérias com este modelo experimental associados com técnicas de biologia molecular e células eucarióticas, para elucidar fatores de virulência relacionados às várias espécies de micro-organismos, bem como a realização de uma triagem inicial com um grande número de cobaias antes da realização de experimentos em mamíferos.

Stenfors Arnesen et al. (2011) realizaram estudo para avaliar o potencial patogênico dependente da temperatura de uma cepa de *Bacillus cereus*. Foi verificado que células vegetativas e o sobrenadante foram patogênicos para o modelo de *G. mellonella* apenas na temperatura de 15°C. Resultado semelhante foi encontrado quando inoculado em células epiteliais e macrófagos. Foi demonstrado que a

baixa temperatura estava relacionada à síntese de várias proteínas envolvidas na virulência como, por exemplo, a enterotoxina HBL e duas proteases, NprB e NprP2, cujo crescimento foi maior na temperatura de 15°C. A quantificação dos níveis de RNAm para estes genes foi realizada por PCR em tempo real quantitativo que mostrou também, neste caso, haver maior quantidade de RNAm, na temperatura mais baixa.

Olsen et al. em 2011 realizaram estudo com cepas de *Streptococcus* do grupo A (GAS). O estudo teve por objetivo desenvolver um modelo de infecção para GAS invasivo em lagartas de *G. mellonella*. Segundo os autores, este novo modelo é particularmente útil para uma rápida triagem de virulência em casos com amostras muito diversificadas. Após a injeção de GAS em *G. mellonella*, foram realizados os seguintes estudos: curva de sobrevivência, contagem de UFC/mL, avaliação da expressão gênica e análise histológica. Verificou-se que GAS provocou danos graves nos tecidos e matou as lagartas dependendo da concentração de células injetadas. Os autores concluíram que a virulência de GAS em *G. mellonella* correlacionou-se fortemente com os dados obtidos em modelos de vertebrados, sugerindo que esse organismo hospedeiro pode ser útil para o estudo da patogênese de *Streptococcus* do grupo A.

Desbois e Coote (2011) avaliaram a lagarta *G. mellonella* como modelo experimental para o estudo da eficácia de agentes antimicrobianos contra *S. aureus* e *S. aureus* meticilina resistentes. Foi demonstrada uma relação direta entre o aumento das doses inoculadas de *S. aureus* e a mortalidade das lagartas, porém, quando foram inoculadas células mortas ou filtrados livres de células, a viabilidade das lagartas permaneceu inalterada. A sobrevivência das lagartas também melhorou com a administração de doses crescentes de antibióticos. O aumento da temperatura de incubação pós-inoculação levou ao aumento da taxa de mortalidade. Os autores concluíram que *G. mellonella* é um

modelo preliminar útil para a avaliação da eficácia *in vivo* de agentes antimicrobianos antes de estudos com mamíferos.

Brackman et al. (2011) avaliaram o efeito de inibidores de *quorum sensing* associados à antibióticos sobre cepas de *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia*. Os experimentos foram realizados em modelos de invertebrados. Uma fração significativamente maior de lagartas de *G. mellonella* infectadas sobreviveu após o tratamento combinado, em comparação com o tratamento somente com antibiótico. Os dados sugerem que antibióticos combinados com inibidores de *quorum sensing* podem aumentar o sucesso de um tratamento através do aumento da eficácia dos antibióticos contra infecções relacionadas com o biofilme.

Oliveira et al. (2011) realizaram estudo para caracterizar genética e fisiologicamente uma proteína (clpB) relacionada com o aumento da capacidade de *Enterococcus faecalis* para sobreviver em condições adversas. A análise revelou que a expressão de clpB é induzida por uma variedade de condições de stress e que inativação de clpB não teve grande impacto sobre a capacidade de *E. faecalis* crescer sob diferentes condições. Porém, quando foi induzida virulência em *G. mellonella* a taxa de mortalidade foi significativamente menor em lagartas infectadas por *E. faecalis* modificados com a deleção de clpB.

No estudo realizado por Evans e Rozen (2012), *G. mellonella* foi utilizada para avaliar o comportamento de *S. pneumoniae* nesse modelo hospedeiro. As lagartas foram inoculadas e a dinâmica da infecção foi determinada através de obtenção de contagens bacterianas. *Galleria mellonella* teve respostas diferentes dependendo da virulência de cada cepa de *S. pneumoniae* e com isto concluiu-se ser um modelo adequado para esse micro-organismo.

Kim Y e Mylonakis (2012) realizaram estudo para avaliar os efeitos de *L. acidophilus* sobre *C. elegans*, outro modelo de invertebrado. Verificaram que *L. acidophilus* não é prejudicial para *C.*

elegans, pois não é capaz de colonizar seu intestino. O experimento mostrou que a exposição de *C. elegans* a cepa probiótica diminuiu significativamente a infecção subsequente por *Enterococcus faecalis* no intestino do nemátodo e prolongou a sobrevivência dos nematóides expostos a cepas patogênicas de *E. faecalis* e *S. aureus*. Entretanto a pré-exposição dos nematóides não forneceu qualquer efeito benéfico quando exposto posteriormente ao *Bacillus subtilis*. Segundo os autores, *L. acidophilus* ativa as principais vias imunes de sinalização de *C. elegans* envolvidas na defesa contra bactérias Gram-positivas. Curiosamente, *L. acidophilus* teve um efeito mínimo sobre a infecção com bactérias Gram-negativas, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Salmonella enterica* sorotipo *Typhimurium*.

Até o momento, não encontramos na literatura a utilização de *G. mellonella* para o estudo de interação *Candida* e *L. acidophilus*. Existem trabalhos na literatura com *Lactococcus lactis*, utilizado como controle por não ser considerado patogênico para este modelo experimental.

A fim de determinar se *G. mellonella* poderia ser usada como um modelo de infecção por *Listeria* spp., Joyce e Gahan (2010), utilizaram espécies de *L. monocytogenes*, um patógeno humano, e *L. innocua*, não patogênica para o homem. Inicialmente, foi padronizada a concentração ideal de micro-organismo a ser inoculada em *G. mellonella*, que levasse a morte de 50% das lagartas no período de 48 h para que os experimentos posteriores fossem viabilizados. Para avaliação dos resultados foram utilizadas imagens de bioluminescência em tempo real. Os resultados mostraram que o aumento da morte das lagartas coincidiu com o aumento da luminescência relativa. Neste estudo, verificou-se que a inoculação destes micro-organismos iniciou uma infecção em *G. mellonella* e que a produção do listeriolisina citolisina O (LLO), proteína que impede a fagocitose em modelos mamíferos, é também necessária para a virulência no modelo de invertebrados. Foi utilizado como controle,

Lactococcus lactis, que é considerado um micro-organismo não patogênico para este modelo experimental por não levar a morte de nenhuma lagarta durante o período do experimento. Foi também demonstrado que a infecção ativa por *L. monocytogenes* induz o crescimento intracelular do patógeno dependentemente da produção de fatores de virulência. Além disso, determinou-se que *L. innocua*, considerada não patogênica para o ser humano, foi patogênica para as lagartas de *G. mellonella*.

Michaux et al. (2011) realizaram estudo da análise funcional do regulador, *slyA*, de *E. faecalis* em *G. mellonella*. Verificou-se que este gene desempenha um papel na virulência, bem como na persistência do micro-organismo no interior do hospedeiro. Foram utilizadas neste experimento, uma cepa selvagem e uma mutante com 69% do gene *slyA* suprimido. A lagarta foi infectada e a curva de morte determinada. Depois de 20 h de infecção, mais de 26% das lagartas infectadas com a cepa selvagem estavam ainda vivas, enquanto menos de 6% das infectadas com cepas mutantes tinham sobrevivido. A bactéria Gram-positiva *L. lactis* IL1403 foi utilizada como controle e após 20 h todas as lagartas infectadas com este micro-organismo haviam sobrevivido.

3 PROPOSIÇÃO

Objetivos gerais:

- Avaliar as interações microbianas entre *L. acidophilus* e *C. albicans* em modelos de biofilmes formados *in vitro* e em modelo experimental de invertebrado.

Objetivos específicos:

- Verificar os efeitos dos diferentes tempos de crescimento das culturas de *L. acidophilus* sobre o biofilme formado por *C. albicans in vitro*;
- Avaliar a interação *in vitro* entre *L. acidophilus* e *C. albicans* na formação de biofilme por meio da contagem de unidades formadoras de colônias, análise por microscopia eletrônica de varredura, e na indução de filamentação por *C. albicans*;
- Analisar os efeitos *in vivo* de *L. acidophilus* sobre a candidose experimental em modelo de invertebrado de *G. mellonella* por meio da análise da curva de sobrevivência de *G. mellonella*, pela quantificação de UFC/mL de *C. albicans* e pela avaliação histológica da filamentação de *C. albicans* nos tecidos do hospedeiro.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Cepas de Micro-organismos

Foram utilizadas cepas padrão de *Candida albicans* (ATCC 18804) e *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356) mantidas em freezer a menos 80°C no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/ UNESP. Para ativação desses micro-organismos, a cepa de *C. albicans* foi cultivada em meio de cultura ágar Sabouraud Dextrose (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) por 48 h a 37°C em estufa bacteriológica e a cepa de *L. acidophilus* foi cultivada em ágar Rogosa (Himedia, Mumbai, India) por 4 dias a 37°C sob condições de microaerofilia (5% de CO₂).

4.2 Interação de *C. albicans* e *L. acidophilus* em modelos *in vitro*

4.2.1 Grupos experimentais

No estudo *in vitro* da interação de *C. albicans* e *L. acidophilus*, foram avaliados os efeitos de *L. acidophilus* sobre a formação de biofilme por *C. albicans* (Quadro 1) e sobre a capacidade de filamentação de *C. albicans* (Quadro 2). Em ambos os testes, foram avaliados os efeitos diretos das células de *L. acidophilus* sobre *C. albicans* e também os efeitos indiretos de *L. acidophilus* sobre *C.*

albicans, utilizando apenas o sobrenadante da cultura de *Lactobacillus*.

O primeiro teste realizado foi o efeito direto das células de *L. acidophilus* sobre o biofilme de *C. albicans*, no qual foram testados os efeitos de *L. acidophilus* sobre *C. albicans* em diferentes fases de crescimento da cultura bacteriana (4, 6, 18 e 24 h). De acordo com os resultados obtidos, o tempo da cultura de Lactobacilos que mais inibiu *C. albicans*, foi adotado para os testes subsequentes.

Quadro 1 - Número de ensaios realizados em cada grupo experimental para o estudo dos efeitos de *L. acidophilus* sobre o biofilme de *C. albicans*

Testes	Análise dos dados	Tempo da cultura de <i>L. acidophilus</i>	n
Células de <i>L. acidophilus</i> sobre biofilme de <i>C. albicans</i>	UFC/mL	4 h	10
		6 h	10
		18 h	10
		24 h	10
	MEV	Maior inibição	3
Sobrenadante de <i>L. acidophilus</i> sobre biofilme de <i>C. albicans</i>	UFC/mL	Maior inibição	10
	MEV	Maior inibição	3
Caldo MRS sobre biofilme de <i>C. albicans</i> (Grupo Controle)	UFC/mL	-	10
	MEV	-	3
PBS sobre biofilme de <i>C. albicans</i> (Grupo Controle)	UFC/mL	-	10
	MEV	-	3
Total de experimentos			82

Quadro 2 - Número de ensaios realizados em cada grupo experimental para o estudo dos efeitos de *L. acidophilus* sobre a filamentação de *C. albicans*

Testes	Tempo da cultura de <i>L. acidophilus</i>	n
Células de <i>L. acidophilus</i> sobre <i>C. albicans</i>	Maior inibição	10
Sobrenadante de <i>L. acidophilus</i> sobre <i>C. albicans</i>	Maior inibição	10
PBS sobre <i>C. albicans</i> (Grupo Controle)	-	10
Caldo MRS sobre <i>C. albicans</i> (Grupo Controle)	-	10
Total de experimentos		40

4.2.2 Estudo dos efeitos de *L. acidophilus* sobre biofilmes de *C. albicans*

4.2.2.1 Preparo da suspensão padronizada de *C. albicans* e *L. acidophilus*

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. acidophilus* foi cultivado em caldo MRS Lactobacilos (Himedia, Mumbai, India) a 37°C por 4, 6, 18 e 24 h em estufa bacteriológica sob condições de microaerofilia (5% de CO₂).

Posteriormente, as células microbianas foram centrifugadas (2000 xg por 10 min), o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi suspenso em 6 mL de solução fisiológica tamponada com fosfato (PBS). Esse procedimento foi repetido novamente. A contagem do número de células da suspensão foi realizada através de

espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) a uma concentração de 10^7 micro-organismos/mL para as cepas de *C. albicans* e *L. acidophilus*. Os parâmetros de densidade óptica e comprimento de onda utilizados foram respectivamente 0,381 e 530 nm para *C. albicans* e 0,296 e 600nm para *L. acidophilus*.

4.2.2.2 Preparo do sobrenadante da cultura de *L. acidophilus*

Para o preparo do sobrenadante de *L. acidophilus*, a cepa foi incubada em caldo MRS a 37°C por 24 h sob condições de microaerofilia (5% de CO₂). Após este período foi realizada 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 incubados novamente a 37°C por 24 h em estufa bacteriológica sob condições de microaerofilia (5% de CO₂). 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).

4.2.2.3 Formação dos biofilmes de *C. albicans*

Para a formação dos biofilmes foi utilizada a metodologia descrita por Thein et al., 2006 com algumas modificações.

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). A placa foi incubada em agitação

a uma rotação de 75 rpm (Quimis, Diadema, São Paulo) a 37°C por 90 min para promover a adesão inicial dos micro-organismos.

Após a fase inicial de adesão, a suspensão de células foi aspirada e cada poço foi lavado duas vezes com PBS para remover as células frouxamente aderidas. Um total de 100 µL de soro fetal bovino foi transferido para cada poço e a placa reincubada por 2 h. Após este período, os poços foram lavados duas vezes com PBS.

Em cada poço da placa de 96 poços, foi inoculado 50 µL da suspensão padronizada de *L. acidophilus* ou 50 µL do sobrenadante da cultura de *L. acidophilus*. No grupo controle, foi inoculado 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 parcialmente trocado a cada 24 h. As placas foram tampadas e incubadas a 37°C em estufa de incubação com agitação de 75 rpm por 48 h.

4.2.2.4 Determinação do número de UFC/mL

Após 48 h, cada poço contendo biofilme foi lavado duas vezes com PBS. Em seguida, 100 µL de PBS foram transferidos para cada poço e o biofilme aderido ao fundo da placa foi cuidadosamente raspado usando palitos de madeira estéril. Em seguida, 100 µL deste inóculo foi transferido para tubo falcon contendo 6 mL de PBS, os quais foram homogeneizados por 30 s, utilizando homogeneizador ultra-sônico (Sonoplus HD 2200, Bandelin Eletronic) com potência de 50 W para romper os agregados microbianos. A partir da solução obtida foram realizadas diluições decimais da suspensão do biofilme, das quais alíquotas de 100 µL foram semeadas em placas de Petri contendo meios

de cultura seletivos: ágar Sabouraud dextrose para *C. albicans* e ágar Rogosa para *L. acidophilus*. As placas de ágar Sabouraud dextrose foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48 h. As placas de ágar Rogosa para *L. acidophilus* foram incubadas a 37°C em estufa sob condições de microaerofilia (5% de CO₂) por 48 h. Após este período, as colônias foram contadas para o cálculo de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL).

4.2.2.5 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura

Para a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi utilizado como corpo-de-prova uma peça de poliestireno com 8 mm de diâmetro colocada em placa de 24 poços para aderência do biofilme. Inicialmente foram inoculados 1 mL da suspensão padronizada de células de *C. albicans* (10⁷ células/mL). A placa foi incubada em agitação a uma rotação de 75 rpm (Quimis, Diadema, São Paulo) a 37°C por 90 min para promover a adesão inicial dos micro-organismos.

Após a fase inicial de adesão, a suspensão de células foi aspirada e cada poço foi lavado duas vezes com PBS para remover as células frouxamente aderidas. Um total de 1 mL de soro fetal bovino foi transferido para cada poço e a placa reincubada por 2 h. Após este período, os poços foram lavados duas vezes com PBS.

Em cada poço da placa de 24 poços contendo os corpos de prova, foi inoculado 500 µL da suspensão padronizada de *L. acidophilus* ou 500 µL do sobrenadante da cultura de *L. acidophilus*. No grupo controle, foi inoculado 500 µL de PBS.

Para a promoção do crescimento do biofilme, 700 µL de YNB acrescido de 100 mM de glicose e 300 µL de caldo BHI foram adicionados a cada poço. O caldo foi trocado a cada 24 h. As placas

foram tampadas e incubadas a 37°C em estufa de incubação com agitação de 75 rpm por 48 h.

A seguir, as peças foram transferidas para placa de 24 poços contendo 1 mL de glutaraldeído a 2,5% para fixação por 1 h. Após este período as peças foram submersas em 1 mL de solução de álcool nas concentrações de 10, 25, 50, 75 e 90% por 20 min em cada uma das concentrações e, posteriormente, em 100% de álcool por 1 h. Os corpos de prova foram colocados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 h para secagem completa das peças.

As peças foram retiradas do fundo da placa com o auxílio de uma pinça estéril, transferidas para *stubs* de alumínio e recobertas com ouro por 160 s a 40 milianperes (Denton Vacuum Desk II). Após a metalização, as peças foram examinadas e fotografadas em MEV (Jeol JSM5600) operando em 15 kV nos aumentos de 2000 e 10000x.

4.2.3 Estudo dos efeitos de *L. acidophilus* 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. acidophilus*, interação *C. albicans* e sobrenadante de *L. acidophilus*, 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. acidophilus* e *C. albicans* foram centrifugadas para o preparo de suspensões padronizadas de 10^7 células por mL conforme descrito no item 4.2.2.1. Foi preparado também o sobrenadante da cultura de *L. acidophilus* de acordo com o item 4.2.2.2.

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 μ L da suspensão padronizada de *C. albicans*.

A seguir, em cada poço foi colocado 50 μ L da suspensão padronizada de *L. acidophilus* ou 50 μ L do sobrenadante da cultura de *L. acidophilus*. Nos grupos controle, foi colocado em cada poço 50 μ L de PBS ou 50 μ L de caldo MRS dependendo do grupo experimental.

As placas contendo os inóculos foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica na presença de 5% de CO₂. Após 24 h, 50 μ L do inóculo contido em cada poço da placa de cultura de células de 24 poços (Costar Corning, Nova York, EUA) foi disperso sobre lâminas de vidro com os campos previamente demarcados no verso da lâmina (Figura 1).

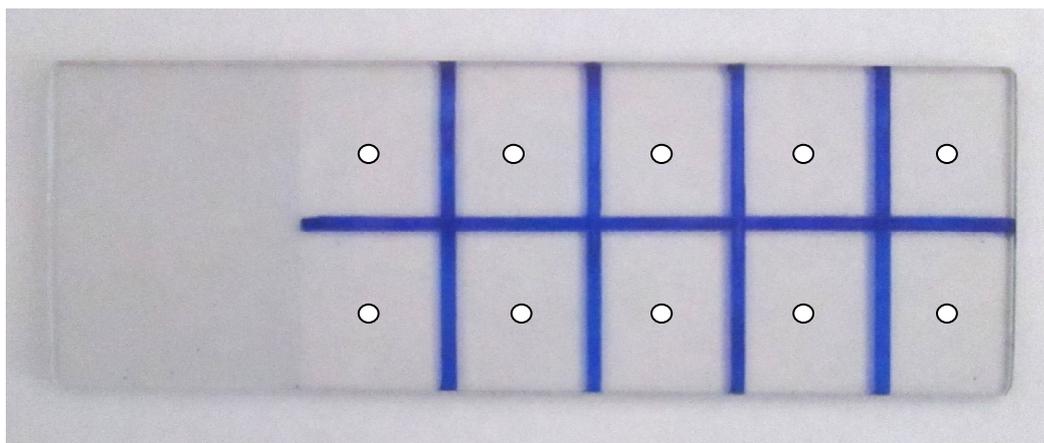


Figura 1 – Visualização da lâmina utilizada para análise da filamentação de *C. albicans* *in vitro* com a demarcação dos campos para a contagem do número de hifas presentes. Os pontos brancos representam o local onde foi realizada a contagem do número de hifas presentes em cada campo.

O material sobre a lâmina foi recoberto por lamínula e as lâminas de microscopia observadas em microscópio óptico com aumento de 400x. Foram realizados 10 ensaios para cada grupo experimental. Os ensaios foram repetidos pelo menos duas vezes 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, sendo que foi padronizado o ponto médio

de cada campo para a análise. Em cada campo microscópio foi atribuído um escore, de acordo com o número de hifas presentes (Quadro 3).

Quadro 3 – Escores utilizados para a contagem de número de hifas presentes em cada campo observado através da microscopia óptica

Escore	Quantidade de hifas
0	ausência
1	1 a 3
2	4 a 10
3	11 a 20
4	mais de 20

4.3 Interação de *L. acidophilus* com *C. albicans* em modelo experimental de *Galleria mellonella*

Para este estudo foi utilizada a metodologia descrita por Mylonakis et al. (2005) e Fuchs et al. (2010b).

4.3.1 Grupos experimentais

Os grupos experimentais e o número de lagartas utilizadas por experimento estão descritas no Quadro 4.

Quadro 4 – Grupos experimentais e número de lagartas utilizadas por experimento em modelo de *G. mellonella*

Grupo Experimentais	Curva de sobrevivência	Contagem de UFC/mL						Análise histológica
		0h	4h	8h	12h	18h	24h	
Infecção por <i>L. acidophilus</i>	80	-	-	-	-	-	-	-
Interação célula de <i>L. acidophilus</i> e <i>C. albicans</i> (Profilático)	16	-	-	-	-	-	-	-
Interação sobrenadante de <i>L. acidophilus</i> e <i>C. albicans</i> (Profilático)	16	-	-	-	-	-	-	-
Interação <i>C. albicans</i> e célula de <i>L. acidophilus</i> (Terapêutico)	16	18	18	18	18	18	18	5
Interação <i>C. albicans</i> e sobrenadante de <i>L. acidophilus</i> (Terapêutico)	16	18	18	18	18	18	18	5
Controle <i>C. albicans</i> e caldo MRS (Terapêutico)	16	18	18	18	18	18	18	5
Controle caldo MRS e <i>C. albicans</i> (Profilático)	16	-	-	-	-	-	-	-
Controle <i>C. albicans</i> e PBS	16	-	-	-	-	-	-	5
Controle PBS	16	6	6	6	6	6	6	5
TOTAL	208	360						25

4.3.2 *Galleria mellonella*

Foram utilizadas lagartas de *G. mellonella* em estágio final da fase larval com peso corporal de aproximadamente 25 mg cedidas

pela pesquisadora Márcia Prata da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA de Juiz de Fora, Minas Gerais.

4.3.3 Verificação da susceptibilidade de *G. mellonella* à infecção por *L. acidophilus*

Antes do estudo da interação de *C. albicans* e *L. acidophilus*, foi realizada uma análise da susceptibilidade de *G. mellonella* à infecção por *L. acidophilus* para determinação da concentração sub-letal de *L. acidophilus* nesses animais. Para isso, foram inoculadas em *G. mellonella* várias suspensões padronizadas de *L. acidophilus* na concentração que variou de 10^4 a 10^8 células/mL. Para cada concentração inoculada, foi utilizado um grupo de 16 lagartas. As suspensões padronizadas de *L. acidophilus* foram preparadas de acordo com o item 4.2.2.1

Um inóculo de 5 µL de cada suspensão foi injetado em *G. mellonella* para determinação da curva de sobrevivência conforme descrito a seguir, no item 4.3.4.2.

4.3.4 Efeitos de *L. acidophilus* na candidose experimental em *G. mellonella*

4.3.4.1 Preparo da suspensão de *C. albicans* e *L. acidophilus*

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. A seguir, as células foram centrifugadas a 2000

Xg por 10 min, sendo o sobrenadante descartado. O depósito foi ressuspenso em PBS e misturado em agitador de tubos (vortex) por 30 segundos. Esta lavagem das células foi repetida por mais 2 vezes. As densidades celulares de *C. albicans* foram ajustadas em 10^5 células/mL por meio de hemocitômetro.

A suspensão padronizada de *L. acidophilus* foi realizada conforme descrito no item 4.2.2.1 na concentração de 10^5 células/mL.

4.3.4.2 Injeção de micro-organismos em *G. mellonella*

Antes da inoculação, as seringas (Hamilton Inc., EUA), utilizadas para as injeções foram esterilizadas com ácido peracético (Henkel - Ecolab GmbH, Düsseldorf, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante.

Um inóculo de 5 μ L da suspensão padronizada de *C. albicans* foi injetado na hemolinfa de cada lagarta através da última prolegue esquerda. Cinco microlitros da suspensão padronizada de células ou sobrenadante da cultura *L. acidophilus* foi inoculado na última prolegue direita (Figura 2). Para os grupos com infecção por um único micro-organismo, 5 μ L da suspensão do micro-organismo foi inoculada na última prolegue esquerda e o mesmo volume de PBS ou caldo MRS na última prolegue direita.

Para cada micro-organismo foi utilizada uma seringa Hamilton. A limpeza da agulha e da parte interna da seringa foram realizadas a cada 5 injeções. Para esta limpeza a seringa foi lavada em uma sequência de 4 tubos falcon que continham respectivamente: 1º) 20 mL de hipoclorito de sódio, 2º) 20 mL de álcool absoluto, 3º) 20 mL de água destilada estéril e 4º) 20 mL de PBS estéril. Em cada tubo a agulha

foi mergulhada e realizados 5 movimentos no êmbolo para cima e para baixo, na sequencia acima descrita.

Em todos os experimentos foi realizado um grupo inoculado apenas com PBS para acompanhar o estado de saúde das lagartas de *G. mellonella* durante todo o experimento.

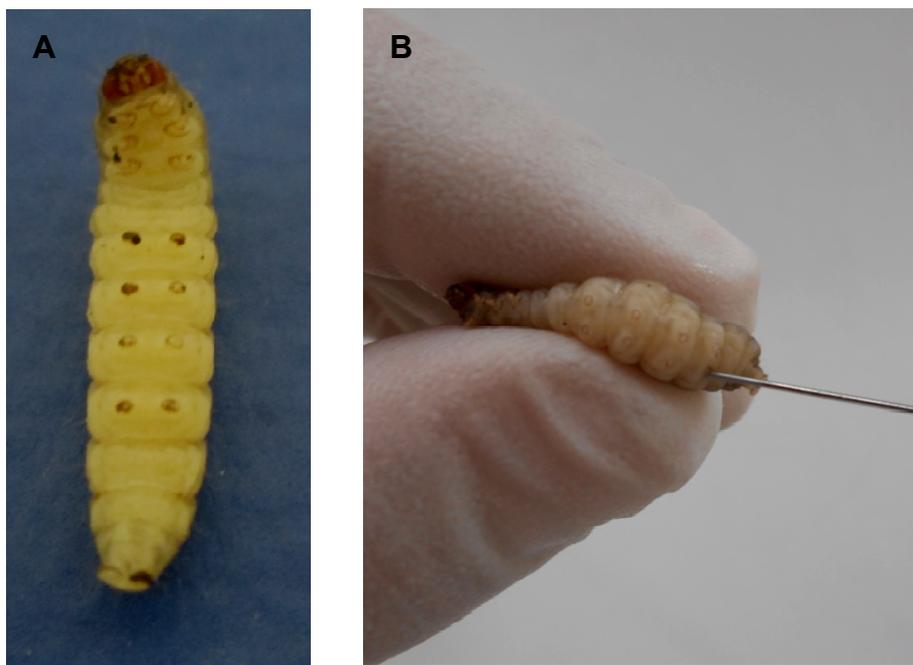


Figura 2 – Imagem do modelo experimental de *G. mellonella*. A) *G. mellonella* em posição ventral com detalhamento das prolegues; B) Demonstração da injeção de micro-organismo em *G. mellonella* utilizando seringa de Hamilton.

4.3.4.3 Determinação da curva de sobrevivência da *G. mellonella*

Para determinação da curva de sobrevivência os grupos de interação foram subdivididos em profilático e terapêutico. No grupo profilático (Interação célula de *L. acidophilus* e *C. albicans* e Interação sobrenadante de *L. acidophilus* e *C. albicans*) as células de *L. acidophilus* ou o sobrenadante obtido a partir da cultura de *L. acidophilus* foi injetado

na última prolegue direita da lagarta 1 h antes da inoculação das células de *C. albicans*. No grupo terapêutico (Interação *C. albicans* e célula de *L. acidophilus* e Interação *C. albicans* e sobrenadante de *L. acidophilus*) as células de *C. albicans* foram inoculadas na última prolegue esquerda 1 h antes da inoculação das células de *L. acidophilus* ou do sobrenadante obtido a partir da cultura de *L. acidophilus*.

Após a inoculação, as lagartas foram armazenadas em placas de Petri e incubadas a 37°C em estufa bacteriológica. 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 determinou o término do experimento.

De acordo com os resultados obtidos na comparação entre o grupo profilático e terapêutico, o grupo em que ocorreu a maior sobrevivência das lagartas, foi adotado para os testes subsequentes.

4.3.4.4 Estudo da cultura de tecidos - Contagem de UFC/mL

Para quantificar a presença de *C. albicans* na infecção em *G. mellonella*, foram realizados experimentos com a eutanásia de lagartas nos tempos de 0, 4, 8, 12, 18 e 24 h após a infecção, nos seguintes grupos experimentais: Interação *C. albicans* e célula de *L. acidophilus*, Interação *C. albicans* e sobrenadante de *L. acidophilus*, Controle *C. albicans* e MBS.

Para cada grupo e tempo foi utilizado um *pool* de 3 a 6 lagartas para coleta de hemolinfa suficiente para realização das diluições seriadas. Como o experimento foi realizado em triplicata, para cada grupo e tempo foram utilizadas 18 lagartas, totalizando 324 lagartas infectadas

para todos os ensaios.

Para cada tempo, foi incluído um grupo controle contendo 6 lagartas no qual foi injetado 5 μ L de PBS na última prolegue esquerda e 5 μ L de PBS na última prolegue direita com o objetivo de analisar a ocorrência de mortes de *G. mellonella* provocadas pela injúria traumática das injeções.

Em cada tempo, as lagartas foram pegas, cortadas com bisturi no sentido céfalo caudal e espremidas para retirada da hemolinfa que foi colocada em um *ependorf* (Figura 3).

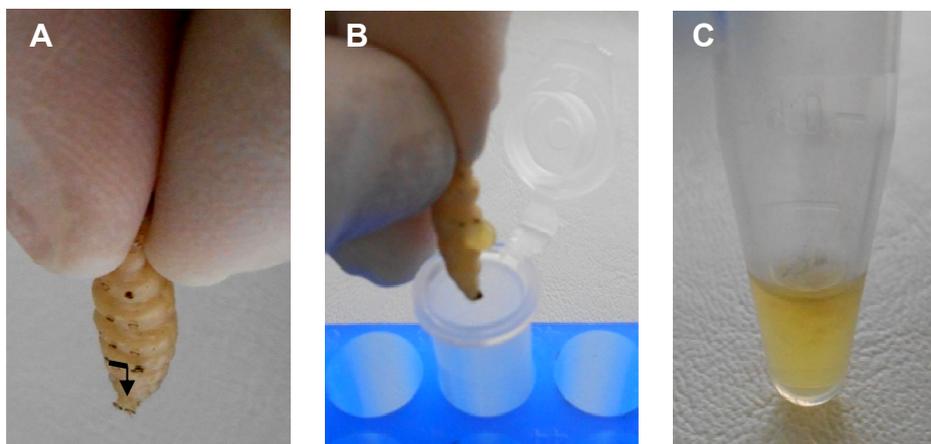


Figura 3 - Imagem do modelo experimental de *G. mellonella*. A) lagarta posicionada para retirada da hemolinfa. Seta representa a sequência das incisões para retirada da hemolinfa. Incisão feita logo abaixo da última prolegue esquerda e posteriormente seguindo a linha mediana da lagarta até sua região caudal; B) hemolinfa sendo retirada após a incisão; C) tubo *ependorf* com a quantidade de hemolinfa referente ao *pool* de 6 lagartas.

A partir do *pool* da hemolinfa das lagartas, foram feitas diluições seriadas e semeadas em placas de Petri contendo meios de cultura seletivos: ágar Sabouraud dextrose com clorfenicol para *C. albicans* e ágar Rogosa para *L. acidophilus*. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48 h. As placas de ágar Rogosa para *L. acidophilus* foram incubadas em estufa a 37°C sob condições de microaerofilia (5% de CO₂) pelo período de 48 h. Após este período, as

colônias foram contadas para o cálculo de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL).

4.3.4.5 Análise histológica de *G. mellonella*

A análise histológica foi realizada para avaliar os efeitos de *L. acidophilus* na filamentação de *C. albicans* em *G. mellonella* e análise das estruturas histológicas presentes no corpo de gordura da lagarta. Foram realizados os seguintes grupos experimentais: Interação *C. albicans* e célula de *L. acidophilus*, Interação *C. albicans* e sobrenadante de *L. acidophilus*, Controle *C. albicans* e PBS, Controle *C. albicans* e caldo MRS e Controle PBS. Para cada grupo experimental foram utilizadas 5 lagartas.

Após 18h da infecção, foi realizada uma incisão na linha mediana da parte ventral do animal. A partir desta incisão a hemolinfa foi descartada e o corpo de gordura removido (Figura 4).

O corpo de gordura foi colocado em formalina a 10% e armazenado a 4°C para fixação por 24 h. Após este período, o tecido foi colocado em álcool a 50, 70 e 90% por 1 h para cada uma das concentrações e 100% durante 3 h para promover a desidratação. O tecido foi transferido para uma solução de xilol durante 3 h e montados em blocos de parafina.

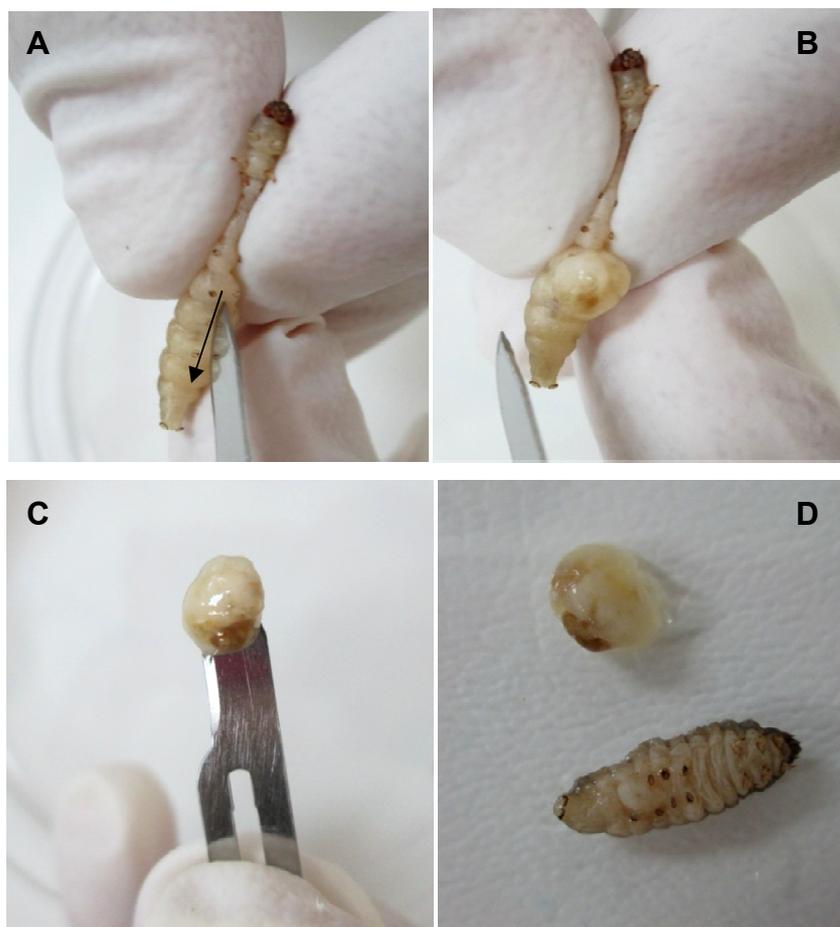


Figura 4 – Sequência da retirada do corpo de gordura da lagarta *G. mellonella*. A) corte transversal realizado na parte ventral da lagarta (seta); B) pressão lateral realizada na lagarta para remoção do corpo de gordura; C) visualização do corpo de gordura após ter sido retirado da lagarta; D) comparação do corpo de gordura em relação ao tamanho da lagarta.

Os blocos foram cortados e corados com hematoxilina e eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS). As observações dos tecidos de *G. mellonella* e a presença de hifas e leveduras foram realizadas em microscópio óptico nos aumentos de 100, 630 e 1000x. Para análise da filamentação, foram fotografadas todas as áreas do corte histológico que apresentavam hifas e leveduras em um aumento original de 1000x, através da câmara digital Cyber Shott modelo DSC-585 (Sony Corporation) acoplada ao microscópio de luz Zeiss Axiophot 2 (Carl Zeiss,

Oberköchen, Alemanha). Em cada imagem foi determinada a área ocupada por hifas e leveduras em μm , com o auxílio do programa Image-J (Versão 1,32 para *Windows*), de domínio público, do Instituto Nacional de Saúde (NIH), Bethesda, EUA. Todas as áreas de hifas e leveduras de cada corte foram somadas e o resultado foi convertido para logaritmo de base 10.

4.4 Análise estatística

Os resultados obtidos na contagem de UFC/mL do biofilme *in vitro* foram submetidos ao teste t-Student. A análise de UFC/mL recuperada de *G. mellonella* e análise microscópica da presença de hifas, foram submetidas à Análise de Variância e teste de Tukey. Para os escores obtidos na análise de filamentação *in vitro* foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Todos esses testes estatísticos foram realizados no Programa Minitab.

Em relação aos experimentos de sobrevivência em *G. mellonella*, foi realizada a curva de sobrevivência e estimativa das diferenças pelo método de Log-rank (Mantel - Cox) utilizando o Programa Graph Pad Prism.

Em todos os testes, foi considerado nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Interação de *C. albicans* e *L. acidophilus* em modelos *in vitro*

5.1.1 Efeito de *Lactobacillus acidophilus* sobre biofilmes de *C. albicans* quanto a contagem de UFC/mL

Primeiramente, foi testada a melhor fase de crescimento da cultura de *L. acidophilus* (4, 6, 18 e 24 h) para inibir as células de *C. albicans* em biofilmes formados *in vitro*. De acordo com os resultados obtidos, houve redução na contagem de UFC/mL de *C. albicans* em relação ao grupo controle para todos os tempos testados, porém esta diferença foi estatisticamente significativa apenas para o grupo com crescimento de 24 h (Tabela 1). A partir dos resultados obtidos, o tempo de 24 h de cultura de *L. acidophilus* foi adotado para todos os testes subsequentes.

Tabela 1- Média e desvio padrão do número de UFC/mL (\log_{10}) obtidos a partir da contagem de *C. albicans* nos biofilmes do Grupo Controle *C. albicans* e PBS e Grupo Interação *C. albicans* e célula de *L. acidophilus* nas diferentes fases de crescimento da cultura de *L. acidophilus*

Fase de crescimento da cultura de <i>L. acidophilus</i>	Controle <i>C. albicans</i> e PBS (n=10)	Interação <i>C. albicans</i> e célula de <i>L. acidophilus</i> (n=10)	p-valor *
4h	7,74 ± 0,10	7,66 ± 0,12	0,15
6h	7,51 ± 0,26	7,29 ± 0,31	0,10
18h	7,73 ± 0,11	7,55 ± 0,26	0,07
24h	7,47 ± 0,11	7,08 ± 0,22	0,0001

*Valor de p obtido na comparação do grupo controle *C. albicans* e PBS e Interação *C. albicans* e célula de *L. acidophilus* (Teste t Student, $p \leq 0,05$)

Além dos efeitos das células de *L. acidophilus* sobre o biofilme de *C. albicans*, também foram analisados os efeitos indiretos de *L. acidophilus* sobre *C. albicans*, utilizando apenas o sobrenadante da cultura de *Lactobacillus* no tempo de crescimento de 24h. A partir dos resultados obtidos foi observado efeito inibitório do sobrenadante da cultura bacteriana sobre o biofilme de *C. albicans* (Tabela 2).

Tabela 2- Média e desvio padrão do número de UFC/mL (\log_{10}) obtidos a partir da contagem de *C. albicans* nos biofilmes do Grupo Controle *C. albicans* e PBS e Grupo Interação *C. albicans* e sobrenadante de *L. acidophilus* no tempo de 24h de crescimento da cultura de *L. acidophilus*

Controle <i>C. albicans</i> e PBS (n=10)	Interação <i>C. albicans</i> e sobrenadante de <i>L. acidophilus</i> (n=10)	p-valor *
7,74 ± 0,05	7,47 ± 0,08	0,0001

*Valor de p obtido na comparação do Grupo controle *C. albicans* e PBS e Grupo Interação *C. albicans* e sobrenadante de *L. acidophilus* (Teste t Student, $p \leq 0,05$)

Para comprovar se a composição do caldo MRS da cultura de *L. acidophilus* poderia ter ação sobre *C. albicans* e, portanto interferir no experimento com o sobrenadante da cultura de *L. acidophilus*, foi realizado posteriormente um experimento comparando o Grupo controle *C. albicans* e PBS com o Grupo controle *C. albicans* e caldo MRS. Os resultados demonstraram que a utilização apenas do caldo MRS em substituição ao sobrenadante não promoveu inibição na contagem de UFC/ mL (Log_{10}) de *C. albicans*, conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3- Média e desvio padrão do número de UFC/mL (\log_{10}) obtidos a partir da contagem de *C. albicans* nos biofilmes do grupo Controle *C. albicans* e PBS e Controle *C. albicans* e caldo MRS no tempo de 24h de crescimento da cultura de *L. acidophilus*

Controle <i>C. albicans</i> e PBS (n=10)	Controle <i>C. albicans</i> e caldo MRS (n=10)	p-valor*
7,07 ± 0,16	7,13 ± 0,14	0,37

*Valor de p obtido na comparação do grupo controle *C. albicans* e PBS e Controle *C. albicans* e caldo MRS (Teste t Student, $p \leq 0,05$)

No grupo da interação *C. albicans* e célula de *L. acidophilus*, além da contagem de *C. albicans*, foi também realizada a contagem de unidades formadas de colônias por mL de *L. acidophilus* e verificou-se que houve um comportamento semelhante no crescimento de *L. acidophilus* em todos os tempos testados sem diferença estatística entre os tempos analisados (Figura 5).

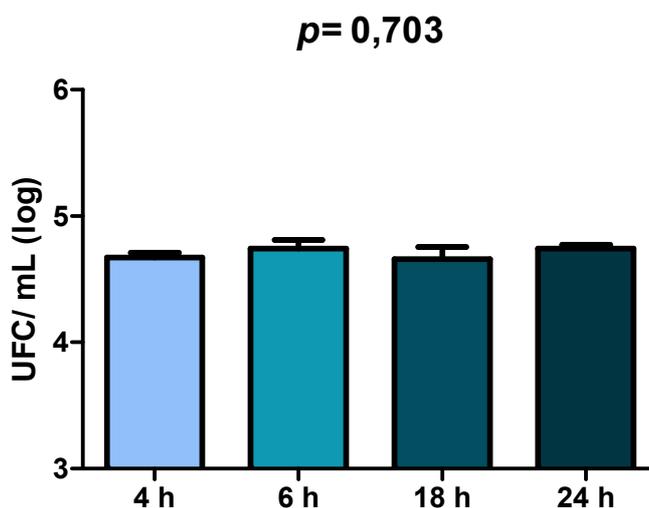


Figura 5- Média e desvio padrão (Log_{10}) de UFC/mL de *L. acidophilus* do grupo interação *C. albicans* e célula de *L. acidophilus* nos tempos de crescimento da cultura de *L. acidophilus* 4, 6, 18 e 24h. Verificou-se o comportamento semelhante entre os tempos testados, sem diferença estatisticamente significativa (Teste de ANOVA, $p \leq 0,05$).

5.1.2 Efeitos de *Lactobacillus acidophilus* sobre biofilmes de *C. albicans*: análise por Microscopia Eletrônica de Varredura

A formação do biofilme de *C. albicans* sobre os corpos de prova de poliestireno foi comprovada pela análise de Microscopia Eletrônica de Varredura, na qual foi observado que o grupo controle *C. albicans* e PBS apresentou um biofilme monotípico composto por numerosas leveduras com formação de pseudohifas e hifas (Figura 6).

No grupo interação *C. albicans* e célula de *L. acidophilus*, observou-se uma íntima associação entre os dois micro-organismos estudados, com a aderência de *L. acidophilus* sobre as leveduras de *C. albicans* e formação de algumas hifas (Figura 7). Além disso, não foi observada redução do número de células de *C. albicans* no grupo interação *C. albicans* e célula de *L. acidophilus* em relação ao grupo controle formado por biofilme monotípico de *C. albicans*.

Por outro lado, nas imagens dos biofilmes formados no grupo interação *C. albicans* e sobrenadante de *L. acidophilus* verificou-se a presença de numerosas leveduras sem formação de hifas, sugerindo que o sobrenadante de *L. acidophilus* pode ter inibido a formação de hifas (Figura 8).

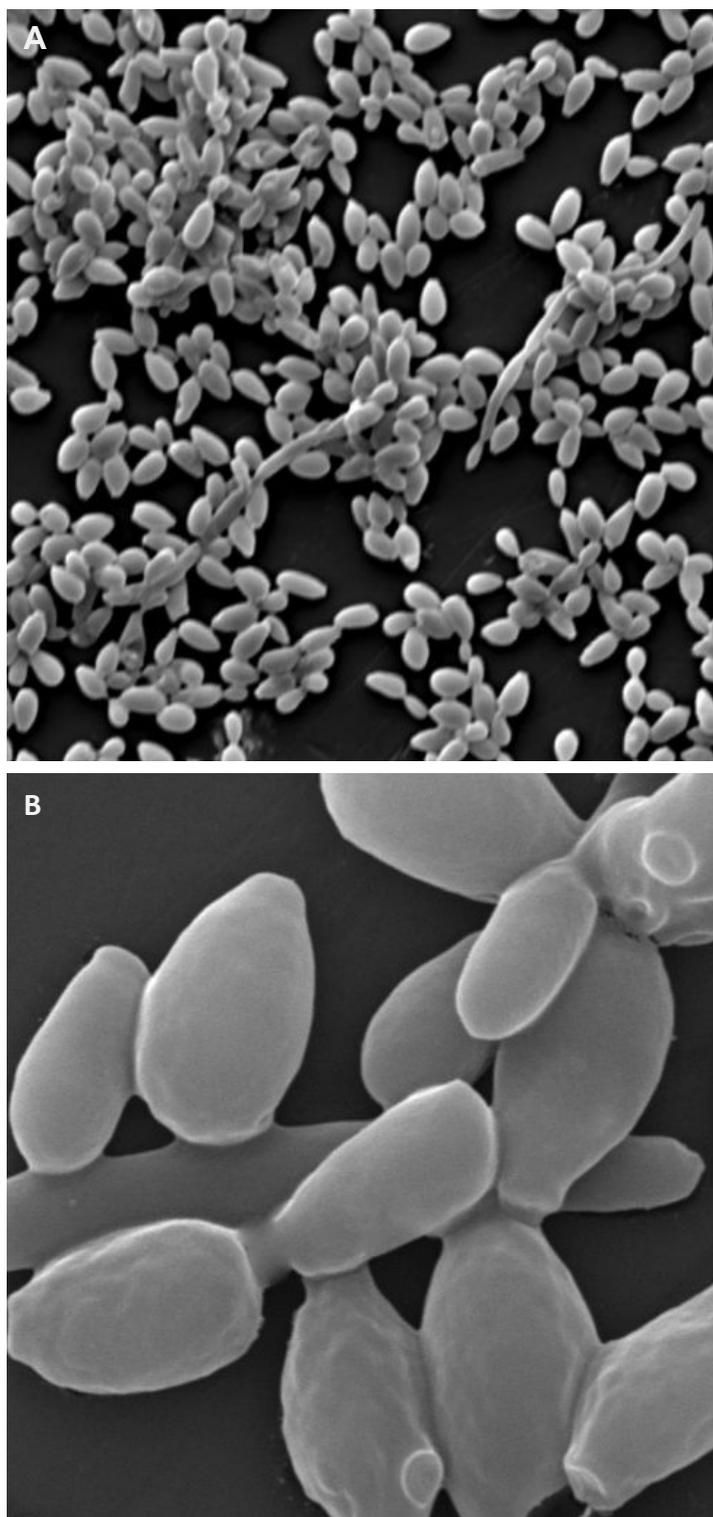


Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura do grupo controle *C. albicans* e PBS. A) Verifica-se a aderência de *C. albicans* ao corpo de prova de poliestireno e a presença de pseudohifas, aumento original: 2000x; B) Presença de hifa e leveduras, aumento original: 10000x.

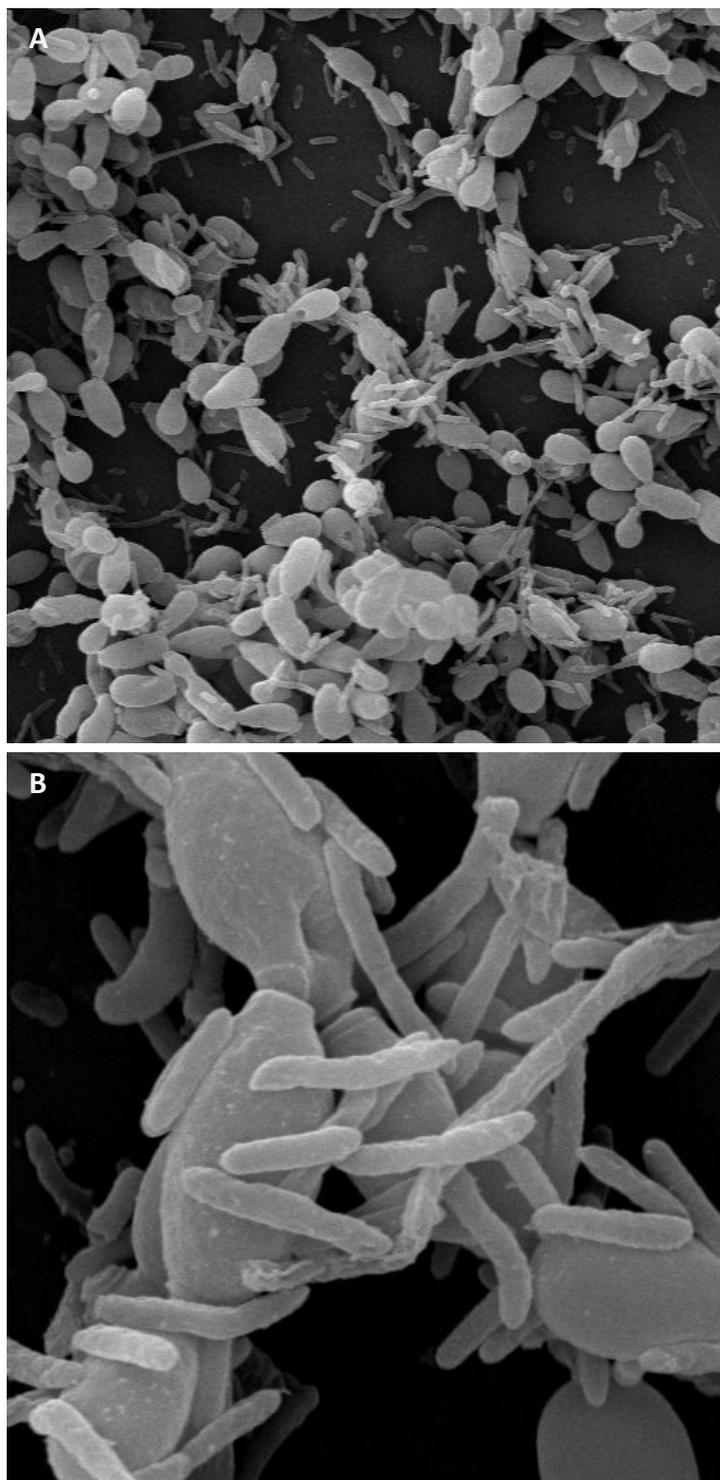


Figura 7 - Microscopia eletrônica de varredura do grupo interação *C. albicans* e célula de *L. acidophilus*. A) Verifica-se a aderência de *C. albicans* e *L. acidophilus* ao corpo de prova de poliestireno, com predomínio de leveduras de *C. albicans*. Presença de células de *L. acidophilus* aderidas às hifas e leveduras de *C. albicans*, aumento original: 2000x; B) Verifica-se íntima interação entre *C. albicans* e *L. acidophilus*, aumento original: 10000x.

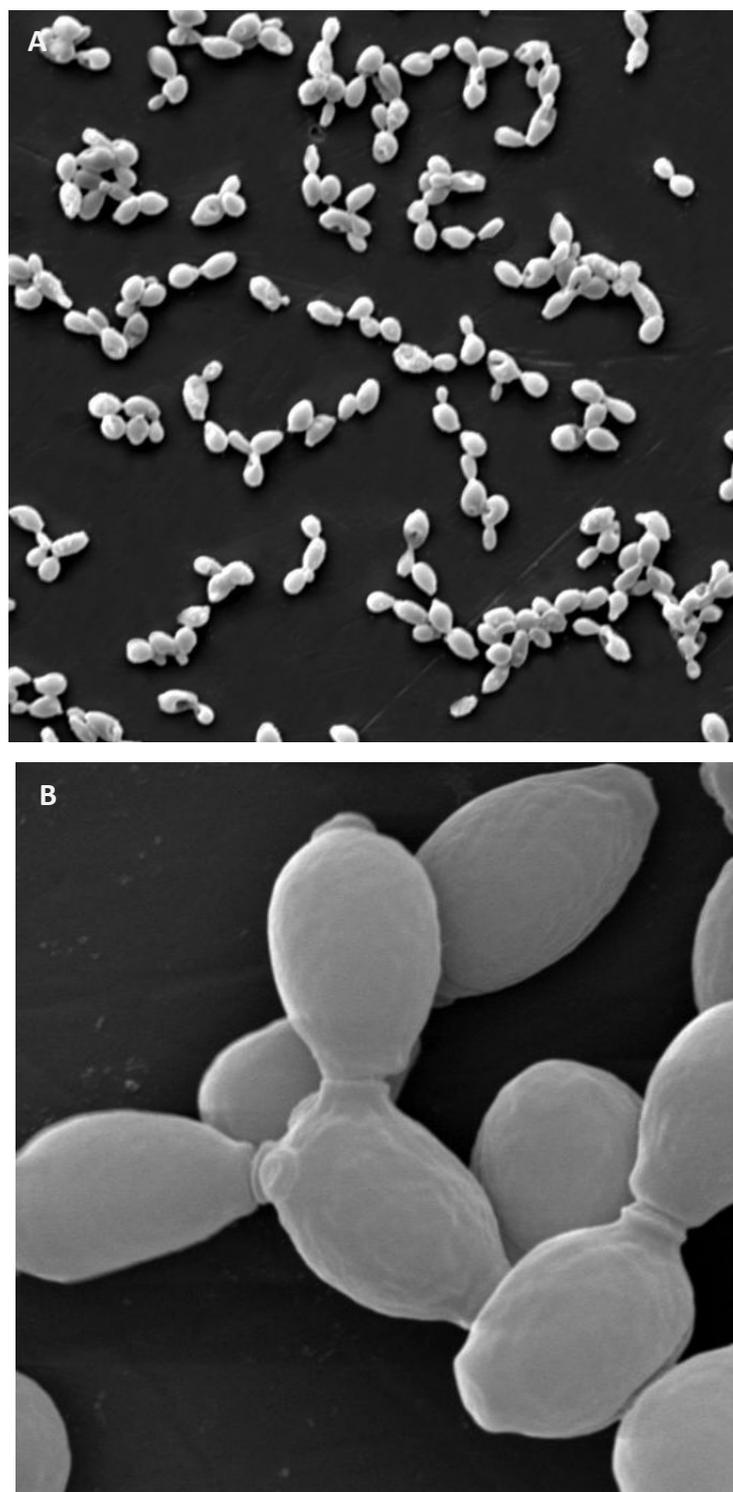


Figura 8 - Microscopia eletrônica de varredura do grupo interação *C. albicans* e sobrenadante de *L. acidophilus*. A) Verifica-se aderência de *C. albicans* ao corpo de prova de poliestireno com predomínio de leveduras sem presença de hifas, aumento original: 2000x. B) Presença de várias leveduras. Aumento original: 10000x.

5.1.3 Efeitos de *L. acidophilus* sobre a filamentação de *C. albicans*

A filamentação *in vitro* foi visualizada em microscopia óptica com aumento de 400x após a incubação de *C. albicans* por 24 h em condições de microaerofilia (5% de CO₂). A presença de hifas de *C. albicans* nos diferentes grupos experimentais foi analisada quanto aos aspectos morfológicos e quantitativos.

Quanto à morfologia as imagens mostraram que o grupo controle *C. albicans* e PBS e o grupo interação *C. albicans* e célula de *L. acidophilus* apresentaram morfologia semelhante com maior número de hifas em detrimento a presença de leveduras ou pseudohifas (Figura 9 A e B). No grupo interação *C. albicans* e sobrenadante de *L. acidophilus*, verificou-se a presença de várias leveduras e um número reduzido de hifas comparado ao grupo controle *C. albicans* e PBS (Figura 9 A e C).

Para verificar se a composição do caldo MRS mesmo sem a presença dos produtos obtidos a partir do crescimento bacteriano teria algum efeito sobre o aspecto morfológico da filamentação de *C. albicans in vitro*, foi realizado posteriormente um experimento comparando-se o grupo controle *C. albicans* e PBS com o grupo controle *C. albicans* e caldo MRS. Os resultados demonstraram que ocorreu alteração na morfologia com aumento do número de leveduras no grupo controle *C. albicans* e caldo MRS quando comparados ao grupo controle *C. albicans* e PBS (Figura 9 A e D).

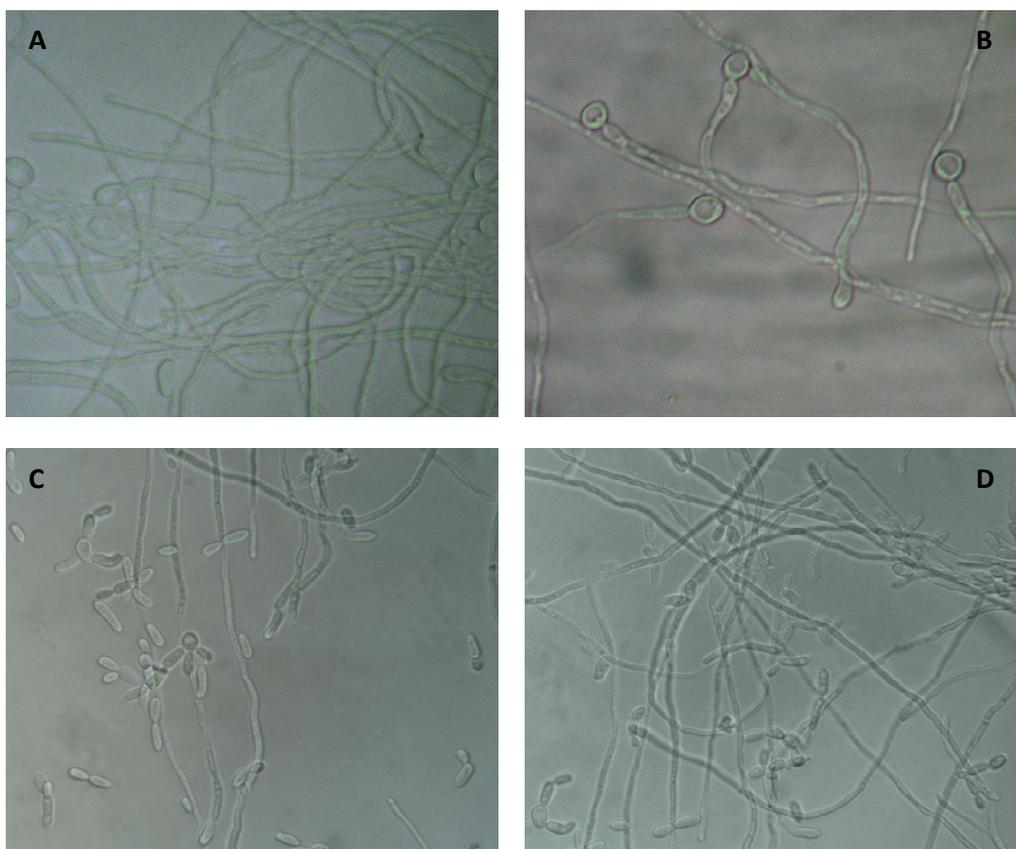


Figura 9 – Microscopia óptica com a visualização da filamentação de *C. albicans in vitro*. A) Grupo controle *C. albicans* e PBS; B) Grupo interação *C. albicans* e célula de *L. acidophilus*. C) Grupo interação *C. albicans* e sobrenadante de *L. acidophilus*; D) Grupo controle *C. albicans* e caldo MRS. Verifica-se nas imagens A e B morfologia semelhante com presença predominante de hifas e nas imagens C e D presença de hifas e leveduras, aumento original: 400x.

A segunda análise realizada foi a quantificação do número de hifas presentes nas lâminas observadas (Tabelas 4-6). A partir dos resultados verificou-se que houve redução estatisticamente significativa do número de hifas quando o grupo controle *C. albicans* e PBS foi comparado com o grupo interação *C. albicans* e célula de *L. acidophilus* e com o grupo interação *C. albicans* e sobrenadante de *L. acidophilus*. Entretanto, quando o grupo controle *C. albicans* e PBS foi comparado ao grupo controle *C. albicans* e caldo MRS, não foi verificada diferença na quantidade de hifas presentes nos dois grupos analisados (Figura 10).

Tabela 4 – Média, desvio-padrão (DP) e mediana obtidos a partir da contagem do número de hifas de *C. albicans* presentes após 24 h da indução da filamentação *in vitro* do grupo controle *C. albicans* e PBS e grupo Interação *C. albicans* e célula de *L. acidophilus*.

Grupos	Média e DP	Mediana
Controle <i>C. albicans</i> e PBS	3,69 ± 0,19	3,75
Interação <i>C. albicans</i> e célula de <i>L. acidophilus</i>	2,46 ± 0,46	2,55

Tabela 5 - Média, desvio-padrão (DP) e mediana obtidos a partir da contagem do número de hifas de *C. albicans* presentes após 24 h da indução da filamentação *in vitro* do grupo controle *C. albicans* e PBS e grupo Interação *C. albicans* e sobrenadante de *L. acidophilus*.

Grupos	Média e DP	Mediana
Controle <i>C. albicans</i> e PBS	3,35 ± 0,17	3,33
Interação <i>C. albicans</i> e sobrenadante <i>L. acidophilus</i>	2,61 ± 0,20	2,68

Tabela 6 – Média, desvio-padrão (DP) e mediana obtidos a partir da contagem do número de hifas de *C. albicans* presentes após 24 h da indução da filamentação *in vitro* do grupo controle *C. albicans* e PBS e grupo controle *C. albicans* e caldo MRS.

Grupos	Média e DP	Mediana
Controle <i>C. albicans</i> e PBS	3,19 ± 0,26	3,23
Controle <i>C. albicans</i> e caldo MRS	3,09 ± 0,18	3,15

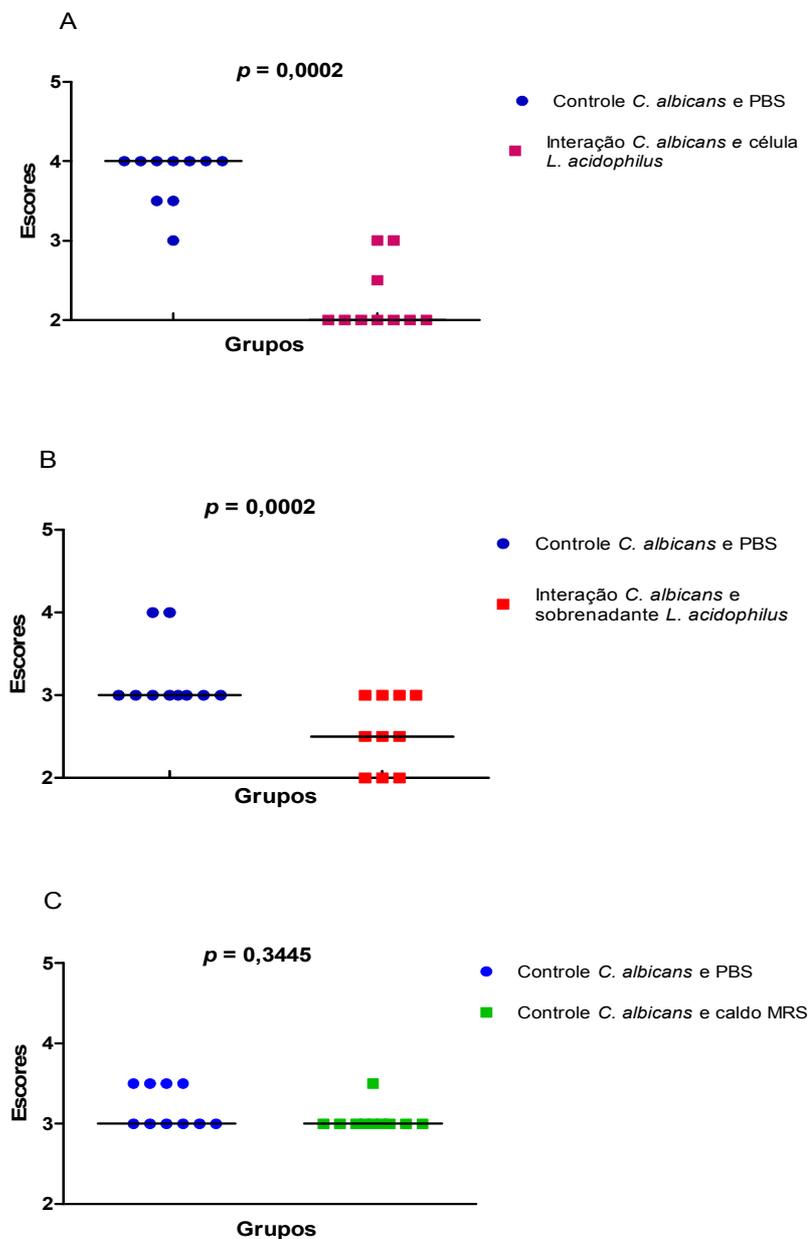


Figura 10 – Quantificação de hifas nos testes de filamentação de *C. albicans in vitro*. Mediana e valor de p dos escores atribuídos aos diversos grupos experimentais. A) Comparação entre grupo controle *C. albicans* e PBS e grupo interação *C. albicans* e célula de *L. acidophilus*. Verifica-se a presença de uma quantidade menor de hifas no grupo da interação ao ser comparado ao grupo controle, valor de $p = 0,0002$; B) Comparação entre grupo controle *C. albicans* e PBS e grupo interação *C. albicans* e sobrenadante de *L. acidophilus*. Verifica-se a presença de um número menor de hifas no grupo da interação ao ser comparado ao grupo controle, valor de $p = 0,0002$; C) Comparação entre grupo controle *C. albicans* e PBS e grupo controle *C. albicans* e caldo MRS. Não ocorreu redução estatisticamente significativa na quantidade de hifas presentes na comparação dos dois grupos, $p = 0,3445$ (teste estatístico Mann-Whitney).

5.2 Interação de *Lactobacillus acidophilus* com *Candida albicans* em modelo experimental de *Galleria mellonella*

5.2.1 Curva de sobrevivência de *Galleria mellonella*

Antes do experimento da curva de sobrevivência foi avaliada a susceptibilidade de *G. mellonella* à infecção por *L. acidophilus*. Suspensões padronizadas de *L. acidophilus* nas concentrações de 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8 micro-organismos/mL foram inoculadas em *G. mellonella*. Para cada concentração foram utilizadas 16 lagartas na fase larval final com peso corporal de aproximadamente 25 mg. As lagartas foram observadas por 168 h (7 dias) e o número de lagartas mortas anotados diariamente.

Através dos resultados obtidos verificou-se que *L. acidophilus* não foi patogênico para *G. mellonella*, pois não ocorreu morte de nenhuma lagarta durante todo o experimento em nenhuma das concentrações testadas. A partir destes resultados a concentração de 10^5 micro-organismos/mL foi adotada para todos os ensaios subsequentes, uma vez que é a mesma concentração utilizada para a infecção de *C. albicans* em *G. mellonella*.

A seguir, as lagartas de *G. mellonella* foram utilizadas para o estudo da interação de *L. acidophilus* e *C. albicans*. Em alguns grupos, denominados terapêuticos, primeiramente foi injetada em *G. mellonella* a suspensão padronizada de *C. albicans*, e uma hora depois foi realizada a inoculação das células ou sobrenadante de *L. acidophilus*. Em outros grupos, denominados profiláticos, a inoculação da célula ou do sobrenadante de *L. acidophilus* foi realizada uma hora antes da inoculação de *C. albicans*.

Em todos os grupos foram realizadas duas injeções, uma na última prolegue esquerda e outra na última prolegue direita. Para o

grupo controle de *C. albicans* e PBS foi utilizada a mesma quantidade de PBS para a injeção na outra prolegue. Foram utilizados para o experimento quatro grupos controle: controle apenas com a inoculação de PBS nas duas prolegues, controle *C. albicans* e PBS, controle *C. albicans* e caldo MRS (Terapêutico) e controle caldo MRS e *C. albicans* (Profilático).

De acordo com os resultados obtidos, a virulência de *C. albicans* no modelo de *G. mellonella* foi dependente do grupo estudado. Os grupos controle com inoculação de *C. albicans* e PBS, *C. albicans* e caldo MRS (Terapêutico) e caldo MRS e *C. albicans* (Profilático) foram os mais virulentos com morte de 100% das lagartas no período de até 48 h.

Quando foi realizada a interação de *C. albicans* com células ou sobrenadante de *L. acidophilus* a sobrevivência das lagartas aumentou, tanto nos grupos profiláticos como nos terapêuticos, permanecendo lagartas vivas durante todos os dias do experimento (168h) (Figura 11).

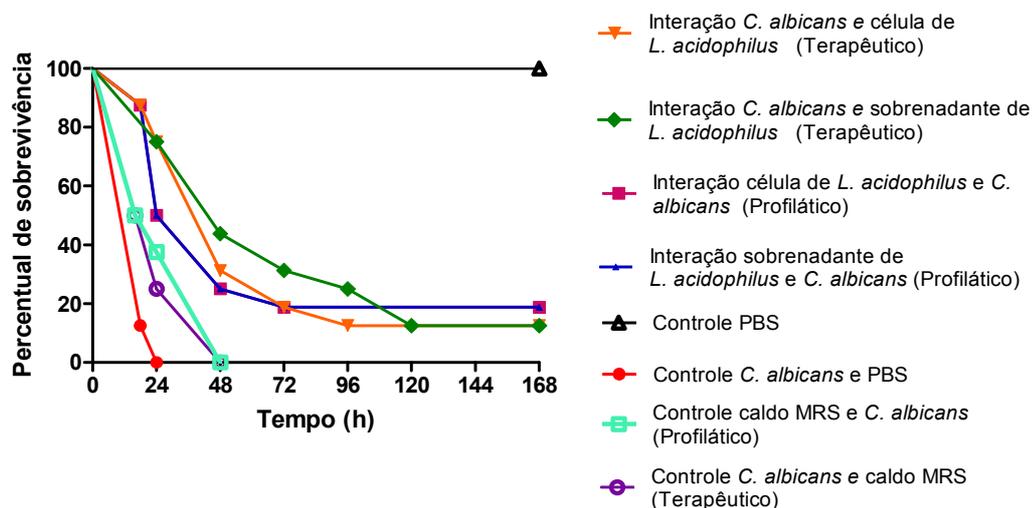


Figura 11 - Curva de sobrevivência em *G. mellonella* dos diferentes grupos experimentais. Verificou-se que no grupo controle PBS não ocorreu morte de nenhuma lagarta. Para os grupos controle *C. albicans* e PBS ou caldo MRS, profilático ou terapêutico, houve morte de 100% das lagartas em até 48 h.

Na análise estatística foram comparados os grupos controles *C. albicans* e PBS e *C. albicans* e caldo MRS com os grupos das interações com o sobrenadante ou célula de *L. acidophilus*, tanto quando estes foram aplicados profilática ou terapêuticamente e verificou-se que a sobrevivência das lagartas foi maior nos grupos das interações com diferença estatisticamente significativa.

Quando a comparação foi realizada entre os grupos controle *C. albicans* e PBS e controle *C. albicans* e caldo MRS foi verificado que não houve diferença estatística entre os dois grupos, tanto para a inoculação profilática como terapêutica do caldo MRS, mostrando mais uma vez que apenas o caldo MRS não tem a capacidade de induzir a redução na virulência de *C. albicans*. Os valores de p para todos os grupos experimentais estão descritos na Tabela 7.

Através da análise estatística, a mediana de sobrevivência para o grupo controle de *C. albicans* e PBS foi de 18h, para os grupos profiláticos com a inoculação de células ou sobrenadante de *L. acidophilus* de 36h e para os grupos terapêuticos de 48h. Apesar da mediana de sobrevivência ter sido maior no grupo das interações terapêuticas quando a comparação foi realizada entre os grupos profiláticos e terapêuticos das interações pode-se verificar que não houve diferença estatística entre eles. Devido ao resultado obtido a partir da mediana de sobrevivência, para realização dos experimentos subsequentes foram utilizados os grupos terapêuticos.

Tabela 7 – Valores de p comparando os grupos do experimento da curva de sobrevivência em *G. mellonella*

	A	B	C	D	E	F	G
A	-	0,6084	0,6680	0,7160	0,0001	0,0012	0,0048
B	-	-	0,5188	0,5131	0,0001	0,0002	0,0008
C	-	-	-	1,0000	0,0001	0,0152	0,0490
D	-	-	-	-	0,0001	0,0152	0,0490
E	-	-	-	-	-	0,4214	0,3062
F	-	-	-	-	-	-	0,5678

A) Grupo interação *C. albicans* e célula de *L. acidophilus* (Terapêutico); B) Grupo interação *C. albicans* e sobrenadante de *L. acidophilus* (Terapêutico); C) Grupo interação célula de *L. acidophilus* e *C. albicans* (Profilático); D) Grupo interação sobrenadante *L. acidophilus* e *C. albicans* (Profilático); E) Grupo controle *C. albicans* e PBS; F) Grupo controle *C. albicans* e caldo MRS (Terapêutico); G) Grupo controle caldo MRS e *C. albicans* (Profilático). Valor de p obtido na comparação dos diferentes grupos (Log-rank , $p \leq 0,05$)

5.2.2 Estudo da cultura de tecidos - Contagem de UFC/mL

Para quantificar a presença de *C. albicans* na infecção em *G. mellonella* foi determinado o número de unidades formadoras de colônias por mL de *C. albicans* recuperadas da hemolinfa da lagarta nos tempos de 0, 4, 8, 12, 18 e 24 h após a infecção. Neste experimento foram avaliados três grupos experimentais: Interação *C. albicans* e célula de *L. acidophilus*, Interação *C. albicans* e sobrenadante de *L. acidophilus* e o Controle *C. albicans* e caldo MRS. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada grupo e tempo analisado.

Através dos resultados obtidos verificou-se haver um comportamento semelhante no crescimento de *C. albicans* em todos os grupos experimentais (Figura 12). Apenas no tempo de 24 h da infecção foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados (Tabela 8).

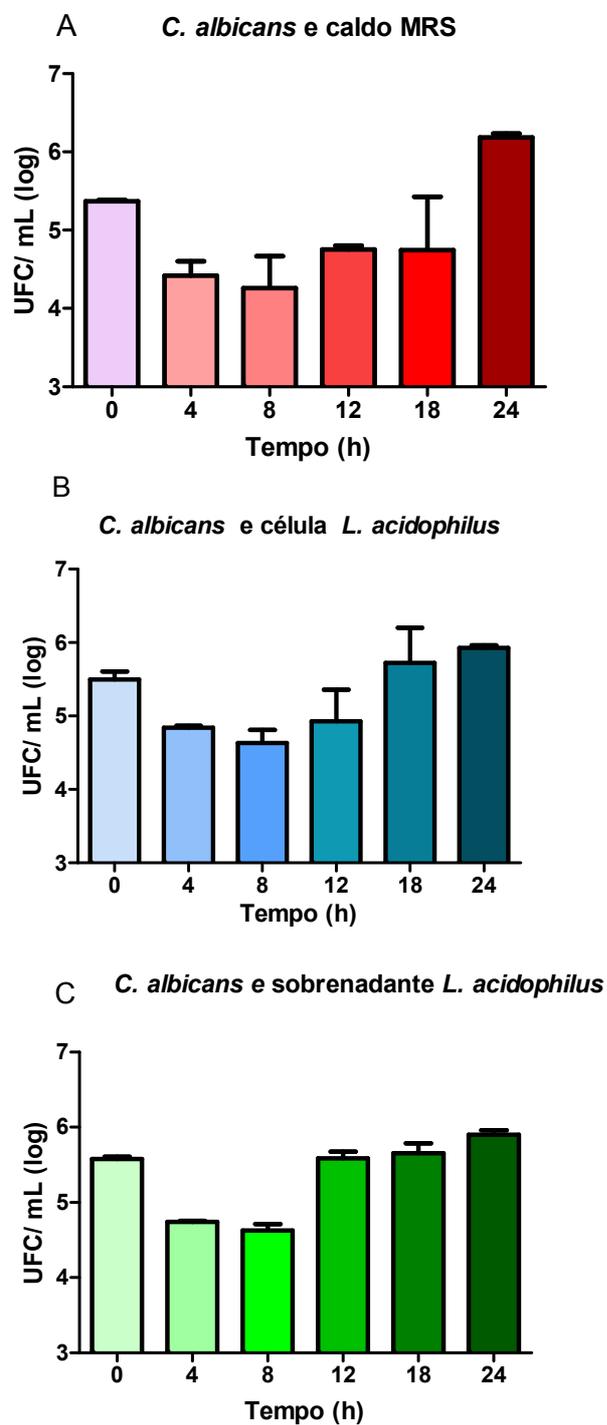


Figura 12 - Média e desvio padrão (Log_{10}) dos diferentes grupos experimentais nos tempos de 0, 4, 8, 12, 18 e 24 h. A) Controle *C. albicans* e caldo MRS.; B) Interação *C. albicans* e célula de *L. acidophilus*; C) Interação *C. albicans* e sobrenadante de *L. acidophilus*. Verifica-se o comportamento semelhante dos grupos em relação ao crescimento de *C. albicans* nos diferentes tempos da infecção.

Tabela 8 - Médias e desvio-padrão dos números de UFC/mL de *C. albicans* (Log10) obtidos nos ensaios realizados, nas diferentes condições experimentais

Tempo (h)	Interação <i>C. albicans</i> e célula <i>L. acidophilus</i>	Interação <i>C. albicans</i> e sobrenadante <i>L. acidophilus</i>	Controle <i>C. albicans</i> e caldo MRS	Valor de p*
0	5,50 ± 0,19	5,58 ± 0,05	5,37 ± 0,02	0,149
4	4,84 ± 0,04	4,74 ± 0,03	4,42 ± 0,18	0,068
8	4,63 ± 0,30	4,62 ± 0,15	4,26 ± 0,40	0,551
12	4,93 ± 0,75	5,59 ± 0,15	4,76 ± 0,04	0,128
18	5,72 ± 0,83	5,65 ± 0,24	4,74 ± 0,68	0,351
24	5,93 ± 0,06	5,90 ± 0,10	6,19 ± 0,05	0,009

*Valor de p obtido na comparação dos grupos experimentais (Teste ANOVA, $p \leq 0,05$)

Na Tabela 9 estão descritos os valores de p para o tempo de 24 h de infecção por *C. albicans* em *G. mellonella*. Os resultados mostraram que a diferença estatística ocorreu apenas quando foram comparados o grupo controle com os grupos das interações. Quando a comparação foi realizada entre os grupos das interações a diferença estatística não foi percebida.

Tabela 9 – Valores de p relativos à contagem de UFC/mL após 24h de infecção em *G. mellonella*

Valor de p*	Interação <i>C. albicans</i> e célula de <i>L. acidophilus</i>	Interação <i>C. albicans</i> e sobrenadante de <i>L. acidophilus</i>	Controle <i>C. albicans</i> e caldo MRS
Interação <i>C. albicans</i> e célula <i>L. acidophilus</i>	–	0,9251	0,0205
Interação <i>C. albicans</i> e sobrenadante de <i>L. acidophilus</i>	–	–	0,0135

*Valor de p obtido na comparação dos grupos experimentais (Teste Tukey, $p \leq 0,05$)

No grupo da interação *C. albicans* e célula de *L. acidophilus* foi realizada também a contagem do número de unidades formadas colônias por mL de *L. acidophilus* nos tempos de 0, 4, 8, 12, 18 e 24 h (Figura 13). Através dos resultados foi possível verificar que houve um comportamento semelhante no crescimento de *L. acidophilus* em todos os tempos testados sem ter sido encontrada diferença estatística entre os tempos analisados.

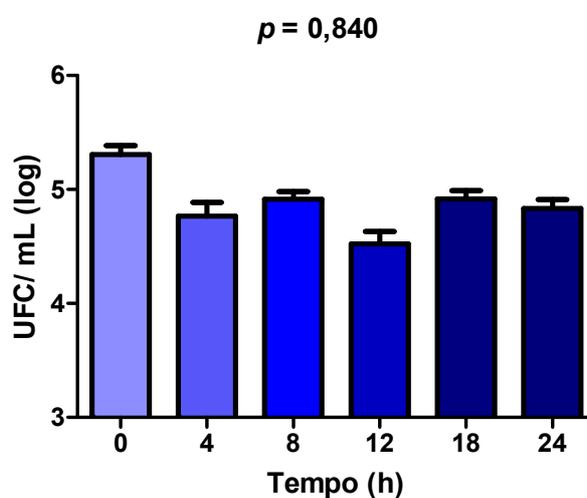


Figura 13- Média e desvio padrão (Log_{10}) de UFC/mL de *L. acidophilus* do grupo da interação *C. albicans* e célula de *L. acidophilus* nos tempos de 0, 4, 8, 12, 18 e 24 h. Verificou-se o comportamento semelhante entre os tempos testados, sem diferença estatisticamente significativa (Teste de ANOVA, $p \leq 0,05$).

5.2.3 Análise histológica de *G. mellonella*

Os cortes histológicos analisados referem-se ao corpo de gordura da lagarta *G. mellonella* no estágio final da fase larval que foram seccionados longitudinalmente na porção perivisceral após 18 h de infecção por *C. albicans*.

Em cada grupo foi extraído o corpo de gordura de 5

lagartas. As peças foram preparadas e as lâminas coradas com hematoxina - eosina (HE) e ácido periódico-Schiff (PAS).

Nas lâminas coradas com HE do grupo controle sem infecção por *C. albicans* no qual foi injetado apenas PBS nas duas prolegues, foram analisadas estruturas histomorfológicas presentes na porção perivisceral do corpo de gordura. Esta porção engloba órgãos internos da lagarta e nos cortes histológicos foram observadas partes de alguns destes órgãos que estão descritos nas Figuras 14, 15 e 16.

O corpo de gordura da lagarta é composto basicamente por duas células, os trofócitos ou adipócitos e os enócitos. Os trofócitos apareceram em maior número em todos os cortes analisados. Suas células tinham aspecto globuloso com a presença de um núcleo irregular na porção central da célula (Figura 17). Os enócitos foram encontrados em menor quantidade espalhados pelo corpo de gordura, apresentando núcleo arredondado ou ligeiramente elíptico (Figura 17).

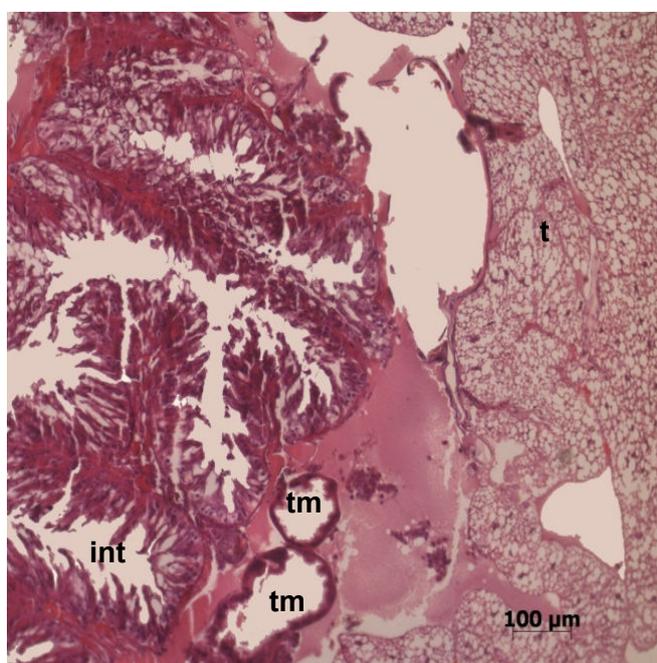


Figura 14 - Corte histológico do corpo de gordura de *G. mellonella* do grupo controle PBS. Observa-se a presença dos túbulos de Malpighi (tm), parte do intestino (int) e trofócitos (t) HE; aumento original: 100x.

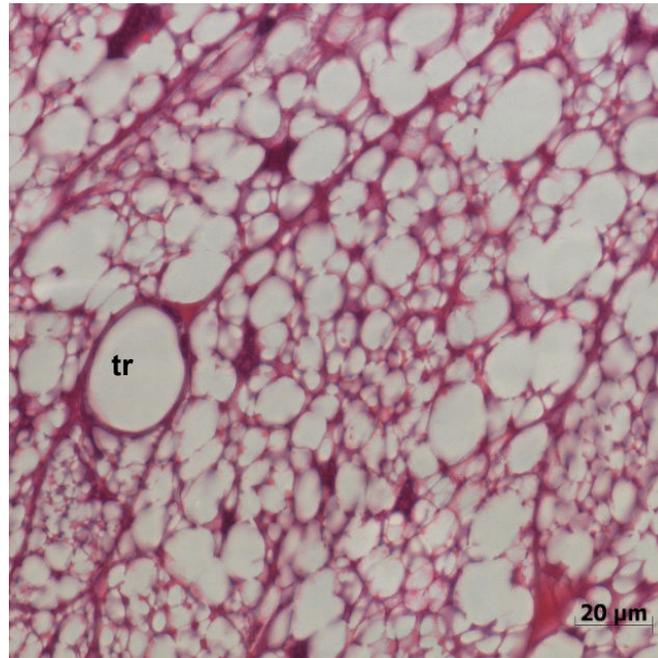


Figura 15 - Corte histológico do corpo do gordura de *G. mellonella* do grupo controle PBS. Observa-se a presença da traquéia (tr) envolvida pelos trofócitos do corpo de gordura. HE; aumento original: 630x.



Figura 16 - Corte histológico do corpo do gordura de *G. mellonella* do grupo controle PBS. Observa-se a presença do túbulo de Malpighi (tm) responsável pela remoção dos excretas presentes na hemolinfa, HE; aumento original: 630x.

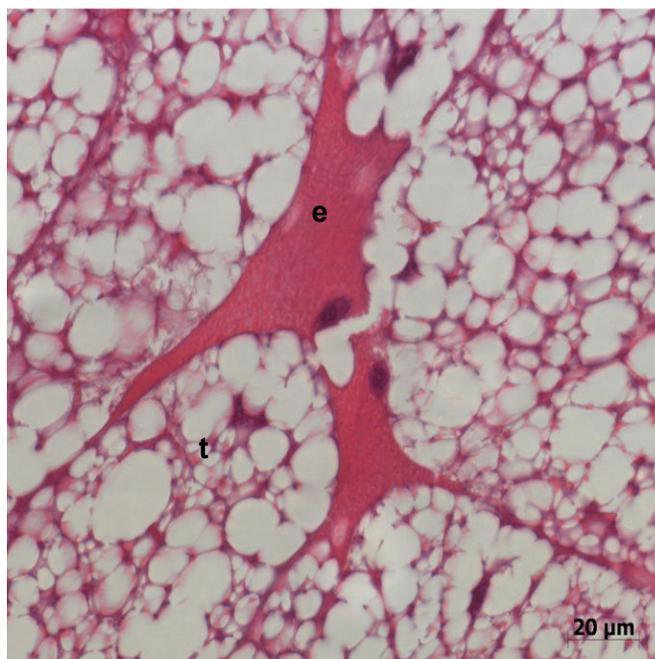


Figura 17 - Corte histológico do corpo de gordura de *G. mellonella* do grupo controle PBS. Observa-se a presença de trofócitos (t) com os núcleos irregulares e os enócitos (e). HE; aumento original: 630x.

Nos grupos das lagartas infectadas por *C. albicans* dos cortes histológicos corados com PAS, as hifas e leveduras presentes não se encontravam espalhadas de maneira uniforme pelo corpo de gordura havendo a presença de agrupamentos em determinados pontos dos cortes histológicos (Figura 19 a 23). A localização destes agrupamentos de hifas e leveduras não foi a mesma em todos os cortes, podendo estar localizados próximo aos órgãos ou espalhados pelo tecido adiposo.

Devido ao grande número de hifas e leveduras presentes nestes agrupamentos não foi possível contar individualmente o número de hifas e leveduras. Para a análise foram fotografadas todas as áreas contendo hifas e leveduras com aumento de 1000x e em cada imagem foi determinada a área ocupada por hifas e leveduras em μm . Todas as áreas de cada corte foram somadas, o resultado convertido para logaritmo de base 10 e realizada a análise estatística.

As médias e desvio padrão dos grupos analisados estão apresentados na Figura 18. Através dessa análise verificou-se não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados.

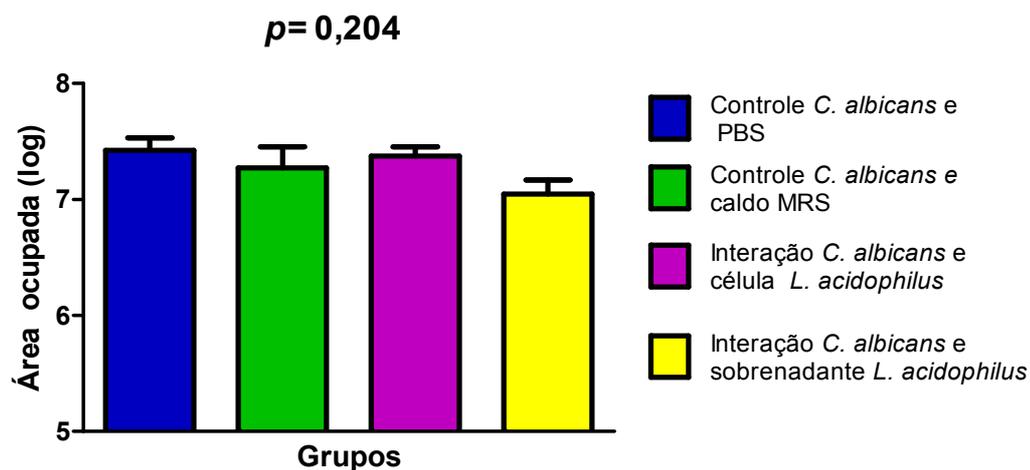


Figura 18 - Média e desvio padrão (Log_{10}) da área ocupada por hifas e/ou leveduras dos diferentes grupos experimentais após 18h de infecção. (Teste ANOVA, $p \leq 0,05$).

As Figuras de 19 a 23 representam os cortes histológicos em coloração PAS dos diferentes grupos experimentais analisados.

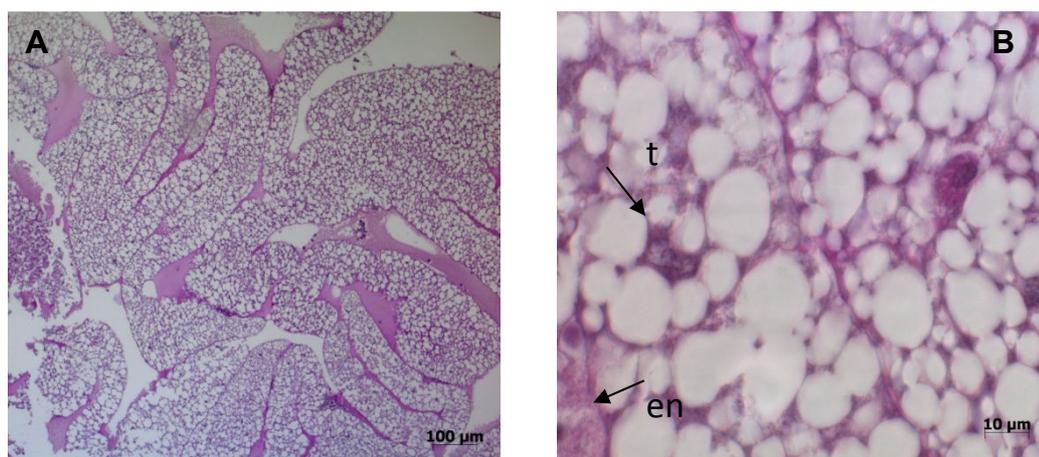


Figura 19 – Corte histológico do corpo do gordura de *G. mellonella* do grupo controle PBS. A) Aspecto normal do corpo de gordura. PAS; aumento original: 100x; B) As setas destacam as principais células presentes no corpo de gordura da lagarta, trofócitos (t) e enócitos (en). PAS; aumento original: 1000x.

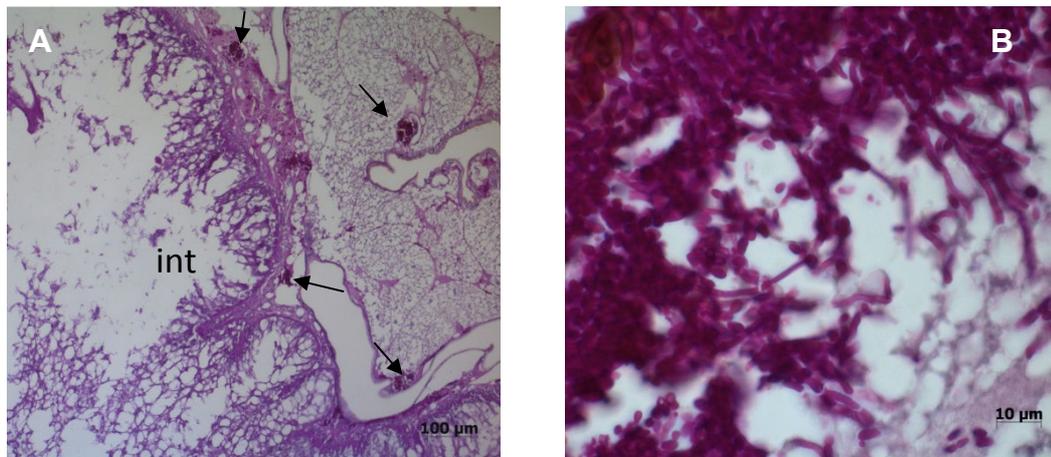


Figura 20 - Corte histológico do corpo do gordura de *G. mellonella* do grupo interação *C. albicans* e célula de *L. acidophilus*. A) Observar-se parte do intestino da lagarta (int) e nas setas escuras a presença dos agrupamentos de hifas e leveduras. PAS; aumento original: 100X; B) Observa-se a presença de hifas e leveduras. PAS; aumento original: 1000X.

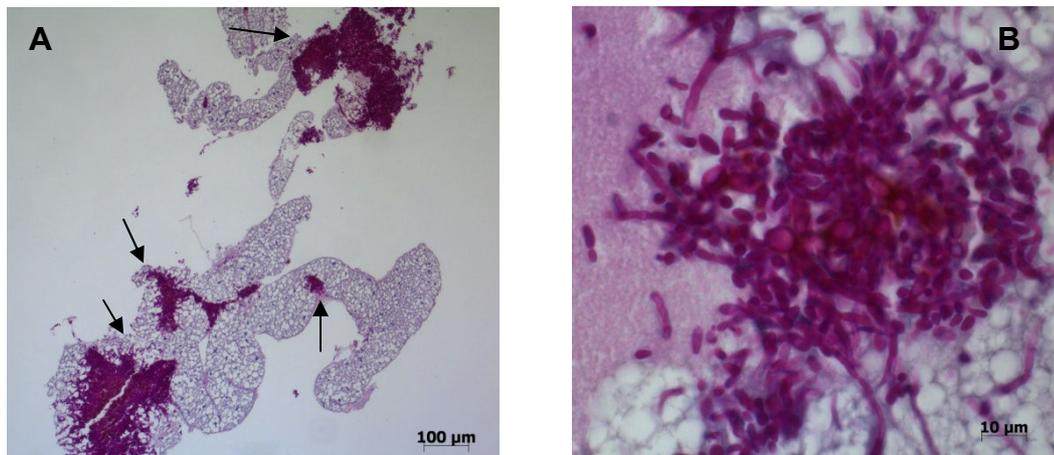


Figura 21 - Corte histológico do corpo do gordura de *G. mellonella* do grupo interação *C. albicans* e sobrenadante de *L. acidophilus*. A) Observa-se nas setas escuras a presença aglomerados de hifas e leveduras. PAS; aumento original: 100x; B) Observa-se a presença de hifas e leveduras em maior aumento. PAS; aumento original: 1000x.

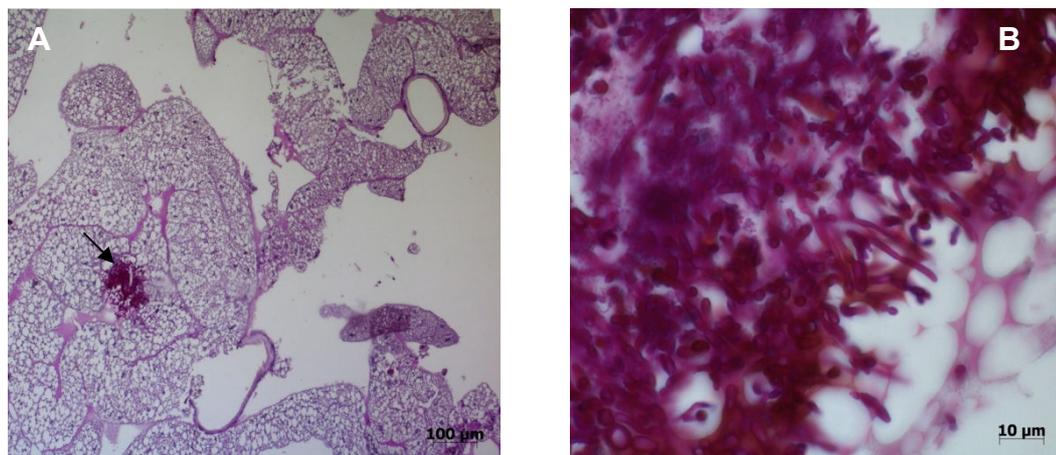


Figura 22 – Corte histológico do corpo do gordura de *G. mellonella* do grupo controle *C. albicans* e PBS. A) Observa-se na seta escura a presença aglomerados de hifas e leveduras. PAS; aumento original: 100x; B) Observa-se a presença de hifas e leveduras em maior aumento. PAS; aumento original: 1000x.

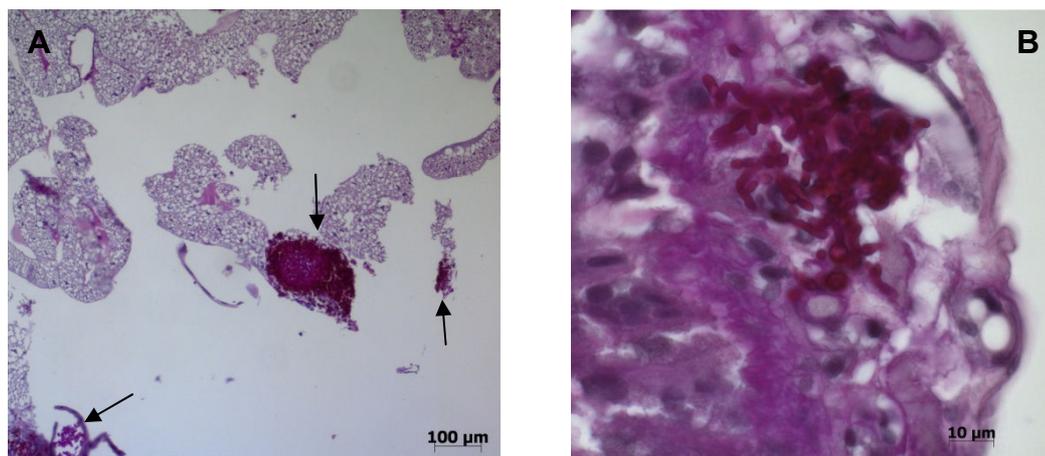


Figura 23 - Corte histológico do corpo do gordura de *G. mellonella* do grupo controle *C. albicans* e caldo MRS. A) Observa-se nas setas escuras a presença de aglomerados hifas e leveduras. PAS; aumento original: 100x; B) Observa-se a presença de hifas e leveduras em maior aumento. PAS; aumento original: 1000x.

6 DISCUSSÃO

L. acidophilus são citados na literatura como organismos probióticos que proporcionam excelentes benefícios terapêuticos. A atividade biológica destas bactérias exerce influência sobre micro-organismos comensais devido à produção de ácido lático e bacteriocinas. Estas substâncias podem inibir o crescimento de patógenos e também alterar o equilíbrio ecológico de micro-organismos comensais entéricos (Kailasapathy, Chin, 2000). A prevenção da formação de biofilme por estes agentes derivados de espécies de *Lactobacillus* parece ser uma abordagem possível que tem sido testada atualmente (Walencka et al., 2008). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de *L. acidophilus* sobre biofilmes formados *in vitro* por *C. albicans* e a sua influência sobre a candidose experimental induzida em modelo de *G. mellonella*.

A literatura tem mostrado que nas interações entre *Candida* e *Lactobacillus*, as células de *Lactobacillus* apresentam efeitos inibitórios sobre as leveduras do gênero *Candida* (Noverr, Huffnagle, 2004; Thein et al., 2006; Smith et al., 2012). Neste trabalho, inicialmente, utilizamos *L. acidophilus* em várias fases de crescimento da cultura bacteriana para verificar o tempo de crescimento bacteriano com maior efeito inibitório sobre *C. albicans* (4, 6, 18 e 24 h). Nossos resultados demonstraram que houve redução na contagem de UFC/mL de *C. albicans* nos biofilmes heterotípicos com *L. acidophilus* em relação ao grupo controle para todos os tempos testados, porém esta diferença foi estatisticamente significativa apenas para o grupo com crescimento de 24 h com percentual de redução de 57%.

Estes resultados estão coerentes com os apresentados

por Thein et al. (2006) que demonstraram uma redução de até 36% no crescimento de *C. albicans* quando associados com *L. acidophilus* em biofilmes polimicrobianos, resultado este obtido a partir média das concentrações testadas. Resultados semelhantes foram também encontrados por Smith et al. (2012) que realizaram experimento com modelo de cultura contínua simulando a microbiota da porção superior do trato gastrointestinal de pacientes com disfagia e que necessitavam de alimentação parenteral. Os resultados mostraram uma contagem de células do biofilme de *C. albicans* reduzida em cerca de 2 log₁₀ durante a alimentação com simbiótico (composto pelos probióticos *L. acidophilus* DUN-311, *Bifidobacterium bifidum* BB-02 e *Bifidobacterium lactis* BL-01).

Em nosso trabalho também foi comprovado que ao interagirmos apenas o sobrenadante resultante do metabolismo de *L. acidophilus* com o biofilme formado por *C. albicans*, ocorreu redução significativa na contagem de UFC/mL desse fungo. Com isto, demonstramos que, durante a interação, há uma relação de competição entre as duas espécies determinada pela presença de substâncias que modificam o meio tornando-o hostil para desenvolvimento do fungo.

Em determinadas interações, moléculas secretadas no meio externo por bactérias podem determinar a inibição do crescimento de uma segunda espécie (Martins et al., 2007; Walencka et al., 2008; Sadowska et al., 2010). Isto tem sido demonstrado em diversos trabalhos na literatura, como no estudo de Walencka et al. (2008), no qual utilizaram uma substância biosurfactante obtida a partir do sobrenadante de uma cepa de *L. acidophilus* sobre biofilmes formados por *S. aureus* e *S. epidermidis*. Foi demonstrado através da microscopia confocal, que a presença dessa substância levou a formação de biofilmes que cobriram uma menor área da superfície da placa de 24 poços, com uma diminuição no volume e espessura total.

Pascual et al. (2008) realizaram isolamento, purificação e caracterização parcial de uma bacteriocina presente no sobrenadante de

L. fermentum L23, cepa isolada da secreção vaginal de mulheres saudáveis. Foi verificado que a presença desta substância era responsável por um amplo espectro de inibição quando inoculada juntamente com bactérias patogênicas Gram-negativas e Gram-positivas e espécies de *Candida*. Foi comprovado também que a substância era de origem proteica por apresentar atividade nula na presença de enzimas proteolíticas, sendo estável ao calor e com atividade progressivamente inativa em pH alcalino.

A interação no biofilme *in vitro* foi comprovada em nosso trabalho, pela análise da microscopia eletrônica de varredura onde foi observado aderência de *L. acidophilus* sobre as leveduras de *C. albicans*, mostrando uma íntima associação entre esses dois micro-organismos. Na análise das imagens não foi possível verificar uma redução do número de células de *C. albicans* quando os biofilmes monotípicos foram comparados aos heterotípicos. Entretanto, foi verificada uma redução na formação de hifas e pseudohifas nos grupos de interação. Etgeton et al. (2011) também verificaram, por meio de microscopia eletônica de varredura, a presença de co-agregação entre *C. albicans* e *L. acidophilus* na adesão às células epiteliais vaginais humanas em estudo *in vitro*.

Nossos experimentos com filamentação *in vitro* demonstraram que a interação entre *C. albicans* e *L. acidophilus* levou a uma redução na quantidade de hifas de até 1,2 Log₁₀ quando comparada ao grupo controle, formado apenas por *C. albicans*. A formação de hifas parece ser um dos pontos críticos para o desenvolvimento de biofilmes de *C. albicans*, pois estudos demonstram que mutações nos genes relacionados com a formação de hifas resultaram em graves defeitos na formação do biofilme *in vitro* (Nobile, Michell, 2005; Nobile, Mitchell, 2006; Fucks et al., 2010a).

Tem sido demonstrado na literatura que a presença de metabólitos liberados por espécies de *Lactobacillus*, como por exemplo, o butirato de sódio, inibe a formação de biofilme, potencializa o efeito de

antifúngicos e suprime a filamentação de *C. albicans*, diminuindo a patogenicidade do fungo (Nguyen et al. , 2011).

No estudo das interações de *C. albicans* e *P. aeruginosa*, realizado por Morales et al. (2013), foi demonstrado que fenazinas, produzidas por *P. aeruginosa* podem modular o metabolismo de *C. albicans*. A presença de baixas concentrações desta substância permitiu o crescimento de *C. albicans*, mas afetou o desenvolvimento dos biofilmes, inibiu a transição da levedura para a forma de hifa e levou a formação de colônias rugosas.

Noverr e Huffnagle (2004) examinaram o efeito de culturas vivas, sobrenadantes ou culturas mortas de bactérias probióticas (*L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus*) sobre a morfogênese de *C. albicans* e verificaram que houve inibição na formação do tubo germinativo quando *C. albicans* interagiu com as células vivas ou o sobrenadante de *Lactobacillus*. Foi verificado também que os sobrenadantes obtidos a partir de culturas de 2 horas destas bactérias inibiram a formação de tubo germinativo de *C. albicans*. No entanto, a adição de culturas de crescimento de 24 h levou uma inibição completa, o que sugere que o acúmulo de um composto solúvel do sobrenadante é responsável por esta inibição.

Outro fator a ser considerado na filamentação de *C. albicans* é o pH do meio. Para *C. albicans*, o pH serve como um forte sinal para diferenciação morfológica. Condições ácidas favorecem o crescimento da levedura e em contrapartida condições alcalinas podem favorecer o crescimento das hifas (Davis, 2003).

A formação de ácido láctico e outros ácidos orgânicos produzidos por *Lactobacillus* podem provocar uma diminuição substancial do valor de pH o que desempenha um importante papel no crescimento dos fungos (Köhler et al., 2012). No estudo realizado por Köhler et al. (2012), foi investigado o potencial do *L. rhamnosus* e *L. reuteri* para o controle de *C. albicans*. A maior inibição do fungo foi detectada no

crescimento em caldo MRS com ácido láctico, que resultou em um pH de 4,2. Levando-se em consideração que o sobrenadante utilizado em nosso experimento foi mantido no caldo MRS durante os diferentes ensaios pode ter ocorrido uma maior redução do pH nestes grupos o que levou uma morfologia final alterada. Por este motivo em nosso trabalho foi também realizado um grupo controle no qual ao invés do PBS utilizou-se o caldo MRS, verificando-se que não houve diferença na quantidade de hifas formadas entre os grupos controle *C. albicans* e PBS e controle *C. albicans* e caldo MRS. Com isto, pudemos concluir que a presença da célula e/ou dos produtos do metabolismo de *L. acidophilus* são essenciais para que ocorra uma redução na formação de hifas durante a interação com *C. albicans* nos experimentos de filamentação *in vitro*.

Para a análise da interação *L. acidophilus* e *C. albicans* *in vivo* utilizamos como modelo experimental as lagartas de *G. mellonella*. Entre as vantagens de sua utilização deste modelo experimental podemos destacar a possibilidade da utilização de temperatura semelhante a existente em mamíferos, a injeção de um inóculo padronizado de micro-organismo e a possibilidade de redução da utilização de mamíferos em trabalhos experimentais, empregando lagartas como um mecanismo de triagem primária inicial (Cotter et al., 2000; Brennan et al., 2002; Pukkila-Worley et al., 2009; Fuchs et al., 2010b).

Até o momento, não encontramos na literatura estudos de infecção experimental em *G. mellonella* por *L. acidophilus*. Como o objetivo desse trabalho foi estudar a influência de *L. acidophilus* sobre a candidose experimental em *G. mellonella*, primeiramente foi necessário testar a virulência de *L. acidophilus* sobre as lagartas de *G. mellonella*. Desse modo, foram injetadas diferentes concentrações de *L. acidophilus* em *G. mellonella* (10^4 a 10^8 células/mL), verificando-se que *L. acidophilus* não causou morte dos animais testados, portanto não foi patogênico para esse modelo experimental.

Existem trabalhos na literatura utilizando cepas de

Lactococcus lactis, como controle para o estudo da infecção experimental em modelo de *G. mellonella* por não ser considerado patogênico para este modelo experimental, uma vez que, não ocorre a morte de nenhuma lagarta inoculada com este micro-organismo (Joyce, Gahan, 2010; Michaux et al., 2011).

Da mesma forma foi demonstrado que para *C. elegans*, outro modelo de invertebrado, a bactéria *L. acidophilus* também não é patogênica sendo incapaz de colonizar seu intestino. Além disto, foi demonstrado que a inoculação de *L. acidophilus* diminuiu significativamente a infecção por *E. faecalis* e prolongou a sobrevivência do neomatodo quando expostos a cepas de *E. faecalis* e *S. aureus* (Kim Y, Mylonakis, 2012).

No estudo *in vivo* da interação de *C. albicans* e *L. acidophilus* foram realizados experimentos para verificar se a presença de *L. acidophilus* injetado profilática ou terapêuticamente em *G. mellonella* poderia ter um efeito sobre a infecção sistêmica por *C. albicans* neste modelo experimental. Comprovamos que tanto na inoculação profilática, como terapêutica, houve um aumento significativo na sobrevivência da lagarta infectada por *C. albicans*. Estes resultados foram obtidos tanto para as interações com a célula como com sobrenadante de *L. acidophilus*, mostrando que, também *in vivo*, a ação dos metabólitos produzidos pela bactéria tem um efeito sobre a virulência de *C. albicans*.

Resultados semelhantes foram encontrados por Matsubara et al. (2012), que avaliaram a colonização oral por *C. albicans* em camundongos imunossuprimidos. Os camundongos foram divididos em quatro grupos: o primeiro foi tratado com nistatina, o segundo com *L. acidophilus* e o terceiro com *L. rhamnosus*, enquanto que o último grupo recebeu tratamento apenas com PBS. O tratamento com nistatina começou um dia após a inoculação experimental de *C. albicans* sendo realizada diariamente com a duração de 13 dias. O tratamento com os probióticos foi realizado diariamente, iniciando-se duas semanas antes da

inoculação de *C. albicans* e se mantendo por mais 27 dias após a infecção por *Candida albicans*. A contagem de *Candida* a partir de esfregaços da mucosa oral dos animais mostrou uma diminuição significativa na presença de *C. albicans* nos grupos tratados com as bactérias probióticas (*L. acidophilus* e *L. rhamnosus*) em comparação ao grupo de animais não tratados. Além disso, o tratamento com o probiótico levou a uma maior redução de *C. albicans* do que o tratamento com nistatina.

McCann et al. (2012) trataram em lagartas de *G. mellonella* infectadas por *C. albicans* com compostos antifúngicos formados por cetoconazol modificados por nanopartículas de prata, que foram administrados de forma profilática ou terapêutica. De forma semelhante ao nosso estudo, em cada caso, a sobrevivência das lagartas aumentou significativamente com a presença do composto com uma taxa de sobrevivência de até 90% após 72h quando a administração foi profilática e 75% quando a administração foi realizada após 1 h da infecção por *C. albicans*. Diferente de nosso experimento a administração profilática do complexo foi mais eficaz no aumento da taxa de sobrevivência de *G. mellonella* infectada por *C. albicans*. Segundo os autores isto pode ser atribuído não apenas a eficácia do composto, mas também pelo aumento esperado no número de hemócitos, peptídeos antimicrobianos e proteínas produzidas pelo sistema imune inato da lagarta em resposta à presença de uma substância estranha que foi administrada. A partir destes resultados pode-se supor que *L. acidophilus* além de não ser patogênico para *G. mellonella*, também não é reconhecido pelo sistema imune inato da lagarta como um agente agressor.

Existem trabalhos na literatura que demonstram que as bactérias probióticas estão envolvidas na regulação do sistema imune do hospedeiro (Kim Y, Mylonakis, 2012). O sistema imune dos insetos é constituído basicamente por duas respostas imunes, a resposta humoral

que resulta na produção de peptídeos antimicrobianos solúveis, formação de melanina e coagulação, e a resposta celular baseada na ação de hemócitos que estão envolvidos em reações de defesa, incluindo a fagocitose e encapsulamento. Estas respostas imunes são desencadeadas através do reconhecimento de micro-organismos por receptores específicos existentes em proteínas do hospedeiro. Tem sido amplamente demonstrado na literatura que estas reações imunológicas são semelhantes as que ocorrem em vertebrados e que, portanto, estes modelos experimentais seriam úteis para o estudo da virulência de fungos e bactérias (Kim C et al., 2010).

De acordo com os resultados dos experimentos de UFC/mL *in vivo* pudemos verificar que ocorreu uma resposta imune da lagarta após a inoculação de *C. albicans*. O número de micro-organismos que pôde ser recuperado a partir da hemolinfa das lagartas logo após a inoculação (tempo 0) não diferiu do número usado para iniciar a infecção, no entanto, após 8 horas de infecção pode-se perceber a maior redução do número de células recuperadas. Após este tempo, provavelmente o sistema imonológico da lagarta não teve como combater a infecção e a contagem do número de micro-organismos foi aumentando gradativamente, sendo que, a maior contagem ocorreu no tempo de 24 h. Pudemos observar o mesmo comportamento do crescimento microbiano tanto nos grupos das interações como no controle, porém, é importante ressaltar que houve um crescimento significativamente menor de *C. albicans* no tempo de 24 h nos grupos das interações quando comparado ao controle. Com isto podemos supor que a presença de *L. acidophilus* na lagarta a torna mais resistente à infecção quando comparado ao grupo controle. Outro fator interessante foi a presença constante do número de bactérias durante todos os tempos analisados, demonstrando mais uma vez que, *L. acidophilus* não é patogênico para este modelo experimental e que esteve presente interagindo com *C. albicans in vivo*, alterando o seu comportamento.

Evans e Rozen em 2012 verificaram o crescimento de cepas de *S. pneumoniae* que possuíam diferenças em sua virulência em modelo de *G. mellonella*. Neste estudo foram utilizados os tempos de análise de 0, 0,5, 1, 4 e 24 h. Assim como em nosso experimento o número de bactérias que pôde ser recuperado a partir da hemolinfa das lagartas durante as primeiras horas não diferiu do número usado no início da infecção. No entanto, o número médio de bactérias presentes da cepa mais virulenta aumentou, após 4 h. Em contraste, o número de bactérias da cepa menos virulenta caiu significativamente dentro dos primeiros 30 min de infecção. Um pequeno aumento no número de bactérias foi observado em algumas lagartas após 4 h. Estes dados mostram que a mortalidade elevada pode estar associada com a proliferação de bactérias dentro do hospedeiro e, portanto, com uma deficiência da resposta do sistema imune para se defender contra a infecção.

Na análise dos cortes histológicos do corpo de gordura de *G. mellonella* não foi verificada diferença estatisticamente significativa na presença de hifas e leveduras ao compararmos os grupos de interação e controle. Mesmo não tendo sido observado uma redução na quantidade de filamentos de *C. albicans* em *G. mellonella* tratados com *L. acidophilus*, houve um aumento na sobrevivência dos animais que receberam *L. acidophilus*.

Ao analisar este aspecto, Fuchs et al. (2010a) verificaram que cepas mutantes de *Candida* que possuíam a incapacidade na formação de hifas *in vitro*, formavam leveduras e hifas no interior de *G. mellonella* e em ratos. Isto ocorreu para todas as cepas estudadas, com exceção da cepa mutante *flo8/ flo8* que não exibiu a formação de filamentos *in vivo*. Mesmo com formação de hifas a redução da virulência *in vivo* das cepas mutantes foi diferente dependendo da cepa analisada. A inoculação do mutante *tec1/ tec1* levou uma maior sobrevivência das lagartas quando comparada ao controle, permanecendo 50% das lagartas vivas após o período de 168 h. O mutante *kem1/ kem1* também

apresentou virulência reduzida com 50% das lagartas vivas após 72 h o mesmo ocorrendo com o mutante *flo8/flo8*. Porém, as cepas mutantes *suv3/suv3* e *bcr1/bcr1* não apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao aumento da sobrevivência quando comparados as cepas de referência DAY286 e DAY185 respectivamente, atingindo cada uma 50% de mortalidade em 24 h após a infecção. Segundo os autores, a capacidade das cepas mutantes formarem filamentos com a virulência alterada sugere que a filamentação isolada não é suficiente para matar *G. mellonella*.

Interações entre bactérias e fungos são portanto altamente complexas, e uma série de fatores devem ser analisados em conjunto, como por exemplo, a virulência dos micro-organismos associadas a fatores ambientais e as interações entre as diferentes espécies presentes em um determinado nicho. Para que os resultados obtidos em nossas pesquisas se tornem mais próximos da realidade é essencial o desenvolvimento apropriado de modelos *in vitro* e em *in vivo* para caracterizar essas interações. Novos estudos são necessários para avaliar as alterações moleculares e a dinâmica da resposta imunológica na interação entre *C. albicans* e *L. acidophilus* visando uma maior compreensão da doença humana e o estabelecimento de novas terapias para a candidose.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos concluiu-se que:

- *L. acidophilus* foi capaz de inibir a formação de biofilme e filamentação por *C. albicans in vitro*;
- O tempo de cultura de *L. acidophilus* que apresentou maior efeito inibitório sobre o biofilme de *C. albicans* foi 24 horas;
- O sobrenadante da cultura de *L. acidophilus* também teve efeitos inibitórios sobre *C. albicans*, sugerindo que *L. acidophilus* pode secretar substâncias bacterianas com efeitos antifúngicos;
- A inoculação de *L. acidophilus* em *G. mellonella* infectadas por *C. albicans* diminuiu o número de leveduras na hemolinfa das lagartas e aumentou a sobrevivência desses animais;
- Não foi possível observar ação inibitória de *L. acidophilus* sobre a filamentação de *C. albicans* nos tecidos de *G. mellonella*.

8 REFERÊNCIAS*

Amdekar S, Dwivedi D, Roy P, Kushwah S, Singh V. Probiotics: multifarious oral vaccine against infectious traumas. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010;58(3):299-306.

Anami LC, Pereira CA, Guerra E, Assunção e Souza RO, Jorge AO, Bottino MA. Morphology and bacterial colonisation of tooth/ceramic restoration interface after different cement excess removal techniques. *J Dent.* 2012;40(9):742-9.

Bahnan W, Koussa J, Younes S, Rizk MA, Khalil B, Sitt SE, et al. Deletion of the *Candida albicans* PIR32 results in increased virulence, stress response, and upregulation of cell wall chitin deposition. *Mycopathologia* 2012;174(2):107-19.

Bamford CV, d'Mello A, Nobbs AH, Dutton LC, Vickerman MM, Jenkinson HF. *Streptococcus gordonii* modulates *Candida albicans* biofilm formation through intergeneric communication. *Infect Immun.* 2009;77(9):3696-704.

Bandara HM, Yau JY, Watt RM, Jin LJ, Samaranayake LP. *Pseudomonas aeruginosa* inhibits in-vitro *Candida* biofilm development. *BMC Microbiol.* 2010;10:125.

Bergin D, Reeves EP, Renwick J, Wientjes FB, Kavanagh K. Superoxide production in *Galleria mellonella* hemocytes: identification of proteins homologous to the NADPH oxidase complex of human neutrophils. *Infect Immun.* 2005;73(7):4161-70.

Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9(6):588-94.

*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

Brackman G, Cos P, Maes L, Nelis HJ, Coenye T. Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(6):2655-61.

Brennan M, Thomas DY, Whiteway M, Kavanagh K. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2002;34:153-7.

Cao F, Lane S, Raniga PP, Lu Y, Zhou Z, Ramon K, **et al**. The Flo8 transcription factor is essential for hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*. 2006;17(1):295-307.

Carvalho BRC. Estudo histológico, histoquímico e ultraestrutural do corpo gorduroso de larvas de *Anticarsia gemmatalis* [tese]. Londrina (PR): Universidade estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias; 2008.

Chassot F, Camacho DP, Patussi EV, Donatti L, Svidzinski TI, Consolaro ME. Can *Lactobacillus acidophilus* influence the adhesion capacity of *Candida albicans* on the combined contraceptive vaginal ring? *Contraception*. 2010;81(4):331-5.

Costa AC, Campos Rasteiro VM, da Silva Hashimoto ES, Araújo CF, Pereira CA, Junqueira JC, **et al**. Effect of erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy on buccal candidiasis infection of immunosuppressed mice and *Candida albicans* adherence to buccal epithelial cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012;114(1):67-74.

Cotter G, Doyle S, Kavanagh K. Development of an insect model for the in vivo pathogenity testing of yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000;27:163-9.

Davis D. Adaptation to environmental pH in *Candida albicans* and its relation to pathogenesis. *Curr Genet*. 2003 Oct;44(1):1-7.

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

Diaz PI, Xie Z, Sobue T, Thompson A, Biyikoglu B, Ricker A, **et al**. Synergistic interaction between *Candida albicans* and commensal oral streptococci in a novel in vitro mucosal model. *Infect Immun Inf*. 2012;80(2):620-32.

Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H, Dwivedi P, Diaz P, Vasilakos J. Characterization of Mucosal *Candida albicans* Biofilms. *PLoS One*. 2009;4(11):e7967.

Ekmekci H, Aslim B, Darilmaz DO. Factors affecting the coaggregation ability of vaginal *Lactobacilli* with *Candida* spp. *Ann Microbiol*. 2009;59(1):163-7.

Etgeton SA, Chassot F, Boer CG, Donatti L, Svidzinski TIE, Consolaro MEL. Influência da co-agregação entre *Candida albicans* e *Lactobacillus acidophilus* na capacidade de adesão destes microrganismos às células epiteliais vaginais humanas (CEVH). *Acta Sci Health Sci*. 2011;33(1):1-8.

Evans BA, Rozen DE. A *Streptococcus pneumoniae* infection model in larvae of the wax moth *Galleria mellonella*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(10):2653-60.

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

Fedhila S, Buisson C, Dussurget O, Serror P, Glomski IJ, Liehl P, et al. Comparative analysis of the virulence of invertebrate and mammalian pathogenic bacteria in the oral insect infection model *Galleria mellonella*. *J Invertebr Pathol*. 2010;103(1):24-9.

Ferreira RAC, Miyoko ME, Conte TH. Morfo-histologia do corpo gorduroso perivisceral em adultos de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera, Cerambycidae). *Rev Cien Agr Amb*. 2011;7(3):490-9.

Fitzsimmons N, Berry RR. Inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*: evidence for the involvement of a peroxidase system. *Microbios*. 1994;80:125-33.

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

Fuchs BB, Mylonakis E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. *Curr Opin Microbiol*. 2006;9(4):346-51.

Fuchs BB, O'Brien E, Khoury JB, Mylonakis E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence*. 2010b;1(6):475-82.

Gaddy JA, Arivett BA, McConnell MJ, López-Rojas R, Pachón J, Actis LA. Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. *Infect Immun*. 2012;80(3):1015-24.

Harriott MM, Noverr MC. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends Microbiol.* 2011;19(11):557-63.

Hasslof P, Hedberg M, Twetman S, Stecksén-Blicks C. Growth inhibition of oral *mutans streptococci* and *Candida* by commercial probiotic lactobacilli-an in vitro study. *BMC Oral Health.* 2010Jul 2;10:18.

Hawser SP, Douglas LJ. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(9):2128-31.

Jarosz LM, Deng DM, van der Mei HC, Crielard W, Krom BP. *Streptococcus mutans* competence-stimulating peptide inhibits *Candida albicans* hypha formation. *Eukaryot Cell.* 2009;8:1658-64.

Jorge AOC. *Microbiologia e Imunologia oral.* 1. ed. São Paulo: Elsevier; 2012.

Joyce SA, Gahan CG. Molecular pathogenesis of *Listeria monocytogenes* in the alternative model host *Galleria mellonella*. *Microbiology.* 2010;156(11):3456-68.

Junqueira JC, Colombo CE, Martins Jda S, Koga Ito CY, Carvalho YR, Jorge AO. Experimental candidosis and recovery of *Candida albicans* from the oral cavity of ovariectomized rats. *Microbiol Immunol.* 2005;49(3):199-207.

Junqueira JC, Fuchs BB, Muhammed M, Coleman JJ, Suleiman JM, Vilela SF, et al. Oral *Candida albicans* isolates from HIV-positive individuals have similar in vitro biofilm-forming ability and pathogenicity as invasive *Candida* isolates. *BMC Microbiol.* 2011;11:247.

Junqueira JC, Jorge AO, Barbosa JO, Rossoni RD, Vilela SF, Costa AC, et al. Photodynamic inactivation of biofilms formed by *Candida* spp., *Trichosporon mucoides*, and *Kodamaea ohmeri* by cationic nanoemulsion of zinc 2,9,16,23-tetrakis(phenylthio)-29H, 31H-phthalocyanine (ZnPc). *Lasers Med Sci.* 2012;27(6):1205-12.

Junqueira JC, Martins Jda S, Faria RL, Colombo CE, Jorge AO. Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats. *Lasers Med Sci.* 2009;24(6):877-84.

Kailasapathy K, Chin J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunol Cell Biol.* 2000;78(1):80-8

Keller MK, Hasslöf P, Stecksén-Blicks C, Twetman S. Co-aggregation and growth inhibition of probiotic lactobacilli and clinical isolates of mutans streptococci: an in vitro study. *Acta Odontol Scand*. 2011;69(5):263-8.

Kim CH, Shin YP, Noh MY, Jo YH, Han YS, Seong YS, et al. An insect multiligand recognition protein functions as an opsonin for the phagocytosis of microorganisms. *J Biol Chem*. 2010;285(33):25243-50.

Kim Y, Mylonakis E. *Caenorhabditis elegans* immune conditioning with the probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM enhances gram-positive immune responses. *Infect Immun*. 2012;80(7):2500-8.

Köhler GA, Assefa S, Reid G. Probiotic interference of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 with the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2012;2012:636474. doi: 10.1155/2012/636474.

Liu SQ, Tsao M. Enhancement of survival of probiotic and non-probiotic lactic acid bacteria by yeasts in fermented milk under non-refrigerated conditions. *Int J Food Microbiol*. 2009;153(1):34-8

Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*. 1986;50(4):353-80.

Lu Q, Jayatilake JA, Samaranayake LP, Jin L. Hyphal invasion of *Candida albicans* inhibits the expression of human beta-defensins in experimental oral candidiasis. *J Invest Dermatol*. 2006;126(9):2049-56.

Mak P, Zdybicka-Barabas A, Cytryńska M. A different repertoire of *Galleria mellonella* antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi. *Dev Comp Immunol*. 2010;34(10):1129-36.

Martins M, Henriques M, Azeredo J, Rocha SM, Coimbra MA, Oliveira R. Morphogenesis control in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* through signaling molecules produced by planktonic and biofilm cells. *Eukaryot Cell*. 2007;6(12):2429-36.

Matsubara VH, Silva EG, Paula CR, Ishikawa KH, Nakamae AE. Treatment with probiotics in experimental oral colonization by *Candida albicans* in murine model (DBA/2). *Oral Dis*. 2012;18(3):260-4

McCann M, Curran R, Bem-Shoshan M, McKee V, Tahir AA, Devereux M, et al. Silver(i) complexes of 9-anthracenecarboxylic acid and imidazoles: synthesis, structure and antimicrobial activity. *Dalton Trans*. 2012;41(21):6516-27.

Medellin-Penã JM, Griffiths WM. Effect of Molecules Secreted by *Lactobacillus acidophilus* Strain La-5 on *Escherichia coli* O157:H7 Colonization. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(4):1165-72.

Michaux C, Martini C, Hanin A, Auffray Y, Hartke A, Giard JC. SlyA regulator is involved in bile salts stress response of *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2011;324(2):142-6.

Morales DK, Grahl N, Okegbe C, Dietrich LE, Jacobs NJ, Hogan DA. Control of *Candida albicans* metabolism and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazines. *MBio*. 2013;4(1):e00526-12.

Morales DK, Hogan DA. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. *PLoS Pathog*. 2010;6(4): e1000886.

Mowlds P, Coates C, Renwick J, Kavangh K. Dose-dependent cellular and humoral responses in *Galleria mellonella* larvae following beta-glucan inoculation. *Microbes Infect*. 2010;12(2):146-53.

Mylonakis E, Aballay A. Worms and flies as genetically tractable animal models to study host-pathogen interactions. *Infect Immun*. 2005;73(7):3833-41.

Mylonakis E. *Galleria mellonella* and the study of fungal pathogenesis: making the case for another genetically tractable model host. *Mycopathol*. 2008;165:1-3.

Nadell CD, Xavier JB, Foster KR. The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol Rev*. 2009 Jan;33(1):206-24

Naglik JR, Fidel PL Jr, Odds FC. Animal models of mucosal *Candida* infection. *FEMS Microbiol Lett*. 2008; 283:129-39.

Nguyen LN, Lopes LCL, Cordero RJB, Nosanchuk JD. Sodium butyrate inhibits pathogenic yeast growth and enhances the functions of macrophages. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:2573-80.

Nobile CJ, Mitchell AP. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiol*. 2006;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;15(12):1150-5.

Noverr MC, Huffnagle GB. Regulation of *Candida albicans* morphogenesis by fatty acid metabolites. *Infect Immun*. 2004 Nov;72(11):6206-10.

Oliveira NE, Abranches J, Gaca AO, Laport MS, Damaso CR, Bastos MC, et al. *clpB*, a class III heat-shock gene regulated by CtsR, is involved in thermotolerance and virulence of *Enterococcus faecalis*. *Microbiology*. 2011;157(3):656-65.

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

Pascual LM, Daniele MB, Giordano W, Pájaro MC, Barberis IL. Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Curr Microbiol*. 2008 Apr;56(4):397-402.

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

Pereira CA, Costa AC, Carreira CM, Junqueira JC, Jorge AO. Photodynamic inactivation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* biofilms in vitro. *Lasers Med Sci*. 2013;28(3):859-64.

Pereira CA, Eskelson E, Cavalli V, Liporoni PC, Jorge AO, do Rego MA. *Streptococcus mutans* biofilm adhesion on composite resin surfaces after different finishing and polishing techniques. *Oper Dent*. 2011;36(3):311-7.

Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Ten Cate JM. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. *J Appl Oral Sci*. 2008;16(2):86-94.

Peters BM, Jabra-Rizk MA, Scheper MA, Leid JG, Costerton JW, Shirtliff ME. Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* dual-species biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010;59:493–503.

Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(1):133-63

Pukkila-Worley R, Peleg AY, Tampakakis E, Mylonakis E. *Candida albicans* hyphal formation and virulence assessed using a *Caenorhabditis elegans* infection model. *Eukaryot Cell*. 2009;8(11):1750-8.

Ramage G, Mowat E, Jones B, Williams C, Lopez-Ribot J. Our current understanding of fungal biofilms. *Crit Ver Microbiol*. 2009;35(4):340-55.

Richard ML, Nobile CJ, Bruno VM, Mitchell AP. *Candida albicans* biofilm-defective mutants. *Eukaryot Cell*. 2005;4(8):1493-502.

Roma GC, Mathias MI, Bueno OC. Fat body in some genera of leaf-cutting ants (*Hymenoptera: Formicidae*). Proteins, lipids and polysaccharides detection. *Micron*. 2006;37(3):234-42.

Rowan R, Moran C, McCann M, Kavanagh K. Use of *Galleria mellonella* larvae to evaluate the in vivo anti-fungal activity of [Ag₂(mal)(phen)₃]. *Biometals*. 2009;22(3):461-7.

Sadowska B, Walencka E, Wieckowska-Szakiel M, Rózalska B. Bacteria competing with the adhesion and biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Folia Microbiol (Praha)*. 2010;55(5):497-501.

Salvana EM, Frank M. Lactobacillus endocarditis: case report and review of cases reported since 1992. *J Infect*. 2006;53(1):e5-e10.

Samaranayake YU, Samaranayake LP. Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(2):398-429.

Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake LP. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Dis*. 2008;14(7):582-90.

Shivakumar KM, Vidya SK, Chandu GN. Dental caries vaccine. *Indian J Dent Res*. 2009;20(1):99-106.

Silverman RJ, Nobbs AH, Vickerman MM, Barbour ME, Jenkinson HF. Interaction of *Candida albicans* Cell Wall Als3 Protein with *Streptococcus gordonii* SspB Adhesin Promotes Development of Mixed-Species Communities. *Infect Immun*. 2010;78(11):4644-52.

Smith AR, Macfarlane GT, Reynolds N, O'May GA, Bahrami B, Macfarlane S. Effect of a synbiotic on microbial community structure in a continuous culture model of the gastric microbiota in enteral nutrition patients. *FEMS Microbiol Ecol*. 2012;80(1):135-45.

Souza TM. Análise histológica e histoquímica do corpo gorduroso perivisceral de larvas de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (*Hymenoptera: Apidae*) submetidas à exposição de inseticida análogo ao hormônio juvenil (piriproxifeno) [TCC]. Sorocaba (SP): Universidade Federal de São Carlos, Campus de Sorocaba - UFS; 2009.

Stenfors Arnesen L, Granum PE, Buisson C, Bohlin J, Nielsen-LeRoux C. Using an insect model to assess correlation between temperature and virulence in *Bacillus weihenstephanensis* and *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett*. 2011;317(2):196-202.

Strong PC, Hinchliffe SJ, Patrick H, Atkinson S, Champion OL, Wren BW. Identification and characterisation of a novel adhesin Ifp in *Yersinia pseudotuberculosis*. BMC Microbiol. 2011;11:85.

Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. Trends Microbiol. 2004 Jul;12(7):317-24.

Ten Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W, de Groot PW. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. J Dent Res. 2009;88(2):105-15.

Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Characteristics of dual species *Candida* biofilms on denture acrylic surfaces. Arch Oral Biol. 2007 Dec;52(12):1200-8.

Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. Arch Oral Biol. 2006;51(8):672-80.

Thein ZM, Seneviratne CJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. Mycoses. 2009;52:467-75.

Thómas JG, Nakaishi LA. Managing the complexity of a dynamic biofilm. J Am Dent Assoc. 2006;137 Suppl:10S-15S.

Tomás JMS, Duhart SCI, de Gregorio PR, Pingitore VE, Macías NME. Urogenital pathogen inhibition and compatibility between vaginal *Lactobacillus* strains to be considered as probiotic candidates. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2011;159(2):399-406.

Tournu H, van Dijck P. *Candida* biofilms and the host: models and new concepts for eradication. Int J Microbiol Int. 2012;2012:845352. doi:10.1155/2012/845352epub2011nov14.

Van Merode AEJ, Pothoven DC, van der Mei HC, Busscher HJ, Krom BP. Surface charge influences enterococcal prevalence in mixed-species biofilms. J Appl Microbiol. 2007;102(6):1254-60.

Wagner RD, Pierson C, Warner T, Dohnalek M, Farmer J, Roberts L, et al. Biotherapeutic effects of probiotic bacteria on candidiasis in immunodeficient mice. Infect Immun. 1997;65(10):4165-72.

Walencka E, Rózalska S, Sadowska B, Rózalska B. The influence of *Lactobacillus acidophilus*-derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. Folia Microbiol. 2008;53(1):61-6.

Waltimo TMT, Haapasalo M, Zehnder M, Meyer J. Clinical aspects related to endodontic yeast infections. *Endodontic Topics*. 2004;9(1):66-78.

Williams DW, Kuriyama T, Silva S, Malic S, Lewis MA. *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontol* 2000. 2011;55(1):250-65.

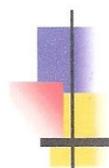
Zijngel V, van Leeuwen MB, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmür R, et al. Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS One*. 2010;5(2):e9321.

ANEXO – Certificado do comitê de ética em pesquisa

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028 / 9086

Fax (12) 3947-9010 / guedes@fosjc.unesp.br/yasmini@fosjc.unesp.br



Comitê de Ética em Pesquisa-Local Envolvendo animais

São José dos Campos, 15 de dezembro de 2010

Ofício nº 23/2010/CEPa

Prezada Senhora

Esclarecemos que não há necessidade do projeto intitulado **“Interações entre Candida albicans e Lactobacillus acidophilus: formação de biofilme in vitro e estudo em modelos de invertebrados”** de sua responsabilidade, tendo como Orientadores, Prof.Dra Juliana Campos Junqueira e Prof. Titular Antonio Olavo Cardoso Jorge, ser analisado por este Comitê, porque a pesquisa em tela não envolve a utilização de vertebrados e sim o uso de invertebrados (Galleria mellonella (larva da mariposa) e Caenorhabditis elegans (neomato), de acordo com a Lei nº 11.794 de 08/10/2008 – Lei “Arouca”.

Atenciosamente,

Profa.Titular YASMIN RODARTE CARVALHO
Coordenadora

Sra. SIMONE FURGERI GODINJO VILELA
Unesp-Campus de SJCampos