



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

**RAFAELLA BRAGA SANTOS**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS PROBIÓTICOS DE CEPAS CLÍNICAS DE  
*Lactobacillus* spp. SOBRE DIFERENTES ESPÉCIES DE *Candida***

2018

**RAFAELLA BRAGA SANTOS**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS PROBIÓTICOS DE CEPAS CLÍNICAS DE  
*Lactobacillus* spp. SOBRE DIFERENTES ESPÉCIES DE *Candida***

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), 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 de Microbiologia e Imunologia.

Orientador: Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

São José dos Campos

2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2018]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Santos, Rafaella Braga

Avaliação dos efeitos probióticos de cepas clínicas de *Lactobacillus* spp. sobre diferentes espécies de *Candida* / Rafaella Braga Santos. - São José dos Campos : [s.n.], 2018.

66 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2018.

Orientador: Antonio Olavo Cardoso Jorge

Coorientadora: Juliana Campos Junqueira

1. *Lactobacillus*. 2. *Candida*. 3. Probiótico. 4. *Galleria mellonella*. 5. Biofilme. I. Jorge, Antonio Olavo Cardoso, orient. II. Junqueira, Juliana Campos, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

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

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp  
Instituto de Ciência e Tecnologia  
Campus de São José dos Campos

**Prof<sup>a</sup>. Adj. Juliana Campos Junqueira**

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp  
Instituto de Ciência e Tecnologia  
Campus de São José dos Campos

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Graziella Nuernberg Back Brito**

Fundação Universitária Vida Cristã (FUNVIC)  
Faculdade de Pindamonhangaba

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Liliana Scorzoni**

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp  
Instituto de Ciência e Tecnologia  
Campus de São José dos Campos

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Fernanda Malagutti Tomé**

Universidade Paulista (UNIP)  
Instituto de Ciências da Saúde

São José dos Campos, 05 de fevereiro de 2018.

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a Deus primeiramente, pelo dom da vida, pela sua presença e proteção, por ser essencial nos meus dias de angústia e de glória e por me capacitar a alcançar meus objetivos.*

*Dedico aos meus pais, Odete Braga Santos e Sandoval Santos, aos meus irmãos, Nicolau Braga Santos e Vanessa Braga Santos de Brito, pelo carinho, incentivo, paciência e compreensão, encorajando-me nos momentos de desânimo e alegrando-me nos momentos de vitórias e conquistas e que dignamente me apresentaram à importância da família e ao caminho da honestidade e persistência. Sem vocês nenhuma conquista valeria a pena.*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Ao querido orientador Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge, sempre disposto a nos ensinar, sendo um exemplo de profissional. Agradeço pelos ensinamentos que foram muito além dos conteúdos curriculares, foram aprendizados importantes para a vida. Obrigado por despertar minha admiração e por se tornar uma inspiração para todos.

À querida Prof<sup>a</sup>. Adj. Juliana Campos Junqueira, que foi minha orientadora durante grande parte do doutorado, todo o meu respeito e admiração. Muito obrigada pelo apoio, incentivo, carinho, compreensão, dedicação pelos alunos e pela pesquisa. Obrigada pelos ensinamentos acadêmicos e de vida. Você é um exemplo de pessoa, de professora, de mulher, de mãe a ser seguido. Tenho muito orgulho de ter sido sua orientada e palavras não podem expressar tamanha gratidão. Obrigada por tudo!

À minha querida orientadora do mestrado, Prof<sup>a</sup>. Dra. Graziella Nuernberg Back Brito, por compor a banca examinadora desta defesa de Tese e por todo carinho, apoio, amizade e companheirismo nesta jornada, desde o início do mestrado. Obrigada por todos os ensinamentos, por sua paciência em ensinar, pela sua dedicação. “ É mais fácil aprender quando há alguém como você para ensinar”. Obrigada por acreditar em mim!

A toda minha família, minha mãe Odete Braga Santos, meu pai Sandoval Santos, irmãos Nicolau Braga Santos e Vanessa Braga Santos Brito, pelo apoio e compreensão ao longo desses anos.

## 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. Tit. Estevão Tomomitsu Kimpara e da vice-diretora Prof<sup>a</sup>. Adj. Rebeca Di Nicoló.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, coordenadora Prof<sup>a</sup>. Adj. Luciane Dias de Oliveira e vice-coordenador Prof. Mauro Pedrine Santamaria, pelo apoio para a realização desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos no mestrado e doutorado.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Fernanda Malagutti Tomé, que prontamente aceitou fazer parte desta banca examinadora e por estar sempre à disposição para ajudar aqueles que precisam. Obrigada pela convivência durante todos estes anos.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Liliana Scorzoni, por fazer parte desta banca examinadora e por estar sempre disposta a ajudar, contribuindo para melhoria das pesquisas e crescimento de todos os alunos. Serei eternamente grata por tudo que você me ajudou!

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia, Sérgio Giovanny Alves e Domingos Gonçalves Pontes, pela colaboração no laboratório e pela convivência durante todos esses anos.

Ao Rodnei Rossoni, por ceder as cepas clínicas isoladas no doutorado dele, das quais eu utilizei nesta tese. Muito obrigada por toda ajuda!

Ao Felipe de Camargo Ribeiro e Jéssica Diane dos Santos, pela ajuda inicial dos experimentos e em todos os momentos que precisei, estavam sempre prontos a ajudar.

À minha aluna de iniciação Andressa Mayumi Namba, pela ajuda nos experimentos, pela paciência, carinho e dedicação com a pesquisa.

A todos os colegas do laboratório, Ana Carolina Chipoletti dos Santos, Nádia Domingues (que estão juntas comigo desde o início do mestrado), Fernanda Freire, Rodnei Rossoni, Patrícia Pimentel, Luciana Ruano de Oliveira Fugisaki, Jéssica Diane dos Santos, Janaína Araújo Alvarenga, Maíra Terra, Felipe de Camargo Ribeiro, Adeline Lacerda Jorjão, Felipe Oliveira, Lívia Mara Alves Godoi, Damara da Silva Avila, Isabela Amendola, Lucas de Paula, Leandro Figueira, Elis Lima Zutin, Pâmela Beatriz do Santos, Fábía Lugli Sper e aos demais colegas pelo companheirismo, amizade e convivência que tivemos durante os anos do mestrado e doutorado. Obrigada por tudo!

À equipe da Seção Técnica de Pós-Graduação, Bruno Shiguemitsu Marques Tanaka, Sandra Mara Cordeiro, Carolina Lourenço Rei, pelo apoio desde o início do mestrado até hoje. Muito obrigada.

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

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

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho se concretizasse.



*“De tudo ficaram três coisas:*

*A certeza de que estamos começando...*

*A certeza de que é preciso continuar...*

*A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar...*

*Façamos da interrupção um caminho novo...*

*Da queda, um passo de dança...*

*Do medo, uma escada...*

*E do sonho, uma ponte...”*

**(Fernando Sabino)**

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	10
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO .....	14
2 PROPOSIÇÃO .....	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Cepas de micro-organismos .....	21
3.2 Interação das espécies de <i>Candida</i> e <i>Lactobacillus</i> spp. em modelos de estudo <i>in vitro</i> : formação de biofilme.....	22
3.2.1 Preparo da suspensão padronizada das cepas de <i>Candida</i> e <i>Lactobacillus</i> .....	22
3.2.2 Grupos experimentais .....	22
3.2.3 Formação dos biofilmes de <i>Candida</i> spp.....	23
3.2.4 Determinação do número de UFC/mL.....	24
3.3 Interação de <i>Lactobacillus</i> com <i>Candida</i> spp. em modelo experimental de <i>Galleria mellonella</i> .....	27
3.3.1 <i>Galleria mellonella</i> .....	27
3.3.2 Verificação da susceptibilidade de <i>G. mellonella</i> à infecção por <i>Candida</i> spp.....	27
3.3.2.1 Curva de sobrevivência.....	27
3.3.2.2 Preparo das suspensões padronizadas de <i>Candida</i> spp. e <i>Lactobacillus</i> spp.....	28
3.3.2.3 Grupos experimentais.....	29
3.3.2.4 Injeção de micro-organismos em <i>G. mellonella</i> .....	29
3.3.2.5 Determinação da curva de sobrevivência da <i>G. mellonella</i> .....	31
3.4 Análise estatística.....	31
4 RESULTADOS.....	32
4.1 Resultados da análise dos biofilmes formados <i>in vitro</i> .....	32

<b>4.2 Resultados do estudo em <i>G. mellonella</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2.1 Verificação da suscetibilidade de <i>G. mellonella</i> à infecção pelas diferentes espécies de <i>Candida</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2.2 Efeitos de <i>Lactobacillus</i> spp. na candidose experimental em <i>G. mellonella</i>.....</b>	<b>43</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Biofilmes de <i>Candida</i> formados no fundo dos poços da placa de 96 poços após o período de 48 h.....	25
Figura 2 - Biofilmes sendo desprendidos do fundo dos poços utilizando-se homogeneizador ultrassônico.....	26
Figura 3 - Placa de Petri contendo ágar Sabouraud com crescimento das colônias de <i>Candida</i> em suas respectivas diluições.....	26
Figura 4 - Modelo de invertebrado: larvas de <i>G. mellonella</i> em placa de <i>Petri</i> .....	30
Figura 5 - Inoculação da suspensão de micro-organismos para indução de infecção experimental em <i>G. mellonella</i> .....	31
Figura 6 - Figura 6. Interação entre <i>C. albicans</i> (cepa 60) e as diferentes espécies de <i>Lactobacillus</i> : dados da contagem de UFC/mL de <i>Candida</i> formados nos biofilmes <i>in vitro</i> .....	33
Figura 7 - Interação entre <i>C. krusei</i> (cepa 62) e as diferentes espécies de <i>Lactobacillus</i> : dados da contagem de UFC/mL de <i>Candida</i> formados nos biofilmes <i>in vitro</i> .....	34
Figura 8 - Interação entre <i>C. tropicalis</i> (cepa 13) e as diferentes espécies de <i>Lactobacillus</i> : dados da contagem de UFC/mL de <i>Candida</i> formados nos biofilmes <i>in vitro</i> .....	36
Figura 9 - Interação <i>C. glabrata</i> (cepa 64) e as diferentes espécies de <i>Lactobacillus</i> : dados da contagem de UFC/mL de <i>Candida</i> formados nos biofilmes <i>in vitro</i> .....	37
Figura 10 - Gráfico da curva de sobrevivência das larvas com infecção por <i>C. albicans</i> em diferentes concentrações.....	41

Figura 11 – Gráfico da curva de sobrevivência das larvas com infecção por <i>C. krusei</i> em diferentes concentrações.....	41
Figura 12 - Gráfico da curva de sobrevivência das larvas com infecção por <i>C. tropicalis</i> em diferentes concentrações.....	42
Figura 13 - Gráfico da curva de sobrevivência das larvas com infecção por <i>C. glabrata</i> em diferentes concentrações.....	42
Figura 14- Efeitos das cepas de <i>Lactobacillus</i> na candidose experimental em <i>G. mellonella</i> induzida pela infecção por <i>C. albicans</i> .....	44
Figura 15 - Efeitos das cepas de <i>Lactobacillus</i> na candidose experimental em <i>G. mellonella</i> induzida pela infecção por <i>C. krusei</i> .....	46
Figura 16 – Efeitos das cepas de <i>Lactobacillus</i> na candidose experimental em <i>G. mellonella</i> induzida pela infecção por <i>C. tropicalis</i> .....	47
Figura 17 - Efeitos das cepas de <i>Lactobacillus</i> na candidose experimental em <i>G. mellonella</i> induzida pela infecção por <i>C. glabrata</i> .....	49

Santos RB. Avaliação dos efeitos probióticos de cepas clínicas de *Lactobacillus* spp. sobre diferentes espécies de *Candida* [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

## RESUMO

Devido ao aumento das infecções causadas por *Candida albicans* e espécies não-*albicans*, surge a necessidade de novas estratégias terapêuticas, como a identificação de cepas bacterianas com características probióticas. Assim, o objetivo foi avaliar a ação antimicrobiana de cepas clínicas de *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus rhamnosus* sobre diferentes espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis*). Foram utilizadas cepas de *Lactobacillus* isoladas da cavidade bucal de indivíduos livres de cárie e cepas de *Candida* isoladas de lesões de candidose orofaríngea obtidas em estudos anteriores. Para estudo *in vitro*, foram formados biofilmes monoespécies de *Candida* (Grupo controle) e biofilmes mistos de *Candida* e *Lactobacillus*, nos quais os lactobacilos foram acrescentados antes da cepa de *Candida* (Grupo Profilático), após a cepa de *Candida* (Grupo Terapêutico) ou ao mesmo tempo da cepa de *Candida* (Grupo Simultâneo). Após 48 h de incubação, foi realizada a contagem do número de células viáveis de *Candida* (UFC/mL). Para estudo *in vivo*, os micro-organismos foram inoculados em larvas de *G. mellonella* e o desenvolvimento da candidose foi monitorado pela curva de sobrevivência, estudando-se os grupos experimentais descritos acima. Nos resultados *in vitro*, foi verificado que os efeitos inibitórios mais significativos de *Lactobacillus* sobre *Candida* ocorreram nos grupos profiláticos. As cepas de *C. tropicalis* e *C. krusei* foram mais sensíveis a ação de *Lactobacillus* do que *C. albicans* e *C. glabrata*. Além disso, foi verificado que as três espécies de *Lactobacillus* estudadas (*L. paracasei*, *L. rhamnosus* e *L. fermentum*) tiveram ação inibitória sobre *Candida*. Em relação ao estudo *in vivo*, também foi verificado que os grupos profiláticos tiveram maiores efeitos inibitórios sobre a candidose experimental em relação aos grupos terapêuticos, levando a um aumento significativo nas taxas de sobrevivência das larvas. Em relação as cepas estudadas, os efeitos profiláticos de *Lactobacillus* sobre a candidose, foram encontrados, de forma semelhante, para todas as cepas de *Candida* e *Lactobacillus* estudadas. Assim, concluiu-se que as cepas clínicas de *L. paracasei* 28.4, *L. rhamnosus* 5.2 e *L. fermentum* 20.4 foram capazes de inibir a formação de biofilme e desenvolvimento de candidose causados por *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, principalmente quando *Lactobacillus* foi administrado de forma profilática.

Palavras-chave: *Lactobacillus*. *Candida*. Probiótico. *Galleria mellonella*. Biofilme.

Santos RB. Evaluation of probiotic effects of clinical strains of *Lactobacillus* spp. on different species of *Candida* [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.

## ABSTRACT

Due to the increase of infections caused by *Candida albicans* and non-*albicans* species, there is a need for new therapeutic strategies, such as the identification of bacterial strains with probiotic characteristics. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial action of *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus rhamnosus* strains on different *Candida* species (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. tropicalis*). We used *Lactobacillus* strains isolated from the oral cavity of caries-free and *Candida* strains isolated from lesions of oropharyngeal candidiasis. For in vitro study, monospecies of *Candida* (Control Group) and mixed biofilms of *Candida* and *Lactobacillus* were prepared, in which the lactobacillus were attached before the *Candida* strain (Profile Group), after a *Candida* (Therapeutic Group) strain or same time as the *Candida* strain (Simultaneous Group). After 48 h of incubation, we counting the number of viable *Candida* cells (CFU/mL). For in vivo study, we inoculate the microorganisms in larvae of *G. mellonella* and the development of the application for monitoring by survival curve, studying the experimental groups described above. In the in vitro results, we find that the most significant inhibitory effects of *Lactobacillus* on *Candida* occurred in the prophylactic groups. The strains of *C. tropicalis* and *C. krusei* were more sensitive to the action of *Lactobacillus* than *C. albicans* and *C. glabrata*. In addition, it we verified that the three species of *Lactobacillus* studied (*L. paracasei*, *L. rhamnosus* and *L. fermentum*) had an inhibitory action on *Candida*. In relation to the in vivo study, we verified that the prophylactic groups had more inhibitory effects on an experimental candidose in relation to the therapeutic groups, leading to a significant increase in the survival rates of the larvae. In relation to the studied strains, the prophylactic effects of *Lactobacillus* on candidiasis were similarly for all *Candida* and *Lactobacillus* strains studied. Thus, it concluded that the clinical strains of *L. paracasei* 28.4, *L. rhamnosus* 5.2 and *L. fermentum* 20.4 were able to inhibit a biofilm formation and development of *Candida* caused by *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* and *C. glabrata*, especially when *Lactobacillus* was given prophylactically.

Keywords: *Lactobacillus*. *Candida*. Probiotic. *Galleria mellonella*. Biofilm.

## 1 INTRODUÇÃO

Leveduras do gênero *Candida* são consideradas fungos oportunistas, que em situação de imunocomprometimento dos indivíduos, como o uso de fármacos imunossupressores, idade avançada, uso de agentes quimioterápicos e, ainda, em portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), podem ser considerados como precursores para a instalação de infecções superficiais e sistêmicas, o que torna estas espécies de grande importância. Apesar de *Candida albicans* ser responsável pela maior parte das infecções que ocorrem no homem, recentemente tem sido observado um aumento significativo de candidoses causadas por espécies não *albicans*, como *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, entre outras (Seneviratne et al., 2008; Silva et al., 2012; Mohammadi et al., 2013; Samaranyake et al., 2005). O aumento do isolamento de espécies não-*albicans* como patógenos humanos pode ser atribuído à melhoria nos métodos de identificação, como exemplo, os métodos moleculares, e aos medicamentos utilizados, que selecionam as amostras resistentes, sendo que algumas espécies não-*albicans* apresentam maior perfil de resistência aos agentes antifúngicos comuns, como o fluconazol (Swinne et al., 2004; Silva et al., 2012; Demitto et al., 2012).

Grande parte das infecções por *Candida* está relacionada com a presença desses micro-organismos na forma de biofilmes em superfície de dispositivos médicos implantados, como respiradores, cateteres venosos centrais, urinários, próteses valvulares cardíacas e dispositivo ortopédico (Dufour et al., 2012). A capacidade de formar biofilmes é considerada um dos principais fatores de virulência das espécies de *Candida* e oferecem várias vantagens para estes micro-organismos, como maior proteção contra as defesas imunes do hospedeiro e ação de antimicrobianos (Giolo, Svidzinski, 2010). Os biofilmes são comunidades microbianas estruturadas ligadas à superfície biótica ou abiótica embutida em uma matriz exopolímera constituída principalmente por carboidratos, hexossaminas, ácidos urônicos, proteínas e ácidos nucléicos (Mitchell et al., 2016). A manutenção da arquitetura de biofilmes pode ser assegurada pela formação de canais e colunas, que permitem a passagem de nutrientes e oxigênio para toda a comunidade microbiana. Biofilmes estão presentes em humanos, nas formas comensais e patogênicas e é claramente uma das principais



estratégias de sobrevivência dos micro-organismos numa variedade de locais no interior do corpo humano e uma das principais causas de infecções em seres humanos. Micro-organismos organizados em biofilmes são mais resistentes aos agentes antimicrobianos do que formas planctônicas (Kumamoto, 2002; Douglas, 2003; Tobudic et al., 2012). Outro mecanismo de patogenicidade das espécies do gênero *Candida* é capacidade de produzir hifas ou pseudo-hifas, que conferem aos micro-organismos poder de invasão tecidual ao hospedeiro e também resistência à fagocitose (Zijngel et al., 2010).

*C. albicans* é uma espécie comumente isolada de infecções superficiais e invasivas em diversos sítios anatômicos, sendo causa de candidose em todas as partes do mundo. É a espécie de *Candida* que se tem maior conhecimento sobre sua patogenicidade, devido à diversidade de fatores de virulência identificados. É um fungo dimórfico apresentando tanto forma leveduriforme quanto micelial composta por pseudo-hifas e hifas verdadeiras. Sua forma leveduriforme tem sido relacionada ao aumento de sua capacidade de disseminação, já a produção de hifas, aumenta sua capacidade invasiva, sua resistência à fagocitose e são consideradas importantes fatores de virulência (Mayer et al., 2013). Habitualmente, considera-se que a origem de *C. albicans* causadora de infecções seja da microbiota do trato digestório humano (organismo comensal). Esta espécie é naturalmente sensível a todas as drogas antifúngicas de uso sistêmico, mas casos de resistência adquirida aos antifúngicos azóis são conhecidos em pacientes expostos a estes medicamentos por longos períodos (Colombo, Guimarães, 2003; Magee, Magee, 2005; Tiraboschi et al., 2007).

*C. glabrata* pode ser considerada como micro-organismo comensal na microbiota normal de indivíduos saudáveis. Porém, nas últimas décadas, como consequência de medicamentos imunossupressores e com o advento da Síndrome da Imunodeficiência adquirida (*AIDS* em inglês), passou a ser um importante agente de infecções em seres humanos, chegando a ser responsável por grande parte dos casos de candidoses em ambientes hospitalares. A mortalidade causada por esta espécie tem sido considerada relativamente alta em relação as outras espécies de *Candida* não *albicans*. *C. glabrata* é um notável agente patogênico de mucosa oral e pode promover infecção concomitante com *C. albicans*, principalmente, em infecções orofaríngeas de pacientes com câncer ou HIV, tornando essas infecções mais difíceis de serem tratadas (Barchiesi et al., 2005; Li et al., 2007). Apresenta-se sempre como

blastoconídio, tanto no meio ambiente como quando na forma patogênica, e especialmente não forma pseudo-hifas em temperaturas acima de 37°C. Isolados clínicos de *C. glabrata* apresentam menor sensibilidade ao fluconazol, conseqüentemente, um aumento nos índices de colonização e infecção por esta espécie tem sido observado em diferentes grupos de pacientes com exposição prolongada ao fluconazol. Além dos problemas terapêuticos de infecções por *C. glabrata* associados aos antifúngicos azólicos, estudos mostram uma menor sensibilidade também para anfotericina B. Na verdade, já havia sido descrito que infecções por *C. glabrata* podem ocorrer em pacientes previamente expostos a anfotericina B. Outro aspecto sobre a epidemiologia deste patógeno é sua maior ocorrência em pacientes idosos (Colombo, Guimarães, 2003; Pemán et al., 2004; Ray et al., 2007).

*C. krusei* tem sido reconhecida como um patógeno fúngico resistente a um amplo repertório de antifúngicos, principalmente devido a sua resistência intrínseca ao fluconazol, combinada com a baixa sensibilidade para anfotericina B e a 5-fluorocitosina. Muitos autores têm reportado um avanço em infecções por *C. krusei* entre pacientes que receberam terapia com fluconazol e anfotericina B. O fenótipo de multirresistência exibido por *C. krusei* é um problema para o tratamento de pacientes em geral, mas principalmente em indivíduos imunocomprometidos. O voriconazol é usado com sucesso em infecções por *C. krusei*, e o grupo de antifúngicos equinocandinas (caspofungina, anidulafungina e micafungina) tem demonstrado excelente atividade *in vitro*. Todavia, autores vêm relatando uma diminuição da sensibilidade para o voriconazol e as equinocandinas. *C. krusei* apresenta a facilidade em desenvolver resistência aos antifúngicos, e assim como *C. glabrata*, é considerada uma importante espécie a ser monitorada com relação à resistência antifúngica (Pfaller et al., 2008).

*C. tropicalis* é responsável por grande parte das candidemias em adultos, especialmente em pacientes com linfoma, leucemia, complicações hematológicas malignas, *Diabetes mellitus* e câncer. Em contraste, é raro encontrar esta espécie em neonatos (colonização mucocutânea), porém o potencial de transmissão nosocomial é considerado. *C. tropicalis* apresenta-se mais virulenta que *C. albicans* em pacientes com complicações hematológicas malignas e infecções disseminadas, portanto, com uma alta taxa de mortalidade. *C. tropicalis* é frequentemente sensível a derivados

poliênicos e azólicos, porém em geral é resistente a 5-fluorocitosina (Zaugg et al., 2001; Vandeputte et al., 2005).

Os padrões de suscetibilidade antifúngica são um determinante crucial que contribuem para o desfecho do tratamento dos pacientes. Embora a incidência de infecções por *Candida* esteja aumentando, a escolha de agentes antifúngicos adequados é limitada devido à resistência de algumas espécies a vários antifúngicos (Quindós, 2014; Badiie, Alborzi, 2011). A detecção de alta taxa de biofilmes entre as espécies de *Candida não-albicans*, juntamente com altos níveis de resistência ao fluconazol, um dos antifúngicos mais utilizados, garante uma vigilância mais ampla deste isolados de *Candida* (Subramanya et al., 2017).

Alguns estudos mostram que o consumo de espécies bacterianas não patogênicas, como os probióticos, pode contribuir para a proteção contra infecções, prevenção da inflamação crônica e manutenção da integridade da mucosa (Ohland, MacNaughton, 2010). Os probióticos são considerados suplementos alimentares compostos de micro-organismos vivos ou componentes de células microbianas que influenciam benéficamente a saúde do hospedeiro (Fuller, 1989). Esses benefícios devem-se principalmente à regulação da microbiota residente, modulação do sistema imunológico das mucosas pela ativação das células linfóides e produção de moléculas antimicrobianas (Herbel et al., 2013). Dentre esses benefícios que os probióticos apresentam à saúde de seres humanos e animais, está a redução dos sintomas de intolerância à lactose, aumento da biodisponibilidade de nutrientes e diminuem a prevalência de alergias em indivíduos suscetíveis (Tsai et al., 2012). A maioria das cepas usadas como probióticos em produtos comerciais pertencem ao gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Estes micro-organismos podem alterar a composição microbiana do biofilme das espécies do gênero *Candida*, entre outros micro-organismos da cavidade bucal (Vestman et al., 2013).

O aumento das bactérias e fungos resistentes aos antimicrobianos despertou a comunidade científica para os usos profiláticos e terapêuticos dos probióticos e para reconsiderá-los como adjuvantes ao tratamento com antibióticos e antifúngicos (Tambekar, Bhutada, 2010). Esses organismos podem funcionar como barreiras microbianas contra patógenos gastrointestinais através da exclusão competitiva, modulação do sistema imunológico do hospedeiro e produção de compostos inibitórios, como ácido orgânico (por exemplo, ácido láctico e ácido acético),

catabolitos de oxigênio (por exemplo, peróxido de hidrogênio), compostos proteínáceos (por exemplo, bacteriocinas), metabólitos de gordura, aminoácidos e outros compostos (ex. reuterina) (Marianelli et al., 2010). Existem algumas evidências de que as bactérias do ácido láctico possuem um potencial antioxidante (Martarelli et al., 2011). Esta propriedade poderia ser útil para permitir que os lactobacilos colonizassem os intestinos, bem como no decurso da inflamação para proteger a mucosa intestinal contra o estresse oxidativo excessivo (Hu"tt et al., 2006). Além de competir com agentes patogênicos por nichos e nutrientes, "excluindo competitivamente" micro-organismo que causam doenças ao hospedeiro (Coman et al., 2014).

Nas últimas décadas, houve uma crescente procura por novos modelos hospedeiros para estudo de patógenos humanos que sejam eticamente mais aceitáveis que modelos mamíferos. Assim, vários modelos de animais invertebrados foram desenvolvidos, incluindo *Galleria mellonella*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e *Acanthamoeba castellani*. Esses modelos têm sido considerados ferramentas importantes para o estudo de diversos patógenos humanos, incluindo bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas e leveduras. No entanto, nenhum dos modelos invertebrados disponíveis pode ser representativo de todos os aspectos fisiopatológicos das interações patógeno-hospedeiro, assim os modelos hospedeiros devem ser selecionados de acordo com o objetivo de cada estudo (Perdoni et al., 2014; Fedhila et al., 2010; Chibebe Junior et al., 2013a, 2013b).

Trabalhos de interação entre bactérias bucais e *Candida albicans* têm 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 na criação, facilidade de manuseio e possibilidade de trabalho em grande escala. 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* (Jorjão et al., 2017; Cotter et al., 2000; Pukkila-Worley et al., 2009; Rowan et al., 2009; Fuchs et al., 2010).

O modelo experimental de *Galleria mellonella*, está sendo utilizado com sucesso para estudar a patogenicidade das cepas do gênero *Candida*, tendo uma

resposta imune semelhante à de mamíferos. Esse modelo apresenta rapidez na obtenção de resultados, não envolvem questões éticas, apresentam tamanho suficiente para injeção de um inóculo ou medicamento, sobrevivem em temperaturas entre 25 a 37°C e a possibilidade de estudos em grande escala, servindo como triagem para os estudos em vertebrados (Perdoni et al., 2014; Chibebe Junior et al., 2013a, 2013b).

Tendo em vista a necessidade do desenvolvimento de novas formas de prevenção e tratamento para as lesões de candidose, causadas por *C. albicans* e espécies não-*albicans*, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência das cepas de *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e *L. fermentum* sobre as diferentes cepas clínicas de *Candida* em estudos *in vitro* e *in vivo*.

## 2 PROPOSIÇÃO

### 2.1 Objetivo geral

Verificar a ação probiótica das cepas clínicas de *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e *L. fermentum* sobre diferentes cepas clínicas de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis*.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) verificar a influência das cepas clínicas de *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e *L. fermentum* sobre as espécies de *Candida* quanto à formação de biofilme *in vitro*;
- b) estudar a interação dessas cepas com espécies de *Candida* em modelos de infecção experimental de *Galleria mellonella*, quanto à sobrevivência desses animais;
- c) analisar os efeitos profiláticos e terapêuticos de *Lactobacillus* sobre o biofilme formado pelas cepas de *Candida* e o desenvolvimento de candidose.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Cepas de micro-organismos

Foram utilizadas as cepas clínicas de *Lactobacillus* e *Candida* previamente isoladas da cavidade bucal de seres humanos e identificadas por PCR multiplex. As cepas clínicas de *Lactobacillus* estudadas foram isoladas da cavidade bucal de indivíduos livres de cárie, (Parecer do Comitê de Ética 560.479) e incluem as cepas de *L. paracasei* (28.4), *L. rhamnosus* (5.2), *L. fermentum* (20.4). Estas cepas foram as que tiveram melhores resultados na redução da candidose experimental em *G.mellonella* (Rossoni et al., 2017).

As cepas clínicas de *Candida* selecionadas fazem parte de uma ampla seleção de amostras de diversas espécies de *Candida*, que foram isoladas de lesões de candidose orofaríngea de pacientes portadores do HIV (Junqueira et al., 2011) e identificadas por PCR multiplex na minha dissertação de mestrado (Santos, 2014). Dentre estas cepas, foram selecionadas amostras estudadas anteriormente e resistentes a diversos antifúngicos: *C. albicans* (60), *C. glabrata* (64), *C. krusei* (62) e *C. tropicalis* (11). As cepas estão armazenadas em freezer a -80°C no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/UNESP (Junqueira et al., 2011; Santos et al., 2014).

Para ativação desses micro-organismos, as cepas de *Candida* foram cultivadas em ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) por 48 h a 37°C e as cepas de *Lactobacillus* foram cultivadas em ágar MRS (Difco, Detroit, MI) por 48 h a 37°C sob condições de microaerofilia (5% de CO<sub>2</sub>).

Os efeitos das cepas de *Lactobacillus* sobre as espécies de *Candida* foram estudados em modelo de biofilme formado *in vitro* e em modelo de infecção experimental em *Galleria mellonella*.

### **3.2 Interação das espécies de *Candida* e *Lactobacillus* em modelos de estudo *in vitro*: formação de biofilme**

#### **3.2.1 Preparo das suspensões padronizadas de *Candida* spp. e *Lactobacillus* spp.**

Após a ativação dos micro-organismos no ágar, as colônias isoladas de *Candida* foram cultivadas a 37°C por 24 h em caldo *Yeast Nitrogen Base* (YNB- Difco, Detroit, USA) suplementado com glicose na concentração de 100 mM. As colônias isoladas de *Lactobacillus* foram cultivadas em caldo MRS (Difco, Detroit, MI) a 37°C por 24 h sob condições de microaerofilia (5% de CO<sub>2</sub>). Posteriormente, as células microbianas foram centrifugadas (2000 xg por 10 min), o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi lavado com suspensão salina 0,85% e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e a suspensão foi padronizada em caldo YNB, para as suspensões de *Candida* e caldo BHI para as suspensões de *Lactobacillus*. A contagem do número de células da suspensão foi realizada através de espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) a uma concentração de 10<sup>7</sup> micro-organismos/mL para as cepas de *Lactobacillus*. Já a contagem do número de células das suspensões de *Candida* foi realizada através da Câmara de Neubauer, utilizando microscópio óptico.

#### **3.2.2 Grupos experimentais**

Para a formação do biofilme *in vitro*, dividimos a placa de 96 poços em 4 grupos, com n= 8 de acordo com o Quadro 1. Os experimentos foram realizados com as interações das 4 espécies de *Candida* com as 3 espécies de *Lactobacillus*, conforme o Quadro 2, que mostra os números de experimentos realizados.



Quadro 1 - Grupos experimentais e número de poços por grupo

<b>Grupos</b>	<b>Poços (n)</b>
<i>Candida</i> (2 h) + <i>Lactobacillus</i> (TERAPÊUTICO)	8
<i>Lactobacillus</i> (2h) + <i>Candida</i> (PROFILÁTICO)	8
<i>Lactobacillus</i> + <i>Candida</i> (SIMULTÂNEO)	8
Controle de <i>Candida</i>	8

Legenda: Nos grupos Terapêutico, as suspensões de *Candida* foram pipetadas nos poços 2h antes das suspensões de *Lactobacillus*. Nos grupos Profilático, as suspensões de *Lactobacillus* são pipetadas nos poços 2 h antes das suspensões de *Candida*. Nos grupos Simultâneo, as suspensões de *Candida* e *Lactobacillus* são pipetadas ao mesmo tempo.

Fonte: Elaborado pela autora.

### 3.2.3 Formação dos biofilmes de *Candida spp.* e *Lactobacillus spp.*

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 pipetadas, em um grupo da placa (n=8), 100 µL da suspensão padronizada das espécies de *Candida* ( $10^7$  células/mL), em outro grupo, 100 µL da suspensão padronizada das espécies de *Lactobacillus* ( $10^7$  células/mL). A placa foi incubada em agitação a 75 xg (Quimis, Diadema, São Paulo) a 37°C por 2 h para promover a adesão inicial dos micro-organismos. Após a fase de adesão, as suspensões de ambos os grupos foram aspiradas e acrescentado 100 µL da suspensão de *Lactobacillus* no grupo de *Candida* (grupo Terapêutico) e 100 µL da suspensão de *Candida* no grupo dos *Lactobacillus* (grupo Profilático). Em outro grupo, foram acrescentados, ao mesmo tempo, 100 µL da suspensão de *Candida* e 100 µL da suspensão de *Lactobacillus* (grupo Simultâneo). Nos grupos controles (n=8), foram inoculados 100 µL de solução salina 0,85% acrescidos das suspensões de *Candida* ou de *Lactobacillus* (100 µL). A cada 24 h da formação do biofilme, as suspensões

foram aspiradas para troca do caldo, acrescentando 100 µL de YNB acrescido de 100 mM de glicose e 100 µL de caldo BHI, para fornecer nutrientes aos micro-organismos, totalizando 200 µL em cada poço. As placas foram incubadas a 37°C em estufa com agitação de 75 *xg* por 48 h. O quadro 1 mostra as interações das 4 espécies de *Candida* com as 3 espécies de *Lactobacillus*, totalizando 12 experimentos de formação de biofilme *in vitro*.

Quadro 2 – Interação entre as espécies de *Candida* e os *Lactobacillus*

<b>Espécies de <i>Candida</i></b>	<b>Espécies de <i>Lactobacillus</i></b>
<i>C. albicans</i> 60	<i>L. paracasei</i> 28.4 <i>L. rhamnosus</i> 5.2 <i>L. fermentum</i> 20.4
<i>C. krusei</i> 62	<i>L. paracasei</i> 28.4 <i>L. rhamnosus</i> 5.2 <i>L. fermentum</i> 20.4
<i>C. tropicalis</i> 11	<i>L. paracasei</i> 28.4 <i>L. rhamnosus</i> 5.2 <i>L. fermentum</i> 20.4
<i>C. glabrata</i> 64	<i>L. paracasei</i> 28.4 <i>L. rhamnosus</i> 5.2 <i>L. fermentum</i> 20.4

Fonte: Elaborado pela autora.

### 3.2.4 Determinação do número de UFC/mL

Após o período de formação do biofilme, como mostra a Figura 1, as suspensões foram aspiradas e os poços lavados uma vez com solução salina, para remoção das células não aderidas. Os biofilmes formados no fundo da placa de microtitulação de 96 poços (Costar Corning, Nova York, EUA) foram homogeneizados

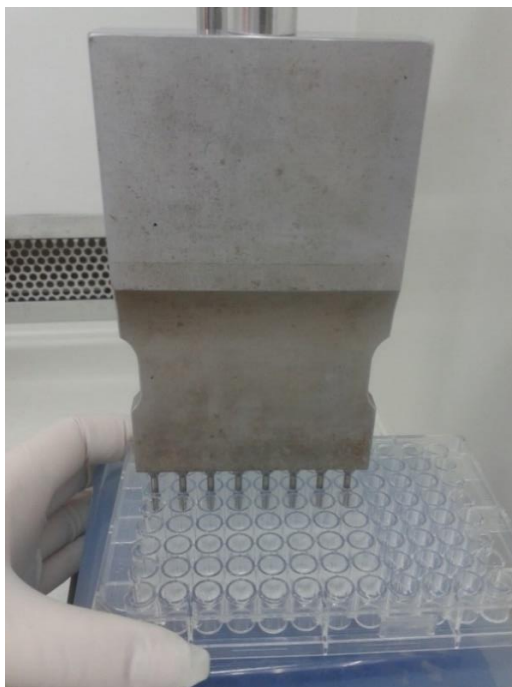
por 30 s com 200  $\mu\text{L}$  de solução salina, utilizando-se homogeneizador ultrassônico (Sonoplus HD 2200 - Bandelin Eletronic) com potência de 50 W, para desprender o biofilme, conforme figura 2. A partir das soluções obtidas nos 8 poços de cada grupo, foram realizadas diluições seriadas, das quais alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  foram transferidas para placas contendo 180  $\mu\text{L}$  de solução salina ( $10^{-1}$  até  $10^{-8}$ ). Após as diluições seriadas de cada grupo, foram plaqueados 10  $\mu\text{L}$  das suspensões  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-8}$ , utilizando-se a técnica da gota, no qual a gota das suspensões escorre pela placa de Ágar Sabouraud, para o crescimento das espécies de *Candida*, conforme mostra a figura 3. As placas de Sabouraud foram incubadas em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48 h. Após este período, as colônias foram contadas para o cálculo de UFC/mL.

Figura 1 - Biofilmes de *Candida* formados no fundo dos poços da placa de 96 poços após o período de 48 h



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 2 - Biofilmes sendo desprendidos do fundo dos poços utilizando-se homogeneizador ultrassônico



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 3 - Placa de Petri contendo ágar Sabouraud com crescimento das colônias de *Candida* em suas respectivas diluições



Fonte: Elaborada pela autora.

### **3.3 Interação de *Lactobacillus* com *Candida* spp. em modelo experimental de *Galleria mellonella***

Para o estudo neste modelo invertebrado foram utilizadas as metodologias descritas por Mylonakis et al. (2005) e Fuchs et al. (2010). Primeiramente, foram realizados ensaios de sobrevivência das lagartas com as cepas clínicas de *Candida* para achar a concentração letal de cada uma das cepas. As suspensões de *Lactobacillus* já foram estabelecidas de acordo com o estudo de Rossoni et al. (2017) e não foram repetidas neste estudo.

#### **3.3.1 *Galleria mellonella***

Foram utilizadas lagartas de *G. mellonella* em estágio final da fase larval, mantida no laboratório como descrito por Jorjão et al. (2017), com peso corporal de aproximadamente de 250 mg, cultivadas no laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos- UNESP. Foram utilizadas 15 lagartas para cada grupo e condição experimental (Figura 4). Estas foram armazenadas e utilizadas em um prazo máximo de 7 dias.

#### **3.3.2 Verificação da susceptibilidade de *G. mellonella* à infecção por *Candida* spp.**

##### **3.3.2.1 Curva de sobrevivência**

Antes do estudo da interação de *Candida* spp. e *Lactobacillus*, foi realizada uma análise da suscetibilidade de *G. mellonella* à infecção por *Candida* spp. para determinação da concentração letal de *Candida* nesses animais. Para isso, foram

inoculadas em *G. mellonella* várias suspensões padronizadas de *Candida* na concentração que variou de  $10^7$  a  $10^{10}$  células/mL. Para cada concentração inoculada, foi utilizado um grupo de 15 larvas. Um inóculo de 10  $\mu$ L de cada suspensão de *Candida* padronizada foi injetado na última *proleg* da *G. mellonella* para determinação da curva de sobrevivência, conforme descrito a seguir, no item 3.3.2.2. Após a inoculação, as lagartas foram armazenadas em placas de *Petri* e incubadas a 37°C. As larvas foram consideradas mortas quando não apresentavam nenhum movimento ao toque. Para *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, foi encontrada a concentração letal (todas mortas em 24 h) na suspensão de  $10^7$  células/larva ( $10^9$  células/ml). Para *C. glabrata*, foi necessária a concentração  $10^8$  células/larva ( $10^{10}$  células/ml), para que a suspensão fosse letal às larvas. Após a curva de sobrevivência das larvas, foi realizado os ensaios de sobrevivência com os grupos experimentais com ambos os micro-organismos.

### **3.3.2.2 Preparo das suspensões padronizadas de *Candida* spp. e *Lactobacillus* spp.**

As colônias isoladas de *Candida* foram cultivadas a 37°C por 24 h em caldo *Yeast Nitrogen Base* (YNB- Difco, Detroit, USA) suplementado com glicose na concentração de 100 mM. As colônias isoladas de *Lactobacillus* foram cultivadas em caldo MRS (Difco, Detroit, MI) a 37°C por 24 h sob condições de microaerofilia (5% de CO<sub>2</sub>). Posteriormente, as células microbianas foram centrifugadas (2000  $\times$ g por 10 min), o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi lavado com suspensão salina 0,85% e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e as suspensões foram padronizadas em solução salina 0,85%. A contagem do número de células da suspensão foi realizada através de espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) a uma concentração de  $10^8$  células/mL para as cepas de *Lactobacillus* (quando inocula 10  $\mu$ L, a concentração na lagarta passa a ser de  $10^6$  células/mL). Já a contagem do número de células das suspensões de *Candida* foi realizada através da Câmara de Neubauer, utilizando microscópio óptico.

### 3.3.2.3 Grupos experimentais

Após a padronização das suspensões com as concentrações letais para cada espécie de *Candida* e a padronização das suspensões de *Lactobacillus*, foram feitos os grupos experimentais. O quadro 3 mostra todos os grupos experimentais e os números de larvas utilizadas por experimento. São 5 grupos experimentais. No grupo chamado Profilático, a suspensão das espécies de *Lactobacillus* foram inoculadas 24 h antes das suspensões de *Candida*, como uma forma de prevenção. No grupo chamado Terapêutico, em cada experimento, a suspensão letal em 24 h da respectiva espécie de *Candida* foi inoculada 30 minutos antes da inoculação da suspensão do respectivo *Lactobacillus*. Foi utilizado este tempo de 30 min pois, após cerca de 1 hora, as lagartas começavam a melanizar, tornando-se escuras e muitas morriam neste período. Nos grupos controles, foram inoculados apenas *Lactobacillus* ou *Candida*. Em todos os experimentos foi realizado um grupo controle inoculado apenas com PBS para acompanhar o estado de saúde das larvas de *G. mellonella* durante todo o experimento. No Quadro 2, mostrado anteriormente, apresenta todas as interações dos micro-organismos que foi realizado nos experimentos de formação de biofilme *in vitro* e *in vivo* na *G. mellonella*.

### 3.3.2.4 Injeção de micro-organismos em *G. mellonella*

Um inóculo de 10 µL da suspensão padronizada de *Candida* foi injetado com auxílio de seringas de precisão (Hamilton Inc., EUA) na hemolinfa de cada lagarta através da última *proleg* esquerda. Dez microlitros da suspensão padronizada de células de *Lactobacillus* foram inoculados na última *proleg* direita (Figura 5). Para os grupos com infecção por um único micro-organismo, 10 µL da suspensão do micro-organismo foi inoculada na última *proleg* esquerda e o mesmo volume de PBS na última *proleg* direita. Para cada micro-organismo foi utilizada uma seringa Hamilton.

Quadro 3 - Grupos experimentais e número de lagartas de *G. mellonella* utilizadas por experimento

<b>Grupos</b>	<b><i>Galleria mellonella</i></b>
<i>Candida</i> (30 min) + <i>Lactobacillus</i> (TERAPÊUTICO)	15
<i>Lactobacillus</i> (24 h) + <i>Candida</i> (PROFILÁTICO)	15
Controle de <i>Candida</i>	15
Controle de <i>Lactobacillus</i>	15
Controle de PBS	15
<b>Total</b>	<b>75</b>

Legenda: Nos grupos Terapêutico, as suspensões de *Candida* foram inoculadas 30 min antes das suspensões de *Lactobacillus*. Nos grupos Profilático, as suspensões de *Lactobacillus* foram inoculadas 24 h antes das suspensões de *Candida*.

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 4 - Modelo de invertebrado: larvas de *G. mellonella* em placa de *Petri*



Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 5 - Inoculação da suspensão de micro-organismos para indução de infecção experimental em *G. mellonella*



Legenda: As suspensões dos respectivos micro-organismos foram injetadas na última *proleg* esquerda das lagartas. Nos grupos com interação, as suspensões foram injetadas nas últimas *prolegs* esquerda e direita.

Fonte: Elaborada pela autora.

### 3.3.2.5 Determinação da curva de sobrevivência da *G. mellonella*

Após a inoculação, as larvas foram armazenadas em placas de *Petri* e incubadas a 37°C. O número de *G. mellonella* mortas foi anotado diariamente durante 7 dias. As larvas foram consideradas mortas quando não apresentavam nenhum movimento ao toque.

## 3.4 Análise Estatística

A análise estatística dos dados da contagem de UFC/mL dos biofilmes *in vitro* foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey. As curvas de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* foram analisadas pelo teste de Log-rank (Mantel- Cox). Em todos os testes foi utilizado o Programa Graph Pad Prism 5.0, considerando nível de significância de 5%.

## 4 RESULTADOS

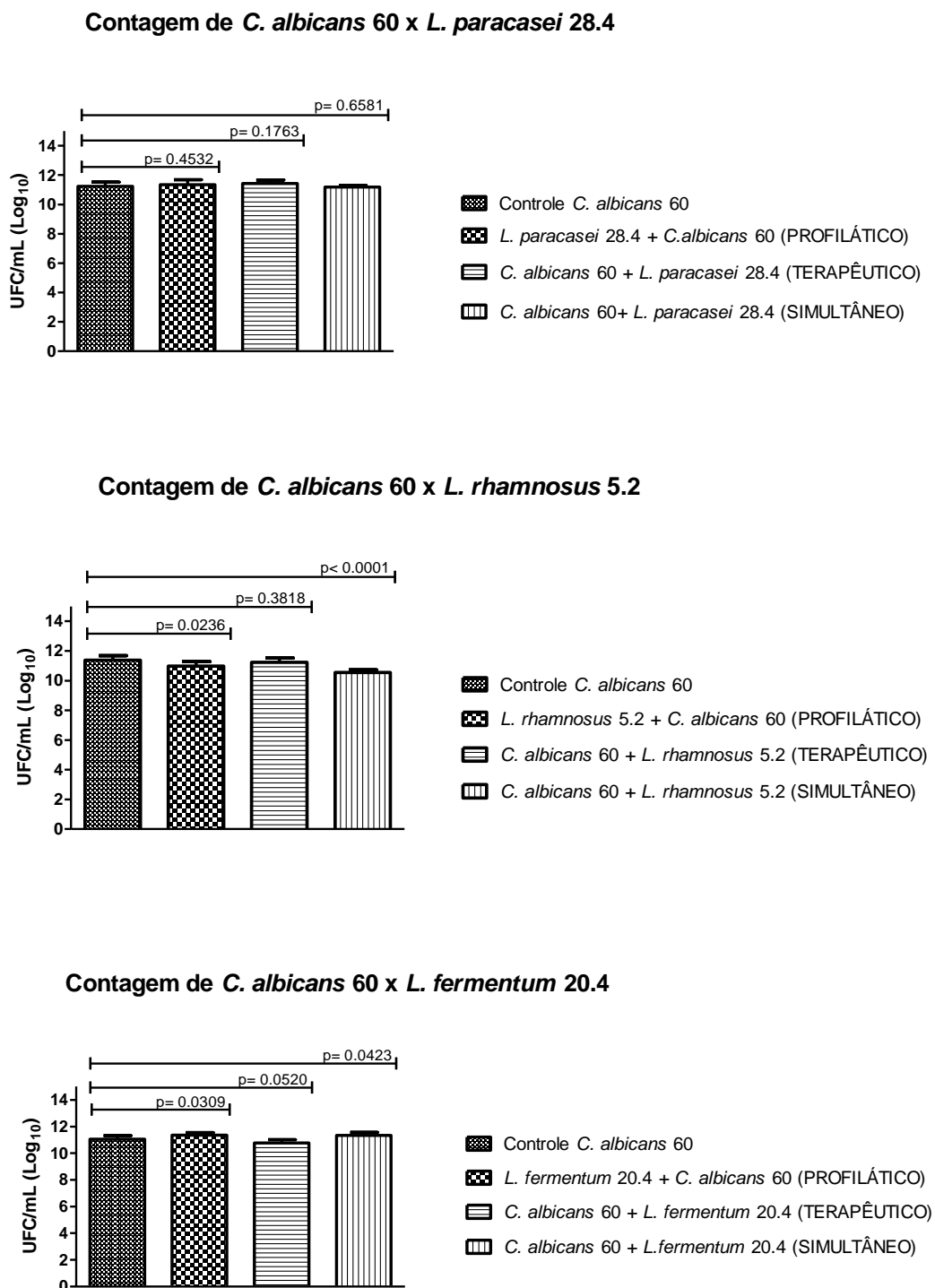
### 4.1 Resultados da análise dos biofilmes formados *in vitro*

Na formação de biofilmes *in vitro*, foram testados os efeitos das cepas de *L. paracasei* 28.4, *L. rhamnosus* 5.2 e *L. fermentum* 20.4 sobre as diferentes espécies de *Candida*. Os resultados obtidos nos testes com *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* estão apresentados respectivamente nas Figuras 6, 7, 8 e 9.

A Figura 6 mostra os gráficos contendo as interações entre as três espécies de *Lactobacillus* e *C. albicans*. Como podemos observar, a interação entre *C. albicans* com *L. paracasei* não teve redução significativa na contagem de *Candida*, em nenhum grupo, comparando-se ao grupo controle. Já na contagem de *C. albicans* com *L. rhamnosus*, o grupo Profilático e o Simultâneo apresentaram redução significativa, apresentando valores de  $p=0.0236$  e  $p<0.0001$ , respectivamente. Na contagem de *C. albicans* com *L. fermentum* também não houve redução do número de *Candida*.

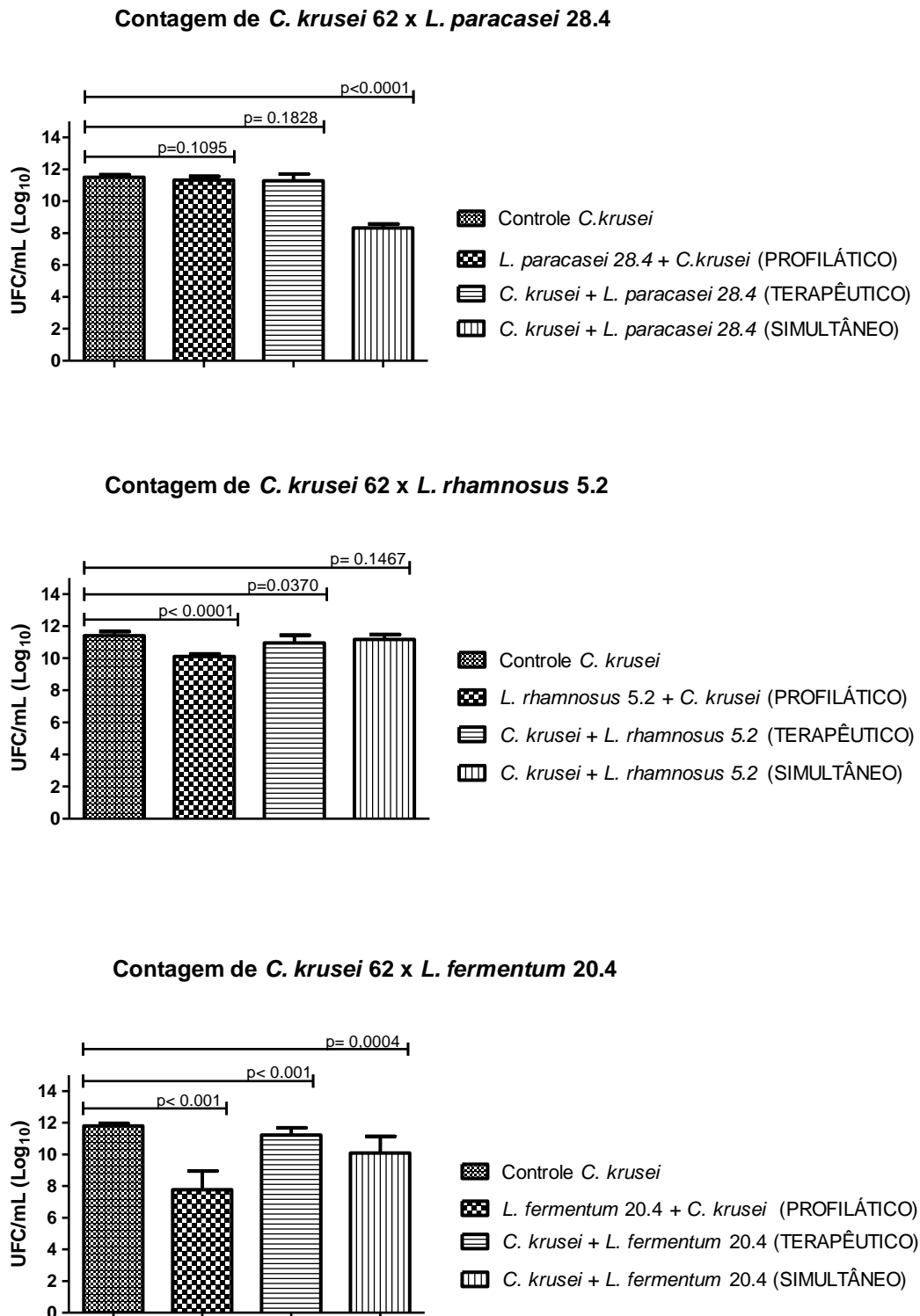
A Figura 7 mostra os gráficos contendo as interações entre as três espécies de *Lactobacillus* e *C. krusei*. Como podemos observar, a interação entre *C. krusei* com *L. paracasei* apresentou redução na contagem de *Candida* no grupo Simultâneo, comparado com o grupo controle. Na contagem de *C. krusei* com *L. rhamnosus*, houve redução no grupo Profilático, sendo  $p<0.0001$ . Já na contagem de *C. krusei* com *L. fermentum*, houve redução significativa nos 3 grupos: Profilático, Terapêutico e Simultâneo.

Figura 6 - Interação entre *C. albicans* (cepa 60) e as diferentes espécies de *Lactobacillus*: dados da contagem de UFC/mL de *Candida* formados nos biofilmes *in vitro*



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 7 - Interação entre *C. krusei* (cepa 62) e as diferentes espécies de *Lactobacillus*: dados da contagem de UFC/mL de *Candida* formados nos biofilmes *in vitro*



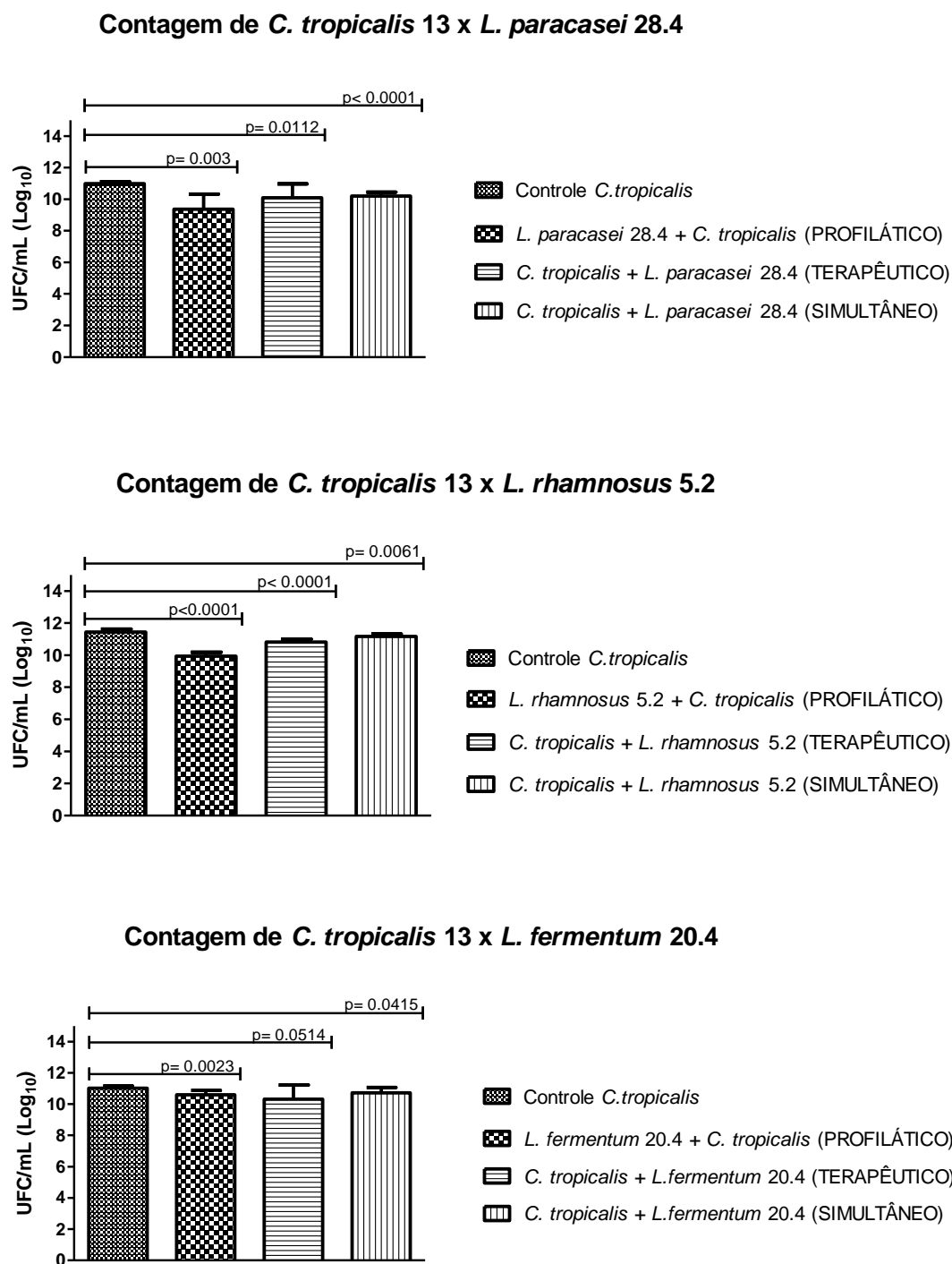
Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 8 mostra a contagem de *C. tropicalis* em biofilmes formados com os *Lactobacillus*. Na interação com *L. paracasei*, a contagem de *C. tropicalis* teve redução nos 3 grupos: Profilático, Terapêutico e Simultâneo. Obtivemos o mesmo resultado na interação com *L. rhamnosus*, no qual todos os grupos tiveram redução significativa, comparando-se ao grupo controle. Já na interação com *L. fermentum*, apenas o grupo Profilático apresentou redução na contagem de *C. tropicalis*.

A Figura 9 mostra a contagem de *C. glabrata* na formação de biofilmes com os *Lactobacillus*. *L. paracasei* conseguiu reduzir significativamente a contagem de *C. glabrata* apenas no grupo Simultâneo. *L. rhamnosus* e *L. fermentum* apresentaram redução apenas no grupo Profilático, com valores de  $p=0.0007$  e  $p<0.0001$ , respectivamente.

Comparando-se as 4 espécies de *Candida* estudadas (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*), verificou-se que as maiores reduções em log de UFC/mL de *Candida*, na interação com *Lactobacillus*, foram encontradas para as espécies *C. tropicalis* (2 logs) e *C. krusei* (5 logs). Esses resultados sugerem que *C. tropicalis* e *C. krusei* mostram-se mais sensíveis aos efeitos inibitórios dos *Lactobacillus* do que *C. albicans* e *C. glabrata* (Figuras 6 a 9).

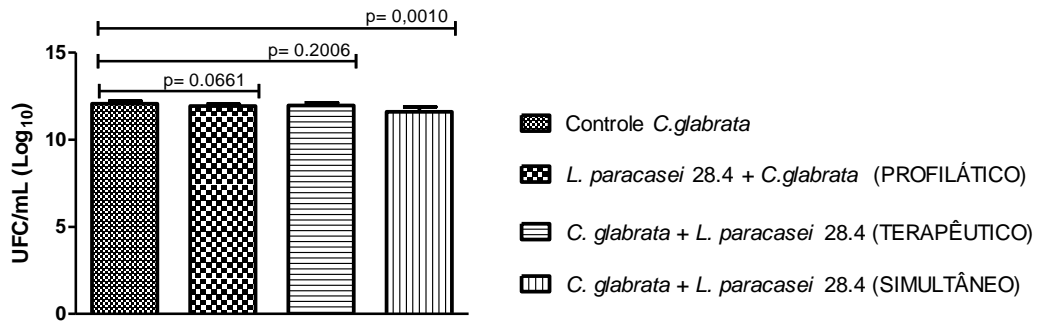
Figura 8 - Interação entre *C. tropicalis* (cepa 13) e as diferentes espécies de *Lactobacillus*: dados da contagem de UFC/mL de *Candida* formados nos biofilmes *in vitro*



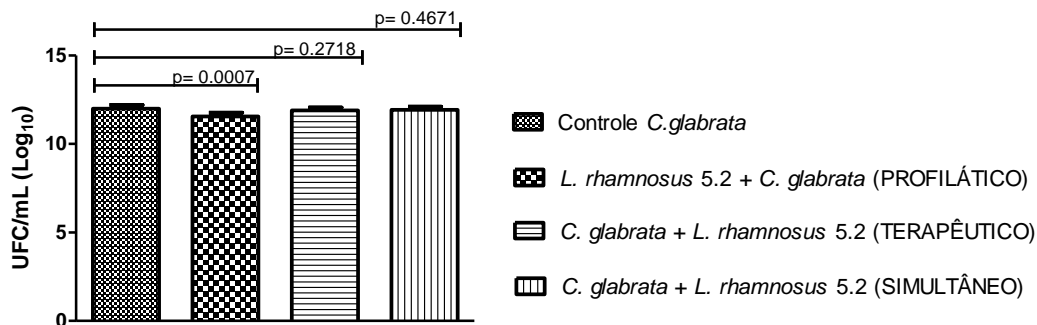
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 9 - Interação *C. glabrata* (cepa 64) e as diferentes espécies de *Lactobacillus*: dados da contagem de UFC/mL de *Candida* formados nos biofilmes *in vitro*

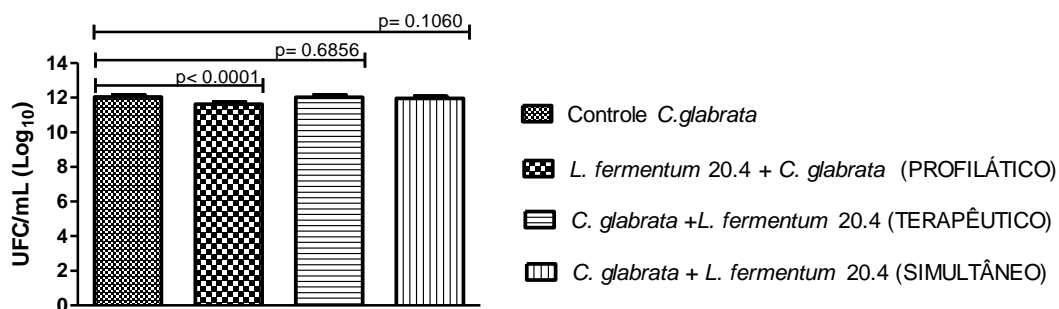
#### Contagem de *C. glabrata* 64 X *L. paracasei* 28.4



#### Contagem de *C. glabrata* 64 X *L. rhamnosus* 5.2



#### Contagem de *C. glabrata* 64 X *L. fermentum* 20.4



Fonte: Elaborada pela autora.

As diferenças estatisticamente significantes entre os biofilmes monoespécies formados por *Candida* com os biofilmes formados pela interação com *Lactobacillus* estão apresentados de forma resumida na Tabela 1. Nesta tabela pode se observar que o maior número de diferenças estatísticas foram encontrados nos grupos profiláticos, seguidos pelos grupos Simultâneo e Terapêutico. Esses dados sugerem que os efeitos de *Lactobacillus* nos biofilmes de *C. albicans* estão mais relacionados com uma ação profilática dos *Lactobacillus*, provavelmente pela competição por aderência.

Na Tabela 1, também, podemos observar que, apesar do maior número de diferenças estatísticas ter ocorrido com *C. tropicalis*, a espécie *C. krusei* foi a que apresentou maior número de redução de UFC/mL quando em contato com as cepas de *Lactobacillus*.

Ainda na Tabela 1, podemos notar que o número de diferenças estatisticamente significantes em relação à redução de *Candida* quando em contato com as diferentes espécies de *Lactobacillus*, foram iguais a 5 para *L. paracasei*, 8 para *L. rhamnosus* e 6 para *L. fermentum*. Esses dados indicam que as três espécies de *Lactobacillus* estudadas apresentam efeitos inibitórios sobre *C. albicans* nos biofilmes formados *in vitro*.



Tabela 1 - Resumo das diferenças estatisticamente encontrada entre os grupos controles e grupos interação (profilático, terapêutico e simultâneo) para cada espécie de *Candida* estudada.

Espécies de <i>Candida</i>	Grupos interação que apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle:
<b><i>C. albicans</i></b>	<i>L. rhamnosus</i> ( <b>Profilático</b> ) (p=0.0236) <i>L. rhamnosus</i> (Simultâneo) (p<0.0001)
<b><i>C. krusei</i></b>	<i>L. paracasei</i> (Simultâneo) (p<0.0001) <i>L. rhamnosus</i> ( <b>Profilático</b> ) (p<0.0001) <i>L. rhamnosus</i> (Terapêutico) (p=0.0370) <i>L. fermentum</i> ( <b>Profilático</b> ) (p<0.0001) <i>L. fermentum</i> (Terapêutico) (p<0.0001) <i>L. fermentum</i> (Simultâneo) (p=0.0004)
<b><i>C. tropicalis</i></b>	<i>L. paracasei</i> ( <b>Profilático</b> ) (p=0.0003) <i>L. paracasei</i> (Terapêutico) (p=0.0112) <i>L. paracasei</i> (Simultâneo) (p<0.0001) <i>L. rhamnosus</i> ( <b>Profilático</b> ) (p<0.0001) <i>L. rhamnosus</i> (Terapêutico) (p<0.0001) <i>L. rhamnosus</i> (Simultâneo) (p=0.0061) <i>L. fermentum</i> ( <b>Profilático</b> ) (p=0.0023) <i>L. fermentum</i> (Simultâneo) (p=0.0415)
<b><i>C. glabrata</i></b>	<i>L. paracasei</i> (Simultâneo) (p=0.0010) <i>L. rhamnosus</i> ( <b>Profilático</b> ) (p=0.0007) <i>L. fermentum</i> ( <b>Profilático</b> ) (p<0.0001)

Fonte: Elaborada pela autora.

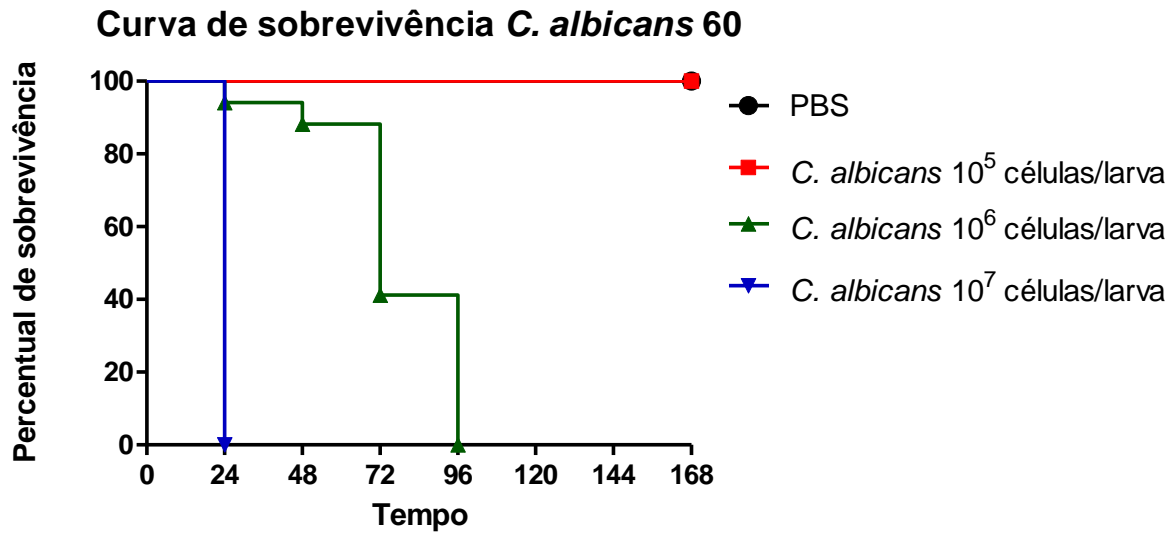
## 4.2 Resultados do estudo em *G. mellonella*

### 4.2.1 Verificação da suscetibilidade de *G. mellonella* à infecção pelas diferentes espécies de *Candida*

Para avaliar se as espécies de *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e *L. fermentum* têm efeitos inibitórios sobre a candidose experimental, primeiramente foi necessário padronizar uma concentração de células de cada espécie de *Candida* que fosse letal às larvas. Desse modo, as larvas foram infectadas com diferentes concentrações das cepas de *Candida*, que variaram de  $10^5$  a  $10^8$  células/larvas, e em seguida foram monitoradas, diariamente, durante 7 dias (168 h) para determinação da curva de sobrevivência.

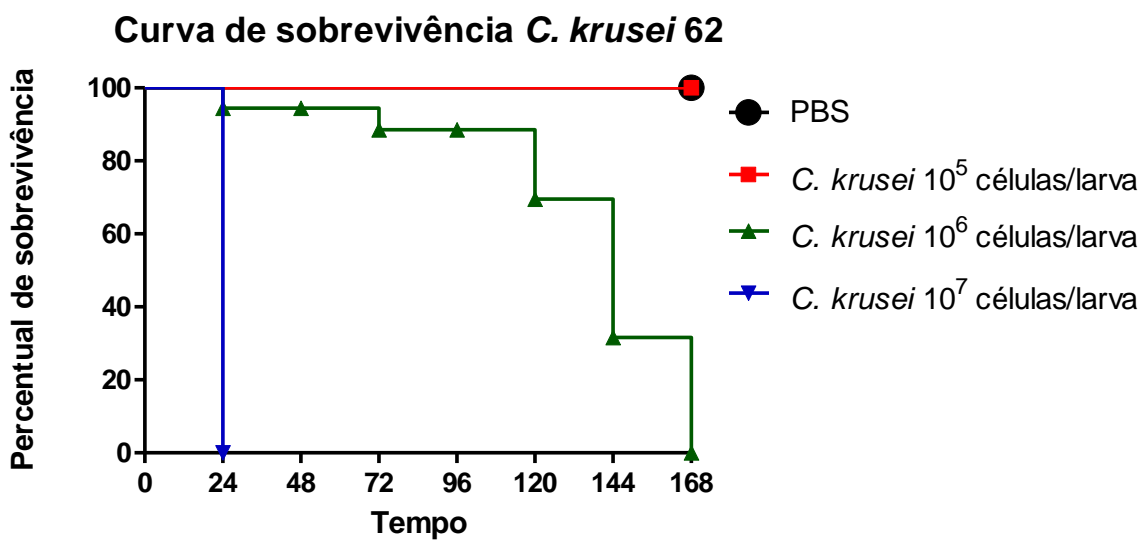
Os resultados obtidos nas curvas de sobrevivência demonstraram que, para as espécies de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, a concentração letal foi de  $10^7$  células/larva, pois nessa concentração ocorreu morte de 100% das larvas após 24 h (Figuras 10, 11 e 12). Entretanto, a concentração letal determinada para *C. glabrata* foi de  $10^8$  células/larva, pois apenas nessa concentração ocorreu morte de todas as larvas em 24 h, conforme mostra a Figura 13. Esses dados sugerem que entre as 4 espécies de *Candida* estudadas, *C. glabrata* foi a menos virulenta para o modelo de *G. mellonella*.

Figura 10 – Gráfico da curva de sobrevivência das larvas com infecção por *C. albicans* em diferentes concentrações



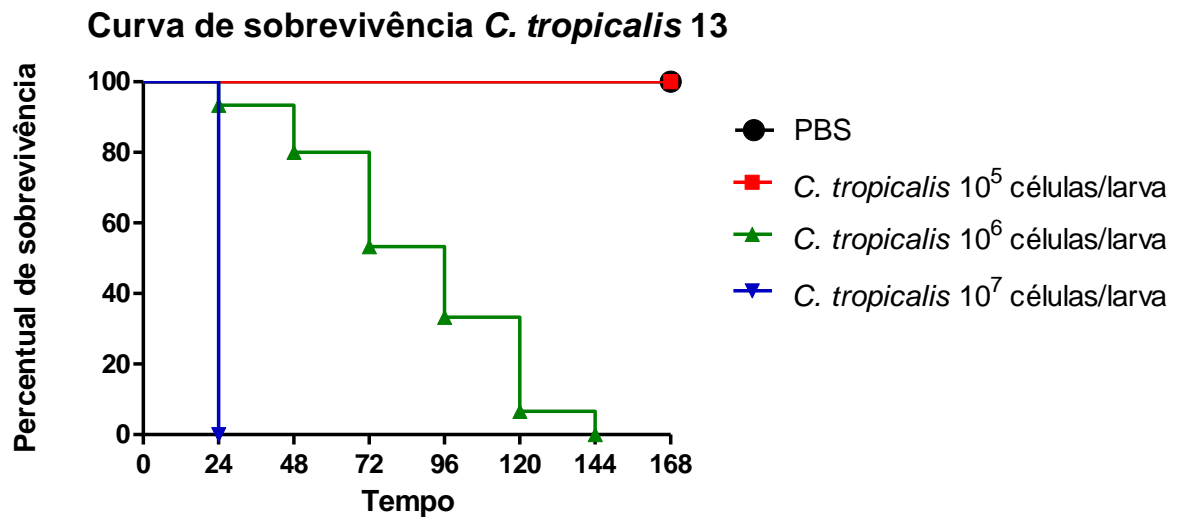
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 11 – Gráfico da curva de sobrevivência das larvas com infecção por *C. krusei* em diferentes concentrações



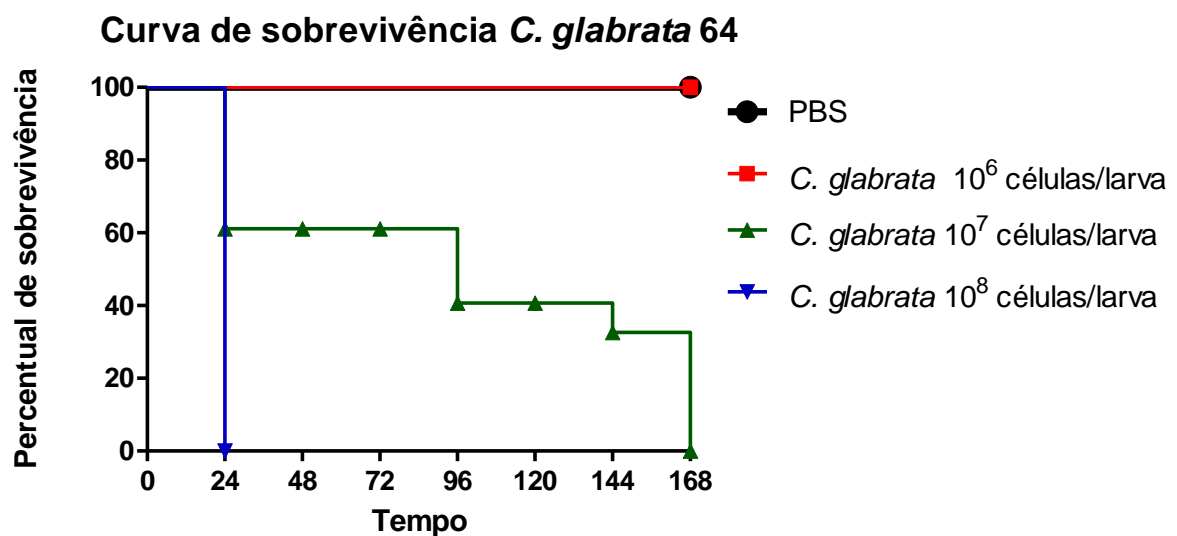
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 12 - Gráfico da curva de sobrevivência das larvas com infecção por *C. tropicalis* em diferentes concentrações



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 13 - Gráfico da curva de sobrevivência das larvas com infecção por *C. glabrata* em diferentes concentrações



Fonte: Elaborada pela autora.

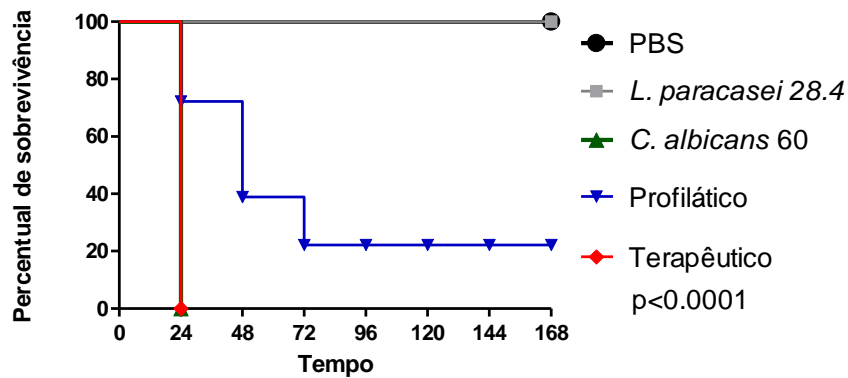
#### 4.2.2 Efeitos de *Lactobacillus* spp. na candidose experimental em *G. mellonella*

Os resultados dos efeitos de *L. paracasei* 28.4, *L. rhamnosus* 5.2 e *L. fermentum* 20.4 na candidose experimental em *G. mellonella* estão demonstrados nas Figuras 14, 15, 16 e 17.

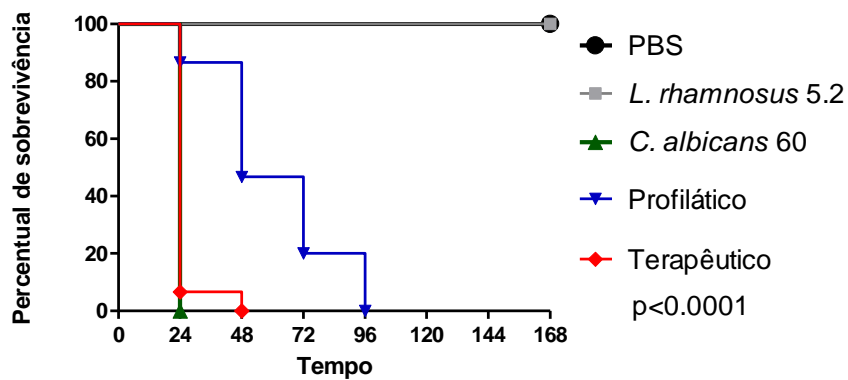
A Figura 14 mostra os resultados da interação das cepas de *Lactobacillus* spp. com *C. albicans*. No grupo PBS e grupo Controle com apenas *Lactobacillus*, ao final das 168 h, 100% das larvas estavam vivas, como podemos observar em todos os experimentos (Figuras 14a, 14b e 14c). No estudo da interação de *C. albicans* com *L. paracasei* (Figura 14a), verificou-se que o grupo Profilático (*L. paracasei* inoculado nas larvas 24 h antes da inoculação de *C. albicans*) apresentou resultado bastante promissor, pois ao final de 7 dias, cerca de 20% das larvas ainda estavam vivas, comparando-se ao grupo controle de *Candida*, no qual 100% das larvas estavam mortas em 24 h. Entretanto, o grupo Terapêutico (*L. paracasei* inoculado 30 min após a infecção por *Candida*) não teve efeito na sobrevivência das larvas, observando-se morte de todas as larvas em 24 h. Resultados semelhantes foram observados nos grupos Terapêuticos com as cepas de *L. rhamnosus* (Figura 14b) e *L. fermentum* (Figura 14c), em que se observou que o grupo Terapêutico não apresentou resultado significativo. No estudo da interação de *C. albicans* com *L. rhamnosus* (Figura 14b), verificou-se que o grupo Profilático apresentou resultado significativo, aumentando a sobrevivência das larvas em até 96 h. A Figura 14c mostra a interação de *C. albicans* com *L. fermentum*, e novamente o grupo Profilático apresentou resultado significativo, aumentando a sobrevivência das larvas em até 168 h.

Figura 14- Efeitos das cepas de *Lactobacillus* na candidose experimental em *G. mellonella* induzida pela infecção por *C. albicans*

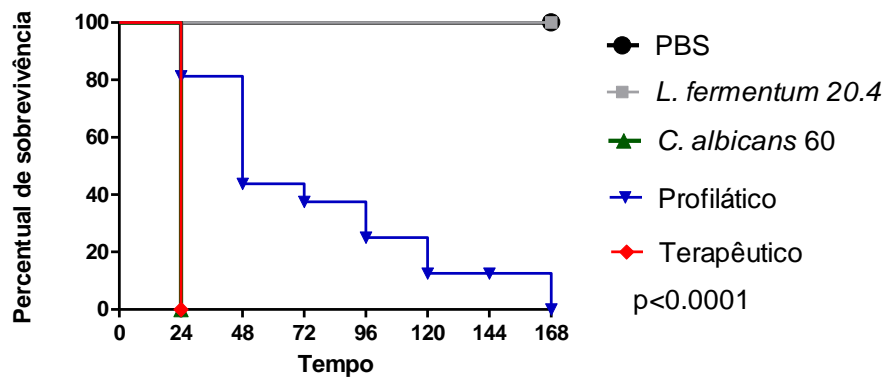
a) *C. albicans* 60 ( $10^7$ ) x *L. paracasei* 28.4 ( $10^6$ )



b) *C. albicans* 60 ( $10^7$ ) x *L. rhamnosus* 5.2 ( $10^6$ )



c) *C. albicans* 60 ( $10^7$ ) x *L. fermentum* 20.4 ( $10^6$ )



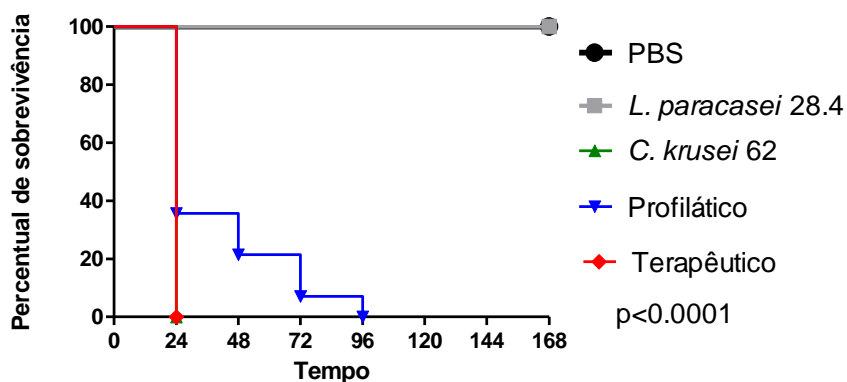
Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 15 apresenta a interação dos *Lactobacillus* spp. sobre *C. krusei*. A Figura 15a mostra que *L. paracasei* apresentou resultado significativo, novamente, no grupo Profilático, aumentando a sobrevivência das larvas em até 96 h. O grupo Terapêutico não apresentou resultado significativo, apresentando 100% das larvas mortas em 24 h. A Figura 15b mostra os efeitos de *L. rhamnosus* sobre a candidose, que também levou a um aumento na sobrevivência das larvas por 120 h no grupo Profilático. No grupo Terapêutico, as larvas sobreviveram por 72 h, comparadas com o grupo controle de *Candida*, que morreram 100% em 24 h. A Figura 15c mostra que *L. fermentum* aumentou a sobrevivência das larvas em cerca de 72 h, apenas no grupo Profilático. No grupo Terapêutico, 100% das larvas estavam mortas em 24 h.

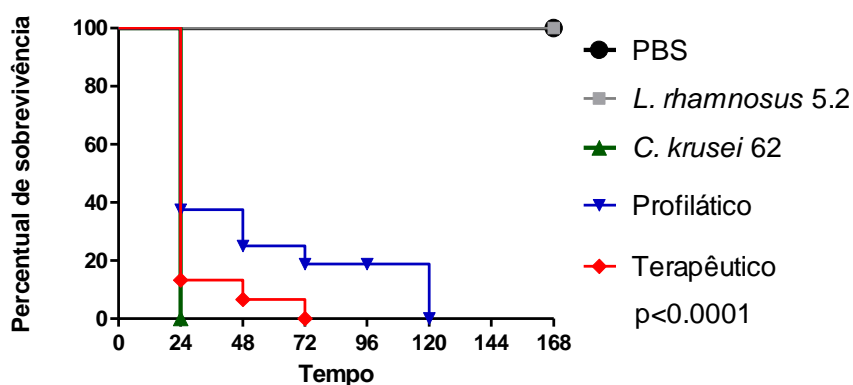
A Figura 16 mostra os efeitos dos *Lactobacillus* na candidose experimental em *G. mellonella* induzida pela infecção por *C. tropicalis*. A Figura 16a mostra a interação do *L. paracasei*, que apresentou um resultado bastante significativo no grupo Profilático, aumentando de forma significativa a sobrevivência das larvas por mais de 7 dias. Ao final do período, cerca de 18% das larvas estavam vivas. No grupo Terapêutico, as larvas sobreviveram por 72 h, comparando-se com o grupo controle de *Candida*, que apresentou 100% das larvas mortas em 24 h. A Figura 16b mostra o efeito do *L. rhamnosus* sobre *C. tropicalis*, que apresentou aumento significativo na sobrevivência das larvas em 96 h, no grupo Profilático e em 72 h no grupo Terapêutico. A Figura 16c mostra que *L. fermentum*, em ambos os grupos (Profilático e Terapêutico), aumentaram a sobrevivência em apenas 48 h.

Figura 15 - Efeitos das cepas de *Lactobacillus* na candidose experimental em *G. mellonella* induzida pela infecção por *C. krusei*

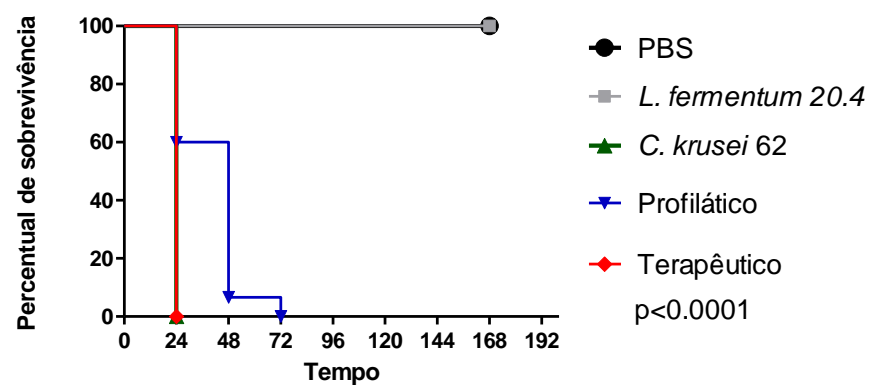
a) *C. krusei* 62 ( $10^7$ ) x *L. paracasei* 28.4 ( $10^6$ )



b) *C. krusei* 62 ( $10^7$ ) x *L. rhamnosus* 5.2 ( $10^6$ )



c) *C. krusei* 62 ( $10^7$ ) x *L. fermentum* 20.4 ( $10^6$ )

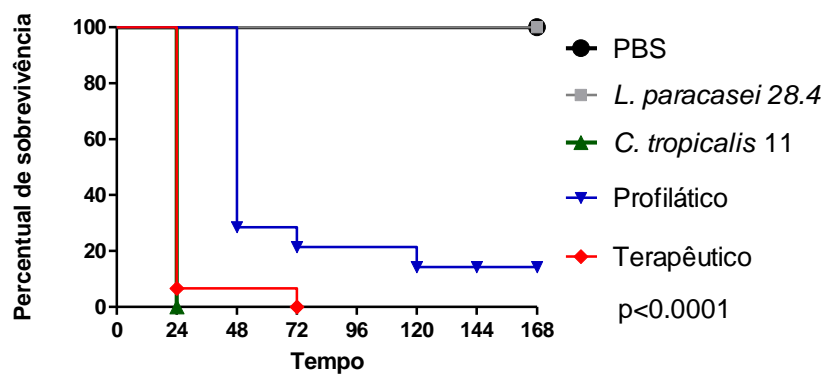


Fonte: Elaborada pela autora.

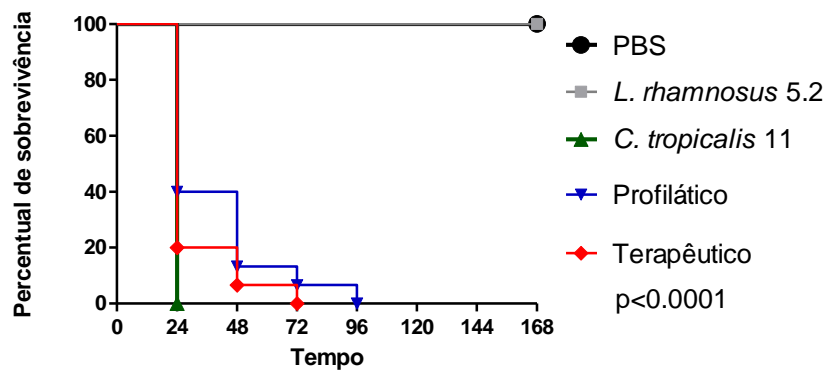


Figura 16 – Efeitos das cepas de *Lactobacillus* na candidose experimental em *G. mellonella* induzida pela infecção por *C. tropicalis*

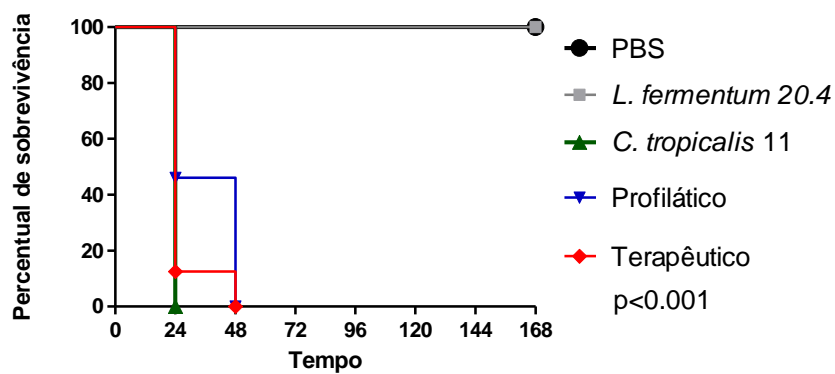
a) *C. tropicalis* 11 ( $10^7$ ) x *L. paracasei* 28.4 ( $10^6$ )



b) *C. tropicalis* 11 ( $10^7$ ) x *L. rhamnosus* 5.2 ( $10^6$ )



c) *C. tropicalis* 11 ( $10^7$ ) x *L. fermentum* 20.4 ( $10^6$ )



Fonte: Elaborada pela autora.

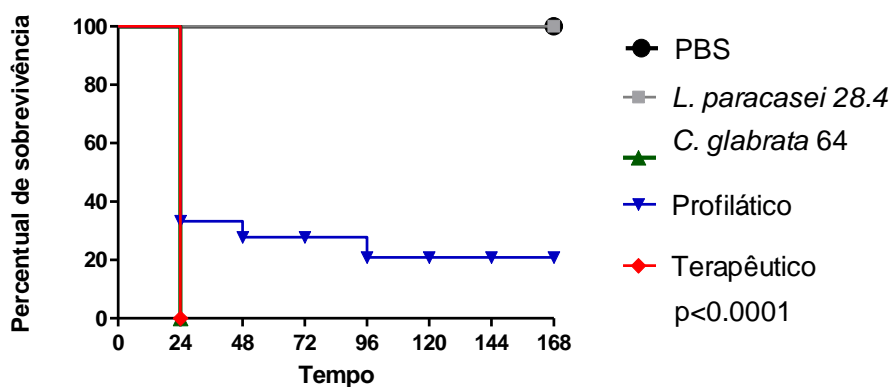
A Figura 17 mostra os efeitos dos *Lactobacillus* spp. sobre *C. glabrata*. A Figura 17a demonstra que *L. paracasei* apresentou um resultado bastante significativo no grupo Profilático, aumentando a sobrevivência das larvas por mais de 7 dias. Ao final do período, mais de 20% das larvas estavam vivas. Em relação à análise de *L. rhamnosus* sobre *C. glabrata* (Figura 17b), verificou-se no grupo profilático uma sobrevivência de 72 h, comparadas ao grupo controle de *C. glabrata*. O grupo Terapêutico não apresentou aumento na sobrevivência das larvas. A Figura 17c mostra que *L. fermentum* levou a um aumento significativo na sobrevivência das larvas em 96 h, no grupo Profilático e em 72 h no grupo Terapêutico.

Assim, os resultados dos experimentos *in vivo* em *G. mellonella*, indicam que as 3 cepas de *Lactobacillus* estudadas (*L. paracasei* 28.4, *L. rhamnosus* 5.2 e *L. fermentum* 20.4) tiveram efeitos inibitórios sobre a candidose experimental. Em relação às espécies de *Candida* analisadas (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*), todas foram sensíveis aos efeitos das cepas clínicas de *Lactobacillus*.

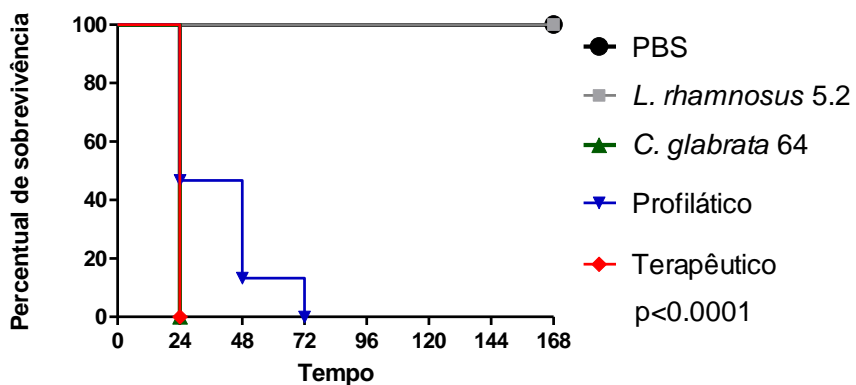
Além disso, o estudo *in vivo* demonstrou que os grupos profiláticos tiveram ação muito mais significativa na sobrevivência das larvas em relação aos grupos terapêuticos. Esses dados sugerem que *Lactobacillus* apresentam maior ação imunomoduladora do que antifúngica. *Lactobacillus* inoculados 24 h antes da infecção por *Candida* são capazes de proteger *G. mellonella* da infecção, provavelmente por estimular o sistema imunológico das larvas.

Figura 17 - Efeitos das cepas de *Lactobacillus* na candidose experimental em *G. mellonella* induzida pela infecção por *C. glabrata*

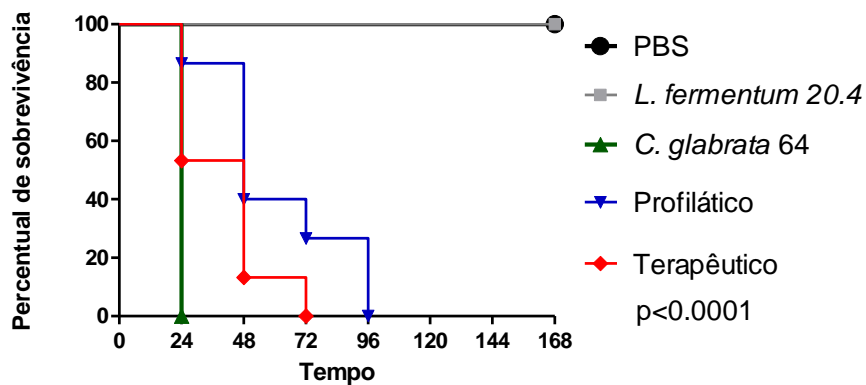
a) *C. glabrata* 64 ( $10^8$ ) x *L. paracasei* 28.4 ( $10^6$ )



b) *C. glabrata* 64 ( $10^8$ ) x *L. rhamnosus* 5.2 ( $10^6$ )



c) *C. glabrata* 64 ( $10^8$ ) x *L. fermentum* 20.4 ( $10^6$ )



Fonte: Elaborada pela autora.

## 5 DISCUSSÃO

Devido as espécies de *Candida* apresentarem características de fungos oportunistas, os pacientes HIV-positivos são considerados as maiores vítimas das infecções fúngicas invasivas. Marukutira et al. (2014) caracterizaram a epidemiologia, o diagnóstico, o tratamento e resultados de infecções fúngicas invasivas (IFIs) em pacientes com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). No total, 320 isolados de fungos foram identificados de 303 pacientes HIV-positivos com IFIs. Estes incluíram 33,1% das espécies de *Candida*, sendo *C. albicans* a espécie mais comum. Esta infecção por *Candida* ocorreu principalmente como candidemia (86%). Pacientes com candidemia apresentaram maior probabilidade de ter outras condições que exigem serviços médicos mais adequados em comparação com pacientes com outras IFIs. No nosso estudo, usamos as cepas de pacientes HIV-positivos, que também apresentaram quadro de candidose, no caso, lesões de candidose orofaríngea, apresentando cepas resistentes aos antifúngicos convencionais, como fluconazol e anfotericina B. Desses isolados clínicos, mais de uma espécie de *Candida* foi identificada nas lesões e também da saliva destes pacientes. Dentre as espécies, *C. albicans* também foi a mais encontrada (Junqueira et al., 2011).

A candidemia é uma preocupação crescente em todo o mundo, e as espécies de *Candida não-albicans* têm aumentado muito nas últimas décadas, especialmente em pacientes debilitados. Wu et al. (2017) atualizaram a epidemiologia e a suscetibilidade antifúngica de isolados de candidemia por espécies não-*albicans* de pacientes com câncer em Taiwan. Um total de 346 casos de candidemia por espécies de *Candida não-albicans* foram identificados. *C. tropicalis* foi a espécie mais comum e apresentou a maior taxa de resistência ao fluconazol dentre todos os isolados, incluindo *C. glabrata* e *C. parapsilosis*.

As altas taxas de morbidade e mortalidade causadas por infecções fúngicas estão associadas com o atual arsenal antifúngico limitado e a alta toxicidade dos compostos. Além disso, identificar novos alvos de drogas é um desafio, pois existem muitas semelhanças entre células fúngicas e humanas. Os fungos desenvolveram mecanismos de resistência, como a superexpressão das proteínas da bomba de efluxo e a formação do biofilme, enfatizando a importância de entender esses

mecanismos. Além disso, uma abordagem diferente para prevenir e tratar doenças fúngicas é a imunoterapia, que envolve mecanismos diferentes, como vacinas, ativação da resposta imune e induzindo a produção de moléculas antimicrobianas hospedeiras. Em geral, são necessários muitos anos para a descoberta de um novo antifúngico para uso clínico. No entanto, o desenvolvimento de novas estratégias antifúngicas reduzirá o tempo terapêutico e / ou aumentará a qualidade de vida dos pacientes (Scorzoni et al., 2017).

A formação de biofilmes é essencial para a proteção de leveduras contra mecanismos de defesa do hospedeiro e medicamentos antifúngicos comumente usados (Ramage et al., 2005). Usando um modelo de biofilme *in vitro*, Pessee et al. (2016) procuraram determinar o efeito combinado de dois agentes antifúngicos pertencentes a diferentes classes com mecanismos de ação distintos, contra o biofilme misto de *C. albicans* e *C. glabrata*. A capacidade de formação de biofilme foi avaliada através da quantificação da biomassa total. A eficácia da combinação de Caspofungina/fluconazol na biomassa e na microestrutura do biofilme misto foi dependente da concentração de Caspofungina. Esta combinação mostrou-se eficaz, porém demonstra um uso excessivo de antifúngicos para poder inibir a formação de biofilme. No nosso estudo, as cepas clínicas de *Lactobacillus*, isoladamente, foram capazes de reduzir a contagem das espécies de *Candida*, na formação do biofilme *in vitro*. *C. albicans* apresentou redução na contagem de colônias nas interações com *L. rhamnosus*, nos grupos Profilático e Simultâneo.

Rossoni et al. (2018) isolaram cepas de *Lactobacillus* da cavidade bucal de indivíduos livres de cárie e avaliaram os efeitos inibitórios em três cepas de *C. albicans*: duas cepas clínicas (CA60, CA230S) e uma cepa ATCC 18804. Trinta cepas de *Lactobacillus* foram isoladas e avaliadas quanto à atividade antimicrobiana contra biofilmes *in vitro* de *C. albicans*. Os isolados de *L. paracasei* 28.4, *L. rhamnosus* 5.2 e *L. fermentum* 20.4 foram as cepas que exibiram a atividade inibitória mais significativa. A interação entre estes micro-organismos resultou na dissuasão do desenvolvimento de biofilme e no retardamento da formação de hifas. O impedimento do desenvolvimento do biofilme foi caracterizado pela expressão negativa de genes específicos do biofilme de *C. albicans* (ALS3, HWP1, EFG1 e CPH1). *L. paracasei* 28.4, *L. rhamnosus* 5.2 e *L. fermentum* 20.4 demonstraram a capacidade de exercer atividade antifúngica através da inibição de biofilmes de *C. albicans*, reduzindo o

número de células fúngicas, inibindo a formação de hifas, desestabilizando a arquitetura do biofilme. Estes autores concluíram que *L. fermentum* 20.4, *L. paracasei* 28.4 e *L. rhamnosus* 5.2 têm o potencial de serem usados como probióticos na cavidade bucal para prevenir o desenvolvimento de candidose oral. Resultado semelhante foi verificado no nosso estudo, porém, estas cepas de *Lactobacillus* apresentaram maiores reduções no número de células na formação de biofilmes *in vitro* de *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. albicans*, respectivamente. Apenas a cepa clínica de *L. rhamnosus* apresentou redução significativa no número de células de *C. albicans*.

De acordo com Rossoni et al. (2017), os probióticos têm sido descritos como uma estratégia potencial para controlar infecções oportunistas devido à sua capacidade de estimular o sistema imunológico. Utilizando o modelo hospedeiro invertebrado de *Galleria mellonella*, estes autores avaliaram se cepas clínicas de *Lactobacillus* spp. eram capazes de fornecer proteção contra a infecção por *C. albicans*. Entre diferentes cepas de *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e *L. fermentum*, verificaram que a cepa *L. paracasei* 28.4 apresentou maior capacidade de prolongar a sobrevivência de larvas infectadas com uma dose letal de *C. albicans*. Descobriram que a injeção de  $10^7$  células/larvas de *L. paracasei* em larvas de *G. mellonella* infectadas por *C. albicans* aumentou a sobrevivência desses animais em comparação com o grupo controle ( $P = 0.0001$ ). Em seguida, investigaram os mecanismos imunes envolvidos na proteção contra a infecção por *C. albicans*, avaliando o número de hemócitos e a expressão gênica de peptídeos antifúngicos. Verificaram que *L. paracasei* aumentou a quantidade de hemócitos ( $2,38 \times 10^6$  células/mL) em relação ao grupo controle ( $1,29 \times 10^6$  células/mL), indicando que essa cepa é capaz de elevar o número de hemócitos circulantes no interior da hemolinfa de *G. mellonella*. Além disso, descobriram que os genes regulados por *L. paracasei* 28.4 regulam os peptídeos antifúngicos galiomicina e galeriamicina. Em relação ao grupo controle, *L. paracasei* 28.4 aumentou a expressão gênica de galiomicina em 6,67 vezes e 17,29 vezes para galmicernina. Finalmente, verificaram que o fornecimento profilático de probiótico levou a uma redução significativa do número de células fúngicas na hemolinfa de *G. mellonella*. Concluíram que a cepa *L. paracasei* 28.4 pode proteger contra a candidose e modular o sistema imunológico de *G. mellonella*. No nosso estudo também confirmamos a ação probiótica desta cepa de *L. paracasei*, que

aumentou a sobrevivência das larvas de *G. mellonella* infectadas com uma dose letal de *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, respectivamente, comparadas com o grupo controle. Destacando a ação destes lactobacilos contra as espécies consideradas não-*albicans*, que ainda existem poucos trabalhos na literatura.

de Barros et al. (2018) verificaram a influência das interações entre microorganismos para identificar uma linhagem de *Lactobacillus* que poderia reduzir a filamentação de *Candida albicans* ATCC 18804 usando modelos *in vitro* e *in vivo*. Assim, apresentando um efeito probiótico contra o patógeno fúngico. Primeiro, analisaram a capacidade de 25 isolados clínicos de *Lactobacillus* para reduzir a filamentação em *C. albicans* *in vitro*. Observaram que o isolado de *L. paracasei* 28,4 apresentou a maior redução de hifas de *C. albicans* ( $p = 0,0109$ ). Essa redução foi confirmada por análise de microscopia eletrônica de varredura. Em um estudo *in vivo*, os grupos profiláticos com *L. paracasei* aumentaram a sobrevivência de vermes *Caenorhabditis elegans* infectados com *C. albicans* ( $p = 0,0001$ ) em 29%. A sobrevivida prolongada foi acompanhada pela prevenção da ruptura da cutícula de 27% dos vermes pela filamentação de *C. albicans*, um fenótipo que é característico da morte de nematóides por este fungo, comparado ao grupo controle. O isolado *L. paracasei* 28.4 reduziu a filamentação de *C. albicans* *in vitro*, regulando negativamente os genes TEC1 e UME6 que são essenciais para a produção de hifas. A provisão profilática de *L. paracasei* 28.4 protegeu *C. elegans* contra candidose *in vivo*. Estes autores concluíram que a cepa clínica *L. paracasei* 28.4 tem o potencial de ser empregado como um método alternativo para controlar a candidose, o que também foi verificado no nosso estudo, porém, nós verificamos a ação probiótica desta cepa clínica de *Lactobacillus* com cepas clínicas de *C. albicans* e não-*albicans*.

Comparando com nossos resultados dos grupos Profiláticos, Ribeiro et al. (2017), que também trataram profilaticamente as larvas de *G. mellonella* com *L. rhamnosus* ATCC 9595 antes da infecção por *C. albicans* ATCC 18804, obtiveram aumento na taxa de sobrevivência de *G. mellonella*.

Zakaria Gomaa (2013) observou 10 espécies de lactobacilos isoladas de produtos lácteos no Egito, quanto sua atividade antimicrobiana e anti-adesiva contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e uma cepa de *C. albicans*. Dentre as espécies, esse autor também estudou *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, entre outros, e todas as espécies apresentaram inibição no crescimento de *C. albicans* em

biofilme *in vitro*. Destacando-se as espécies de *Candida* não-*albicans*, as três espécies de lactobacilos tiveram um número maior de redução comparado com *C. albicans*, que não apresentou redução significativa na interação com *L. paracasei*.

Diversas interações antagônicas entre micro-organismos podem ser encontradas na literatura. Dentro das relações, pode-se salientar as que ocorrem entre as espécies de *Candida* com bactérias probióticas, que por meio da produção de metabólitos antimicrobianos, alteração do meio ou por competição direta por sítios de adesão, influenciam negativamente o crescimento destes fungos, podendo ser uma alternativa promissora aos antifúngicos convencionais (Vestman et al., 2013; Al Kassaa et al., 2014). Existem muitos estudos na literatura que descrevem as propriedades probióticas de diferentes lactobacilos e sua capacidade de inibir a colonização de micro-organismos patogênicos, produzir peróxido de hidrogênio e modular a resposta imune do hospedeiro (Aoudia et al., 2016; Chassot et al., 2010; Morales, Hogan, 2010). Vários parâmetros são considerados para atribuir propriedades probióticas para um micro-organismo. Os critérios incluem capacidade de aderir às células epiteliais do hospedeiro, produção de biofilmes, capacidade de co-agregação com bactérias patogênicas, inibição da ligação de agentes patogênicos às células epiteliais e atividade antimicrobiana (Andreu et al., 1995; Mastromarino et al., 2002; Martin et al., 2008; Van Tassell, Miller, 2011; Castro et al., 2013; Dhanani, Bagchi, 2013; Nishiyama et al., 2013).

No estudo de Chew et al. (2015), algumas cepas de *Lactobacillus* também apresentaram atividade contra *C. glabrata*. *L. rhamnosus* GR-1 (ATCC 55826) e *L. reuteri* RC-14 (ATCC 55845) exibiram efeitos antifúngicos por causarem a interrupção do crescimento e morte celular no biofilme misto com *C. glabrata*. Além disso, a capacidade de autoagregação dos lactobacilos e coagregação entre os micro-organismos observados nestas cepas parece ser um mecanismo importante para inibir o crescimento de *C. glabrata*, podendo representar potencial alternativa para o tratamento de infecções causadas por *C. glabrata*.

Estudos mostram que as células de *Lactobacillus* apresentam efeitos inibitórios sobre as leveduras do gênero *Candida* (Thein et al., 2006; Hasslof et al., 2010; Vilela et al., 2015). Estudos realizados com cepas probióticas de *L. acidophilus* e *L. fermentum* em ratos infectados com *C. albicans*, demonstraram uma redução significativa na quantidade de leveduras na cavidade bucal, o que sugere uma



capacidade terapêutica destas bactérias para a candidose bucal (Elahi et al., 2005). O uso de várias cepas de *Lactobacilos* como probióticos tem sido associado com a redução de doenças inflamatórias crônicas e de infecções fúngicas do trato gastrointestinal (Thein et al., 2006; Hasslof et al., 2010).

Guo et al. (2017) avaliaram a ação antimicrobiana de *L. acidophilus* e *L. fermentum* contra *Clostridium perfringens*, que é um patógeno causador da enterite necrótica aviária. Investigaram os efeitos de *L. acidophilus* e *L. fermentum* sobre o crescimento, a produção de toxinas  $\alpha$  e as respostas inflamatórias de *C. perfringens*. Em experiências de cultura *in vitro*, ambos os lactobacilos inibiram o crescimento de *C. perfringens*, acompanhado de uma diminuição do pH. Ambos os lactobacilos também diminuíram a produção de toxinas  $\alpha$  de *C. perfringens*. A redução do pH levou à produção de toxinas  $\alpha$ . A pré-incubação com *L. acidophilus* diminuiu a ligação de *C. perfringens* às células sem que a citotoxicidade celular fosse afetada. Ambos os pré-tratamentos com lactobacilos reduziram a regulação dos fatores pró-inflamatórios, dos receptores de peptídeoglicano (PGN) e do fator nuclear kappa B (NF-kB) p65 em células epiteliais intestinais de frango desafiadas por *C. perfringens*. Concluíram que *L. acidophilus* e *L. fermentum* inibiram os efeitos patológicos das condições *in vitro* de *C. perfringens*.

Amizic et al. (2017) avaliaram a capacidade antimicrobiana *in vitro* de dois probióticos em pastas de dentes (uma contendo *Lactobacillus paracasei*, outra contendo *Lactobacillus acidophilus*) e uma pasta de dente sem probiótico, separadamente. Estas três pastas foram testadas contra *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivarius* e *Staphylococcus aureus*. As pastas de dentes probióticas tiveram melhor efeito inibitório do que as sem probiótico no caso de *C. albicans* e *Streptococcus salivarius*. Ambas as pastas de dentes probióticas testadas mostraram satisfatória atividade antimicrobiana. Pasta de dentes contendo *L. paracasei* teve maior capacidade de inibição do que a pasta contendo *L. acidophilus* em todos os casos, apresentando um efeito mais forte foi contra *C. albicans*. Esta é uma descoberta interessante e deve ser considerada em outros estudos de candidose oral, visando melhorar principalmente a qualidade de vida dos indivíduos imunossuprimidos e idosos. As pasta de dente contendo probióticos é um conceito relativamente novo na prevenção de Doenças infecciosas orais. O presente estudo foi limitado a apenas alguns tipos de micro-organismos. Assim sendo, estudos adicionais

são necessários para testar esses tipos de pastas de dente em diferentes concentrações e micro-organismos.

Ishikawa et al. (2003) revelaram que as cepas probióticas de *Lactobacillus* foram úteis na redução da inflamação gengival. Outros ensaios clínicos demonstraram uma prevalência reduzida de inflamação gengival grave em adultos após o uso regular de comprimidos probióticos (Shimauchi et al., 2008; Iniesta et al., 2012). Dados de um estudo piloto sugeriu um efeito benéfico da bebida probiótica do leite na inflamação gengival (Staab et al., 2009). Além disso, demonstrou-se que as gomas de mastigação probióticas consumidas durante o período de duas semanas causaram uma redução nas citocinas pró-inflamatórias em pacientes com gengivite (Twetman et al., 2009). Possíveis ações de bactérias probióticas no ambiente oral devem ser devido a competição por sítios de ligação, produção de substâncias antimicrobianas, ativação e modulação da resposta imune (de Vrese et al., 2008; Meurman, 2005; Teughels et al., 2011).

Vilela et al. (2015) estudaram a interação entre *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 e *Candida albicans* ATCC 18804 em modelo invertebrado de *Galleria mellonella* por meio da análise de curva de sobrevivência e quantificação de UFC/mL de *C. albicans* na hemolinfa das lagartas. Verificaram que a injeção de *L. acidophilus* em *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, sugerindo que *L. acidophilus* protegeram *G. mellonella* da infecção experimental por *C. albicans*. No nosso trabalho, verificamos a ação profilática do *L. paracasei*, *L. fermentum* e *L. rhamnosus*, respectivamente, que apresentaram aumento da sobrevivência destas larvas quando infectadas por uma dose letal de *C. albicans*.

De acordo com do Carmo et al. (2016), os *Lactobacillus* estão envolvidos na homeostase microbiana no trato genital feminino. Devido à alta prevalência de doenças bacterianas do trato genital feminino e a resistência de micro-organismos a vários agentes antimicrobianos, meios alternativos para controlar essas infecções são necessários. Com isso, esses autores avaliaram as propriedades probióticas de espécies de *Lactobacillus* incluindo *L. acidophilus* (ATCC 4356), *L. fermentum* (ATCC 23271), *L. paracasei* (ATCC 335), *L. plantarum* (ATCC 8014) e *L. rhamnosus* (ATCC

9595), contra *Candida albicans* (ATCC 18804), *Neisseria gonorrhoeae* (ATCC 9826) e *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813). O potencial probiótico foi investigado usando os seguintes critérios: adesão ao epitélio do hospedeiro, células e muco, formação de biofilmes, co-agregação com patógenos bacterianos, inibição da adesão de agentes patogênicos às células mucosas e células epiteliais humanas (HeLa) e atividade antimicrobiana. Os lactobacilos testados aderiram à mucina, coagregaram com todos os micro-organismos genitais e exibiram atividade antimicrobiana. No entanto, apenas *L. fermentum* produziu um biofilme moderado e um maior nível de co-agregação e ligação de mucina. O ensaio demonstrou que todas as cepas de *Lactobacillus* inibiram *C. albicans* por se ligarem à mucina. *L. fermentum* ATCC 23271 foi a cepa mais proeminente, exibindo os mais altos níveis de adesão às células HeLa e ligação à mucina, além das propriedades antimicrobianas contra *Candida* spp. Assim, *L. fermentum* apresentou o melhor perfil probiótico em comparação com as outras espécies de lactobacilos testadas. Finalmente, sugeriram que *L. fermentum* pode ser usado sozinho ou em combinação com outras espécies a fim de tratar infecções genitais. No nosso estudo, *L. fermentum* reduziu significativamente a contagem de *C. krusei* na formação do biofilme *in vitro*, no grupo Profilático e no Terapêutico, respectivamente, comparando com o grupo controle de *C. krusei*. *L. paracasei* também reduziu significativamente a contagem de *C. krusei* na formação do biofilme, porém, esta redução ocorreu no grupo Simultâneo, no qual as suspensões são colocadas ao mesmo tempo, o que nos sugere que a cepa *L. paracasei* 28.4 foi capaz de aderir melhor ao fundo dos poços, devido também à sua capacidade de co-agregação, à sua capacidade de produzir ácido lático podem ter contribuído para esta redução. No nosso experimento *in vivo*, a cepa clínica de *L. fermentum* 20.4, *L. paracasei* 28.4 e *L. rhamnosus* 5.2 apresentaram um potencial efeito antimicrobiano contra a infecção por *C. albicans*, no experimento de ensaio de sobrevivência de *G. mellonella*, aumentando significativamente a sobrevivência dessas larvas quando tratadas com estas espécies de *Lactobacillus* antes da infecção por *C. albicans* (grupo Profilático).

Leão et al. (2015) avaliaram a influência de *L. rhamnosus* (ATCC1465) na expressão dos fatores de virulência de *C. albicans* (18804) *in vitro*. Observou-se uma redução significativa no crescimento de *C. albicans* na presença de *L. rhamnosus* após 24, 48 ou 72 horas. Também foi observada redução significativa na formação de

tubo germinativo após a interação por 48 ou 72 horas. Concluíram que os resultados sugerem que *L. rhamnosus* é capaz de influenciar significativamente o crescimento e a expressão de fatores de virulência de *C. albicans*, podendo interferir na patogenicidade desses micro-organismos.

Mendonça et al. (2012) verificaram que o consumo do probiótico Yakult LB® (*Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium*) foi capaz de influenciar a resposta imunológica específica contra espécies de *Candida* e a presença dessas leveduras na cavidade bucal de indivíduos saudáveis. As amostras de saliva foram coletadas antes e após o uso de probióticos durante 30 dias, 3 vezes por semana. Concluíram que as bactérias probióticas reduziram o número de leveduras de *Candida* na cavidade oral de idosos e aumentaram a resposta imune secretora específica contra essas leveduras, sugerindo seu possível uso no controle da candidose oral.

Existem poucos trabalhos na literatura que avaliaram *in vivo* a interação de *Lactobacillus* com espécies de *Candida*, principalmente com as espécies não-*albicans*, como *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. Assim, este trabalho contribuiu com resultados significativos em relação ao efeito antimicrobiano das cepas de *Lactobacillus* sobre estas espécies de *Candida*, tanto nos resultados *in vitro*, na formação de biofilmes, quanto nos resultados *in vivo*, no modelo invertebrado de *Galleria mellonella*.

## 6 CONCLUSÕES

Concluiu-se que as cepas clínicas de *L. paracasei* 28.4, *L. rhamnosus* 5.2 e *L. fermentum* 20.4 foram capazes de inibir a formação de biofilme *in vitro* e o desenvolvimento de candidose causados por *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, em modelo hospedeiro de invertebrado de *Galleria mellonella*, principalmente quando *Lactobacillus* foi administrado de forma profilática.

## REFERÊNCIAS\*

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

Amizic IP, Cigic L, Gavic L, Radic M, Lukenda DB, Tonkic M, et al. Antimicrobial efficacy of probiotic-containing toothpastes: an *in vitro* evaluation. *Med Glas* 2017;14(1):139-44.

Andreu A, Stapleton AE, Fennell CL, Hillier SL, Stamm WE. Hemagglutination, adherence, and surface properties of vaginal *Lactobacillus* species. *J Infect Dis.* 1995;171(5):1237-43.

Aoudia N, Rieu A, Briandet R, Deschamps J, Chluba J, Jegou G, et al. Biofilms of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum*: Effect on stress responses, antagonistic effects on pathogen growth and immunomodulatory properties. *Food Microbiol.* 2016;53:51–9.

Badiee P, Alborzi A. Assessment of real-time PCR method to detect human non-Cryptococcal fungal meningitis. *Arch Iran Med.* 2011;14:381–4.

Barchiesi F, Spregnini E, Tomassetti S, Arzeni D, Ginnini D, Scalise G. Comparison of the fungicidal activities of caspofungin and amphotericin B against *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Ch.* 2005;49(12):4989-92.

Castro J, Henriques A, Machado A, Henriques M, Jefferson KK, Cerca N. Reciprocal interference between *Lactobacillus* spp. and *Gardnerella vaginalis* on initial adherence to epithelial cells. *Int J Med Sci.* 2013;10(9):1193-8.

Chamilos G, Lionakis MS, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Role of mini-host models in the study of medically important fungi. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(1):42-55.

Chew SY, Cheah YK, Seow HF, Sandai D, Than LTL. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 exhibit strong antifungal effects against vulvovaginal candidiasis-causing *Candida glabrata* isolates. *J Appl Microbiol.* 2015;118(5):1180-90.

Chibebe Junior J, Fuchs BB, Sabino CP, Junqueira JC, Jorge AO, Ribeiro MS, et al. Photodynamic and antibiotic therapy impair the pathogenesis of *Enterococcus faecium* in a whole animal insect model. *Plos One.* 2013a;8(2):e55926.

---

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

- Chibebe Junior J, Sabino CP, Tan X, Junqueira JC, Wang Y, Fuchs BB, et al. Selective photoinactivation of *Candida albicans* in the non-vertebrate host infection model *Galleria mellonella*. BMC Microbiol. 2013b;13:217.
- Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36(5):599-607.
- Coman MM, Verdenelli MC, Cecchini C, Silvi S, Orpianesi C, Boyko N, et al. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501®, *Lactobacillus paracasei* IMC 502® and SYN BIO® against pathogens. J Appl Microbiol. 2014;117: 518-27.
- Cotter G, Doyle S, Kavanagh K. Development of an insect model for the *in vivo* pathogenicity testing of yeasts. FEMS Immunol Med Microbiol. 2000;27:163-9.
- de Barros PP, Scorzoni L, Ribeiro FC, Fugisaki LRO, Fuchs BB, Mylonakis E, et al. *Lactobacillus paracasei* 28.4 reduces *in vitro* hyphae formation of *Candida albicans* and prevents the filamentation in an experimental model of *Caenorhabditis elegans*. Microb Pathog. 2018;117:80-7.
- Demitto FO, Amaral RCR, Biasi RP, Guilhermetti E, Svidzinski TIE, Baeza LC. Antifungal susceptibility of *Candida* spp. *in vitro* among patients from Regional University Hospital of Maringá-PR. J Bras Patol Med Lab. 2012; 48(5):315-21.
- de Vrese M, Schrezenmeir J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. Adv Biochem Eng Biotechnol. 2008; 111:1–66.
- Dhanani AS, Bagchi T. The expression of adhesin EF-T u in response to mucin and its role in *Lactobacillus* adhesion and competitive inhibition of enteropathogens to mucin. J Appl Microbiol. 2013;115:546-54.
- do Carmo MS, Noronha FMF, Arruda MO, Costa EPS, Bomfim MRQ, Monteiro AS, et al. *Lactobacillus fermentum* ATCC 23271 displays *in vitro* inhibitory activities against *Candida* spp. Front. Microbiol. 2016;7(1722):1-11.
- Douglas LJ. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. Rev Iberoam Micol. 2003;19:139-43.
- Dufour D, Leung V, Lévesque CM. Bacterial biofilm: structure, function and antimicrobial resistance. Endodontic Topics. 2012;22:2-16.
- Elahi S, Pang G, Ashman R, Clancy R. Enhanced clearance of *Candida albicans* from the oral cavities of mice following oral administration of *Lactobacillus acidophilus*. Clin Exp Immun. 2005;141:29-36.
- 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.

- Fuchs BB, O'Brien E, Khoury JB, Mylonakis E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence*. 2010;1(6):475-82.
- Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*. 1989;66(5):365-78.
- Giolo MP, Svidzinski TIE. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. *J Bras Patol Med Lab*. 2010;46(3):225-34.
- Guo S, Liu D, Zhang B, Li Z, Li Y, Ding B, et al. Two *Lactobacillus* species inhibit the growth and  $\alpha$ -toxin production of *Clostridium perfringens* and induced proinflammatory factors in chicken intestinal epithelial cells *in vitro*. *Front Microbiol*. 2017 Oct 25;8:2081. doi: 10.3389/fmicb.2017.02081. eCollection 2017.
- 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*. 2010;10:18.
- Herbel SR, Vahjen W, Wieler LH, Guenther S. Timely approaches to identify probiotic species of the genus *Lactobacillus*. *Gut Pathog*. 2013;5(1):27.
- Hu"tt P, Shchepetova J, Loivukene K, Kullisaar T, Mikelsaar M. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero and uropathogens. *J Appl Microbiol*. 2006;100:1324-32.
- Iniesta M, Herrera D, Montero E, Zurbriggen M, Matos A R, Marin MJ, et al. Probiotic effect of orally administered *Lactobacillus reuteri*-containing tablets on subgingival and salivary microbiota in patients with gingivitis. A randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2012; 39:736-44.
- Ishikawa H, Aiba Y, Nakanishi M, Ohhashi Y, Koga Y. Suppression of periodontal pathogenic bacteria in the saliva of humans by the administration of *Lactobacillus salivarius* TI 2711. *J Jpn Soc Periodontol*. 2003;45:105-12.
- Jorjão AL, Oliveira LD, Scorzoni L, Godoi LMAF, Prata MCA, Jorge AOC. From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for *in vivo* microbiological studies. *Virulence*. 2017.doi: 10.1080/21505594.2017.1397871.
- Junqueira JC, Fuchs BB, Muhammed M, Coleman JJ, Suleiman MAHJ, Vilela SFG, et al. Oral *Candida albicans* isolates from HIV-positive individuals have similar *in vitro* biofilm-forming ability and pathogenicity as invasive *Candida* isolates. *BMC Microbiology*. 2011;11:247.
- Kumamoto CA. *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol*. 2002;5:608-11.
- Leão MV, Gonçalves e Silva CR, Santos SS, Leite PG. *Lactobacillus rhamnosus* may change the virulence of *Candida albicans*. *Rev Bras Ginecol Obstet*.2015;37(9):417-20.



- Li L, Redding S, Dongari-Bagtzoglou A. *Candida glabrata*, an emerging oral opportunistic pathogen. *J Dent Res*. 2007;86(3):204-15.
- Magee BB, Magee PT. Recent advances in the genomic analysis of *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol*. 2005;22:187-93.
- Marianelli C, Cifani N, Pasquali P. Evaluation of antimicrobial activity of probiotic bacteria against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar typhimurium 1344 in a common medium under different environmental conditions. *Res Microbiol*. 2010;161:673–80.
- Martarelli D, Verdenelli MC, Scuri S, Cocchioni M, Silvi S, Cecchini C, et al. Effect of a probiotic intake on oxidant and antioxidant parameters in plasma of athletes during intense exercise training. *Curr Microbiol*. 2011;62:1689-96.
- Martin R, Soberón N, Vázquez F, Suárez JE. Vaginal microbiota: composition, protective role, associated pathologies, and therapeutic perspectives. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26(3):160-7.
- Marukutira T, Huprikar S, Azie N, Quan SP, Kriesche HUM, Horn DL. Clinical characteristics and outcomes in 303 HIV-infected patients with invasive fungal infections: data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance registry, a multicenter, observational study. *HIV/AIDS Research and Palliative Care*. 2014;6:39-47.
- Mastromarino P, Brigidi P, Macchia S, Maggi L, Pirovano F, Trinchieri V, et al. Characterization and selection of vaginal lactobacillus strains for the preparation of vaginal tablets. *J Appl Microbiol*. 2002;93:884-93.
- Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013;4(2):119-28.
- Mendonça FHBP, Santos SSF, Faria IS, Silva CRG, Jorge AOC, Leão MVP. Effects of probiotic bacteria on *Candida* presence and IgA anti-*Candida* in the oral cavity of elderly. *Braz Dent J*. 2012;23(5):534-8.
- Meurman JH. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? *Eur J Oral Sci*. 2005;113:188-96.
- Mitchell KF, Zarnowski R, Andes DR. The extracellular matrix of fungal biofilms. *Adv Exp Med Biol*. 2016;931:21–35.
- Mohammadi R, Mirhendi H, Rezaei-Matehkolaei A, Ghahri M, Shidfar MR, Jalalizand N, et al. Molecular identification and distribution profile of *Candida* species isolated from Iranian patients. *Med Mycol*. 2013;51(6):657-63.
- Morales DK, Hogan DA. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. *PLoS Pathog*. 2010;6(4):1-4.

Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB, Idnurm A, Heitman J, Calderwood SB, et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect Immun*. 2005;73(7):3842-50.

Nishiyama K, Ochiai A, Tsubokawa D, Ishihara K, Yamamoto Y, Mukai T. Identification and characterization of sulfated carbohydrate binding protein from *Lactobacillus reuteri*. *PLoS ONE*. 2013;8(12):1-10.

Ohland CL, MacNaughton WK. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;298:807–19.

Perdoni F, Falleni M, Tosi D, Cirasola D, Romagnoli S, Braidotti P, et al. A histological procedure to study fungal infection in the wax moth *Galleria mellonella*. *Eur J Histochem*. 2014;58:2428.

Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Nagy E, Dobiasova S, et al. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the artemis disk antifungal surveillance program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol*. 2008;46(2):515-21.

Pemán J, Aparisi N, García-Esteban C, Gobernado M. Utilidad de una nueva técnica comercial, *Glabrata* rtt, para la identificación rápida de *Candida glabrata*. *Rev Iberoam Micol*. 2004;21:82-4.

Pesee S, Angkananuwat C, Tancharoensukjit S, Muanmai S, Sirivan P, Bubphawas M, et al. In vitro activity of Caspofungin combined with Fluconazole on mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilm. *Med Mycol*. 2016;54:384–93.

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.

Quindós G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol*. 2014;31:42–8.

Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell*. 2005;4:633–8.

Ray D, Goswami R, Banerjee U, Dadhwal V, Goswami D, Mandal P, et al. Prevalence of *Candida glabrata* and its response to boric acid vaginal suppositories in comparison with oral fluconazole in patients with diabetes and vulvovaginal candidiasis. *Diabetes Care*. 2007;30(2):312-7.

Rossoni RD, Fuchs BB, Barros PP, Velloso MS, Jorge AOC, Junqueira JC, et al. *Lactobacillus paracasei* modulates the immune system of *Galleria mellonella* and protects against *Candida albicans* infection. *PLoS ONE*. 2017;1-17.

Rossoni RD, de Barros PP, de Alvarenga JA, Ribeiro FC, Velloso MDS, Fuchs BB, et al. Antifungal activity of clinical *Lactobacillus* strains against *Candida albicans*

biofilms: identification of potential probiotic candidates to prevent oral candidiasis. *Biofouling*. 2018;34(2):212-25.

Rowan R, Moran C, McCann M, Kavanagh K. Use of *Galleria mellonella* larvae to evaluate the in vivo anti-fungal activity of [Ag<sub>2</sub>(mal) (phen)<sub>3</sub>]. *Biometals*. 2009;22(3):461-7.

Samaranayake YH, Ye J, Yau JYY, Cheung BPK, Samaranayake LP. In vitro method to study antifungal perfusion in *Candida* Biofilms. *Am Soc Microbiol*. 2005;43(2):818-25.

Santos RB. Molecular identification by multiplex polymerase chain reaction for species of the *Candida* genus of medical importance [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, 2014.

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

Shimauchi H, Mayanagi G, Nakaya S, Minamibuchi M, Ito Y, Yamaki K, et al. Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Periodontol*. 2008; 35:897–905.

Scorzoni L, Silva ACP, Marcos CM, Assato PA, Melo WCMA, Oliveira HC, et al. Antifungal therapy: new advances in the understanding and treatment of mycosis. *Front Microbiol*. 2017;8(36):1-23.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2012;36(2):288-305.

Staab B, Eick S, Knöfler G, Jentsch H. The influence of a probiotic milk drink on the development of gingivitis: a pilot study. *J Clin Periodontol*. 2009; 36:850-6.

Subramanya SH, Baral BP, Sharan NK, Nayak N, Metok Y, Sathian B, et al. Antifungal susceptibility and phenotypic virulence markers of *Candida* species isolated from Nepal. *BMC Res Notes*. 2017;10:543.

Swinne D, Watelle M, Van der Flaes M, Nolard N. In vitro activities of voriconazole (UK-109, 496), fluconazole, itraconazole and amphotericin B against 132 non-*albicans* bloodstream yeast isolates. *Mycoses*. 2004;47(5-6):177–83.

Tambekar DH, Bhutada SA. An evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus* spp. from milk of domestic animals and commercial available probiotic preparations in prevention of enteric bacterial infections. *Recent Res Sci Technol*. 2010;2:82-8.

Teughels W, Loozen G, Ouirynen M. Do probiotics offer opportunities to manipulate the periodontal oral microbiota? *J Clin Periodontol*. 2011; 38:159-77.

- 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.
- Tiraboschi IN, Carnovale S, Benetucci A, Fernández N, Kurlat I. Brote de candidemia por *Candida albicans* em neonatología. *Rev Iberoam Micol.* 2007;24:263-7.
- Tobudic S, Kratzer C, Lassnigg A, Presterl E. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. *Mycoses.* 2012;55:199-204.
- Tsai YT, Cheng PC, Pan TM. The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;96:853–62.
- Twetman S, Derawi B, Keller M, Ekstrand K, Yucel Lindberg T, Stecksén-Blicks C. Short-term effect of chewing gums containing probiotic *Lactobacillus reuteri* on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid. *Acta Odontol Scand.* 2009; 67:19-24.
- Vandeputte P, Larcher G, Bergès T, Renier G, Chabasse D, Bouchara J-P. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolates of *Candida tropicalis*. *Antimicrob Agentes Ch.* 2005;49(11):4608-15.
- Van Tassell ML, Miller MJ. *Lactobacillus* adhesion to mucus. *Nutrients.* 2011;3(5):613-36.
- Vestman NR, Timby N, Holgerson PL, Kressirer CA, Claesson R, Domellöf M, et al. Characterization and *in vitro* properties of oral lactobacilli in breastfed infants. *BMC Microbiol.* 2013;13:193.
- Vilela SFG, Barbosa JO, Rossoni RD, Santos J, Prata MCA, Anbinder AL, et al. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 inhibits biofilm formation by *C. albicans* and attenuates the experimental candidiasis in *Galleria mellonella*. *Virulence.* 2015;6:(1)29-39.
- Wu PF, Liu WL, Hsieh MH, Hii IM, Lee YL, Lin YT, et al. Epidemiology and antifungal susceptibility of candidemia isolates of non-*albicans Candida* species from cancer patien. *Emerg Microbes Infect.* 2017; 6:87.
- Zakaria Goma E. Antimicrobial and anti-adhesive properties of biosurfactant procuded by lactobacilli isolates, biofilm formation and aggregation ability. *J Gen Appl Microbiol.* 2013;54(6):425-36.
- Zaugg C, Zepelin MB-V, Reichard U, Sanglard D, Monod M. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. *Infect Immun.* 2001;69(1):405-12.
- Zijngue V, van Leeuwen, MBM, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, et al. Oral biofilm architecture on natural teeth. *Plos One.* 2010;5(2)e9321.