



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

FELIPE DE CAMARGO RIBEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES PROBIÓTICAS PARA
PREVENÇÃO DA CANDIDOSE BUCAL: estudo *in vitro* e *in vivo***

2019

FELIPE DE CAMARGO RIBEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES PROBIÓTICAS PARA PREVENÇÃO
DA CANDIDOSE BUCAL: estudo *in vitro* e *in vivo***

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: Microbiologia e Imunologia. Linha de pesquisa: Doenças Infeciosas de Interesse Médico-odontológico.

Orientadora: Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira

São José dos Campos

2019

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2020]. 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).

Ribeiro, Felipe de Camargo

Desenvolvimento de formulações probióticas para a prevenção da candidose bucal: estudo in vitro e in vivo / Felipe de Camargo Ribeiro. - São José dos Campos : [s.n.], 2019.

81 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, 2019.

Orientador: Juliana Campos Junqueira.

1. Lactobacillus paracasei. 2. Candida albicans. 3. Candidose oral. 4. Hidrogéis. 5. Gellan gum. I. Junqueira, Juliana Campos, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Mariella Viera Pereira Leão

Universidade de Taubaté

Instituto Básico de Biociências

Campus Bom Conselho

Profa. Dra. Liliana Scorzoni

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Silvana Soléo Ferreira dos Santos

Universidade de Taubaté

Instituto Básico de Biociências

Campus Bom Conselho

São José dos Campos, 16 de dezembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

À minha **família**, por sempre estar comigo e me apoiar em todos os momentos.

À minha orientadora, **Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira**, que acreditou no meu potencial e proporcionou uma das melhores oportunidades na minha vida.

Ao professor **Antonio Olavo Cardoso Jorge**, que me orientou no mestrado e sempre me apoiou para que continuasse seguindo em frente.

Aos professores **Beth Burgwyn Fuchs** e **Eleftherios Mylonakis** por terem me recebido tão bem no laboratório de **Doenças Infecciosas do Rhode Island Hospital**, da **Brown University**, onde desenvolvi parte deste estudo.

A professora **Anita Shukla** e seu aluno **Shashank Shukla** do **Laboratory for Designer Biomaterials** da **Brown University School of Engineering**, por me ensinarem as técnicas envolvidas com o *gellan gum* e todo seu apoio no decorrer da presente pesquisa.

À professora **Mariella Vieira Pereira Leão**, por me apresentar o mundo da pesquisa e sempre me ajudar com sua sabedoria.

À **Jéssica Diane dos Santos**, por toda sua ajuda no laboratório e com os camundongos.

À **Patrícia Pimentel de Barros**, por sua sabedoria, ajuda e suporte na indentificação molecular de *L. paracasei*.

À **Universidade Estadual Paulista (Unesp)**, na pessoa da diretora, **Rebeca Di Nicoló**, do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, e do vice-diretor **Cláudio Antonio Talge Carvalho**.

Ao **Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal**, na pessoa da coordenadora **Profa. Adj. Luciane Dias de Oliveira** e vice-coordenador **Prof. Dr. Mauro Pedrine Santamaria**.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão de bolsa de doutorado (**Processo 2016/25544-1**).

Ao **INSIDE**, grupo de dança formado por, **Amanda, Ana Carolina, Alisson, Naiara e Teri**, vocês foram presentes que surgiram em minha vida, foram a minha válvula de escape, e por muitos momentos me deram força para continuar.

À **Takashi Ehara** por ter me mostrado que a vida é mais do que se pode ver, é sentir. E a sua **família**, pelo grande carinho e por terem me mostrado um novo caminho, cheio de possibilidades, transformações e alegrias.

Aos meus queridos amigos, **Cleiton Bernado, Thais Galdino, Kleber Baroffe e Sabrina Salvador**, que sempre me ajudaram com uma palavra amiga, de incentivo, ou até mesmo um puxão de orelha.

Aos meus queridos colegas de **Pós-Graduação do laboratório de Microbiologia e Imunologia**, obrigado pela convivência e por terem me ensinado tanto nessa minha caminhada, cada um de vocês foi importante para meu crescimento pessoal e profissional.

"Não se anda porque existe um caminho, é por andar que o caminho se abre."

Daisaku Ikeda

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 PROPOSIÇÃO	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Desenho experimental e Comitê de Ética.....	16
3.2 Cepas e condições de crescimento.....	18
3.3 Preparo das suspensões padronizadas de <i>C. albicans</i> e <i>L. paracasei</i> 28.4..	18
3.4 Desenvolvimento e caracterização das formulações probióticas	19
3.4.1 Preparo das formulações probióticas em <i>gellan gum</i>	19
3.4.2 Recuperação de <i>L. paracasei</i> 28.4 a partir das formulações de <i>gellan gum</i>	19
3.4.3 Recuperação de <i>L. paracasei</i> 28.4 das formulações de <i>gellan gum</i> após armazenamento	20
3.4.4 Recuperação de <i>L. paracasei</i> 28.4 a partir das formulações de <i>gellan gum</i> após armazenamento prolongado.....	20
3.4.5 Análise do sistema de liberação de <i>L. paracasei</i> 28.4 das formulações probióticas	21
3.5 Avaliação dos efeitos das formulações probióticas sobre <i>C. albicans</i> : estudo <i>in vitro</i>	22
3.5.1 Estudo dos efeitos antimicrobianos das formulações probióticas sobre <i>C. albicans</i> por meio do método de ágar sobreposição	22
3.5.2 Estudo dos efeitos das formulações probióticas sobre o biofilme de <i>C. albicans</i>	23
3.5.2.1 Formação dos biofilmes	23
3.5.2.2 Análise dos biofilmes por determinação do número de células viáveis ..	23
3.5.2.3 Análise dos biofilmes por quantificação da biomassa total (ensaio de cristal violeta)	24

3.5.2.4 Análise dos biofilmes por microscopia eletrônica de varredura.....	25
3.5.3 Estudo dos efeitos das formulações probióticas contendo <i>L. paracasei</i> 28.4 sobre a filamentação de <i>C. albicans</i>	25
3.6 Avaliação dos efeitos das formulações probióticas na colonização de <i>L.</i> <i>paracasei</i> 28.4 na cavidade bucal e no desenvolvimento de candidose experimental: estudo <i>in vivo</i>	26
3.6.1 Animais experimentais.....	26
3.6.2 Estudo da colonização de <i>L. paracasei</i> 28.4 na cavidade bucal de camundongos saudáveis.....	27
3.6.3 Estudo dos efeitos da formulação de <i>L. paracasei</i> na candidose bucal em camundongos.....	29
3.6.3.1 Recuperação de <i>C. albicans</i> e <i>L. paracasei</i> 28.4 da cavidade bucal.....	30
3.6.3.2 Análise macroscópica da candidose no dorso na língua	31
3.6.3.3 Análise microscópica da candidose no dorso na língua	31
3.6.4 Análise estatística	32
4 RESULTADO	33
4.1 Desenvolvimento e Caracterização das formulações probióticas.....	33
4.1.1 Análise da viabilidade de <i>L. paracasei</i> 28.4 nas formulações em <i>gellan</i> <i>gum</i> em diferentes tempos e temperaturas de armazenamento	33
4.1.2 Recuperação de <i>L. paracasei</i> 28.4 das formulações após armazenamento.....	34
4.1.3 Recuperação de <i>L. paracasei</i> 28.4 a partir das formulações de <i>gellan</i> <i>gum</i> após armazenamento prolongado.....	36
4.1.4 Análise do sistema de liberação de <i>L. paracasei</i> 28.4 a partir das formulações probióticas.....	37
4.2 Avaliação dos efeitos das formulações probióticas sobre <i>C. albicans</i> : estudo <i>in vitro</i>	39
4.2.1 Efeitos antimicrobianos das formulações probióticas sobre <i>C. albicans</i> por meio do método de ágar sobreposição	39
4.2.2 Efeitos das formulações probióticas sobre o biofilme de <i>C. albicans</i> : contagem de células viáveis, cristal violeta e microscopia eletrônica de varredura	43

4.2.3 Efeitos das formulações probióticas contendo <i>L. paracasei</i> 28.4 sobre a filamentação de <i>C. albicans</i>	50
4.3 Efeitos das formulações probióticas na colonização de <i>L. paracasei</i> 28.4 na cavidade bucal e no desenvolvimento de candidose experimental: estudo <i>in vivo</i>	54
4.3.1 Colonização de <i>L. paracasei</i> 28.4 na cavidade bucal de camundongos saudáveis	54
4.3.2 Identificação molecular de <i>L. paracasei</i> por PCR das amostras de saliva.....	55
4.3.3 Recuperação de <i>C. albicans</i> e <i>L. paracasei</i> 28.4 da cavidade bucal dos camundongos	58
4.3.4 Análise macroscópica da candidose no dorso da língua dos camundongos	60
5 DISCUSSÃO	67
6 CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS.....	75
ANEXO.....	81

Ribeiro FC. Desenvolvimento de formulações probióticas para prevenção da candidose bucal: estudo *in vitro* e *in vivo* [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2019.

RESUMO

Os probióticos são considerados uma alternativa potencial para o controle da candidose, no entanto, existe uma falta de produtos probióticos direcionados para a cavidade bucal. Neste estudo, desenvolvemos formulações probióticas usando *gellan gum*, um biopolímero natural usado como aditivo alimentar, e investigamos os efeitos dessas formulações em *Candida albicans*. Para isso, *Lactobacillus paracasei* 28.4, uma cepa recentemente isolada da cavidade bucal, foi incorporada em várias concentrações de *gellan gum* (1 a 0,6%). Todas as concentrações testadas foram capazes de incorporar as células de *L. paracasei*, mantendo a viabilidade bacteriana. As formulações probióticas permaneceram estáveis por 7 dias quando armazenadas à temperatura ambiente ou a 4°C. Entretanto, o armazenamento a longo prazo das formulações probióticas foi conseguido apenas quando *L. paracasei* 28.4 foi liofilizado. As formulações probióticas proporcionaram uma liberação de células de *L. paracasei* por 24 horas, o que foi suficiente para inibir o crescimento de *C. albicans* com efeitos dependentes das concentrações celulares incorporadas no *gellan gum*. As formulações probióticas também tiveram atividade inibitória contra os biofilmes de *Candida*, reduzindo o número de células de *Candida* ($p < 0,0001$), diminuindo a biomassa total ($p = 0,0003$) e prejudicando a formação de hifas ($p = 0,0002$) em relação ao grupo controle não tratado. Contudo, a formulação probiótica de *gellan gum* a 1% proporcionou uma colonização oral de *L. paracasei* em camundongos com aproximadamente 6 log de UFC/mL após 10 dias. Essa formulação inibiu o crescimento de *C. albicans* ($p < 0,0001$), impediu o desenvolvimento de lesões de candidose ($p = 0,0013$) e suprimiu a inflamação ($p = 0,0006$) quando comparada aos camundongos não tratados. Estes resultados indicam que o *gellan gum* pode ser um biomaterial promissor como sistema transportador de probióticos para prevenir a candidose oral.

Palavras-chave: *Lactobacillus paracasei*. *Candida albicans*. Candidose oral. Hidrogéis. *Gellan gum*.

Ribeiro FC. Development of probiotic formulations for prevention of oral candidiasis: *in vitro* and *in vivo* study [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2019.

ABSTRACT

Probiotics are considered a potential alternative for the control of candidiasis, however there is a lack of probiotic products targeted for the oral cavity. In this study, we developed probiotic formulations using gellan gum, a natural biopolymer used as a food-additive, and investigated the effects of this delivery method on Candida albicans. Lactobacillus paracasei 28.4, a strain recently isolated from the oral cavity, was incorporated in several concentrations of gellan gum (1 to 0.6%). All tested concentrations could incorporate L. paracasei cells while maintaining bacterial viability. Probiotic-gellan formulations were stable for 7 days when stored at room temperature or 4°C. Long-term storage of bacterial impregnated gellan gum could be achieved when L. paracasei 28.4 was lyophilized. The probiotic-gellan formulations provided a release of L. paracasei cells over 24 hours that was sufficient to inhibit the growth of C. albicans with effects dependent on the cell concentrations incorporated into gellan gum. The probiotic-gellan formulations also had inhibitory activity against Candida biofilms by reducing the number of Candida cells ($p < 0.0001$), decreasing the total biomass ($p = 0.0003$) and impairing hyphae formation ($p = 0.0002$) in relation to the control group, not treated. However, only probiotic formulation of gellan gum 1% provided an oral colonization of L. paracasei in mice with approximately 6 log of CFU/mL after 10 days. This formulation inhibited the C. albicans growth ($p < 0.0001$), prevented the development of candidiasis lesions ($p = 0.0013$), and suppressed the inflammation ($p = 0.0006$) when compared to the mice not treated. These results indicate that gellan gum is a promising biomaterial as a carrier system of probiotics to prevent oral candidiasis.

Keywords: Lactobacillus paracasei. Candida albicans. Oral candidiasis. Hydrogels. Gellan gum.

1 INTRODUÇÃO

Candida albicans é um fungo comensal que coloniza a mucosa oral de indivíduos saudáveis e pode se tornar patogênico quando o balanço entre o fungo, a mucosa e os mecanismos de defesa do hospedeiro são interrompidos, levando ao aparecimento de candidose (Thompson et al., 2010; Cassone et al., 2012; Hebecker et al., 2014; Matsubara et al., 2016; Salvatori et al., 2016). O desenvolvimento da candidose bucal está associado à diferentes fatores predisponentes, incluindo o uso de próteses totais, uso de corticosteróides inaláveis, redução do fluxo salivar, dieta rica em açúcar, idade avançada, deficiências nutricionais, administração prolongada de antibióticos de largo espectro, imunossupressão associada à tratamentos antineoplásicos, doenças hematológicas e síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (Coronado-Castellote et al., 2013; Costa et al., 2013).

Candida albicans é um fungo dimórfico que apresenta as formas morfológicas leveduriforme e micelial. A forma leveduriforme é composta por células unicelulares de morfologia ovalada, que possuem importantes proteínas de adesão em sua superfície celular que se ligam aos tecidos do hospedeiro (Ding et al., 2014; Holmes et al., 2014; Cota, Hoyer, 2015). A forma micelial é composta por hifas e pseudo-hifas, que são importantes estruturas para a virulência de *C. albicans*, pois dificultam o processo de fagocitose, aumentam a adesão do fungo às células epiteliais e estão intimamente relacionadas com a formação do biofilme e a penetração nos tecidos do hospedeiro (Bandara et al., 2014; Sun et al., 2015). Portanto, a identificação e elucidação dos mecanismos de virulência das espécies do gênero *Candida* são extremamente importantes uma vez que esses mecanismos podem ser alvo para novas terapias antifúngicas.

Até o momento, modelos *in vitro* e *in vivo* foram desenvolvidos para estudar os mecanismos de virulência de *C. albicans*. Os modelos *in vitro* são voltados principalmente para a formação de biofilmes sobre corpos de prova de vários materiais, inclusive os utilizados na confecção de aparelhos ortodônticos e próteses dentárias (Junqueira et al., 2011; Costa et al., 2013; Holmes et al., 2014). A maioria dos modelos *in vivo* são realizados em animais experimentais, como ratos e camundongos, nos quais a candidose bucal é induzida por cepas patogênicas de *C.*

albicans associadas à fatores predisponentes, como imunossupressão, xerostomia ou tratamento com antibióticos de amplo espectro (Junqueira 2012; Costa et al., 2013). Todos esses modelos *in vitro* e *in vivo* oferecem grande suporte para o manejo das candidoses bucais na clínica odontológica.

A candidose bucal representa um significativo problema clínico, especialmente em indivíduos idosos que fazem uso de próteses totais, pacientes HIV-positivos ou pacientes submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço (Coronado-Castellote et al., 2013; Garcia-Cuesta et al., 2014; Seneviratne et al., 2016; Zhang et al., 2016). O desenvolvimento de candidose bucal parece ocorrer em mais de 80% de indivíduos HIV-positivos, 37% dos pacientes em radioterapia e 15 a 71% dos indivíduos idosos que usam próteses totais. O uso contínuo de agentes terapêuticos para controlar as infecções causadas por *Candida* nesses pacientes, tem contribuído significativamente para o desenvolvimento de cepas resistentes aos antifúngicos (Baccaglini et al., 2007; Thompson et al., 2010; Berberi et al., 2015; Moges et al., 2016).

Estudos anteriores indicaram taxas significativas de resistência ao fluconazol entre as cepas de *C. albicans* isoladas da cavidade bucal de pacientes HIV-positivos: 12% na Etiópia (Moges et al., 2016), 14% na China (Liu et al., 2015), 25% nos EUA (Thompson et al., 2010), 27% no Brasil (Junqueira et al., 2012) e mais de 50% na África do Sul e Camarões (Abrantes et al., 2014). Além da resistência antifúngica, o alto custo e os efeitos colaterais também têm sido considerados como fatores críticos para o tratamento com antifúngicos azóis (Patton, 2016).

Neste contexto, cepas de bactérias probióticas têm sido estudadas como um método alternativo para o controle da candidose bucal. Os probióticos são micro-organismos vivos com efeitos positivos sobre a saúde humana quando administrados em quantidades adequadas (cerca de 10^7 a 10^{11} unidades formadoras de colônias) (Gonzalez-Hernandez et al., 2012). A atividade antimicrobiana das cepas probióticas tem sido relacionada com a produção de moléculas antimicrobianas e estimulação do sistema imune por meio da ativação das células de defesa e pela produção de citocinas (Chiang et al., 2015; Elahi et al., 2005; Rong et al., 2015; Haghshenas et al., 2015). Os probióticos são classificados pela *Food and Drug Administration* (FDA) como produtos vivos bioterapêuticos, podendo ser

utilizados em uma variedade de produtos, tais como alimentos, suplementos alimentares e medicamentos (Gonzalez-Hernandez et al., 2012; Olle, 2013).

A maioria das preparações probióticas disponíveis no mercado são compostas por cepas de *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium* isoladas a partir de amostras de fezes humanas para facilitar a compatibilidade com a microbiota intestinal humana (Rivera-Espinoza et al., 2010). Entre as bactérias com potencial para serem usadas como probióticos na cavidade bucal, *Lactobacillus* spp. tem ganhado bastante atenção devido a sua capacidade de colonizar e modular a microbiota bucal, inibindo assim o crescimento de vários patógenos, como as leveduras do gênero *Candida* (Matsubara et al., 2016).

O desenvolvimento de formulações probióticas tem sido considerado um desafio para pesquisadores e indústrias no mundo, pois em geral, os suplementos diários que contêm probióticos não são suficientemente caracterizados para satisfazer o Center for Biologics Evaluation and Research of the FDA (CBER/FDA) (Olle, 2013). A CBER requer várias especificações para produtos probióticos, incluindo: identificação da cepa probiótica por determinados ensaios específicos e reprodutíveis (métodos genotípicos e fenotípicos); determinação da potência dos micro-organismos vivos que é geralmente analisado pela viabilidade celular por unidade ou dose (contagem de UFC); e execução de testes de pureza ou contaminantes introduzidos durante o processo de fabricação (Guidance for Industry CBER/FDA).

As formulações probióticas para controle de infecções bucais precisam apresentar um sistema de liberação de bactérias que proporcionem tempos de retenção e exposição suficiente na cavidade bucal, para que os probióticos possam colonizar os tecidos do hospedeiro e influenciar a microbiota residente (Devine et al., 2015; Wescombe et al., 2012). Além disso, as formulações precisam apresentar formas de estocagem adequadas para manter a viabilidade celular (Wescombe et al., 2012).

Os sistemas de carreamento dos micro-organismos probióticos para seu sítio de ação ainda são escassos. Na literatura, estudos com biopolímeros têm sido desenvolvidos pelas suas vantagens e propriedades físico-químicas. Entre eles, o *gellan gum*, um heteropolissacarídeo natural, está sendo bastante utilizado na indústria alimentícia, farmacêutica e na medicina para o encapsulamento de células,

antibióticos e micropartículas (Coutinho et al., 2010; Oliveira et al., 2010; D'Arrigo et al., 2014; Osmalek et al., 2014; Zhu et al., 2015). Diferentes tipos de preparações de *gellan* têm sido desenvolvidas, variando desde micropartículas e grânulos maiores, até formulações mais líquidas (Agnihotri et al., 2005; Mahdi et al., 2014). A utilização do *gellan* como carreador de fármacos apresenta a vantagem da liberação contínua dos antibióticos por período de tempo prolongado (Novac et al., 2014; Posadowska et al., 2016). Os sistemas de carreamento utilizando *gellan* apresentam resultados promissores, pois esse biopolímero não apresenta toxicidade para o organismo e oferece uma proteção para o fármaco encapsulado em seu interior. Por exemplo, na administração por via oral, as moléculas do fármaco ficam protegidas no interior do *gellan*, evitando sua degradação pelo processo digestivo e, conseqüentemente, a perda rápida da sua concentração (Miyazaki et al., 1999; Kubo et al., 2002; Zhu et al., 2015).

Tendo em vista as características de biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixo custo, o *gellan gum* foi usado nessa pesquisa para a incorporação de uma cepa de *Lactobacillus*, buscando-se o desenvolvimento de formulações probióticas adequadas para uso na cavidade bucal. Além disso, as formulações desenvolvidas foram testadas *in vitro* e *in vivo* como agente de prevenção da candidose bucal.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

O objetivo da presente pesquisa foi desenvolver uma formulação probiótica utilizando *L. paracasei* 28.4 incorporado em *gellan gum*, e avaliar seus efeitos inibitórios contra *C. albicans*.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver formulações incorporando *L. paracasei* 28.4 em diferentes concentrações de hidrogéis usando *gellan gum*;
- Verificar a viabilidade bacteriana e o sistema de liberação das formulações probióticas *in vitro*, testando diferentes formas de armazenamento e estocagem;
- Investigar os efeitos antimicrobianos das formulações sobre *C. albicans* em modelos *in vitro*;
- Avaliar o sistema de liberação das formulações e a colonização de *L. paracasei* 28.4 na cavidade bucal de camundongos saudáveis;
- Explorar os efeitos das formulações probióticas na candidose bucal experimental em camundongos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental e Comitê de Ética

A metodologia desse trabalho foi desenvolvida em três partes experimentais: 1) desenvolvimento e caracterização das formulações probióticas; 2) avaliação dos efeitos das formulações probióticas sobre *C. albicans* em *estudo in vitro*; 3) avaliação dos efeitos das formulações probióticas sobre *C. albicans* na cavidade bucal e no desenvolvimento de candidose experimental em *estudo in vivo*. Todos os ensaios experimentais desse trabalho estão apresentados no Fluxograma da Figura 1.

Esse projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT/UNESP) com o número de protocolo 15/2016. A manipulação dos animais durante todos os experimentos foi realizada de acordo com as recomendações da Lei 11794, de 8 de outubro de 2008, que rege a criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica das espécies classificadas como filo Chordata, subfilo Vertebrata.

Figura 1 - Desenho experimental das metodologias realizados na presente pesquisa



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.2 Cepas e condições de crescimento

Para realização desse trabalho, foram utilizadas as seguintes cepas de micro-organismos: cepa clínica *L. paracasei* 28.4 isolada da cavidade bucal de indivíduo livre de cárie obtida no trabalho realizado por Rossoni et al. (2018) (Parecer do Comitê de Ética 560.479); cepa padrão *C. albicans* ATCC 18804; e cepas clínicas *C. albicans* 60 e *C. albicans* 14 isoladas de lesão de candidose orofaríngea de pacientes HIV-positivos atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (Junqueira et al. 2012) (Parecer do Comitê de Ética 274/2009). Para ativação desses micro-organismos, as cepas de *C. albicans* foram cultivadas em meio de cultura extrato de levedura, peptona, dextrose (YPD) por 24 h a 37°C em estufa bacteriológica. A cepa de *L. paracasei* 28.4 foi cultivada em ágar Lactobacilli MRS (Himedia, Mumbai, Índia) por 48 h a 37°C em 5% de CO₂.

3.3 Preparo das suspensões padronizadas de *C. albicans* e *L. paracasei* 28.4

C. albicans foi cultivada a 37°C por 24 h em caldo YPD e *L. paracasei* foi cultivado em caldo Lactobacilli MRS (Himedia, Mumbai, Índia) a 37°C por 24 h (5% de CO₂). Posteriormente, as células de cada micro-organismo foram centrifugadas (2000 xg por 10 min), o sobrenadante foi desprezado e o sedimento suspenso em 6 mL de solução fisiológica tamponada com fosfato (PBS). Esse procedimento foi repetido novamente.

A contagem do número de células de *C. albicans* da suspensão foi realizada em espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil), com comprimento de onda a 530 nm e densidade óptica de 0,385, obtendo-se concentração de 10⁷ micro-organismos/mL. O número de células de *L. paracasei* da suspensão foi ajustado a concentração de 10⁸ micro-organismos/mL, utilizando-se os parâmetros de comprimento de onda a 600 nm e 1.400 de densidade óptica.

3.4 Desenvolvimento e caracterização das formulações probióticas

3.4.1 Preparo das formulações probióticas em *gellan gum*

As formulações probióticas foram desenvolvidas em colaboração com a Profa. Anita Shukla do Laboratório de Designer de Biomateriais no Centro para Engenharia Biomédica da *Brown University* (Providence, Rhode Island, USA). A suspensão de *L. paracasei* 28.4 foi preparada de acordo com a metodologia descrita anteriormente por Coutinho et al. (2010) com algumas modificações. Uma cultura de 24h de *L. paracasei* 28.4 no caldo MRS foi centrifugada e lavada com solução de PBS (tampão salino-fosfato, ph 7,4), seguida de padronização usando um espectrofotômetro (AJX-1900, Micronal, São Paulo) a 600 nm para atingir DO de 1,400, correspondendo a uma concentração de 10^8 células/mL de *L. paracasei* 28.4.

As formulações foram preparadas em diferentes concentrações de *gellan gum* (1,0, 0,9, 0,8, 0,7 e 0,6% p/v). Para isso, o pó de *gellan gum* foi adicionado em 45 mL de água destilada e agitado a 85-90°C até dissolução completa. A temperatura foi então reduzida para 40°C e 2 mL de suspensão de *L. paracasei* 28.4 contendo 10^8 células/mL foram adicionados à mistura. Finalmente, 3mL de CaCl_2 (1 mM) foi adicionado à mistura de *gellan gum* e *L. paracasei* para a gelificação. Para a liofilização, as formulações foram preparadas conforme descrito acima, e após seu preparo, elas foram liofilizadas por 24 h (Liofilizador série LS, Terroni, São Carlos, São Paulo).

3.4.2 Recuperação de *L. paracasei* 28.4 a partir das formulações de *gellan gum*

A quantificação de células viáveis de *L. paracasei* 28.4 a partir das formulações de *gellan gum* foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Juarez Tomás et al. (2015), com algumas modificações. Imediatamente após a incorporação de *L. paracasei* 28.4 nas diferentes concentrações do hidrogel, uma

alíquota de 1 mL de cada formulação foi suspensa em 9 mL de PBS seguida por agitação à temperatura ambiente. Subsequentemente, 1 mL do hidrogel-suspensão bacteriana foi diluído em PBS e semeado em ágar MRS. As placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ por 48h para determinar o número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Uma suspensão de *L. paracasei* 28.4 em PBS, na mesma concentração (10⁸ células / mL) e não incorporada em *gellan gum*, foi usada como grupo controle.

3.4.3 Recuperação de *L. paracasei* 28.4 das formulações de *gellan gum* após armazenamento

Após a preparação, as formulações de *gellan gum* contendo *L. paracasei* 28.4 incorporadas, foram armazenadas à temperatura ambiente ou sob refrigeração (4°C). Após 1 dia, uma alíquota de 1 mL de cada formulação de *gellan gum* (1,0, 0,9, 0,8, 0,7 e 0,6% p/v) incorporada de bactérias foi suspensa em 9 mL de PBS seguida por agitação à temperatura ambiente por 10 minutos a 75 rpm. Posteriormente, esta suspensão foi diluída em série, semeada em ágar MRS e incubada a 37°C para determinar o número de UFC/mL. Este procedimento foi repetido diariamente por 7 dias e comparado com uma alíquota de *L. paracasei* 28.4 em PBS não impregnada no hidrogel como controle.

3.4.4 Recuperação de *L. paracasei* 28.4 a partir das formulações de *gellan gum* após armazenamento prolongado

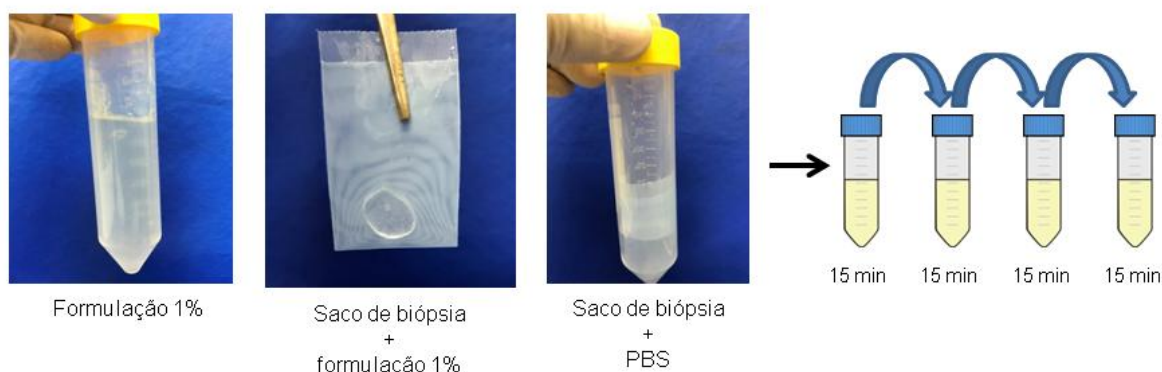
Para a análise da viabilidade de *L. paracasei* 28.4 após armazenamento prolongado das formulações probióticas, foi utilizada a concentração de *gellan gum* 1%. O material gelificado com probiótico impregnado foi armazenado em três condições diferentes: formulação probiótica à temperatura ambiente, formulação

probiótica sob refrigeração (4°C) e formulação probiótica liofilizada (Terroni LS 3000, São Carlos, SP) à temperatura ambiente. Após 1 semana, uma alíquota de 1 mL das formulações teste foi ressuspensa em 9 mL de PBS, seguida por agitação à temperatura ambiente por 10 minutos a 75 rpm. Depois disso, 0,1 mL de cada suspensão foi plaqueada como descrito acima. Esse processo foi repetido uma vez por semana durante três meses.

3.4.5 Análise do sistema de liberação de *L. paracasei* 28.4 das formulações probióticas

A quantificação de células viáveis de *L. paracasei* 28.4 liberadas a partir das formulações probióticas (1,0, 0,9, 0,8, 0,7 e 0,6% p/v) foi avaliada usando sacos de biópsia (*biopsy bags*, malha de 0,2 mm de diâmetro, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Uma alíquota de 1 mL de cada formulação foi colocada nos sacos de biópsia para permitir que as bactérias se difundissem do gellan gum para o líquido circundante e depois transferidas para tubos contendo 9 mL de PBS ou 9 mL de saliva artificial (Biotène Dry Mouth Oral Rinse, Middlesex, Reino Unido). Os tubos foram deixados em repouso por 15 minutos e após esse tempo foram homogeneizados com um vortex por 10 segundos. Os sacos de biópsia foram então transferidos para outros tubos contendo 9 mL de PBS ou saliva artificial e deixados repousar por mais 15 minutos. Este processo foi repetido por um tempo total de 1 h (Figura 2). Após a remoção do saco de biópsia, uma alíquota de 100 µL foi retirada de cada tubo e diluições em série foram realizadas e semeadas em ágar MRS e incubadas por 48 h a 37°C (CO₂) para determinar o número de UFC/mL.

Figura 2 - Esquema do ensaio do sistema de liberação de *L. paracasei* 28.4 das formulações probióticas



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.5 Avaliação dos efeitos das formulações probióticas sobre *C. albicans*: estudo *in vitro*

3.5.1 Estudo dos efeitos antimicrobianos das formulações probióticas sobre *C. albicans* por meio do método de ágar sobreposição

Foi utilizada a metodologia descrita por Son et al. (2017), com algumas modificações. Em uma placa contendo MRS ágar foram pipetados 5 μL de cada formulação em pontos equidistantes, e logo após, essas placas foram incubadas por 24 h em estufa de CO_2 a 37°C para o crescimento dos lactobacilos. Foi preparada uma suspensão contendo 10^6 células/mL de *C. albicans* em PBS. Uma alíquota de 1000 μL dessa suspensão foi transferida para um tubo contendo 9 mL de ágar Sabouraud a 55°C . Esta solução foi homogeneizada e vertida na superfície das placas contendo o crescimento de 24 h de *L. paracasei* 28.4. As placas foram incubadas novamente em estufa a 37°C por 24 h. Transcorrido esse período, os halos de inibição foram mensurados.

3.5.2 Estudo dos efeitos das formulações probióticas sobre o biofilme de *C. albicans*

3.5.2.1 Formação dos biofilmes

Os biofilmes de *C. albicans* foram formados em corpos de prova confeccionados em resina acrílica medindo 5x5x2 mm, seguindo a metodologia descrita por Vilela et al. (2015) com algumas modificações. Os corpos de prova foram colocados em placas de microtitulação de 24 poços (KASVI, Curitiba, Brasil) e recobertos com 1,5 mL de meio de cultura na proporção de 70% de caldo YNB (*Yeast Nitrogen Base*, Difco, Detroit, USA) suplementado com glicose na concentração de 100 mM, para o crescimento de *C. albicans*, e 30% de caldo BHI, para o crescimento de *L. paracasei* 28.4. A seguir, em cada poço foram adicionados 250 µL das formulações, dependendo do grupo experimental (Grupo controle de *Candida*, Controle de gel, Controle suspensão de *L. paracasei* 28.4, Grupo formulação). Foi adicionado um grupo apenas com a suspensão de *L. paracasei* 28.4. Essa placa foi incubada por 24 h a 37°C em 5% de CO₂, para a liberação e crescimento dos lactobacilos das formulações.

Transcorrido o período de 24 h, as formulações foram retiradas dos poços, o caldo foi trocado e foram adicionados 250 µL da suspensão de *C. albicans* (10⁷ células/mL). Foram testadas uma cepa padrão (*C. albicans* ATCC 18804) e dois isolados clínicos (*C. albicans* 60 e *C. albicans* 14). As placas foram incubadas por 24 h a 37°C para a formação do biofilme de *C. albicans*.

3.5.2.2 Análise dos biofilmes por determinação do número de células viáveis

Após a formação do biofilme, cada corpo de prova foi transferido para tubos Falcon contendo 6 mL de PBS e o biofilme aderido foi despreendido, utilizando-se

homogeneizador ultra-sônico (Sonopuls HD 2200, Bandelin Eletronic, Berlin, Alemanha) com potência de 50 W por 30 segundos.

A partir da solução obtida, foram realizadas diluições decimais da suspensão do biofilme, das quais alíquotas de 100 µL foram semeadas em placas de Petri contendo meios de cultura seletivos: ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol para *C. albicans* e ágar MRS para *L. paracasei*. As placas de ágar Sabouraud foram incubadas a 37°C por 24 h. As placas de ágar MRS foram incubadas em 5% de CO₂ a 37°C por 48 h. Após este período, foi realizado a contagem e o cálculo de UFC/mL.

3.5.2.3 Análise dos biofilmes por quantificação da biomassa total (ensaio de cristal violeta)

Para a quantificação da biomassa, os biofilmes foram formados diretamente no fundo das placas de 96 poços, sem a utilização de corpos de prova. Após a formação do biofilme conforme descrito anteriormente, 200 µL de metanol 99,9% (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foram adicionados em cada poço para a fixação do biofilme. Passados 15 minutos, o metanol foi removido e a placa mantida em temperatura ambiente overnight (aproximadamente 16 h). Após o período de incubação, 200 µL de cristal violeta (1% v/v) foi colocado em contato com os biofilmes durante 20 minutos. Em seguida, os poços foram lavados 2 vezes com 200 µL de PBS para liberação do excesso de corante. Posteriormente, foi adicionado 200 µL de metanol 100% para descoloração do biofilme e liberação do sobrenadante. Então, 100 µL do sobrenadante do processo de descoloração foi transferido para placas de 96 poços. As placas foram colocadas em leitor de microplacas com comprimento de onda de 570 nm para medida da absorbância.

3.5.2.4 Análise dos biofilmes por microscopia eletrônica de varredura

Os corpos de prova com os biofilmes formados foram transferidos para uma nova placa de 24 poços contendo 1 mL de glutaraldeído a 2,5% para fixação por 1 h. Após este período, os corpos de prova foram submersos em 1 mL de solução de álcool nas concentrações de 10, 25, 50, 75 e 90% por 20 min para cada concentração e, posteriormente, em álcool a 99,5% por 1 h. As placas foram colocadas em estufa a 37°C por 24 h para secagem completa dos corpos de prova.

Os corpos de prova foram retirados do fundo da placa com o auxílio de uma pinça estéril, transferidos para *stubs* de alumínio e recobertos com ouro por 160 s a 40 mA (Denton Vacuum Desk II). Após a metalização, os corpos de prova foram examinados e fotografados em Microscópio Eletrônico de Varredura do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT/Unesp) (FEI, Inspect S50).

3.5.3 Estudo dos efeitos das formulações probióticas contendo *L. paracasei* 28.4 sobre a filamentação de *C. albicans*

O crescimento de uma cultura de 24 h de *C. albicans*, em caldo YPD, foi centrifugado para o preparo de suspensão padronizada a 10^7 células/mL. Em uma placa de cultura de células de 24 poços foi aliquoteado 1 mL de água destilada suplementada com 10% de soro fetal bovino e 100 μ L da suspensão padronizada de *C. albicans*. A seguir, em cada poço foi colocado 50 μ L da formulação probiótica contendo *L. paracasei* 28.4. Nos grupos controle, foram colocados em cada poço 50 μ L de PBS ou 50 μ L do hidrogel sem *Lactobacillus*, dependendo do grupo experimental. As placas contendo os inóculos foram incubadas a 37°C na presença de 5% de CO₂. Após 24 h, 50 μ L do inóculo contido em cada poço foram dispersos sobre lâminas de vidro com os campos previamente demarcados no verso da lâmina. O material sobre a lâmina foi recoberto por lamínula e as lâminas observadas em microscópio óptico com aumento de 400x. As imagens foram analisadas sob o aspecto morfológico e quantitativo. Para quantificação das hifas

presentes, foram analisados 10 campos microscópios em cada lâmina, sendo que foi padronizado o ponto médio de cada campo para a análise. Em cada campo microscópico foi atribuído um escore, de acordo com o número de hifas presente, atribuindo-se os seguintes escores: 0, ausência de hifas; 1, de 1 a 3; 2, de 4 a 10; 3, de 11 a 20; 4, mais de 20.

3.6 Avaliação dos efeitos das formulações probióticas na colonização de *L. paracasei* 28.4 na cavidade bucal e no desenvolvimento de candidose experimental: estudo *in vivo*

3.6.1 Animais experimentais

Foram utilizados 80 camundongos (*Mus musculus*, albinos, Swiss) machos e adultos, com peso variando de 30 a 60 g, provenientes do Biotério central de Botucatu (Unesp) e mantidos no Biotério do Instituto de Ciência e Tecnologia, Unesp - Campus de São José dos Campos. Os animais foram distribuídos da seguinte forma:

-40 animais foram usados para analisar o sistema de entrega das formulações probióticas na cavidade bucal de camundongos saudáveis, bem como a capacidade de colonização oral da cepa de *L. paracasei* 28.4;

-40 animais foram incluídos no estudo dos efeitos das formulações probióticas sobre *C. albicans* utilizando-se camundongos com candidose bucal experimental.

Todos os experimentos foram realizados seguindo as diretrizes e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT/UNESP) (protocolo 15/2016).

3.6.2 Estudo da colonização de *L. paracasei* 28.4 na cavidade bucal de camundongos saudáveis

Formulações probióticas a 1% (n = 10) e 0,6% (n = 10) incorporadas com *L. paracasei* 28.4 foram administradas aos camundongos com uma pipeta (100 µL), uma vez ao dia, por 10 dias (Figura 3). Os grupos controle foram tratados pela administração de suspensão de *L. paracasei* (n = 10) ou hidrogel sem probiótico pelo mesmo período de tempo (n = 10). Após 24 h da última administração, as amostras de saliva da cavidade oral foram coletadas lavando a cavidade oral dos animais com 100 µL de PBS estéril e recolhendo 80 µL da suspensão líquida. As amostras foram colocadas em tubo contendo 920 µL de PBS para diluições em série. Em seguida, alíquotas das diluições foram semeadas em placas de ágar Rogosa (Difco™, BD, Nova Jersey, EUA) contendo ácido acético glacial. As placas foram incubadas a 37°C por 48 h (CO₂ a 5%) para contagem e cálculo da UFC/mL.

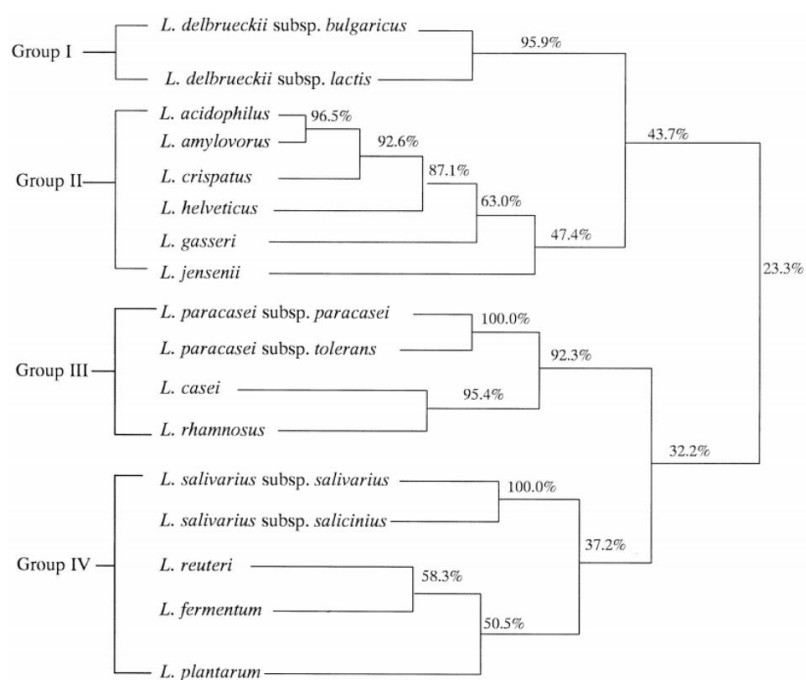
As amostras de saliva também foram utilizadas para identificação molecular de *L. paracasei* 28.4 através da reação em cadeia da polimerase (PCR). O DNA cromossômico foi extraído utilizando kit PureLink® Genomic DNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação do seguimento intergênico das subunidades rRNA entre 16S e 23S foi realizada como descrito por Song et al. (2000). A identificação das amostras foi feita em duas etapas: primeiramente foi realizada a PCR G, que diferencia as espécies de *Lactobacillus* por grupos (Figura 4), e depois, foi realizada uma PCR específica para a identificação de *L. paracasei*. Para esse experimento foi utilizada a espécie *L. rhamnosus* 9595 como controle positivo da reação da PCR. As sequências dos primers utilizados no presente trabalho estão descritas no Quadro 1.

Figura 3 - Inoculação das formulações na cavidade bucal dos camundongos



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4 - Árvore filogenética de 17 cepas de referência de *Lactobacillus* baseadas na sequência 16S-23S rRNA



Fonte: Song et al. (2000).

Quadro 1 - Sequência dos primers utilizados no trabalho

	Primer	Sequência 5' - 3'	Referência
	16	GCTGGATCACCTCCTTTC	Song et al. (2000)
	23-10C	CCTTTCCCTCACGGTACTG	Song et al. (2000)
PCR G	Ldel-7	ACAGATGGATGGAGAGCAGA	Song et al. (2000)
	LU-1P	ATTGTAGAGCGACCGAGAAG	Song et al. (2000)
	LU-3P	AAACCGAGAACACCGCGTT	Song et al. (2000)
	LU-5	CTAGCGGGTGCGACTTTGTT	Song et al. (2000)
PCR específica	Rhall	GCGATGCGAATTTCTATTATT	Song et al. (2000)
	Lpar-4	GGCCAGCTATGTATTCACTGA	Song et al. (2000)

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.6.3 Estudo dos efeitos da formulação de *L. paracasei* na candidose bucal em camundongos

Os 40 animais destinados ao estudo da candidose bucal foram divididos em 4 grupos: formulação probiótica a 1% (n = 10); Suspensão de *L. paracasei* 28.4 (n = 10); gellan gum sem *L. paracasei* (n = 10); ou apenas solução de PBS (n = 10). Para a indução da candidose bucal experimental foi utilizada a metodologia descrita por Rossoni et al. (2015) com algumas modificações. Os animais foram imunossuprimidos pela administração de duas injeções subcutâneas de prednisolona (Depo-Medrol, Laboratórios Pfizer Ltda., Guarulhos, SP, Brasil) na dose de 100 mg/Kg de massa corpórea em dias alternados com a inoculação da suspensão de *C. albicans* 60. A inoculação da cepa de *C. albicans* foi realizada da seguinte maneira: os animais foram sedados, um swab previamente embebido em uma suspensão padronizada de *C. albicans* a 10^8 células/mL foi esfregado no dorso da língua do animal durante 1 minuto. A administração da formulação de *L.*

paracasei 28.4 foi realizada conforme descrita anteriormente e de acordo com os experimentos indicados no Quadro 2.

Quadro 2 - Desenho do experimento de candidose bucal experimental

Dias	Etapas
1 - 10	Inoculação da formulação de <i>L. paracasei</i> 28.4
11	1º Imunossupressão
12	Inoculação de <i>C. albicans</i> 60
13	2º Imunossupressão
14	Inoculação de <i>C. albicans</i> 60
15	Recuperação de <i>C. albicans</i> e <i>L. paracasei</i> 28.4 Eutanásia: análise macroscópica e histológica

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.6.3.1 Recuperação de *C. albicans* 60 e *L. paracasei* 28.4 da cavidade bucal

A recuperação dos micro-organismos foi realizada conforme descrito no item 3.6.2, para recuperação de *C. albicans* as alíquotas de saliva foram plaqueadas em placas contendo agar Sabouraud dextrose com cloranfenicol, e agar Rogosa para o crescimento de *L. paracasei* 28.4.

3.6.3.2 Análise macroscópica da candidose no dorso na língua

Após a eutanásia dos animais por dose excessiva de anestésico, as lesões características de candidose no dorso da língua dos camundongos foram analisadas e escores de 0-4 foram atribuídos de acordo com a extensão das lesões: 0) ausência de lesões; 1) placas brancas em menos de 20% da superfície da língua; 2) placas brancas cobrindo de 21- 90% da superfície; 3) placas brancas em mais de 91%; 4) lesões espessas com pseudomembrana em mais de 91% (Takakura et al., 2003). As línguas retiradas foram observadas com o auxílio de lupa estereoscópica (Zeiss, Göttingen, Alemanha), com aumento de 6,5; 8; 10 e 12,5 vezes.

3.6.3.3 Análise microscópica da candidose no dorso na língua

Para a análise histológica das lesões, as línguas foram fixadas em formol a 10% por 24 h. Após inclusão em parafina, foram obtidos cortes de 5 μ m de espessura que foram corados pelas técnicas da Hematoxilina-Eosina (HE) e Ácido Periódico de Schiff (PAS). A presença de candidose foi pesquisada, com auxílio de microscópio óptico (Olympus, CX41, Toquio, Japão) com aumento de 400 x, e a descrição dos cortes histológicos foi realizada de acordo com a presença de leveduras e hifas, localização e extensão das lesões e alterações dos tecidos envolvidos. A presença de leveduras e hifas foi quantificada de acordo com a metodologia de Junqueira et al. (2005), atribuindo-se os seguintes escores para 21 campos histológicos: 0) ausência de leveduras e hifas; 1) de 1 a 5; 2) de 6 a 15; 3) de 16 a 50; 4) mais de 50 leveduras e/ou hifas. Foi realizada a avaliação da intensidade das lesões teciduais e atribuição de escores à resposta inflamatória no tecido conjuntivo de acordo com Junqueira et al. (2009). Foram observadas as seguintes alterações teciduais no dorso da língua de cada camundongo: hiperplasia epitelial, desorganização da camada basal, excitose, espongirose, perda das papilas filiformes, hiperqueratose e formação de microabscessos intraepiteliais. Para o infiltrado inflamatório, foram atribuídos os seguintes escores: 0) ausência de

células inflamatórias; 1) infiltrado inflamatório leve; 2) infiltrado inflamatório moderado; e, 3) infiltrado inflamatório intenso.

3.6.4 Análise estatística

Primeiramente, foi aplicado o teste de normalidade nos resultados obtidos. A seguir, foi utilizado o teste ANOVA com pós-teste de Tukey para a análise da viabilidade de *L. paracasei* 28.4 e análise do halo de inibição pelo método de ágar sobreposição. Para a análise dos escores da filamentação e dos ensaios histológicos foram realizados o teste de Kuskal-Wallis com pós teste de Dunn. Para os demais ensaios foi utilizado o teste *t* de *Student*. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism 7.0, com nível de significância de 5%.

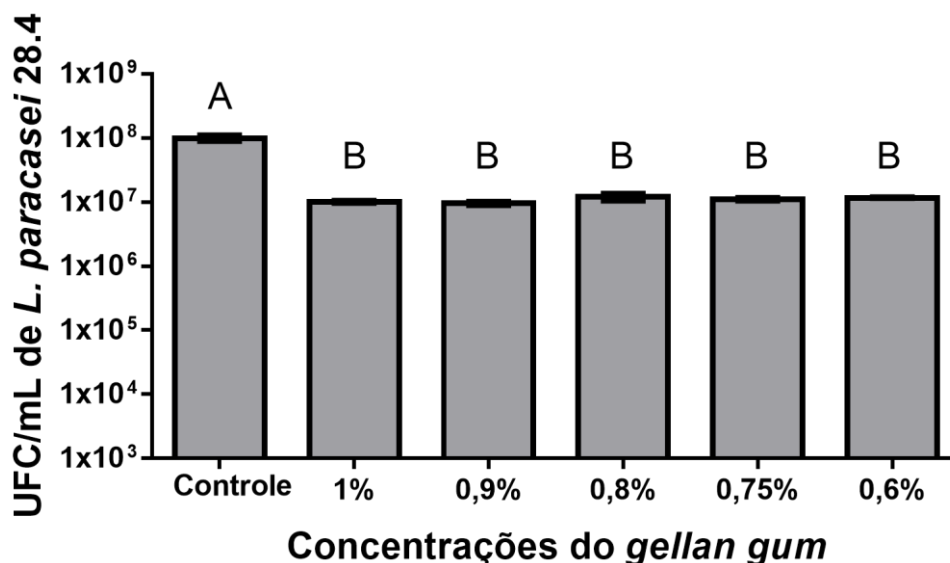
4 RESULTADO

4.1 Desenvolvimento e caracterização das formulações probióticas

4.1.1 Análise da viabilidade de *L. paracasei* 28.4 nas formulações probióticas em diferentes tempos e temperaturas de armazenamento

Inicialmente, estudamos a capacidade de carreamento do *gellan gum* e liberação de células de *L. paracasei* 28.4. Para isso, as formulações foram preparadas pela adição de 10^8 células/mL de *L. paracasei* 28.4 em diferentes concentrações de *gellan gum* (1,0, 0,9, 0,8, 0,7 e 0,6% p/v). Imediatamente após o preparo das formulações probióticas, foi recuperado aproximadamente 7 log (UFC/mL) de *L. paracasei* 28.4 de todas as formulações probióticas e 8 log (UFC/mL) de *L. paracasei* do grupo controle (suspensão de *L. paracasei* não incorporado em *gellan gum*). Portanto, a recuperação de *L. paracasei* das formulações foi de 1 log a menos do que o grupo controle, indicando que o *gellan gum*, nas concentrações testadas, não foi letal para as células bacterianas e permitiu sua liberação, restando apenas uma pequena porção das de *L. paracasei* (Figura 5).

Figura 5 - Média e desvio-padrão de células de *L. paracasei* 28.4 (UFC/mL), recuperadas imediatamente após o preparo das formulações em *gellan gum* (1, 0,9, 0,8, 0,75 e 0,6 p/v). Grupo controle: suspensão de *L. paracasei* 28.4 não incorporada em formulações. ANOVA e teste de Tukey: Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa



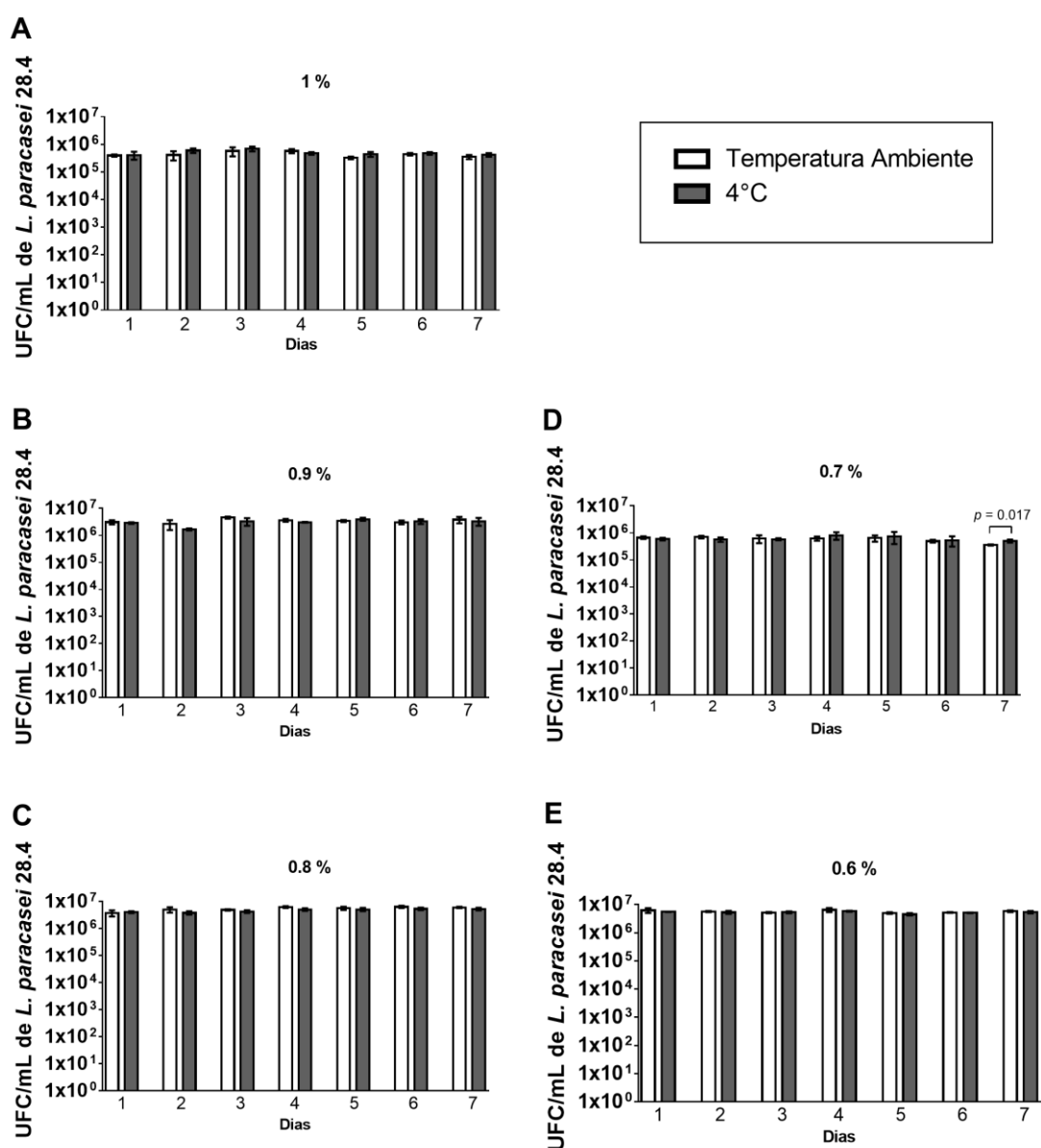
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.2 Recuperação de *L. paracasei* 28.4 das formulações probióticas após armazenamento

Para verificar a capacidade dessas formulações em manter a viabilidade de *L. paracasei* 28.4, a quantidade de células viáveis recuperadas das formulações foi determinada diariamente durante um período de 7 dias. Foi recuperado aproximadamente 6 log (UFC) de *L. paracasei* das formulações de *gellan gum* por todos os períodos de tempo, comprovando a manutenção da viabilidade celular. Neste ensaio as formulações probióticas foram armazenadas à temperatura ambiente ou a 4°C para avaliar a influência da temperatura durante os períodos de armazenamento. Verificamos que após 7 dias de armazenamento, as formulações

probióticas mantiveram a viabilidade de *L. paracasei* 28.4, independentemente das concentrações de *gellan gum* ou das temperaturas de armazenamento (Figura 6).

Figura 6 - Média e desvio-padrão de células de *L. paracasei* 28.4 (UFC/mL), recuperadas após armazenamento por 1 a 7 dias em temperatura ambiente e a 4°C. O teste *t* de *Student* foi utilizado para a comparação dos grupos experimentais (temperatura ambiente x 4°C) para cada dia do experimento

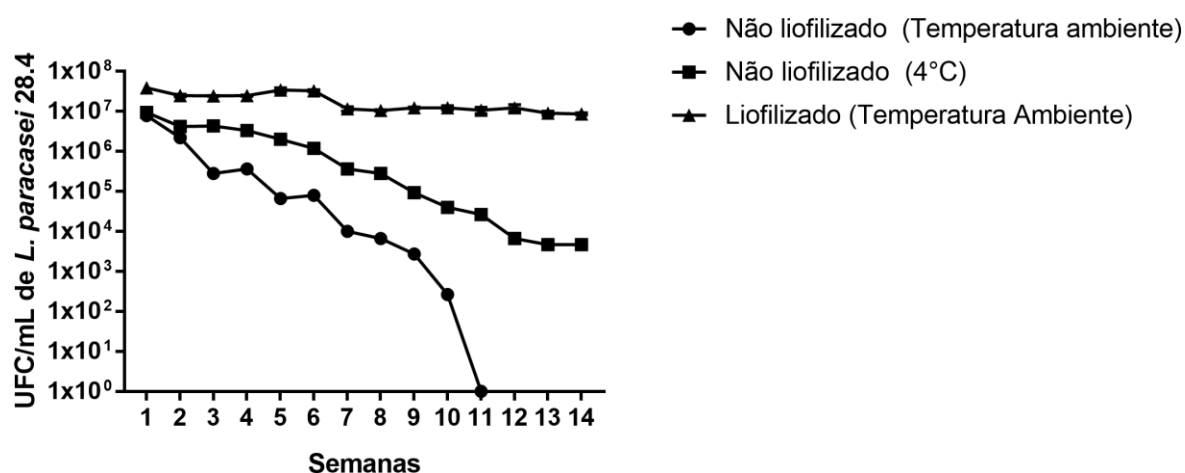


Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.3 Recuperação de *L. paracasei* 28.4 a partir das formulações probióticas após armazenamento prolongado

Para monitorar a viabilidade celular por um longo período de tempo, usamos a formulação probiótica a 1%, comparando três condições diferentes de armazenamento: não liofilizado à temperatura ambiente, não liofilizado a 4°C e liofilizado a temperatura ambiente. A formulação não liofilizada à temperatura ambiente mostrou uma curva de morte crescente das células de lactobacilos, com perda total de viabilidade após 11 semanas. A formulação não liofilizada armazenada a 4°C também mostrou uma diminuição da viabilidade de *Lactobacillus* ao longo do tempo, no entanto, no final do experimento (14 semanas), aproximadamente 4 log de células de *L. paracasei* ainda estavam viáveis. Quando a formulação probiótica foi liofilizada, as células de *L. paracasei* 28.4 mantiveram a viabilidade durante o período de 14 semanas (Figura 7). Estes resultados indicaram que a liofilização teve um papel importante na manutenção da viabilidade celular durante o armazenamento a longo prazo.

Figura 7 - Contagem da UFC/mL de *L. paracasei* 28.4 da formulação de 1% liofilizada e não liofilizada armazenada em temperatura ambiente e a 4°C por um período de 3 meses

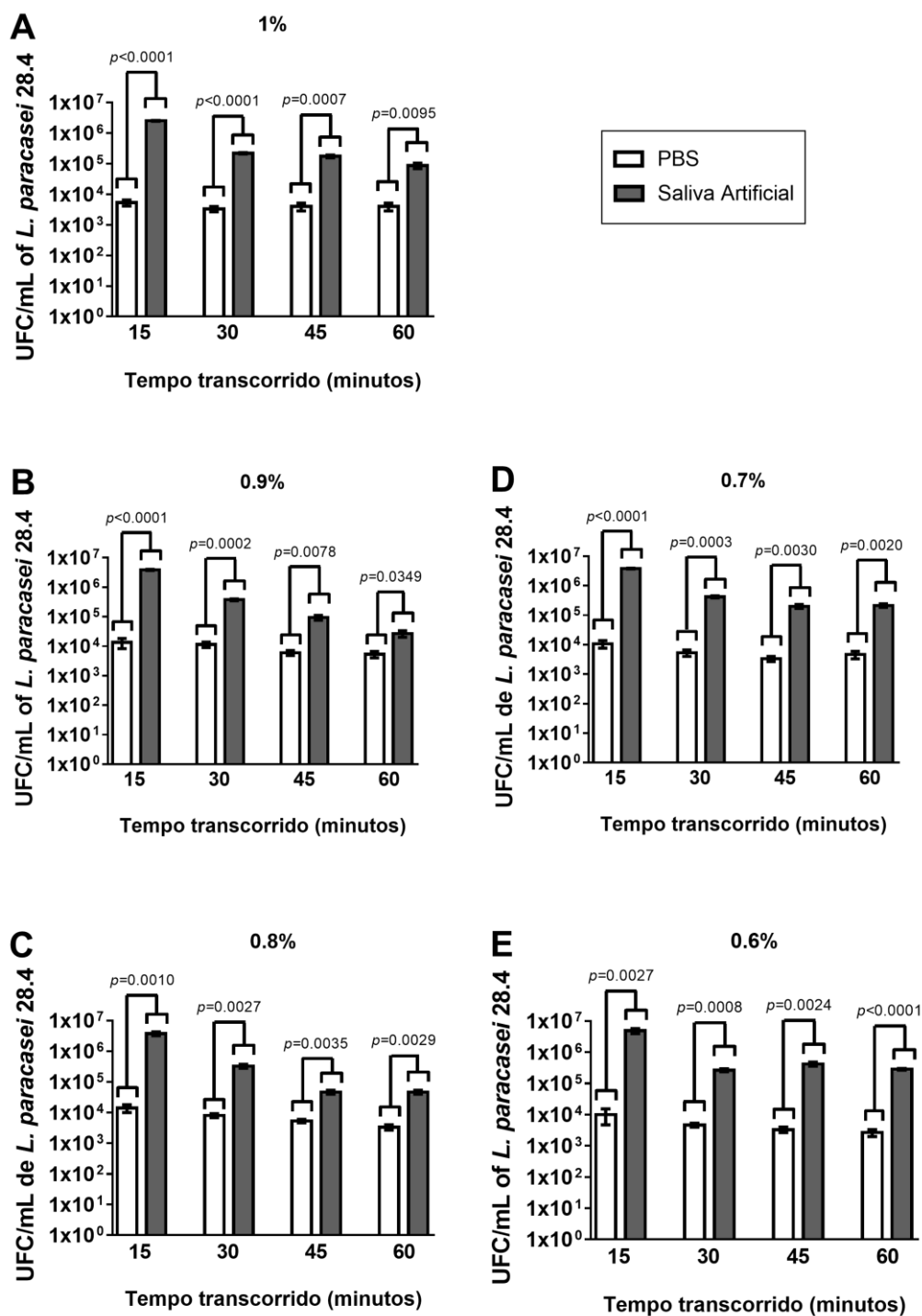


Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.4 Análise do sistema de liberação de *L. paracasei* 28.4 a partir das formulações probióticas

Nós também avaliamos o sistema de entrega das formulações probióticas em duas soluções diferentes: PBS e saliva artificial. Os resultados demonstraram que todas as formulações probióticas (1 a 0,6%) foram capazes de liberar as células de *L. paracasei* 28.4 quando colocadas em ambas as soluções por 60 minutos. Entretanto, a exposição à saliva artificial proporcionou uma taxa de liberação mais alta em comparação ao PBS (Figura 8), sugerindo que a saliva artificial pode ter interagido com o *gellan gum* e facilitado a liberação de *L. paracasei* 28.4.

Figura 8 - Média e Desvio-padrão de células de *L. paracasei* 28.4 (UFC/mL) liberadas das formulações quando na presença de PBS ou saliva artificial. O teste *t* de Student foi utilizado para comparar os grupos PBS e saliva artificial nos diferentes tempos



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Avaliação dos efeitos das formulações probióticas sobre *C. albicans*: estudo *in vitro*

4.2.1 Efeitos antimicrobianos das formulações probióticas sobre *C. albicans* por meio do método de ágar sobreposição

Como todas as formulações probióticas (1 a 0,6%) foram capazes de incorporar células de *L. paracasei*, mantendo sua viabilidade e fornecendo um sistema de liberação adequado, selecionamos as formulações de 1% (consistência mais gelatinosa) e 0,6% (consistência mais líquida) para estudar suas atividades antifúngicas (Figura 9).

Figura 9 - Diferentes consistências das formulações probióticas de *L. paracasei* 28.4 em gellan gum



Legenda: **A:** Formulação 0,6% (consistência mais líquida); **B:** Formulação 1% (consistência mais gelatinosa).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Inicialmente, investigamos se as formulações probióticas seriam capazes de inibir o crescimento de *C. albicans* (ATCC 18804) usando o método de agar sobreposição. Para isso, testamos a atividade antifúngica das formulações probióticas (1 e 0,6%) contendo diferentes concentrações de *L. paracasei* 28.4 (10^9 a 10^6 células/mL) sobre *C. albicans* (Figura 10). Ambas as formulações probióticas levaram à inibição no crescimento de *C. albicans* com efeitos dependentes das concentrações de *L. paracasei* 28.4. As formulações probióticas com maiores concentrações de células de *L. paracasei* 28.4 demonstraram maiores zonas de inibição. A atividade antifúngica dependente da concentração de *L. paracasei*,

também, foi observada no grupo controle composto apenas por suspensão de *L. paracasei* (Tabela 2). Estes resultados indicaram que as células de *L. paracasei* liberadas das formulações probióticas para o meio de cultura mantiveram sua atividade antifúngica contra *C. albicans*.

Tabela 2 - Média e desvio-padrão (DP) dos halos de inibição de crescimento de *C. albicans*. ANOVA e teste de Tukey: letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos

(continua)

Valores de halo de inibição (cm)				
	Suspensão 10 ⁹ (n=6)	Suspensão 10 ⁸ (n=6)	Suspensão 10 ⁷ (n=6)	Suspensão 10 ⁶ (n=6)
	2	1,8	2,5	1,5
	2	2	2	2
	1,7	1,6	2,5	1
	2	2	3	2,5
	1,9	1,8	2	1
	1,9	1,7	3,5	1,5
Média + DP	1,9 ± 0,12 ^A	1,8 ± 0,16 ^A	1,3 ± 0,58 ^B	1 ± 0,16 ^B

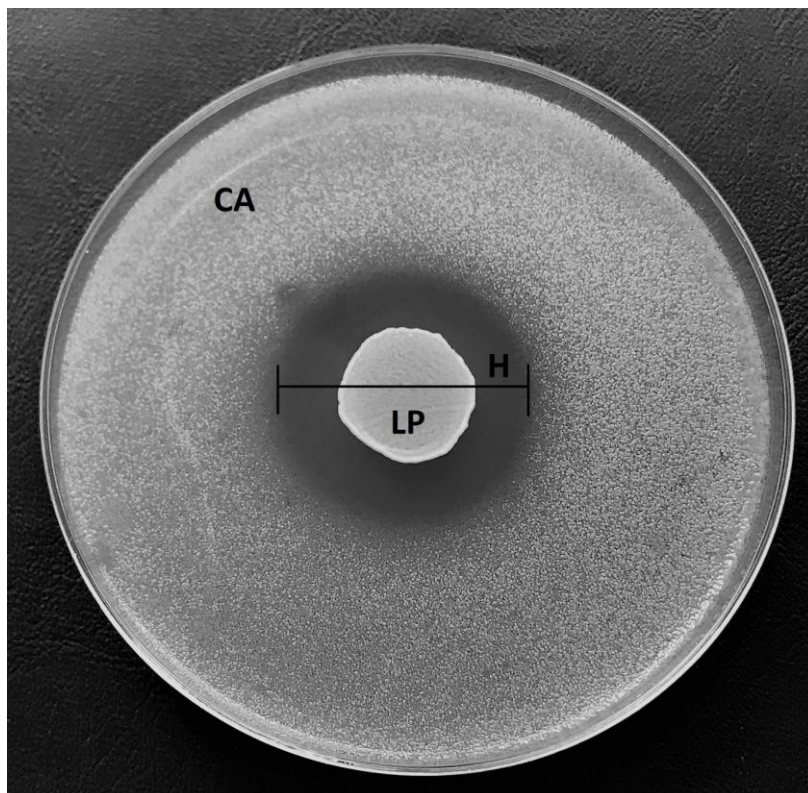
(conclusão)

Valores de halo de inibição (mm)				
Formulação 1%				
	10 ⁹ cels/mL (n=6)	10 ⁸ cels/mL (n=6)	10 ⁷ cels/mL (n=6)	10 ⁶ cels/mL (n=6)
	7	6	5	4
	8	7	5	5
	7,5	7	5	6
	7	8	6	5
	6	7	6,5	5
	6,5	6,5	6	5
Média + DP	7 ± 0,71 ^A	6,9 ± 0,66 ^A	5,6 ± 0,66 ^B	5 ± 0,63 ^B

Valores de halo de inibição (mm)				
Formulação 0,6%				
	10 ⁹ cels/mL (n=6)	10 ⁸ cels/mL (n=6)	10 ⁷ cels/mL (n=6)	10 ⁶ cels/mL (n=6)
	6	6,5	4	4
	7	7	4	4
	6,5	6	4,5	3,5
	7	6	4	3,5
	5,5	6,5	4,5	3
	6	5	3,5	4
Média + DP	6,3 ± 0,61 ^A	6,2 ± 0,68 ^A	4,1 ± 0,38 ^B	3,7 ± 0,41 ^B

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 10 - Placa de Petri montada pelo método de ágar sobreposição, mostrando a formação do halo de inibição do crescimento de *C. albicans* ao redor de *L. paracasei*



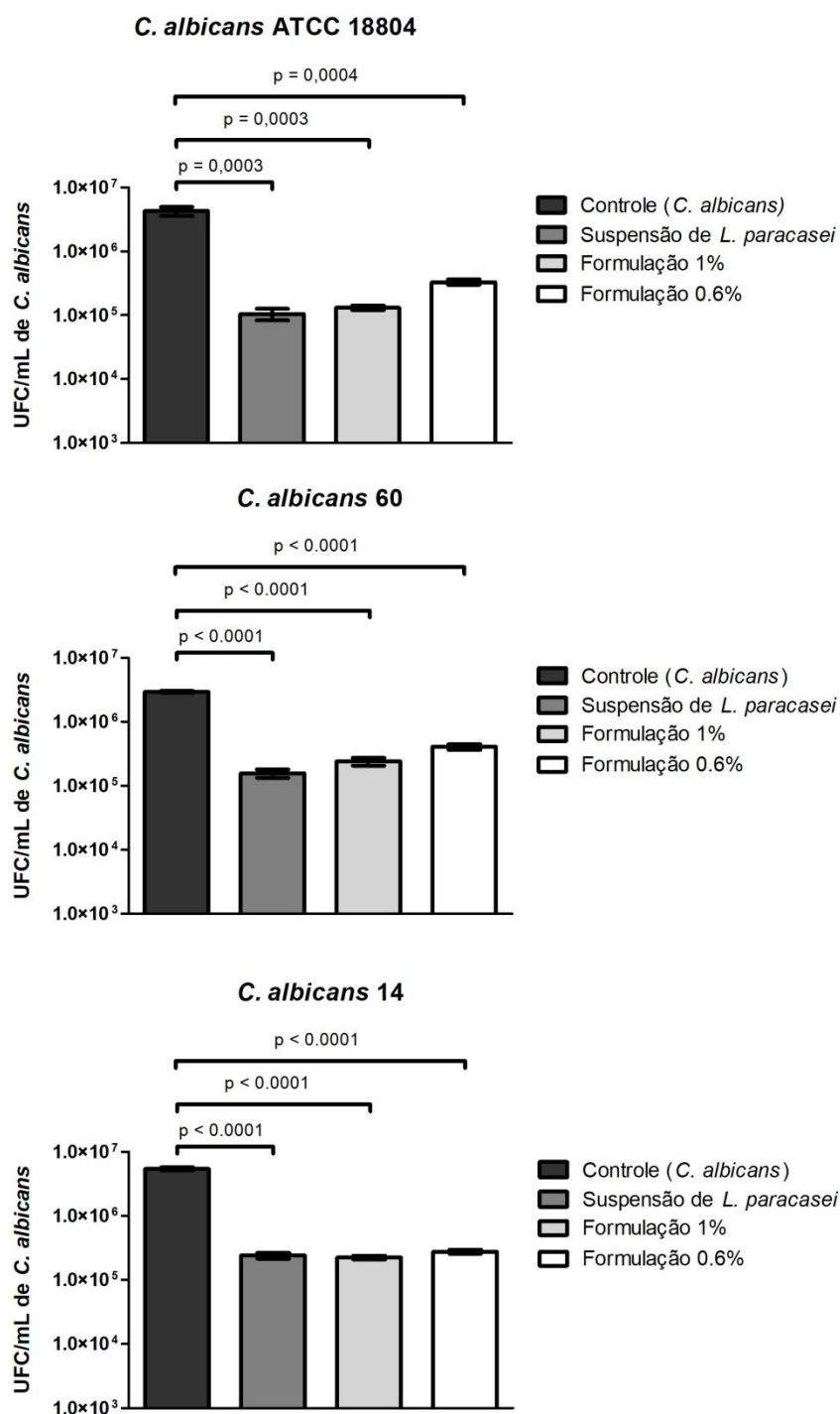
Legenda: CA: Crescimento de *C. albicans*; LP: Crescimento de *L. paracasei* 28.4; H: Halo de inibição.
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.2 Efeitos das formulações probióticas sobre o biofilme de *C. albicans*: contagem de células viáveis, cristal violeta e microscopia eletrônica de varredura

A formulação probióticas contendo 0,6 ou 1% de *gellan gum* e 10^8 células/mL de *L. paracasei* 28.4 foram testadas em biofilmes de *C. albicans*. Além de *C. albicans* ATCC 18804, dois isolados clínicos (*C. albicans* 60 e 14) foram adicionados nesse ensaio. Por meio da contagem de células viáveis, verificamos que ambas as formulações probióticas foram capazes de inibir a formação de biofilme para todos os isolados de *C. albicans*. Observou-se uma redução estatisticamente significativa

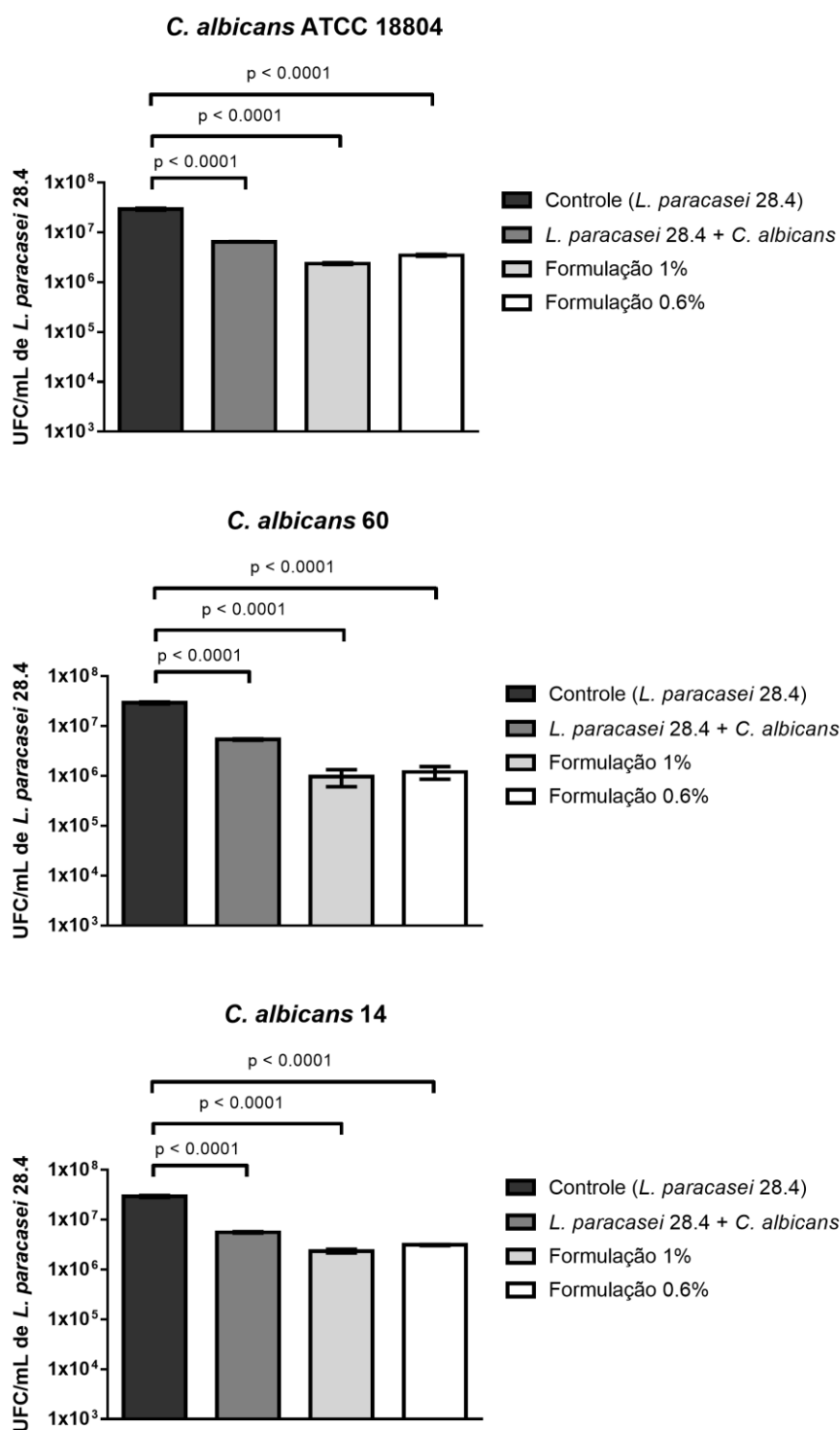
de *C. albicans* nos grupos tratados *L. paracasei* 28.4 e com as formulações probióticas de 0,6 ou 1%, quando comparados ao grupo controle contendo *C. albicans* (sem tratamento probiótico) (Figura 11). O número de *L. paracasei* também foi quantificado, mostrando valores entre 10^6 e 10^7 células/mL, confirmando que as células de *L. paracasei* foram liberadas do *gellan gum* durante o ensaio de formação de biofilme (Figura 12). As análises dos biofilmes foram complementadas com o ensaio de cristal violeta, no qual também foi encontrado uma redução nos biofilmes de *C. albicans* pré-tratados com formulações probióticas em relação ao grupo controle não tratado (Figura 13 e 14). Curiosamente, a redução de células de *C. albicans* (UFC/mL) e a biomassa total (absorbância) alcançada pela cepa *L. paracasei* 28.4 não foram prejudicadas pela sua incorporação nas formulações em *gellan gum*, comparadas à suspensão de *L. paracasei* 28.4. Portanto, as formulações probióticas a 1 e 0,6% p/v de *gellan gum* proporcionaram um sistema de entrega de *L. paracasei* 28.4 suficiente para inibir a formação de biofilme de *C. albicans*.

Figura 11 - Médias e desvio-padrão do número de UFC/mL de *C. albicans* após a formação do biofilme em contato com *L. paracasei* 28.4 em suspensão ou incorporado nas formulações de 1% e 0.6%. Teste *t* de Student foi utilizado para comparar o grupo controle com cada grupo experimental



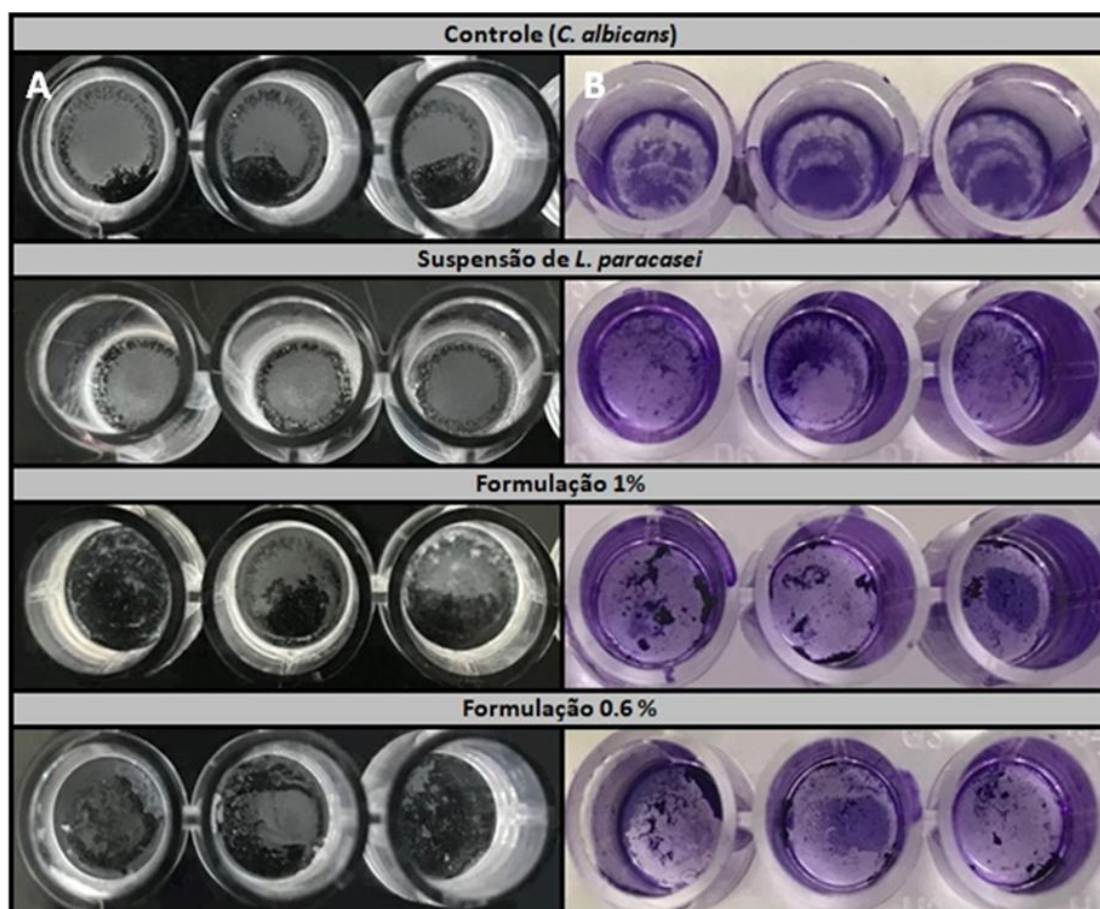
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 12 - Médias e desvio-padrão do número de UFC/mL de *L. paracasei* 28.4 recuperados após a formação dos biofilmes de *C. albicans* tratados pela suspensão ou formulações probióticas. Teste *t* de *Student* foi utilizado para comparar o grupo controle com cada grupo experimental.



Fonte: Elaborada pelo autor.

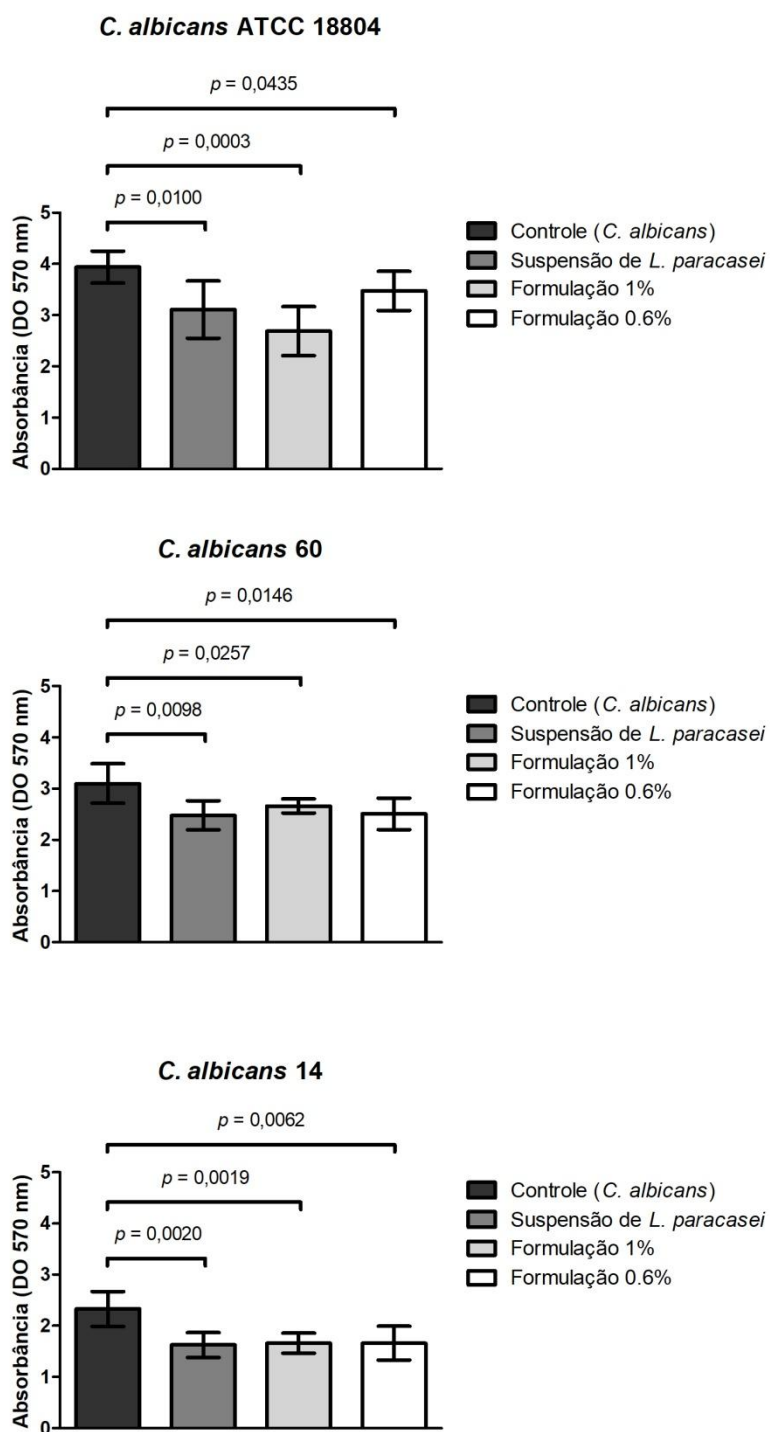
Figura 13 - Biofilmes de *C. albicans* após 24 h de formação no fundo de placa de 96 poços



Legenda: A. Biofilmes antes da coloração pelo cristal violeta; B. Biofilmes após a coloração pelo cristal violeta.

Fonte: Elaborada pelo autor.

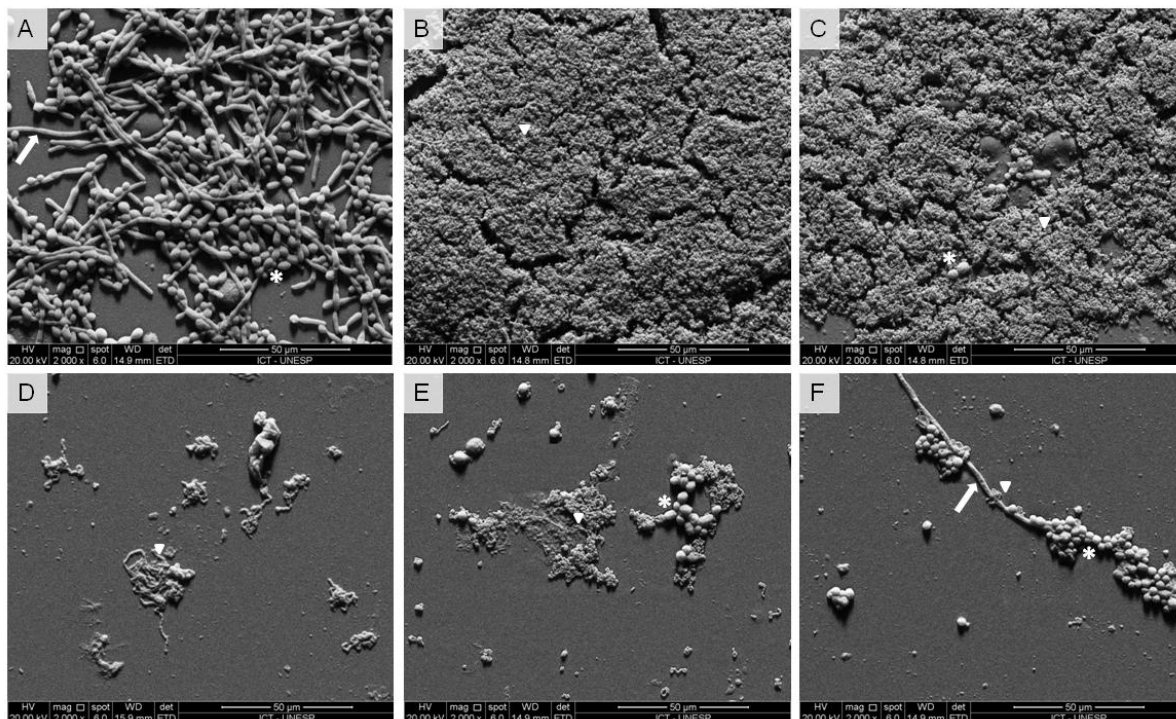
Figura 14 - Médias e Desvio-padrão dos valores de densidade óptica obtidos na análise da biomassa dos biofilmes. Teste *t* de *Student* foi utilizado para comparar o grupo controle com cada grupo experimental



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para verificar as características estruturais dos biofilmes, foi realizada a análise de microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes formados na superfície da resina acrílica. Como esperado, o grupo formado apenas por *C. albicans* (não tratado) mostrou um biofilme maduro com a presença de numerosas quantidades de leveduras e hifas (Figura 15A). Foi testado também um grupo composto apenas por suspensão de *L. paracasei* (sem *C. albicans*), no qual as células de *Lactobacillus* demonstraram capacidade de formar biofilmes compostos por grande número de células aderidas à superfície da resina (Figura 15B). Quando os biofilmes de *C. albicans* foram pré-tratados com suspensão de *L. paracasei* 28.4, encontramos apenas algumas células de *C. albicans* aderidas à resina sem formação de hifas (Figura 15C). Quando os efeitos da formulação probiótica na superfície da resina foram testados sem os biofilmes de *C. albicans*, verificamos a presença de células de *L. paracasei*, indicando que essas células foram liberadas do *gellan gum* e se acumularam na superfície da resina (Figura 15D). Também foram observadas células de *Lactobacillus* nos biofilmes de *C. albicans* pré-tratados com formulações probióticas (1 e 0,6%), porém nesses grupos, a característica mais significativa foi a redução de leveduras e hifas aderidas à resina em relação ao grupo de biofilme de *C. albicans* não foi tratado com o probiótico (Figuras 15E e 15F).

Figura 15 - Microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes formados *in vitro*, sobre discos de resina acrílica medindo 5x5x2 mm



Legenda: A) biofilmes formados apenas por *C. albicans* (ATCC 18804); B) Biofilmes formados por apenas suspensão de *L. paracasei* 28.4; C) Biofilmes de *C. albicans* pré-tratados com suspensão *L. paracasei* 28.4; D) Biofilmes formados apenas pela formulação probiótica a 1%; E) Biofilmes de *C. albicans* pré-tratados com formulação probiótica a 1%; F) Biofilmes de *C. albicans* pré-tratados com formulação probiótica a 0,6%. É possível observar a presença de células de *L. paracasei* (▼), leveduras (*) e hifas (→) de *C. albicans*.

Aumento: 2000X.

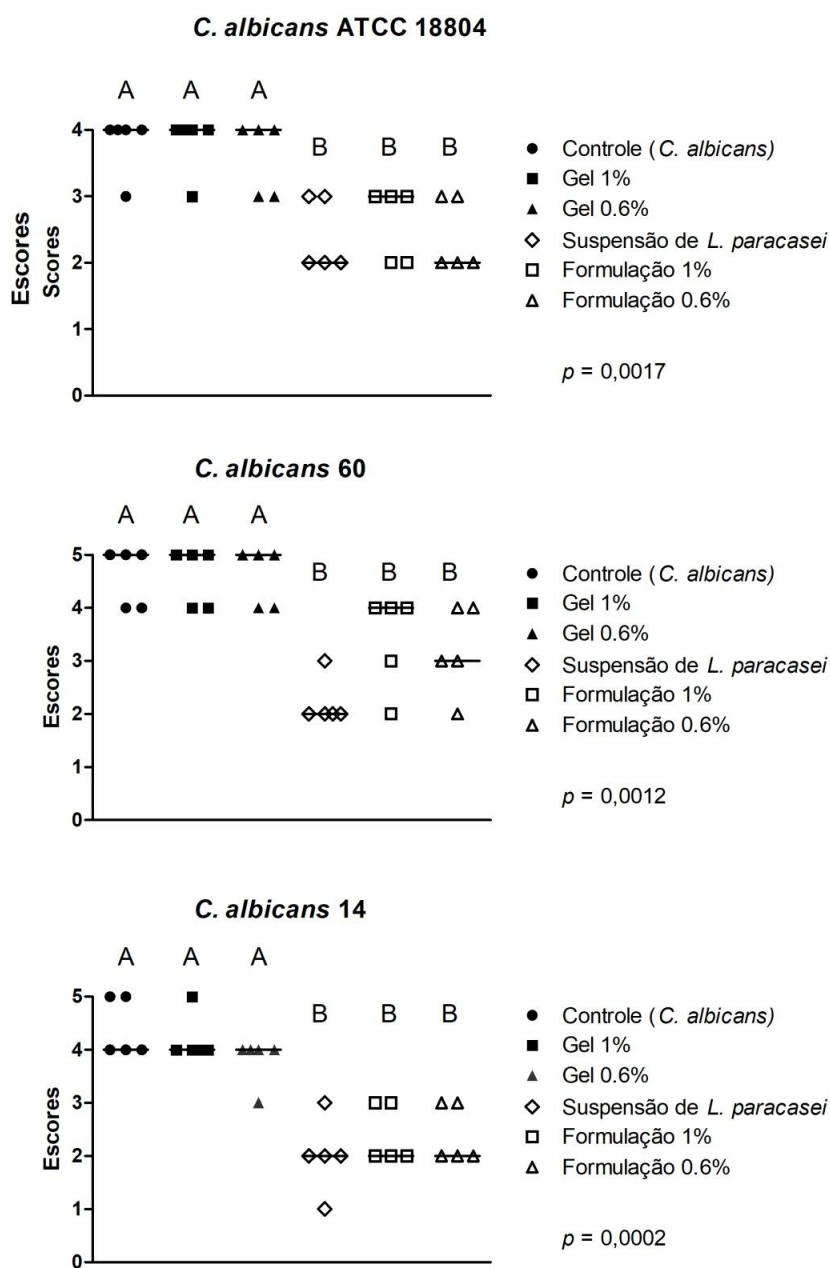
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.3 Efeitos das formulações probióticas contendo *L. paracasei* 28.4 sobre a filimentação de *C. albicans*

Além de confirmar a inibição do biofilme pelas formulações probióticas nas células de *C. albicans* e na biomassa total, as imagens de MEV indicaram uma atividade inibitória de *L. paracasei* 28.4 na filimentação de *C. albicans*. Então, para explorar esses dados, investigamos os efeitos das formulações probióticas na formação de hifas por diferentes isolados de *C. albicans*, usando um ensaio

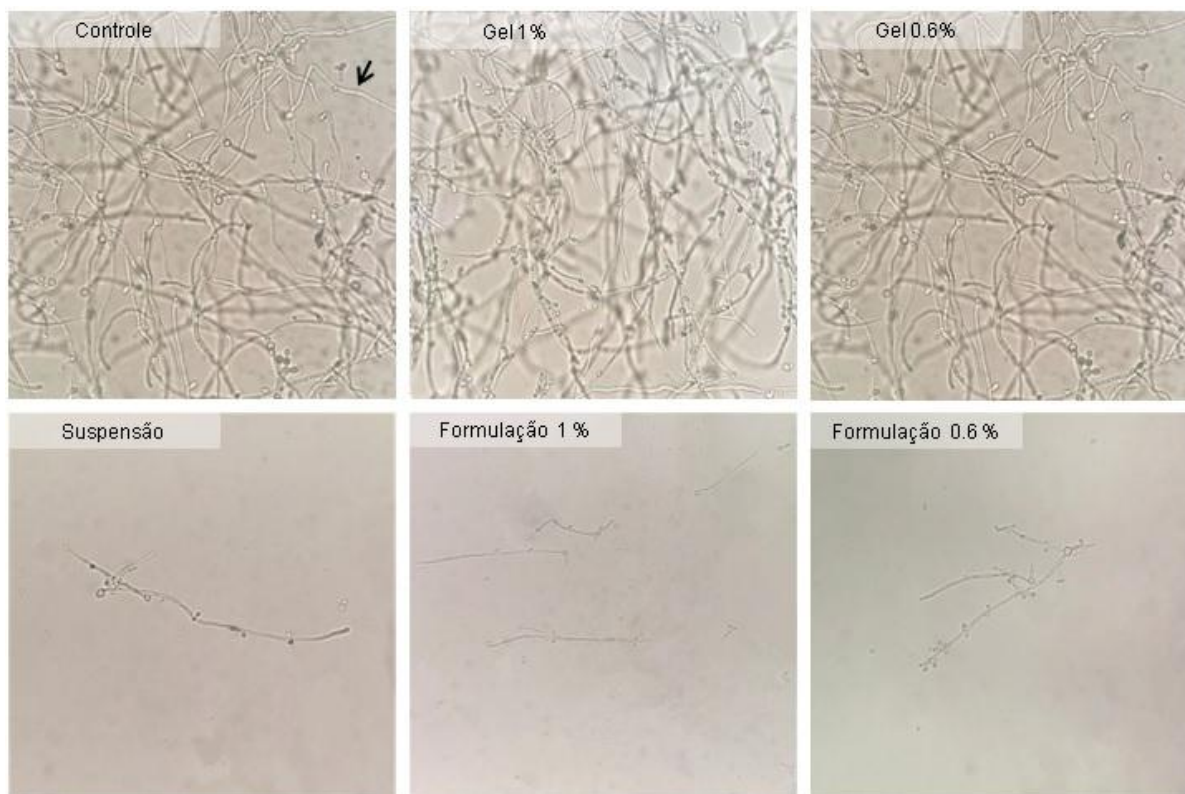
específico para induzir formação de hifas em soro fetal bovino. Os resultados demonstraram que as formulações probióticas a 1 e 0,6% reduziram a formação de hifas para todos os isolados de *C. albicans* estudados. Quando as duas formulações foram comparadas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (Figuras 16 e 17).

Figura 16 - Média dos escores obtidos nas contagens de hifas de *C. albicans* que ficaram em contato com: solução fisiológica (Controle), gellan 1% sem probiótico, gellan 0,6% sem probiótico (gel 0,6%), suspensão de *L. paracasei*, formulação probiótica 1% e formulação probiótica 0,6%. Kuskal-Wallis: letras diferentes correspondem à diferença significativa entre os grupos



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 17 - Microscopia óptica da filamentação de *C. albicans* quando em contato com: solução fisiológica (Controle), gellan 1% sem probiótico, gellan 0,6% sem probiótico, suspensão de *L. paracasei*, formulação probiótica 1% e formulação probiótica 0,6%



Legenda: ▲ = Hifas de *C. albicans*.
Fonte: Elaborada pelo autor.

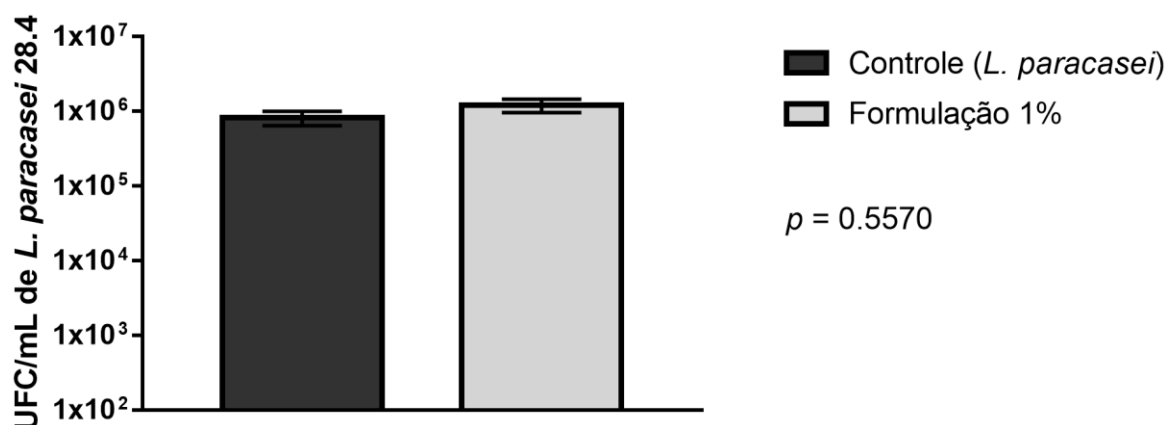
Em resumo, os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* mostraram que as formulações probióticas a 1 e 0,6% forneceram um sistema de entrega de *L. paracasei* 28.4 capaz de inibir o crescimento, a formação de biofilme e a filamentação de *C. albicans*.

4.3 Efeitos das formulações probióticas na colonização de *L. paracasei* 28.4 na cavidade bucal e no desenvolvimento de candidose experimental: estudo *in vivo*

4.3.1 Colonização de *L. paracasei* 28.4 na cavidade bucal de camundongos saudáveis

Antes de estudar os efeitos das formulações probióticas na candidose bucal, foi analisado a capacidade das formulações probióticas em liberar *L. paracasei* e promover sua colonização na cavidade bucal de camundongos saudáveis. A formulação probiótica a 1% foi capaz de fornecer colonização oral em camundongos, atingindo a mesma viabilidade celular encontrada nos camundongos inoculados com a suspensão fresca de *L. paracasei* (7 log de UFC/mL) (Figura 18). No entanto, não foi possível recuperar as células de *Lactobacillus* da cavidade oral quando os animais foram tratados com a formulação probiótica a 0,6%, demonstrando que a concentração de *gellan gum* foi um fator crucial para o sistema de entrega de *Lactobacillus* na cavidade oral dos camundongos.

Figura 18 - Médias e desvio-padrão de UFC/mL obtidas das amostras de saliva recuperadas após administração da formulação 1% ou suspensão de *L. paracasei* 28.4 (controle) em camundongos saudáveis. O teste *t* de *Student* foi utilizado para comparação entre os grupos

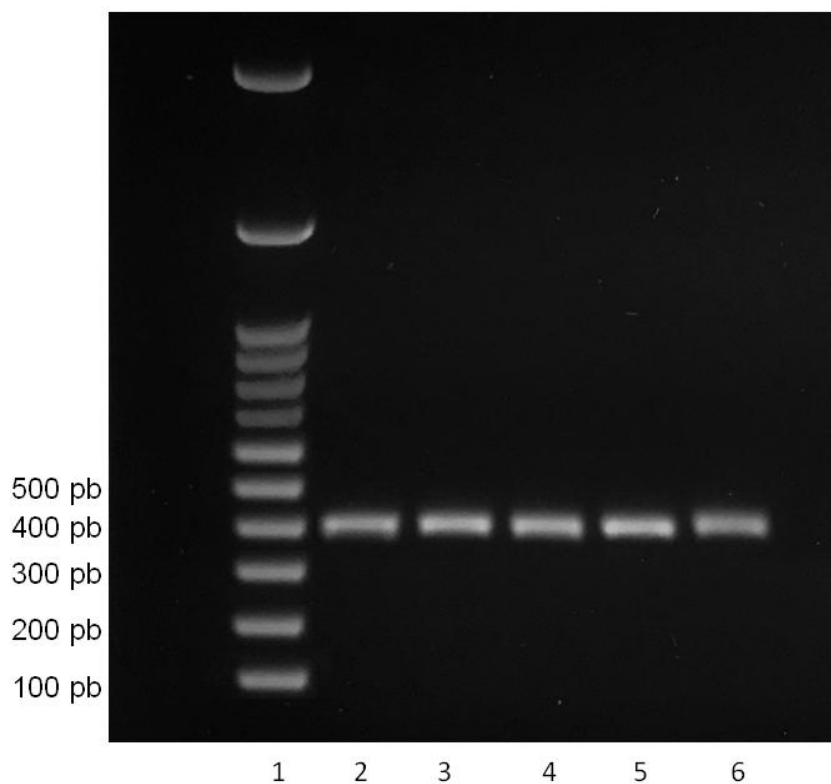


Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.2 Identificação molecular de *L. paracasei* por PCR das amostras de saliva

Após a coleta e amplificação das amostras, foi realizado gel de agarose para a visualização e comparação do material amplificado com o grupo controle, cepa de *L. paracasei* 28.4 que não foi inoculada na cavidade bucal dos camundongos. Utilizando o primer G, foi possível verificar que todas as amostras recuperadas da cavidade bucal dos camundongos eram pertencentes ao Grupo III (Figura 19). A seguir, o material extraído foi amplificado utilizando primers específicos para *L. paracasei*, e através da análise do material amplificado foi possível comprovar, que a espécie de *Lactobacillus* recuperada da cavidade bucal após a administração da formulação de 1% era a espécie de *L. paracasei*. Para essa amplificação foi utilizado uma cepa padrão de *L. rhamnosus* 9595 como controle da reação (Figura 20).

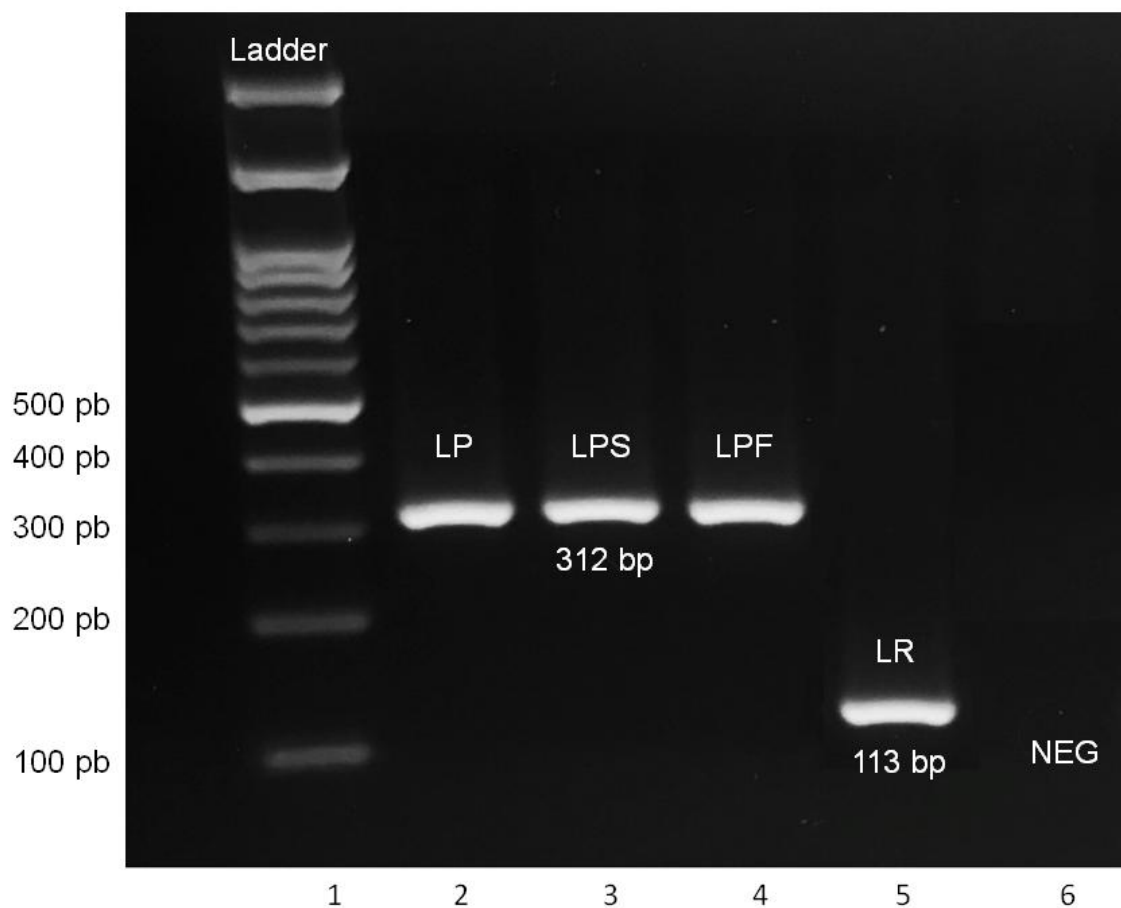
Figura 19 - Gel de agarose após amplificação utilizando o primer G, que diferencia as espécies de *Lactobacillus* por grupos



Legenda: 1. Marcador de peso molecular 100 pb ; 2. *L. paracasei* 28.4 (controle); 3 - 4. Amostras da suspensão recuperada da cavidade bucal dos camundongos; 5 - 6. Amostras da formulação 1% recuperada da cavidade bucal dos camundongos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 20 - Confirmação do grupo *L. paracasei* recuperada da cavidade oral de camundongos saudáveis. Eletroforese em gel de agarose (1,5% em TAE) de produtos amplificados por PCR. PCR multiplex para identificação dos grupos *L. paracasei* e *L. rhamnosus* com fragmentos de 312 pb e 113 pb, respectivamente



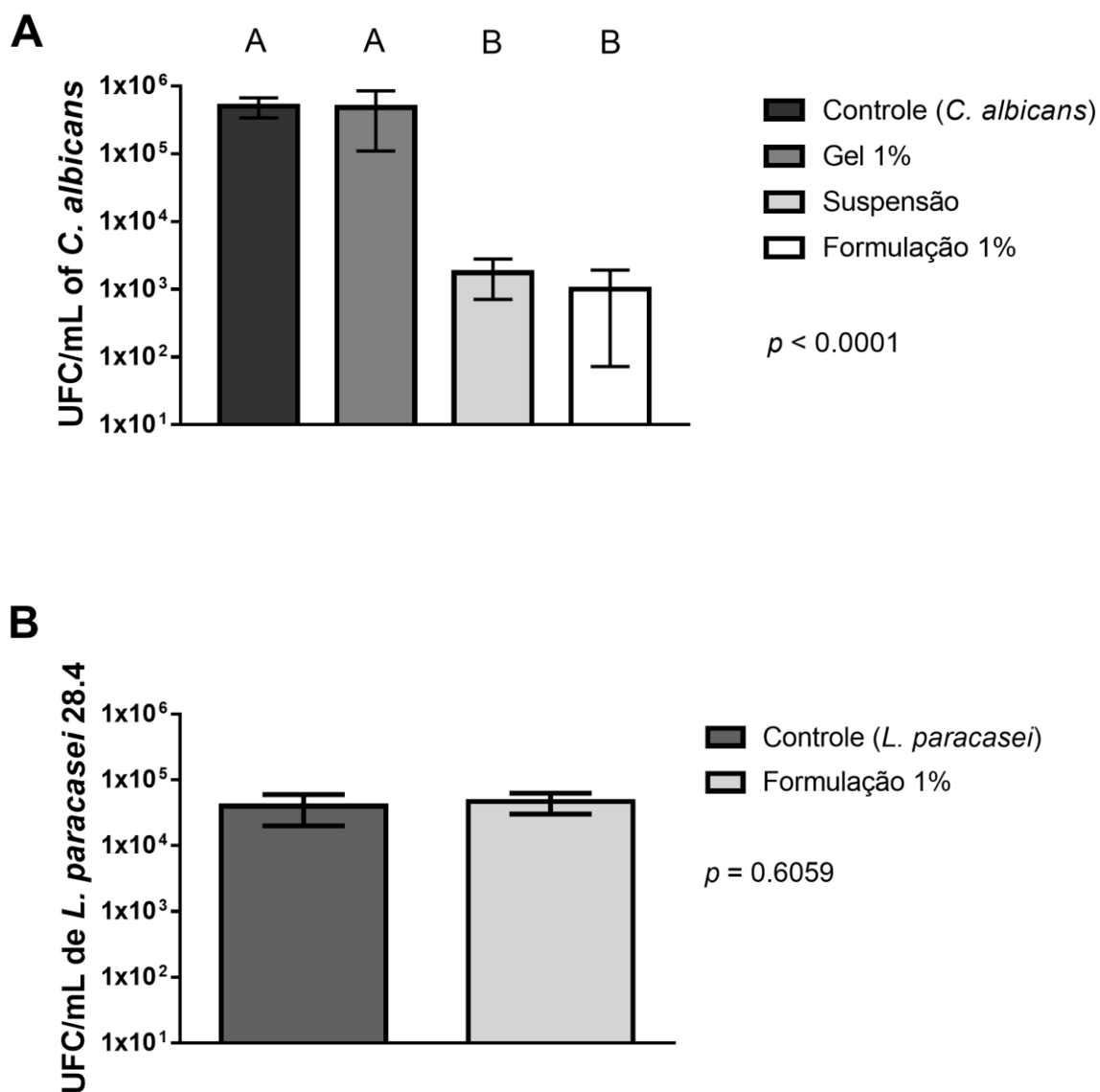
Legenda: **1.** Marcador de peso molecular 100 pb; **2.** *L. paracasei* 28.4 (LP) (312 pb); **3.** Suspensão de *L. paracasei* (LPS) (312 pb); **4.** Formulação probiótica de 1% (LPF) (312 pb); **5.** *L. rhamnosus* (LR) (113 pb); **6.** Controle negativo (NEG).

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.3 Recuperação de *C. albicans* e *L. paracasei* 28.4 da cavidade bucal dos camundongos

Com base nos resultados dos dados obtidos no estudo *in vitro* e na colonização da cavidade oral de camundongos saudáveis, utilizamos a formulação probiótica a 1% para o estudo da candidose oral em camundongos. Os animais pré-tratados com formulação probiótica ou suspensão de *L. paracasei* 28.4 tiveram uma redução de aproximadamente 3 log (UFC/mL) no número de células de *C. albicans* quando comparados ao grupo controle (camundongos infectados por *C. albicans* não tratados com probiótico). Para verificar se o *gellan gum* poderia interferir na candidose oral, um grupo de camundongos infectados com *C. albicans* recebeu o *gellan gum* sem *L. paracasei*. Este grupo não apresentou redução no número de células de *Candida* recuperadas, confirmando que o *gellan gum* foi incapaz de reduzir ou estimular o crescimento de *Candida* (Figura 21A). Também foi determinado o número de *L. paracasei* 28.4 recuperados da cavidade oral, verificando se que as células de *L. paracasei* foram capazes de colonizar a cavidade oral de camundongos até o final do experimento (15 dias) (Figura 21B).

Figura 21 - Recuperação de *C. albicans* e *L. paracasei* da cavidade oral de camundongos infectados com *C. albicans*. Médias e desvio padrão de UFC/mL obtidos de amostras de saliva coletadas no último dia do experimento (15 dias)



Legenda: A) contagem de UFC/mL de *C. albicans* recuperada da cavidade oral de camundongos tratados com PBS (grupo controle), *gellan gum* de 1% não incorporada com *L. paracasei* (grupo *gellan gum*), suspensão de *L. paracasei* 28.4 e formulação probiótica de 1% (ANOVA e teste de Tukey). B) Contagem de UFC/mL de *L. paracasei* 28.4 recuperada dos camundongos tratados com suspensão de *L. paracasei* 28.4 ou formulação probiótica de 1% (teste t de Student).

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.4 Análise macroscópica da candidose no dorso da língua dos camundongos

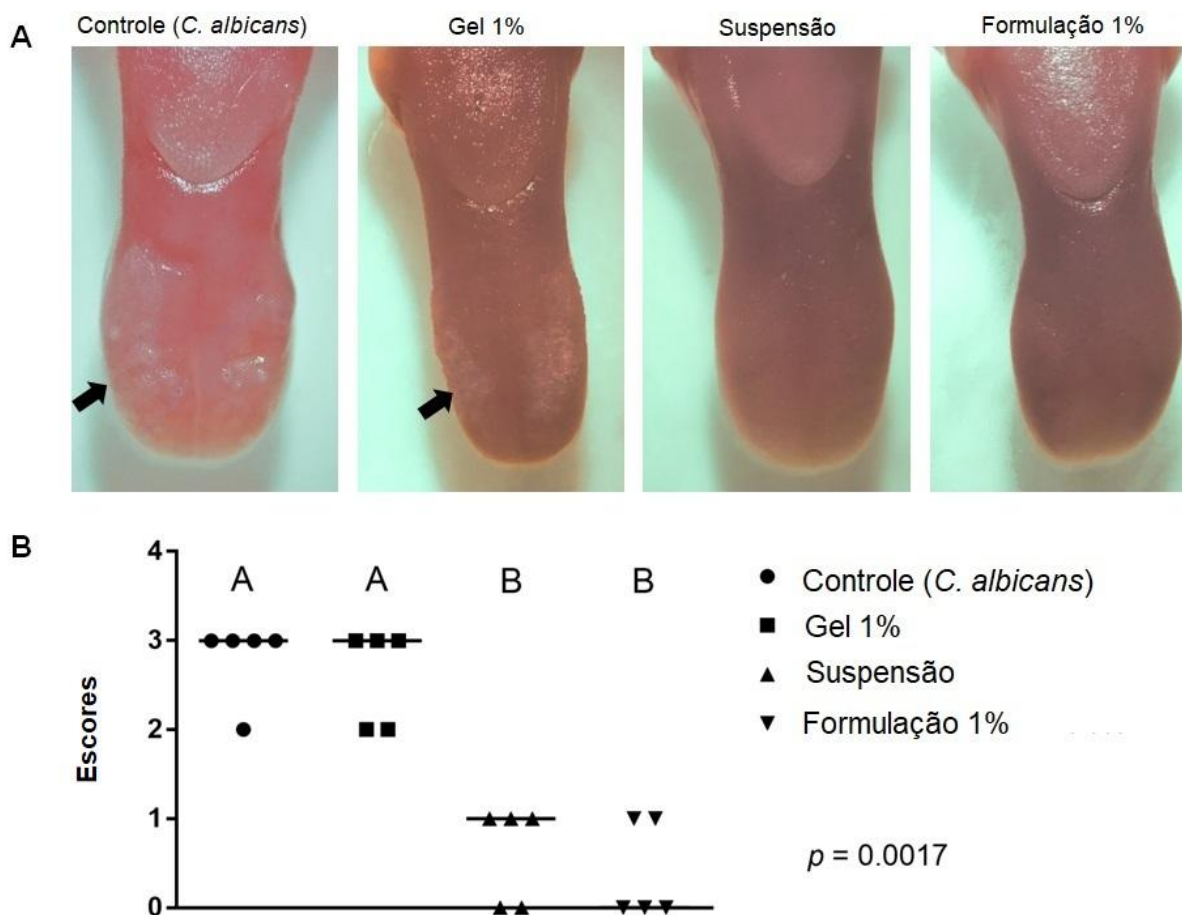
Em relação ao desenvolvimento de candidose oral, verificamos que o grupo controle (camundongos infectados por *C. albicans* e não tratados com probióticos) apresentou lesões características de candidose pseudomembranosa no dorso da língua (Figura 22). Interessantemente, os grupos tratados com a formulação probiótica ou suspensão fresca de *L. paracasei* 28.4 apresentaram uma redução significativa nas lesões de candidose em comparação ao grupo controle. Após a eutanásia, as línguas foram submetidas à análise microscópica, na qual o grupo controle apresentou grande número de leveduras e hifas localizadas na camada queratinizada, além de várias lesões epiteliais e intenso infiltrado inflamatório. Essas lesões incluíram a presença de perda de papila, descamação, acantólise, hiperplasia tecidual, espongirose e microabscessos intra-epiteliais. Em contraste, os animais tratados com formulações probiótica ou suspensão fresca de *L. paracasei* apresentaram menos leveduras/hifas, lesões epiteliais ou infiltrado inflamatório, em comparação ao grupo controle (Figuras 23 - 26).

Figura 22 - Lesões de candidose bucal no dorso da língua dos camundongos infectados por *C. albicans* e não tratados (grupo controle)



Legenda: Lesão eritematosa no dorso da língua dos camundongos (*). Presença de placas brancas causadas pela infecção por *C. albicans* (↗).
Fonte: Elaborada pelo autor.

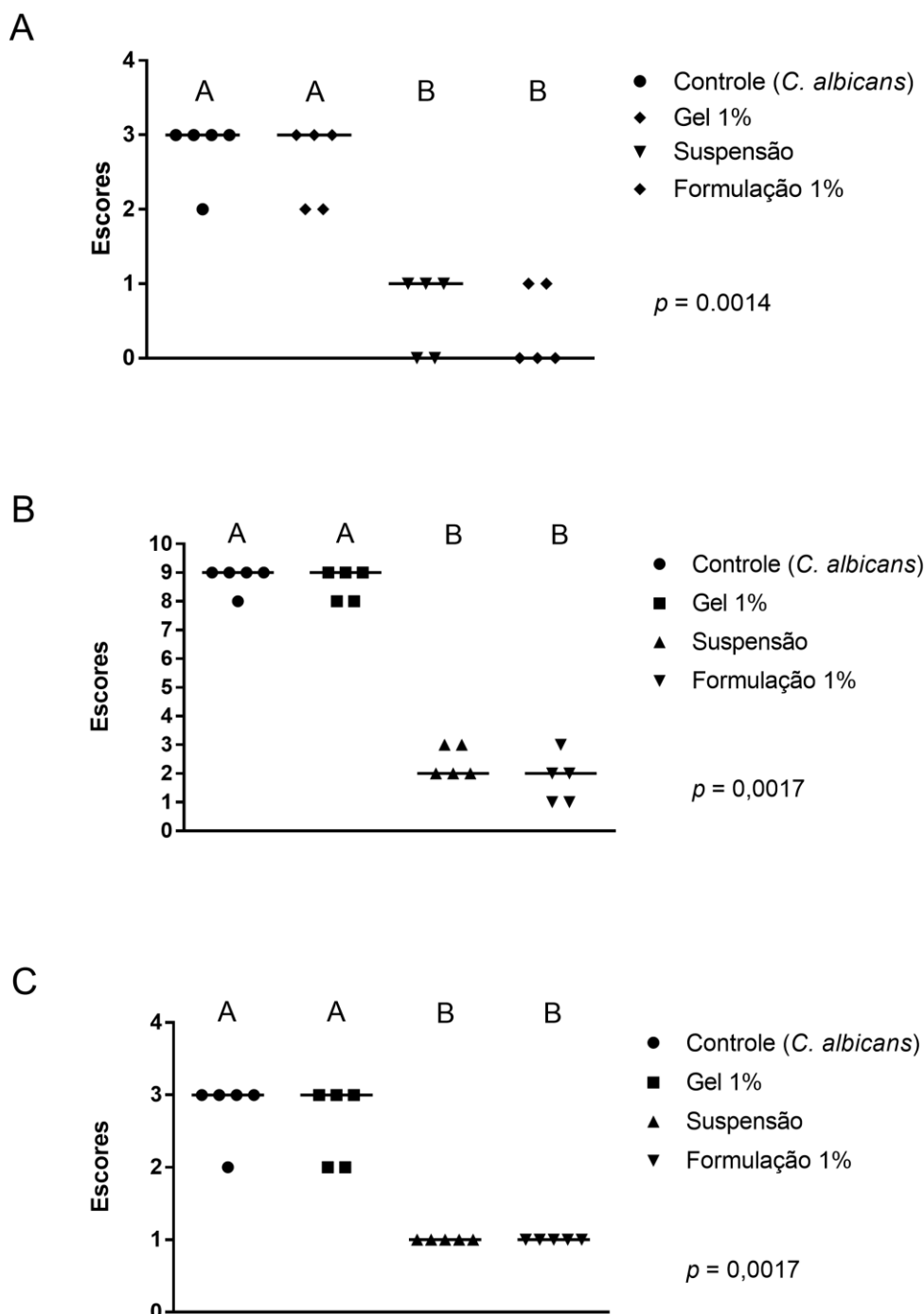
Figura 23 - Análise macroscópica do dorso da língua de camundongos infectados com *C. albicans*



Legenda: A) Aspectos da língua do dorso de camundongos tratados com PBS (grupo Controle), *gellan gum* a 1% não incorporado a *L. paracasei* (grupo Gel 1%), suspensão de *L. paracasei* 28.4 e formulação probiótica de 1%. Nos grupos não tratados com *L. paracasei*, é possível observar a presença de manchas brancas de candidíase (→); B) Escores obtidos na quantificação de lesões macroscópicas de camundongos tratados com PBS (grupo Controle), *gellan gum* a 1% não incorporado a *L. paracasei* (grupo Gel 1%), suspensão de *L. paracasei* 28.4 e formulação probiótica de 1% (Kuskal-Wallis e após o teste de Dunn, letras diferentes correspondem à significância estatística entre os grupos).

Fonte: Elaborada pelo autor.

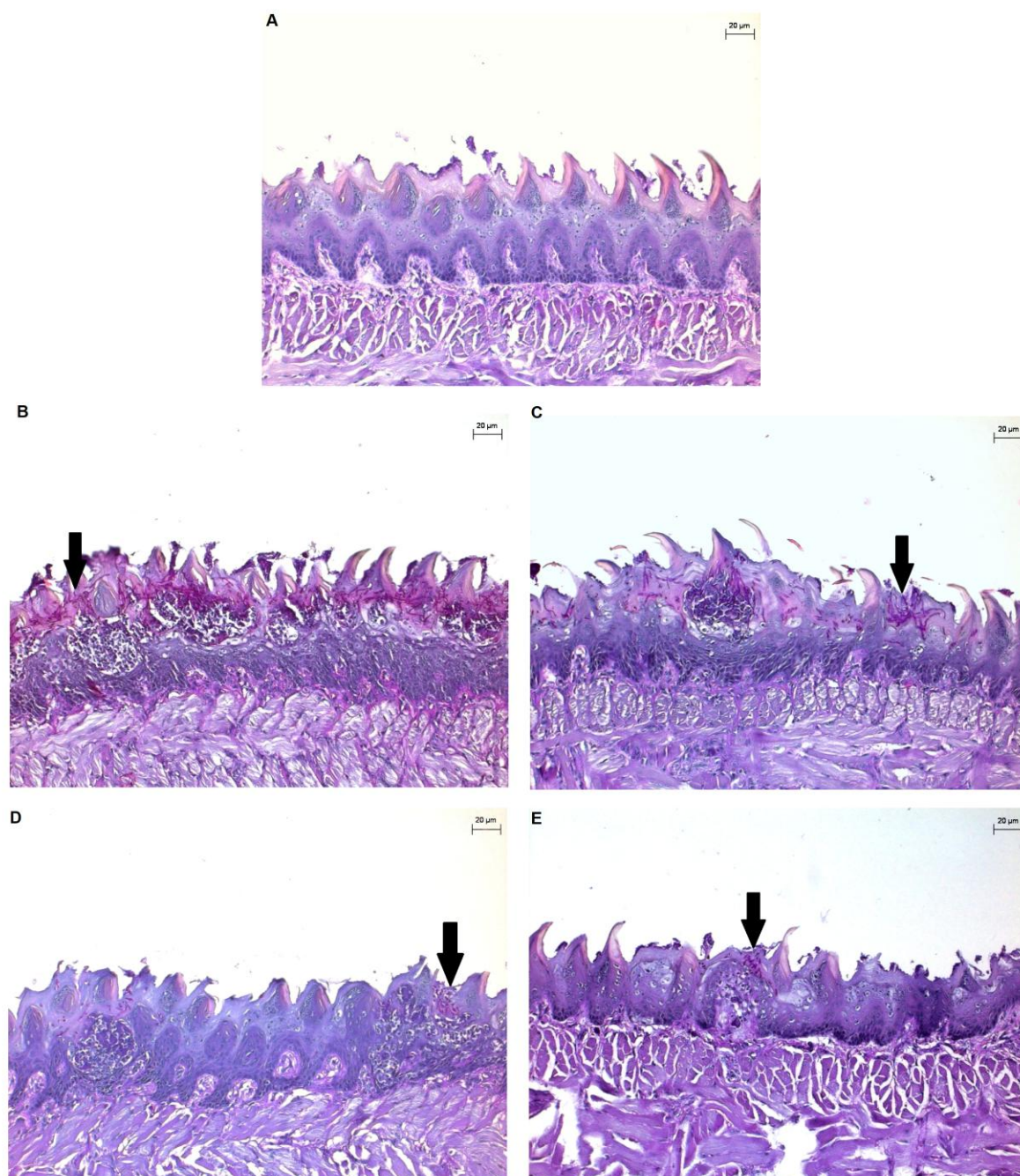
Figura 24 - Análise microscópica do dorso da língua de camundongos infectados com *C. albicans*



Legenda: Escores e mediana obtidos a partir da contagem de leveduras e hifas (A), lesões epiteliais (B) e infiltrado inflamatório (C) do dorso da língua de camundongos tratados com PBS (grupo controle), *gellan gum* a 1% não incorporado a *L. paracasei* (grupo Gel 1%), suspensão de *L. paracasei* 28.4 e formulação probiótica de 1% (Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn: letras diferentes correspondem à diferença estatisticamente significativa entre os grupos).

Fonte: Elaborada pelo autor.

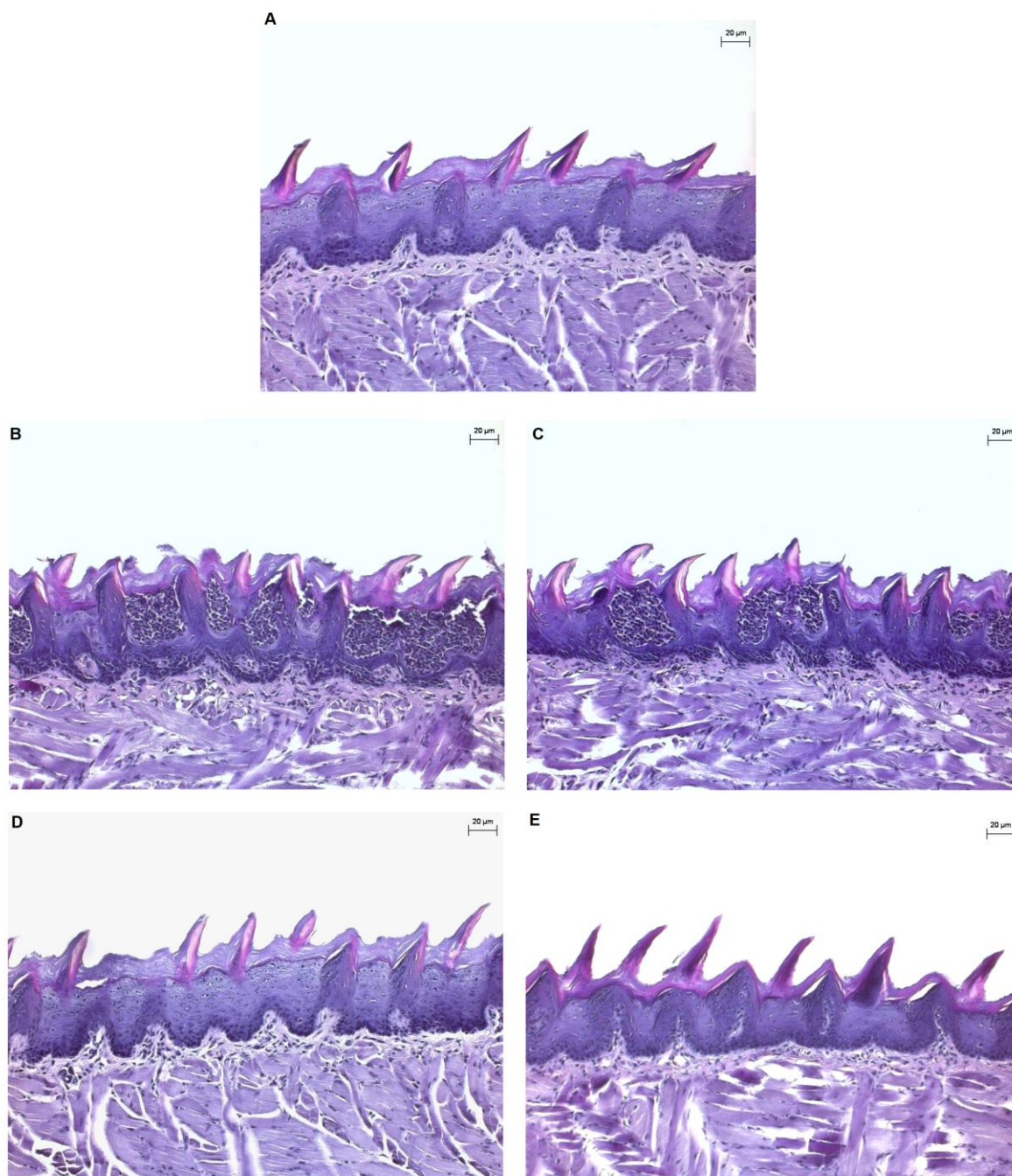
Figura 25 - Análise microscópica da língua do dorso de camundongos. Imagens de cortes histológicos corados por ácido periódico-Schiff (PAS)



Legenda: **A.** camundongos não infectados por *C. albicans*; **B.** camundongos infectados por *C. albicans* e tratados com PBS; **C.** camundongos infectados por *C. albicans* e tratados com *gellan gum* a 1% não incorporada com *L. paracasei*; **D.** infectados por *C. albicans* e tratados com suspensão de *L. paracasei* 28.4; **E.** camundongos infectados por *C. albicans* e tratados com formulação probiótica de 1%. Hifas e leveduras podem ser observadas na camada epitélio-queratinizada (→).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 26 - Análise microscópica da língua do dorso de camundongos. Imagens de cortes histológicos corados por hematoxilina-eosina (H&E)



Legenda: **A.** camundongos não infectados por *C. albicans*; **B.** camundongos infectados por *C. albicans* e tratados com PBS; **C.** camundongos infectados por *C. albicans* e tratados com *gellan gum* a 1% não incorporada com *L. paracasei*; **D.** infectados por *C. albicans* e tratados com suspensão de *L. paracasei* 28.4; **E.** camundongos infectados por *C. albicans* e tratados com formulação probiótica de 1%. Podem ser observados microabcessos intraepiteliais e infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados do estudo *in vivo* demonstraram que a formulação probiótica contendo 1% de *gellan gum* foi capaz de fornecer uma liberação local de *L. paracasei* na cavidade oral, resultando em colonização dessa cepa probiótica e redução da colonização de *C. albicans*, que conseqüentemente levou à diminuição das lesões de candidose bucal.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, utilizamos o *gellan gum* como sistema de carreamento de *L. paracasei* 28.4 para a cavidade bucal, com o objetivo de inibir o crescimento de *C. albicans* e, conseqüentemente, o desenvolvimento de candidose. Primeiro, realizamos uma série de experimentos para criar uma composição de *gellan gum* capaz de incorporar as células de *L. paracasei* 28.4, manter a viabilidade bacteriana e proporcionar um adequado sistema de liberação. Assim, verificamos que formulações contendo concentrações de *gellan gum* variando de 0,6 a 1% (p/v) foram capazes de incorporar *L. paracasei* 28.4, além de manter a viabilidade celular por 7 dias quando armazenadas à temperatura ambiente ou a 4°C. No entanto, períodos prolongados de armazenamento exigiram a liofilização das formulações probióticas. Interessantemente, as formulações probióticas exibiram maior liberação de *L. paracasei* na saliva artificial do que em PBS. A seguir, verificamos que as células de *L. paracasei* liberadas foram capazes de inibir o crescimento, a formação de biofilme e a filamentação de *C. albicans*, demonstrando que o processo de encapsulamento e liberação não alterou o fenótipo antifúngico da cepa 28.4. Por fim, o estudo *in vivo* em camundongos confirmou a capacidade das formulações probióticas em promover a colonização oral por *L. paracasei* e impedir o crescimento de *C. albicans* e lesões de candidose.

Até o presente momento, este é o primeiro estudo que utilizou *gellan gum* para incorporar células de *Lactobacillus* para o controle de infecções orais. Embora os probióticos tenham sido incorporados em uma gama de produtos (alginato, quitosana, proteínas de soro de leite, ftalato de acetato de celulose) (Gbassi, Vandamme, 2012), o *gellan gum* foi escolhido por ser um polissacarídeo natural não tóxico, aprovado pela US Food and Drug Administration (FDA) como aditivo alimentar com grande potencial para ser empregado pelas indústrias farmacêuticas no encapsulamento de antibióticos e células (Coutinho et al., 2010; D' Arrigo et al., 2014; Zhu et al., 2015). Além disso, o *gellan* fornece hidrogéis fisicamente reticulados que são mecanicamente robustos em comparação com outros polissacarídeos usados em formulações farmacêuticas. Essa estabilidade

aprimorada pode ser atribuída ao mecanismo de gelificação dupla, que depende tanto das interações iônicas quanto da agregação helicoidal (Shukla, Shukla, 2018).

Para este trabalho, aproveitamos as propriedades antifúngicas recentemente identificadas de *L. paracasei* 28.4, um isolado adquirido da cavidade oral (Rossoni et al., 2018). O uso desta cepa probiótica representa uma vantagem desse estudo, tendo em vista que a maior parte das cepas usadas em produtos comerciais foram isoladas do intestino humano ou animal (Pradeep et al., 2014). Em nossos estudos anteriores, mostramos que a cepa *L. paracasei* 28.4 teve atividade inibitória no crescimento de *C. albicans*, resultando em diminuição dos genes de virulência (ALS3, HWP1, EFG1 e CPH1), impedindo o desenvolvimento de biofilme e retardando a formação de hifas (Rossoni et al., 2018). Os efeitos antifúngicos da cepa *L. paracasei* 28.4 também foram confirmados em modelos animais (Rossoni et al., 2018; Rossoni et al., 2017; Santos et al., 2019; de Barros et al., 2018). Rossoni et al. (2017) demonstraram que *L. paracasei* 28.4 foi capaz de prolongar a sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com uma dose letal de *C. albicans*. Esse efeito foi correlacionado com a capacidade de *L. paracasei* 28.4 em estimular o sistema imunológico de *G. mellonella* pelo recrutamento de hemócitos circulantes e produção de níveis elevados de peptídeos antifúngicos. Barros et al. (2018) também encontraram um efeito protetor de *L. paracasei* 28.4 contra candidose *in vivo* usando o modelo *Caenorhabditis elegans*, no qual a sobrevivência prolongada foi acompanhada pela inibição da filamentação de *C. albicans*. Santos et al. (2019) observaram que os efeitos protetores de *L. paracasei* 28.4 contra *C. albicans* se estenderam à espécie não *albicans*, incluindo *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*.

Neste estudo, inicialmente, investigamos se o *gellan gum* poderia incorporar as células de *L. paracasei* 28.4 e se essa incorporação poderia ser influenciada pelas concentrações do hidrogel. Sabe-se que a retenção física de células na matriz do hidrogel depende da tecnologia de encapsulamento utilizada, incluindo seleção de biomateriais (Gbassi, Vandamme, 2012), parâmetros de processo (Sipailiene, Petraityte, 2018) e biocompatibilidade do polímero com a cepa de bactérias (Jimenez-Pranteda et al., 2012). Os resultados obtidos mostraram que as formulações de *gellan gum* conseguiram incorporar *L. paracasei* 28,4 em todas as concentrações de *gellan* testadas, variando desde formas mais líquidas (0,6%) até

formas mais sólidas (1%). Essa característica pode ser altamente vantajosa na utilização de *gellan gum* como um sistema carreador de probióticos, uma vez que as formulações podem ser manipuladas de acordo com as necessidades específicas na cavidade bucal. Imediatamente após a incorporação de *L. paracasei* 28.4 em formulações de *gellan gum*, foi possível recuperar aproximadamente 7 log de UFC/mL em comparação com as células livres presentes na suspensão de *L. paracasei* (8 log UFC/mL), indicando que o processo de encapsulamento reduziu a viabilidade celular em apenas 1 log. Em geral, o processo de encapsulamento tem sido associado a uma diminuição da viabilidade celular de cepas probióticas (Santivarangkna et al., 2008; Falco et al., 2017). Falco et al. (2017) estudaram a incorporação de *Lactobacillus acidophilus* LA5 ao hidrogel de quitosana dextrano sulfato e encontraram uma redução em torno de 2-3 log na quantidade de células viáveis após 3 horas.

Vários fatores externos podem afetar a capacidade de sobrevivência de cepas probióticas durante o armazenamento: tempo, temperatura e teor de umidade. Por esse motivo, neste estudo, armazenamos as formulações probióticas em duas temperaturas diferentes: temperatura ambiente e 4°C (Sipailiene, Petraityte, 2018). Todas as formulações de *gellan gum* mostraram números semelhantes de células viáveis para ambas as temperaturas por até 6 dias. Após 7 dias, o número de células recuperadas da formulação de *gellan gum* a 0,7% foi maior para armazenamento a 4°C em comparação com a temperatura ambiente. No entanto, o impacto das temperaturas de armazenamento na viabilidade celular tornou-se mais evidente quando as formulações probióticas foram armazenadas por um longo período de tempo. O armazenamento de formulações probióticas à temperatura ambiente preservou a viabilidade celular por 11 semanas, enquanto o armazenamento a 4°C manteve a viabilidade celular por 14 semanas, embora tenha sido observada uma diminuição gradual nas células viáveis (4 log de UFC / mL).

Outra maneira de preservar as células probióticas é reduzir o conteúdo de água disponível por meio de liofilização (Broeckx et al., 2017). Portanto, neste estudo também testamos a formulação probiótica a 1% liofilizada para avaliar a capacidade de armazenamento a longo prazo à temperatura ambiente. *L. paracasei* 28.4 manteve a viabilidade até o final do período de estudo. O número de células recuperadas após 14 semanas não foi significativamente diferente das células

recuperadas após 1 semana (7 log). Resultados semelhantes foram encontrados por González-Ferrero et al. (2018) que verificaram que *Lactobacillus plantarum* CECT 220 e *Lactobacillus casei* CECT 475 incorporados em micropartículas de proteína de soja mantiveram-se viáveis por um período de 150 dias a 25°C em formulações liofilizadas. Li et al. (2016) também avaliaram a viabilidade celular de formulações probióticas em condições liofilizadas para armazenamento à temperatura ambiente por 4 semanas. Esses autores encapsularam *Lactobacillus rhamnosus* GG em esferas de hidrogel preparadas com pectina, glicose e cloreto de cálcio, verificando que essas formulações preservaram a viabilidade celular no mesmo nível da suspensão fresca de *L. rhamnosus*. Esses achados indicam que a liofilização de formulações probióticas pode aumentar a estabilidade e o prazo de validade do produto farmacêutico (Broeckx et al., 2017). Além disso, um ambiente estável fornecido por materiais biocompatíveis oferece proteção às células probióticas durante a reidratação (Gbassi, Vandamme, 2012).

De acordo com Gbassi e Vandamme (2012), quando os probióticos são encapsulados, é essencial garantir que as células sejam liberadas em meios que simulam fluidos biológicos. Neste estudo, avaliamos a liberação de *L. paracasei* 28.4 das formulações de *gellan gum* em dois meios diferentes, PBS e saliva artificial. Verificamos que o sistema de entrega de células de *L. paracasei* fornecido pelas formulações probióticas na saliva artificial foi mais eficiente do que em PBS. Possivelmente, esses efeitos ocorreram pela interação das enzimas salivares presentes na saliva artificial com o *gellan*, uma vez que a saliva utilizada neste estudo continha glicose oxidase, lactoperoxidase e lisozima. Entre elas, a lisozima é uma enzima antibacteriana importante que lisa a parede celular das bactérias e libera N-acetil-D-glucosamina. Alguns estudos demonstraram que os hidrogéis de polissacarídeos também podem sofrer hidrólise enzimática na presença de lisozima. Essa enzima quebra as ligações estruturais de diferentes tipos de hidrogéis (Xu et al., 2018). A atividade enzimática da lisozima nas formulações de *gellan gum* foi estudada por Xu et al. (2018) que encontraram uma taxa de degradação altamente dependente da concentração de lisozima. Além disso, quando analisamos o sistema de entrega das formulações probióticas na saliva artificial, verificamos a liberação de aproximadamente 10^6 células/mL de *L. paracasei* 28.4 no contato inicial com a saliva artificial, seguido por um declínio no número de células liberadas por hora. Esta

libertação imediata está tipicamente associada a uma liberação rápida de moléculas associadas à superfície (neste caso *L. paracasei* 28.4) da formulação de hidrogel. No entanto, essas formulações probióticas também apresentam uma liberação contínua do probiótico, uma vez que a estrutura do *gellan gum* é bem estável, necessitando de tempo para ser degradada, liberando seu conteúdo de maneira gradual (Carmona-Moran et al., 2016; Abbas, Marihal, 2014; Shukla, 2018) .

Tem sido relatado na literatura que, durante o processo de encapsulamento, as células probióticas podem sofrer danos em sua estrutura e função (Nivoliez et al., 2012; Gbassi, Vandamme, 2012; Sipailiene et al., 2018). Assim, realizamos vários testes *in vitro* para verificar se *L. paracasei* 28.4 mantinha sua atividade antifúngica após incorporação em formulações de *gellan gum*. Os resultados mostraram que *C. albicans* foi inibida por *L. paracasei* 28.4 no teste de ágar sobreposição. Esses dados confirmaram que *L. paracasei* 28.4 manteve sua atividade antifúngica durante o processo de encapsulamento. Entretanto, as medidas de inibição do halo foram maiores nos grupos de suspensão de *L. paracasei* (1 a 1,9 cm) em relação aos grupos de formulações probióticas (3 a 7 mm). Este resultado pode estar associado a uma limitação do método de difusão em ágar, uma vez que o *gellan* pode ter atuado como uma barreira à difusão das células de *L. paracasei* no meio de cultura.

Além disso, foi verificado que *L. paracasei* 28.4 incorporado no *gellan gum*, também, manteve a atividade antifúngica sobre biofilmes de *C. albicans*, levando à uma diminuição no número de células viáveis, biomassa total e filamentação. Embora vários autores tenham demonstrado os efeitos inibitórios dos probióticos nos biofilmes de *Candida*, poucos estudos foram realizados com células de *Lactobacillus* incorporadas ao *gellan gum*. Ujaoney et al. (2017) avaliaram o efeito *in vitro* de suplementos probióticos disponíveis comercialmente em biofilmes de *C. albicans* formados na superfície de adesivos para próteses totais. Foram utilizadas quatro formulações probióticas: Accuflora® (mistura de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus salivarius*, *Streptococcus thermophilus*), Align® (*Bifidobacterium infantis* 35624, *Culturelle*® (*Lactobacillus GG*) e *Sustenex*® (*Bacillus coagulans* BC30). Somente os grupos tratados com os probióticos apresentaram redução na formação do biofilme de *C. albicans*, sendo estes mais finos e irregulares, quando comparados com o grupo controle.

Para avaliar a capacidade das formulações probióticas em proporcionar a colonização oral por *L. paracasei* 28.4, foram administradas formulações probióticas de 1% e 0,6% para camundongos saudáveis. Somente a formulação probiótica a 1% foi capaz de estabelecer colonização oral de *L. paracasei* 28.4. Estes resultados indicam que, embora as concentrações de *gellan gum* nas formulações não interfiram com suas propriedades de incorporação, manutenção da viabilidade celular ou liberação de *L. paracasei* 28.4, a concentração de *gellan gum* foi um fator determinante para a colonização oral em camundongos. Estes resultados podem ser explicados pelo tempo de retenção da formulação probiótica na cavidade bucal, que é determinado diretamente pela concentração de *gellan gum*. A concentração mais líquida de hidrogel (0,6%) levou a uma rápida deglutição, o que pode ter prejudicado a liberação de *L. paracasei* pela formulação probiótica. Enquanto a concentração mais sólida (1%) permaneceu na cavidade oral por mais tempo, permitindo maior liberação da bactéria.

Posteriormente, a formulação probiótica a 1% foi utilizada para estudar a candidose bucal. O pré-tratamento com a formulação probiótica ou suspensão fresca de *L. paracasei* foi capaz de reduzir 3 log UFC/mL de *C. albicans* em comparação ao grupo não tratado. Matsubara et al. (2012) também avaliaram os efeitos de *Lactobacillus* na colonização oral de *C. albicans* em camundongos, no entanto, apenas suspensões frescas de *Lactobacillus* foram testadas. Os autores encontraram uma redução de aproximadamente 2 log UFC/mL de *C. albicans* na mucosa oral de animais tratados com suspensões de *L. acidophilus* NCFM e *L. rhamnosus* Lr-32. Além da contagem de *C. albicans*, também analisamos a quantidade de *L. paracasei* 28.4 na cavidade bucal dos camundongos tratados. Esses resultados confirmaram que a redução da colonização por *Candida* alcançada pela formulação probiótica ocorreu pela presença física de *L. paracasei* na cavidade bucal, o que pode ter inibido o crescimento de *C. albicans* pela competição por sítios de ligação, pela produção de substâncias antimicrobianas e por estimulação do sistema imunológico.

Notavelmente, o efeito inibitório da formulação probiótica a 1% no crescimento de *C. albicans* foi capaz de proteger os camundongos das infecções por *Candida*. Maekawa et al. (2016) também encontraram efeito profilático do *Lactobacillus pentosus* S-PT84 contra infecções por *Candida* no trato

gastrointestinal. A ingestão de uma nova suspensão dessa cepa resultou em diminuição da adesão de *C. albicans* à mucosa estomacal, supressão da inflamação causada pela infiltração de neutrófilos, e reduziu a formação de placas esbranquiçadas diminuindo o número das lesões estomacais.

Em resumo, os resultados deste estudo demonstraram que o *gellan gum* pode ser um biomaterial interessante para uso como carreador de *L. paracasei* 28.4 na cavidade bucal, levando à uma redução significativa nas lesões e infecções induzidas por *C. albicans*. As propriedades do *gellan gum* em encapsular as células de *Lactobacillus*, manter a viabilidade celular durante o armazenamento e fornecer um sistema de entrega na cavidade oral suficiente para interagir com patógenos orais devem ser consideradas em estudos clínicos futuros com pacientes com fatores predisponentes para candidose bucal.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no presente estudo podemos concluir que:

- a) *Gellan gum* foi um biomaterial capaz de incorporar as células de *L. paracasei* 28.4 e manter sua viabilidade celular;
- b) *Gellan gum* manteve as células de *L. paracasei* 28.4 viáveis por 7 dias em temperatura ambiente e a 4°C. Entretanto, foi necessária a liofilização da formulação probiótica para o armazenamento em períodos prolongados;
- c) As formulações probióticas foram capazes de liberar as células de *L. paracasei* 28.4 tanto na presença de PBS como em saliva artificial, porém o sistema de liberação foi mais eficaz na saliva artificial;
- d) *L. paracasei* 28.4 manteve suas propriedades antifúngicas após incorporação no *gellan gum*, que foi confirmado pela inibição do crescimento, formação de biofilme e redução da filamentação de *C. albicans*;
- e) A formulação probiótica foi capaz de promover a liberação e colonização de *L. paracasei* 28.4 na cavidade bucal de camundongos saudáveis;
- f) A formulação probiótica conseguiu proteger os camundongos da infecção por *C. albicans*, reduzindo as lesões clínicas e danos teciduais da candidose bucal no dorso da língua.

REFERÊNCIAS*

- Abbas Z, Marihal S. Gellan gum-based mucoadhesive microspheres of almotriptan for nasal administration: formulation optimization using factorial design, characterization, and in vitro evaluation. *J Pharm Bioall Sci.* 2014;6(4):267-77
- Abrantes PMDS, McArthur CP, Africa CW. Multi-drug resistant oral *Candida* species isolated from HIV-positive patients in South Africa and Cameroon. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;79(2):222-7.
- Agnihotri SA, Jawalkar SS, Aminabhavi TM. Controlled release of cephalexin through gellan gum beads: effect of formulation parameters on entrapment efficiency, size, and drug release. *Eur J Pharm Biopharm.* 2006;63(3):249-61.
- Baccaglioni L, Atkinson JC, Patton LL, Glick M, Ficarra G, Peterson DE. Management of oral lesions in HIV-positive patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;103 Suppl: S50 e 1-23.
- Bandara HM, K Cheung BP, Watt RM, Jin LJ, Samaranyake LP. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide inhibits *Candida albicans* hyphae formation and alters gene expression during biofilm development. *Mol Oral Microbiol.* 2013;28(1):54-69.
- Barros P De, Rossoni RD, Fuchs BB, Velloso S, Olavo A, Jorge C, et al. *Lactobacillus paracasei* modulates the immune system of *Galleria mellonella* and protects against *Candida albicans* infection. *Plos one.* 2017;1–17.
- Berberi A, Noujeim Z, Aoun G. Epidemiology of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus/Acquired immune deficiency syndrome patients and CD4+ counts. *J Int Oral Health.* 2015;7(3):20-3.
- Broeckx G, Vandenneuvel D, Henkens T, Kiekens S, van den Broek MFL, Lebeer S, et al. Enhancing the viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG after spray drying and during storage. *Int. J. Pharm.* [Internet]. Elsevier; 2017;534(1–2):35–41.
- Carmona-Moran CA, Zavgorodnya O, Penman AD, Kharlampieva E, Bridges SL, Hergenrother RW, et al. Development of gellan gum containing formulations for transdermal drug delivery: component evaluation and controlled drug release using temperature responsive nanogels. *Int. J. Pharm.* 2016;(1–2):465–76.
- Cassone A, Cauda R. *Candida* and candidiasis in HIV-infected patients: where commensalism, opportunistic behavior and frank pathogenicity lose their borders. *AIDS.* 2012;26(12):1457-72.
- Chiang ML, Chen HC, Chen KN, Lin YC, Lin YT, Chen MJ. Optimizing production of two potential probiotic *Lactobacilli* strains isolated from piglet feces as feed additives for weaned piglets. *Asian Australas J Anim Sci.* 2015;28(8):1-8.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2019 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Coronado-Castellote L, Jimenez-Soriano Y. Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. *J Clin Exp Dent*. 2013;5(5):279-86.

Costa AC, Pereira CA, Junqueira JC, Jorge AO. Recent mouse and rat methods for the study of experimental oral candidiasis. *Virulence*. 2013;4(5):391-9.

Costa AC, Pereira CA, Freire F, Junqueira JC, Jorge AO. Methods for obtaining reliable and reproducible results in studies of *Candida* biofilms formed in vitro. *Mycoses* 2013;56(6):614-22.

Cota E, Hoyer LL. The *Candida albicans* agglutinin-like sequence family of adhesins: functional insights gained from structural analysis. *Future Microbiol*. 2015:1-5.

Coutinho DF, Sant SV, Shin H, Oliveira JT, Gomes ME, Neves NM, et al. Modified gellan gum hydrogels with tunable physical and mechanical properties. *Biomaterials*. 2010;31(29):7494-502.

D'Arrigo G, Navarro G, Di Meo C, Matricardi P, Torchilin V. Gellan gum nanohydrogel containing anti-inflammatory and anti-cancer drugs: a multi-drug delivery system for a combination therapy in cancer treatment. *Eur J Pharm Biopharm*. 2014;87(1):208-16.

de Barros PP, Scorzoni L, Ribeiro F de C, Fugisaki LR de O, 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*. 2018:80-7.

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

Elahi S, Pang G, Clancy A, Clancy R. Enhanced clearance of *Candida albicans* from the oral cavities of mice following oral administration of *Lactobacillus acidophilus*. *Clin Exp Immunol*. 2005;141(1):29-36.

Falco CY, Sotres J, Rascón A, Risbo J, Cárdenas M. Design of a potentially prebiotic and responsive encapsulation material for probiotic bacteria based on chitosan and sulfated β -glucan. *J. Colloid Interface Sci*. 2017;1(481):97-106.

Garcia-Cuesta C, Sarrion-Perez MG, Bagan JV. Current treatment of oral candidiasis: a literature review. *J Clin Exp Dent*. 2014;6(5):576-82.

Gbassi GK, Vandamme T. Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics*. 2012;4(1):149–63.

González-Ferrero C, Irache JM, González-Navarro CJ. Soybean protein-based microparticles for oral delivery of probiotics with improved stability during storage and gut resistance. *Food Chem*. 2018;239:879–88.

Gonzalez-Hernandez LA, Jave-Suarez LF, Fafutis-Morris M, Montes-Salcedo KE, Valle-Gutierrez LG, Campos-Loza AE, et al. Synbiotic therapy decreases microbial translocation and inflammation and improves immunological status in HIV-infected patients: a double-blind randomized controlled pilot trial. *Nutr J*. 2012;11:90.

Haghshenas B, Nami Y, Haghshenas M, Abdullah N, Rosli R, Radiah D, et al. Bioactivity characterization of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Microbiologyopen*. 2015:1-11.

Hebecker B, Naglik JR, Hube B, Jacobsen ID. Pathogenicity mechanisms and host response during oral *Candida albicans* infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014;12(7):867-79.

Holmes AR, Rodrigues E, Van der Wielen P, Lyons KM, Haigh BJ, Wheeler TT, et al. Adherence of *Candida albicans* to silicone is promoted by the human salivary protein SPLUNC2/PSP/BPIFA2. *Mol Oral Microbiol*. 2014;29(2):90-8.

Jimenez-Pranteda ML, Poncelet D, Nader-Macias ME, Arcos A, Aguilera M, Monteoliva-Sanchez M, et al. Stability of lactobacilli encapsulated in various microbial polymers. *J Biosci Bioeng*. 2012;113:179-84.

Juarez Tomás MS, De Gregorio PR, Leccese Terraf MC, Nader-Macias ME. Encapsulation and subsequent freeze-drying of *Lactobacillus reuteri* CRL 1324 for its potential inclusion in vaginal probiotic formulations. *Eur J Pharm Sci*. 2015;79:87-95.

Junqueira JC. Model hosts for the study of oral candidiasis. *Adv Exp Med Biol*. 2012;7(10):95-105.

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

Junqueira JC, Fuchs BB, Muhammed M, Coleman JJ, Suleiman JM, Vilela SF, et al. Oral *Candida albicans* isolates from HIV-positive individuals have similar in vitro biofilm-forming ability and pathogenicity as invasive *Candida* isolates. *BMC Microbiol* 2011;4:247-57.

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

Junqueira JC, Vilela SFG, Rossoni RD, Barbosa JO, Costa ACBP, Rasteiro VMC, et al. Oral colonization by yeasts in HIV-positive patients in Brazil. *Rev do Instit de Med Trop de São Paulo*. 2012;54(1):17-24.

Kubo W. Oral sustained delivery of paracetamol from in situ-gelling gellan and sodium alginate formulations. *Int J of Pharm*. 2003;258(1-2):55-64.

- Li R, Zhang Y, Polk DB, Tomasula PM, Yan F, Liu L. Preserving viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in vitro and in vivo by a new encapsulation system. *J Control Release*. 2016;230:79-87.
- Liu JY, Shi C, Wang Y, Li WJ, Zhao Y, Xiang MJ. Mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from Shanghai, China. *Res Microbiol*. 2015;166(3):153-61.
- Maekawa T, Ishijima SA, Ida M, Izumo T, Ono Y, Shibata H, et al. Prophylactic effect of *Lactobacillus pentosus* strain s-pt84 on *Candida* infection and gastric inflammation in a Murine gastrointestinal Candidiasis model. *Med Mycol J*. 2016;57(4):E81–92.
- Mahdi MH, Conway BR, Smith AM. Evaluation of gellan gum fluid gels as modified release oral liquids. *Int J Pharm*. 2014;475(1-2):335-43.
- Matsubara VH, Wang Y, Bandara HM, Mayer MP, Samaranayake LP. Probiotic lactobacilli inhibit early stages of *Candida albicans* biofilm development by reducing their growth, cell adhesion, and filamentation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;00(14):6415-26.
- Miyazaki S, Aoyama H, Kawasaki N, Kubo W, Attwood D. In situ-gelling gellan formulations as vehicles for oral drug delivery. *J Control Release*. 1999;60(2-3):287-95.
- Moges B, Bitew A, Shewaamare A. Spectrum and the in vitro antifungal susceptibility pattern of yeast isolates in ethiopian HIV patients with oropharyngeal candidiasis. *Int J Microbiol*. 2016;2016:3037817.
- Nivoliez A, Camares O, Paquet-Gachinat M, Bornes S, Forestier C, Veisseire P. Influence of manufacturing processes on in vitro properties of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35®. *J Biotechnol*. 2012;160(3–4):236–41.
- Novac O, Lisa G, Profire L, Tuchilus C, Popa MI. Antibacterial quaternized gellan gum based particles for controlled release of ciprofloxacin with potential dermal applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;35:291-9.
- Olle B. Medicines from microbiota. *Nat Biotechnol*. 2013;31(4):309-15.
- Oliveira JT, Gardel LS, Rada T, Martins L, Gomes ME, Reis RL. Injectable gellan gum hydrogels with autologous cells for the treatment of rabbit articular cartilage defects. *J Orthop Res*. 2010;28(9):1193-9.
- Osmalek T, Froelich A, Tasarek S. Application of gellan gum in pharmacy and medicine. *Int J Pharm*. 2014;466(1-2):328-40.
- Patton LL. Current strategies for prevention of oral manifestations of human immunodeficiency virus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2016;121(1):29-38.

Pradeep K, Kuttappa MA, Prasana KR. Probiotics and oral health: an update. *SADJ*. 2014;69(1):20-4.

Posadowska U, Brzychczy-Wloch M, Pamula E. Injectable gellan gum-based nanoparticles-loaded system for the local delivery of vancomycin in osteomyelitis treatment. *J Mater Sci Mater Med*. 2016;27(1):1-9.

Rivera-Espinoza Y, Gallardo-Navarro Y. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiol*. 2010;27(1):1-11.

Rong J, Zheng H, Liu M, Hu X, Wang T, Zhang X, et al. Probiotic and anti-inflammatory attributes of na isolate *Lactobacillus helveticus* NS8 from Mongolian fermented koumiss. *BMC Microbiol*. 2015;15(1):1-11

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

Rossoni RD, Barros PP De, De JA, Ribeiro FDC, Velloso S, Fuchs B, et al. Antifungal activity of clinical *Lactobacillus* strains against *Candida albicans* biofilms : identification of potential probiotic candidates to prevent oral candidiasis. *Biofouling*. 2018;7014:1–14.

Salvatori O, Puri S, Tati S, Edgerton M. Innate immunity and saliva in candida albicans-mediated oral diseases. *J Dent Res*. 2016;5(4):365-71.

Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. 2008;105:1-13.

Santos RB, Scorzoni L, Namba AM, Rossoni RD, Jorge AOC, Junqueira JC. *Lactobacillus* species increase the survival of *Galleria mellonella* infected with *Candida albicans* and non-albicans *Candida* clinical isolates. *Med Mycol*. 2019;57:391-4.

Seneviratne CJ, Rosa EA. Editorial: antifungal drug discovery: new theories and new therapies. *Front Microbiol*. 2016;7:728.

Shukla A, Shukla S. Tunable antibiotic delivery from gellan hydrogels. *Journal of Materials Chemistry B*. 2018;40(6):6444-58.

Šipailienė A, Petraitytė S. Encapsulation of probiotics: proper selection of the probiotic strain and the influence of encapsulation technology and materials on the viability of encapsulated microorganisms. *Probiotics Antimicrob. Proteins*. 2018;10(1):1-10.

Son SH, Jeon HL, Yang SJ, Lee NK, Paik HD. In vitro characterization of *Lactobacillus brevis* KU15006, an isolate from kimchi, reveals anti-adhesion activity against foodborne pathogens and antidiabetic properties. *Microb Pathog*. 2017;112:135-41.

Song Y, Kato N, Liu C, Matsumiya Y, Kato H, Watanabe K. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microbiology Letters*. 2000;187(2):167-73.

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

Thompson GR, 3rd, Patel PK, Kirkpatrick WR, Westbrook SD, Berg D, Erlandsen J, et al. Oropharyngeal candidiasis in the era of antiretroviral therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;109(4):488-95.

Ujaoney S, Wang J, Taifour L, Chandra J, Faddoul F, Chane M, et al. Effect of Probiotics on the ability of *Candida albicans* to form biofilms in vitro. *North Coast Spring Dent. Meet*. 2012;88(3):183–9.

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

Xu Z, Li Z, Jiang S, Brattlie KM. Chemically modified gellan gum hydrogels with tunable properties for use as tissue engineering scaffolds. *ACS Omega*. 2018;3(6):6998–7007.

Wescombe PA, Hale JD, Heng NC, Tagg JR. Developing oral probiotics from *Streptococcus salivarius*. *Future Microbiol*. 2012;7(12):1355-71.

Zhang LW, Fu JY, Hua H, Yan ZM. Efficacy and safety of miconazole for oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Oral Dis*. 2016;22(3):185-95.

Zhu L, Ao J, Li P. A novel in situ gel base of deacetylase gellan gum for sustained ophthalmic drug delivery of ketotifen: in vitro and in vivo evaluation. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:3943-9.

ANEXO A -- Certificado do Comitê de Ética



CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 15/2016, intitulado:- "**Desenvolvimento de formulações probióticas para a prevenção da candidose bucal**" sob a responsabilidade de **FELIPE DE CAMARGO RIBEIRO**, tendo como orientadora a Profa.Dra. **JULIANA CAMPOS JUNQUEIRA** e que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA – ICT – CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS-UNESP), em reunião de 10/02/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	10/02/2017 a 30/10/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo/heterogênico Wistar
Nº de Animais	60
Peso/idade	30-45 grs / 60 dias
Sexo	MACHO
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP

São José dos Campos, 10 de fevereiro de 2017

Profa.Dra. **PAULA CAROLINA KOMORI DE CARVALHO**
Coordenadora