



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

FELIPE EDUARDO DE OLIVEIRA

**EFEITOS IMUNOMODULADORES E ATIVIDADE ANTI-
Candida DE LACTOBACILOS COM PROPRIEDADES
PROBIÓTICAS EM MACRÓFAGOS E EM MODELO
INVERTEBRADO DE *Galleria mellonella***

2017

FELIPE EDUARDO DE OLIVEIRA

**EFEITOS IMUNOMODULADORES E ATIVIDADE ANTI-*Candida* DE
LACTOBACILOS COM PROPRIEDADES PROBIÓTICAS EM
MACRÓFAGOS E EM MODELO INVERTEBRADO DE
*Galleria mellonella***

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Microbiologia e Imunologia.

Orientadora: Profa. Adj. Luciane Dias de Oliveira

Co-orientadora: Profa. Dra. Mariella Vieira Pereira Leão

São José dos Campos

2017

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2017]. 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).

Oliveira, Felipe Eduardo De

Efeitos imunomoduladores e atividade anti-Candida de lactobacilos com propriedades probióticas em macrófagos e em modelo invertebrado de *Galleria mellonella* / Felipe Eduardo De Oliveira. - São José dos Campos : [s.n.], 2017.

80 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, 2017.

Orientadora: Luciane Dias De Oliveira

Coorientadora: Mariella Vieira Pereira Leão

1. Imunomodulação. 2. *Lactobacillus* spp. 3. *Candida* spp. 4. Macrófagos. 5. *Galleria mellonella*. I. Oliveira, Luciane Dias De, orient. II. Leão, Mariella Vieira Pereira, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj Luciane Dias de Oliveira (Orientadora)

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

Profa. Dra. Ana Paula Candido Santos

Universidade Braz Cubas
Faculdade de Odontologia
Campus de Mogi das Cruzes

Profa. Dra. Michelle Cardoso de Sousa

Universidade Braz Cubas
Faculdade de Odontologia
Campus de Mogi das Cruzes

Profa. Dra. Graziella Nuernberg Back Brito

Faculdade de Pindamonhangaba
Campus de Pindamonhangaba

Profa. Adj. Estela Kaminagakura Tango

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

São José dos Campos, 08 de Fevereiro de 2017

DEDICATÓRIA

A Deus

A minha mãe

A todos meus amigos

Aos meus alunos

AGRADECIMENTOS

Nem todas as palavras do mundo são capazes de demonstrar a minha real gratidão por todas as pessoas que, de algum modo, me ajudaram a chegar ao fim dessa fase tão importante da minha vida. No entanto, jamais encararia isso como uma obrigação. Na verdade, ao agradecer, abrimos os olhos para ver o quanto Deus foi generoso e colocou pessoas maravilhosas em nossas vidas, as quais nos estenderam a mão quando precisamos. Agradecer nos faz perceber o quanto se é querido e amado. Agradecer nos faz retribuir amor.

Embora algumas vezes me faltem palavras, e desde já peço desculpas por isso, garanto que jamais faltarão afeto e sinceridade no meu “muito obrigado”.

Agradeço em primeiro lugar a Deus, meu arco-íris depois de todas as tempestades. Agradeço a Ele pelo dom da vida, por todas as lições que aprendi, por ser um Pai bondoso e generoso comigo. Mais que tudo, agradeço a Ele pelas experiências e pessoas incríveis que colocou em meu caminho para o meu amadurecimento.

Agradeço a minha mãe, Diovana Aparecida dos Santos Napoleão, a pessoa por quem eu nutrirei amor eterno e incondicional. Não há pessoa nesse mundo que mereça mais o meu amor que ela. Hoje eu posso afirmar que nenhuma diferença, das tantas que já tivemos, chega perto da infinitude do que sinto por você.

Agradeço ao Instituto de Ciência e Tecnologia – UNESP e ao Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal por toda a formação que tive como profissional da saúde.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, a

todos os professores e secretários do curso por sempre me ajudarem e estarem ao meu lado.

Agradeço a minha orientadora, Prof. Adj. Luciane Dias de Oliveira, por ter acreditado e investido em mim desde o primeiro momento. Sua amizade é um tesouro. Graças a minha orientadora, eu cresci como profissional e como pessoa. Onde quer que eu vá, sempre haverá uma parte dela comigo porque é nela que me espelho. O orgulho e a sorte de ser orientado por ela é algo que se torna difícil de colocar em poucas palavras. Obrigado por tudo professora, te quero muito bem e muito feliz.

Agradeço a minha co-orientadora, Prof. Dra. Mariella Vieira Pereira Leão, por sua ajuda e amizade sempre presentes.

Agradeço ao Prof. Titular Antonio Olavo Cardoso Jorge por todos os ensinamentos e paciência e por ter acreditado em mim.

Agradeço a Prof. Adj. Juliana Campos Junqueira pela paciência e doçura com a qual sempre me tratou e por servir de exemplo para todos.

Agradeço a Prof. Dra. Graziella Nuernberg Back-Brito, que além de integrante da banca, é uma grande amiga. Seu exemplo como profissional, paciência comigo durante a iniciação científica e carinho do dia-a-dia fizeram a convivência virar uma grande amizade. Obrigado por todas as conversas, incentivo e força que você já me deu.

Agradeço a Profa. Adj. Estela Kaminagakura Tango pelo aceite em participar da minha banca examinadora e pela parceria e amizade que criamos. Obrigado por ser sempre tão gentil e me incluir como um de seus alunos, professora.

Agradeço a Prof. Dra. Michelle Cardoso de Sousa por aceitar participar da minha banca examinadora, pela amizade sincera e por ter acreditado e confiado em mim. Você tem um espaço certo no meu coração, Michelle.

Agradeço a Prof. Dra. Ana Paula Candido Santos por aceitar participar da minha banca examinadora e pelo convívio, sempre leve e divertido. Agradeço muito pela simpatia com que me recebeu desde o primeiro dia de trabalho, pelo modo como me fez sentir querido. Obrigado por tudo, Ana.

Agradeço ao meu grande amigo, Prof. Dr. Bruno de Mello Matos por toda a amizade e companheirismo ao longo da minha graduação e pós-graduação. Você é um amigo sem igual, um irmão, e me faz muita falta.

Não poderia deixar de agradecer aos meus amigos de São José dos Campos, da minha antiga casa, Rodnei Rossoni, Tânia Mara, Lucélia Gonçalves, Rosemary Santana, Evelyn Santos e Beatriz Fonseca pela amizade tão grande e sincera. Formamos um grupo de amigos cheio de amor uns pelos os outros, nos importamos e comemoramos cada vitória, sem nunca deixar de nos consolarmos e ajudarmos nos momentos difíceis. Amo vocês, obrigado por tudo.

Gostaria de agradecer meus melhores amigos de vida Rosana Santos, Vera Cassini, Victor Cassini e Marcelo Moreira por sempre estarem ao meu lado, por sempre me apoiarem e nunca medirem esforços por mim. Obrigado por serem uma fonte de amor sem fim.

Agradeço também as minhas companheiras de casa e grandes amigas Denise Huarastaca, Karollyne Spigariol e Leticia Rodrigues pelo companheirismo, pela paciência e por toda a força que nos damos em tempos difíceis. Estarei sempre aqui para vocês, seja para o que for. Contem sempre com meu carinho, atenção e conselhos.

Agradeço a Érica Crastechini por essa amizade de anos, desde a graduação, que nos acompanhou na pós-graduação e certamente acompanhará pelo restante da vida. Você é única, Érica.

Não poderia deixar de agradecer a Vivian Narana Ribeiro El Achkar, minha amiga de graduação e pós-graduação. Trilhamos por muito tempo o mesmo caminho e a nossa amizade e cumplicidade só cresceu com o passar

desses 11 anos. Hoje posso afirmar que o amor que sinto por ela é algo sem igual. Obrigado por estar sempre ao meu lado, Gordinha.

Agradeço também a Camila Miorelli Girondi pela amizade incrível e divertida que me deu ao longo da graduação e que se estende até hoje. Eu tenho um carinho muito grande por você, Cá.

Gostaria de agradecer também ao Mestre Rodnei Dennis Rossoni e a Doutora Patrícia Pimentel de Barros pela ajuda na conclusão da parte experimental da minha tese. Sem o auxílio de vocês eu não teria conseguido.

Agradeço a todos meus colegas de pós-graduação dos cursos de Microbiologia e Imunologia, Patologia e Periodontia pelo convívio diário, pelas conversas, ajuda e companheirismo. Que o sucesso esteja sempre presente ao fim do caminho que vocês trilharem.

Agradeço aos técnicos do laboratório de Microbiologia e Imunologia, Sergio Alves e Domingos Pontes, por toda a ajuda, paciência e amizade ao longo de tantos anos.

Insiro aqui um agradecimento muito especial a Universidade Braz Cubas. Ser docente no ensino superior se tornou um sonho ao longo da minha graduação e foi lá que esse sonho se concretizou. Meu muito obrigado, em especial, aos cursos de Odontologia e de Tecnologia Óptica e Optometria, nos quais sou docente.

Não poderia deixar de agradecer a todos os meus alunos dos cursos de Odontologia e Tecnologia Óptica e Optometria. Meus alunos são parte importante do que sou, eles me fazem uma pessoa melhor a cada dia, a cada lição. Queria que soubessem que apesar do conteúdo sem fim, de eu não gostar que vocês saiam antes do horário e de alguns puxões de orelha, vocês são uma das partes mais importantes de toda a minha vida. Uma frase que ouvi e nunca mais esqueci foi uma fala de Dom Bosco: “Educação é coisa do coração”. Acreditem, coloco meu coração em todas as aulas e em tudo que faço para vocês

porque sou professor por amor, por acreditar que posso contribuir na formação de pessoas éticas, competentes e responsáveis para o futuro. Obrigado por tudo.

"Não há nada de nobre em sermos superiores ao próximo. A verdadeira nobreza consiste em sermos superiores ao que éramos antes." Esopo

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 PROPOSIÇÃO	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Análise das interações microbianas em macrófagos de camundongo: estudo <i>in vitro</i>	20
3.1.1 Cultura de macrófagos.....	20
3.1.2 Preparação das suspensões de lactobacilos.....	21
3.1.3 Preparação das suspensões de <i>Candida</i>	22
3.1.4 Ativação dos macrófagos e estimativa de fagocitose.....	23
3.1.5 Quantificação de citocinas	26
3.1.6 Quantificação de óxido nítrico	27
3.1.7 Ensaio de viabilidade de macrófagos ativados por <i>Lactobacillus</i> e <i>Candida</i> por azul de Alamar.....	29
3.1.8 Seleção das suspensões de lactobacilos.....	30
3.2 Análise das interações microbianas em <i>Galleria mellonella</i> : estudo <i>in vivo</i>	30
3.2.1 <i>Galleria mellonella</i>	30
3.2.2 Verificação da susceptibilidade de <i>Galleria mellonella</i> a <i>Candida krusei</i> e <i>Candida glabrata</i>	31
3.2.3 Verificação da susceptibilidade de <i>Galleria mellonella</i> a <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	32
3.2.4 Análise da sobrevivência de <i>G. mellonella</i> frente a infecção por <i>L. rhamnosus</i> e <i>C. albicans</i>	33

3.2.5 Contagem de UFC/larva na hemolinfa de <i>G. mellonella</i>	33
3.2.6 Contagem de hemócitos na hemolinfa de <i>G. mellonella</i>	34
3.3 Análise estatística	35
4 RESULTADO	36
4.1 Resultados <i>in vitro</i>	36
4.1.1 Análise da estimativa de fagocitose	36
4.1.2 Quantificação de citocinas e óxido nítrico	37
4.1.2.1 Fator de necrose tumoral- α	37
4.1.2.2 Interleucina-1 β	38
4.1.2.3 Interleucina-6.....	40
4.1.2.4 Interleucina-17.....	41
4.1.2.5 Óxido nítrico	42
4.1.3 Ensaio de viabilidade de macrófagos ativados por <i>Lactobacillus</i> e <i>Candida</i> por azul de Alamar.....	44
4.1.4 Seleção das suspensões de lactobacilos.....	45
4.2. Resultados <i>in vivo</i>	45
4.2.1 Verificação da susceptibilidade de <i>G. mellonella</i> a <i>C. krusei</i> e <i>C.</i> <i>glabrata</i>	45
4.2.2 Adequação da metodologia aos resultados obtidos em modelo invertebrado de <i>G. mellonella</i>	47
4.2.3 Cepas clínicas de <i>C. albicans</i>	48
4.2.4 Verificação da susceptibilidade de <i>G. mellonella</i> a <i>L. rhamnosus</i>	48
4.2.5 Análise da sobrevivência de <i>G. mellonella</i> frente ao tratamento com <i>L. rhamnosus</i> e infecção por <i>C. albicans</i>	49
4.2.6 Contagem de UFC/larva na hemolinfa de <i>G. mellonella</i>	52
4.2.7 Contagem de hemócitos na hemolinfa de <i>G. mellonella</i>	54
5 DISCUSSÃO	55

5.1 Análise das interações microbianas em macrófagos de camundongo: estudo <i>in vitro</i>.....	56
5.2 Análise das interações microbianas em <i>G. mellonella</i>: estudo <i>in vivo</i>	61
6 CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	66
ANEXO	79

Oliveira FE. Efeitos imunomoduladores e atividade anti-*Candida* de lactobacilos com propriedades probióticas em macrófagos e em modelo invertebrado de *Galleria mellonella* [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2017.

RESUMO

Muitos produtos probióticos são compostos pela associação de lactobacilos no intuito de potencializar seu efeito benéfico. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a imunomodulação e atividade anti-*Candida* causada por diferentes combinações de suspensões probióticas em macrófagos e em *Galleria mellonella*. *Lactobacillus rhamnosus* (LR), *L. acidophilus* (LA), e *L. paracasei* (LP) foram suspendidos para obtenção das suspensões LR, LA, LP, LR+LA, LR+LP, LA+LP e LR+LA+LP. Foram utilizadas suspensões de *Candida albicans* (CA) ATCC 18804, *C. krusei* (CK) ATCC 6258 e *C. glabrata* (CG) ATCC 9030. Macrófagos de camundongo (RAW 264.7) foram ativados por cada suspensão de lactobacilos e desafiados por cada uma das cepas fúngicas. Foram investigadas taxa de fagocitose, produção de citocinas e óxido nítrico e a viabilidade celular. A melhor suspensão probiótica para cada cepa fúngica seria usada nos testes *in vivo*, com *G. mellonella*, no entanto, devido à baixa virulência das espécies não-*albicans*, os testes *in vivo* prosseguiram com CA e LR. Duas cepas clínicas de CA foram acrescentadas: 21 e 60. Suspensões de LR foram injetadas na hemolinfa das larvas 24 h antes do desafio com as cepas fúngicas. Foram determinadas curva de sobrevivência, contagem de UFC/mL das cepas de *C. albicans* e de hemócitos. Os resultados foram analisados estatisticamente de acordo com a distribuição normal (ANOVA e Tukey ou Kruskal-Wallis e Dunn) e a curva de sobrevivência pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox), $p < 0,05$. As melhores suspensões para CA, CK e CG foram LR (com melhores resultados no perfil de citocinas), LP e LA (com melhores resultados sobre a fagocitose), respectivamente. Em *G. mellonella*, a suspensão de LR proporcionou aumento da percentagem de sobrevivência e do número de hemócitos e diminuição da contagem de UFC/mL em todos os grupos com diferenças estatisticamente significantes. Sendo assim, pode-se concluir que as suspensões de lactobacilos possuem potencial imunomodulador cepa dependente mas sua mistura não favorece essa qualidade. Além disso, possuem atividade anti-*Candida*, demonstrada pela diminuição na contagem de *Candida*.

Palavras-chave: Imunomodulação. *Lactobacillus* spp. *Candida* spp. Macrófagos. *Galleria mellonella*.

Oliveira FE. Immunomodulatory effects and anti-Candida activity of lactobacilli with probiotic properties in macrophages and invertebrate model Galleria mellonella [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2017.

ABSTRACT

Many probiotic products are composed by association of lactobacilli in order to potentiate their beneficial effect. Therefore, the objective of this study was evaluating the immunomodulation and anti-Candida activity caused by different combinations of probiotic suspensions in macrophages and in Galleria mellonella. Lactobacillus rhamnosus (LR), L. acidophilus (LA) and L. paracasei (LP) were suspended to obtain the suspensions LR, LA, LP, LR + LA, LR + LP, LA + LP and LR + LA + LP. Suspensions of Candida albicans (CA) ATCC 18804, C. krusei (CK) ATCC 6258 and C. glabrata (CG) ATCC 9030 were used. Mouse macrophages (RAW 264.7) were activated by each suspension of lactobacilli and then challenged by each fungal strain. Phagocytosis, cytokine and nitric oxide production and cell viability were investigated. The best lactobacilli suspension for each fungal strain would be used in the in vivo assays with G. mellonella, however, because of low virulence of the non-albicans species, *in vivo* tests were performed with CA and LR. Two clinical strains of CA were added: 21 and 60. LR suspensions were injected into the haemolymph of the larvae 24 h before challenging with fungal strains. Survival curve, CA strains CFU/mL counting and hemocytes were determined. The results were statistically analyzed according to their normal distribution (ANOVA and Tukey or Kruskal-Wallis and Dunn) and the survival curve by Log-rank test (Mantel-Cox), $p < 0.05$. The best suspensions for CA, CK and CG were LR (which obtained the best results in the cytokine profile), LP and LA (which obtained the best results on phagocytosis), respectively. In G. mellonella, LR suspension increased percentage survival and hemocyte counting and decreased CFU/mL counting in all groups, with statistically significant differences in the results. Thus, it can be concluded that the suspensions of lactobacilli have immunomodulatory potential strain-dependent but their association does not favor this quality. Besides, they showed anti-Candida activity, demonstrated by the decrease of Candida counting.

Keywords: Immunomodulation. Lactobacillus spp. Candida spp. Macrophages. Galleria mellonella.

1 INTRODUÇÃO

Leveduras do gênero *Candida* são os principais agentes causadores de infecções fúngicas em pacientes imunodeprimidos, pelo uso de drogas imunossupressoras, idade avançada e/ou doenças sistêmicas (Williams et al., 2011; Rossoni et al., 2014). Cerca de 96% de todas as micoses oportunistas são causadas por espécies *Candida* (Naglik et al., 2003; Pfaller, Diakema, 2007; Kourkumpetis et al., 2010).

As barreiras anatômicas, como a pele e as superfícies mucosas, protegem o corpo humano, além de secretarem ácidos, enzimas, muco e outras substâncias antimicrobianas. Quando essas barreiras são afetadas, em casos de cirurgia, uso de cateteres, radioterapia, queimaduras ou quimioterapia, agentes oportunistas podem atingir os tecidos profundos. As formas clínicas e gravidade das manifestações da doença dependem da resposta imune do hospedeiro (Marr et al., 2002; Brown, 2011; Romani, 2011; Badiee, Hashemizadeh, 2014).

Uma vez que os fungos invadem os tecidos, eles sofrem opsonização e os fagócitos são ativados por uma vasta gama de receptores para fagocitose e de sinalização (Brown, 2011), que incluem os receptores padrão de reconhecimento da célula hospedeira, como os receptores de lectina tipo C e receptores *Toll-like* (Bourgeois et al., 2010; Badiee, Hashemizadeh, 2014). Em indivíduos saudáveis e imunocompetentes, o sistema imune inato (neutrófilos e macrófagos) funciona como uma sentinela eficiente que fornece proteção contra as espécies de fungos por meio da fagocitose. Numerosas citocinas, como interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-17 e fator de necrose tumoral (TNF)- α , são importantes para direcionar as respostas imunes para fungos (Kullberg et al., 1999; Romani, 2011).

A frequência de infecções fúngicas invasivas e a resistência a terapia antifúngica continuam a crescer apesar da introdução de novos agentes

antifúngicos (Pfaller, Diakema, 2007). As taxas de insucesso dessas terapias permanecem elevadas e, o surgimento de cepas fúngicas resistentes é uma crescente preocupação (Postetaro et al., 2013). Por essa razão, pesquisadores buscam tratamentos alternativos contra infecções fúngicas. Fitoterapia (Okwuosa et al., 2012; Anibal et al., 2013; Kim J et al., 2013; Kosalec et al., 2013; Alili et al., 2014; Watson et al., 2014), terapia fotodinâmica (Chibebe Junior et al., 2013; Haidaris et al., 2013; Quishida et al., 2015; de Freitas-Pontes et al., 2014; Paz-Cristobal et al., 2014) e o uso de probióticos (Demirel et al., 2013; Kulakova et al., 2013; Kumar et al., 2013a; Kumar, Singhi, 2013b; Li D et al., 2014; Roy et al., 2014) estão entre os tratamentos emergentes mais estudados.

De acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), os probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro. Probióticos participam na modulação da resposta imune de diversas maneiras: aumentando a atividade fagocítica inespecífica por meio da ativação dos macrófagos (Cross, 2002; Jain et al., 2008), alterando a liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias (Amital et al., 2007; Chiu et al., 2010; Miyzawa et al., 2011; Dong et al., 2012; Zhao et al., 2012; Ganguli et al., 2013), competindo com os patógenos por nutrientes e sítios de fixação, prevenindo temporariamente a ação do patógeno ou liberando substâncias como bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e lactase (Cross, 2002; Coppola, Turnes, 2004; Muench et al., 2009; Kanmani et al., 2013). No entanto, suspensões probióticas podem ser constituídas pela associação de duas ou mais espécies (Mastromarino et al., 2002; Mendonça et al., 2012; Zhao et al., 2013, Yoon et al., 2015) sendo a modulação propiciada por essas suspensões cepa dependente (Chiu et al., 2010).

Várias espécies probióticas, de *Lactobacillus* spp., são amplamente usadas em pesquisas que visam esclarecer os seus benefícios para o hospedeiro (Liu et al., 2011; Matsubara et al., 2012; Villena et al., 2012; Yang et al., 2014; Yun et al., 2014). Dentre estes benefícios, temos relatado na literatura propriedades antimutagênicas (LeBlanc et al., 2005), anticarcinogênicas (Wollowski et al., 2001), antidiarréicas (Clancy, 2003), estimulação do sistema imunológico (Ashraf et al., 2014), prevenção de atopia e eczema (Wickens et al., 2008), redução da pressão arterial (Hlivak et al., 2005), redução dos níveis de colesterol (Hlivak et al., 2005), melhoria da resistência a doenças infecciosas (Li J et al., 2008), estimulação de crescimento (Ohashi, Ushida, 2009), melhora em doenças inflamatórias gastrointestinais (Ryan et al., 2009), manutenção da microbiota equilibrada e melhoria do metabolismo da lactose (Shieh et al., 2011).

A fim de estudar os probióticos e seus efeitos sobre o hospedeiro, pode-se utilizar diferentes ferramentas de pesquisa. Culturas celulares têm sido usadas para se verificar estes efeitos dos probióticos *in vitro* (Morita et al., 2002; Miyzawa et al., 2011; Tinrat et al., 2011; Silva et al., 2014). RAW 264.7 é uma linhagem celular de macrófagos de camundongo utilizada numa grande variedade de investigações (Kim YC et al., 2014; Oliveira et al., 2014; Phiphatwatcharaded et al., 2014), incluindo probióticos e o seu papel na atividade celular e defesa do hospedeiro como mostrado por: Villéger et al. (2014), que mostraram que alterações no LTA de diferentes cepas probióticas são capazes de alterar a produção de óxido nítrico por macrófagos, Cha et al. (2014) que desenvolveram formulações mistas de probióticos capazes de diminuir a produção de óxido nítrico em macrófagos tratados com lipopolissacarídeo, Huang et al. (2013), que com base em seus estudos, sugeriu que esporos de *Bacillus subtilis* B10 podem ativar os macrófagos e melhorar a sua função imune, Zakostelska et al. (2011) que apontaram o tratamento com

Lactobacillus casei DN-114 001 como supressor da produção de TNF- α de macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo, entre outros trabalhos.

Além de culturas celulares, estudos *in vivo*, com modelos invertebrados, também são valiosas ferramentas de investigação da patogenia fúngica. Dentre estes modelos invertebrados, temos *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), a traça da cera, um modelo emergente (Fuchs et al., 2010) e que tem sido utilizado com êxito para estudar patogênese e infecção por diferentes espécies fúngicas, tais como *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus* (Desalermos et al., 2012).

Embora haja diversos estudos sobre probióticos, ainda existe a necessidade do conhecimento dos efeitos das diferentes suspensões probióticas, isoladas ou em associação, na resposta imunológica às infecções fúngicas. Diferentes cepas são capazes de induzir diferentes respostas, e a associação entre elas pode se dar de maneira sinérgica, antagônica ou indiferente, influenciando a resposta imunológica. Assim, torna-se de grande importância avaliar o papel imunomodulador de diferentes suspensões probióticas, isoladas ou em associação, sobre macrófagos e *G. mellonella*, na presença de patógenos fúngicos, para ampliar a compreensão dos seus efeitos nos estados de doença e novos estudos contribuiriam para se determinar a melhor indicação terapêutica dos probióticos.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a imunomodulação e atividade anti-*Candida* propiciadas por cepas probióticas isoladas ou associadas, *in vitro*, em macrófagos, por meio de sua atividade fagocítica, viabilidade celular e da análise de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17) e, *in vivo*, em *Galleria mellonella*, por meio da análise da curva de sobrevivência, contagem de UFC/mL de *Candida* spp. e hemócitos em sua hemolinfa e produção de peptídeos com propriedade antifúngica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análise das interações microbianas em macrófagos de camundongo: estudo *in vitro*

3.1.1 Cultura de macrófagos

Foram utilizados macrófagos de camundongos da linhagem RAW 264.7, obtidos do banco de células da Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM, Rio de Janeiro, RJ). Essas células foram cultivadas com meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (completo), e incubadas em estufa à temperatura de 37°C, com umidade atmosférica contendo 5% de CO₂.

O meio de cultura foi trocado a cada dois dias e houve o controle de cada frasco de cultivo celular com auxílio de microscópio de luz invertida (Carl Zeiss - Alemanha). A partir do momento em que era constatado estado de confluência das células, o qual pode ser descrito pela ocupação de mais de 70% do frasco, foram realizados subcultivos celulares. Para esse subcultivo, o meio DMEM do frasco da cultura era aspirado, descartado e era acrescentado meio fresco, com o qual eram realizadas três lavagens, sendo descartado também. Novo meio de cultura era acrescentado e as células eram liberadas com a ajuda de um varredor celular e transferidas para tubo estéril de 50 mL. Em seguida, as células ressuspensas em meio fresco eram distribuídas em novos frascos de cultivo celular.

3.1.2 Preparação das suspensões de lactobacilos

Foram utilizadas as seguintes cepas de *Lactobacillus*: *L. rhamnosus* ATCC 7469, *L. acidophilus* - LA 14 (isolada do produto comercial Prolive-Aché®) e *L. paracasei* 19.1 (cepa isolada da cavidade bucal humana de um indivíduo adulto livre de cárie, de acordo com a aprovação do Comitê de Ética sob o protocolo 560.479 - ANEXO A). Todos os micro-organismos estavam mantidos em freezer a -80°C no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/ UNESP.

Para ativação desses micro-organismos, todas as cepas foram cultivadas em ágar Man-Rogosa-Shape (Himedia, Mumbai, India) por 4 dias a 37°C sob condições de microaerofilia (5% de CO₂).

A partir das colônias isoladas, e confirmadas pela coloração de Gram, foram obtidas colônias puras de cada cepa, as quais foram semeadas em caldo MRS. Após os cultivos, foram obtidas as suspensões das bactérias e suas associações, de acordo com o Quadro 1.

Para a preparação dessas diferentes suspensões, as culturas puras bacterianas de cada cepa foram centrifugadas por 5 min a 8300 Xg, separadamente, e os sobrenadantes descartados. Os sedimentos foram ressuspensos em solução fisiológica estéril e apirogênica e centrifugados duas vezes. Após a centrifugação, o sedimento foi ressuspenso em soro fisiológico estéril e apirogênico até a concentração de 5×10^7 (Cross et al., 2004) e 1×10^6 células/mL, padronizado em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm e densidade óptica final de 0,4. Ao final, foram obtidas três suspensões monoespécie, as quais fizeram parte dos experimentos e deram origem às suspensões multiespécies, como mostra o quadro 1. As suspensões multiespécies foram obtidas a partir da mistura das suspensões monoespécie em partes iguais.

Quadro 1 – Suspensões de lactobacilos e suas associações

Suspensão	Lactobacilos utilizados
LR	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
LC	<i>Lactobacillus casei</i>
LA	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
LR+LC	<i>L. rhamnosus</i> + <i>L. casei</i>
LR+LA	<i>L. rhamnosus</i> + <i>L. acidophilus</i>
LC+LA	<i>L. casei</i> + <i>L. acidophilus</i>
LR+LC+LA	<i>L. rhamnosus</i> + <i>L. casei</i> + <i>L. acidophilus</i>

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1.3 Preparação das suspensões de *Candida*

Foram utilizadas cepas padrão de *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida glabrata* (ATCC 9030) mantidas em freezer a -80°C no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/ UNESP.

As suspensões de cada cepa de *Candida* foram preparadas a partir de culturas em 5 mL de caldo YNB (Laboratórios Difco Inc, Detroit, MI, EUA) a 37°C por 24 h. A seguir, as células foram centrifugadas a 2000 Xg por 10 min, sendo o sobrenadante descartado. A seguir, o depósito foi ressuspensionado em PBS e misturado em agitador de tubos (Vortex) por 30 s. Essa lavagem das células foi repetida por mais 2 vezes. As concentrações celulares foram ajustadas em 1×10^6 ou 8×10^4 células viáveis/mL, dependendo do experimento, por meio de hemocítômetro.

3.1.4 Ativação dos macrófagos e estimativa de fagocitose

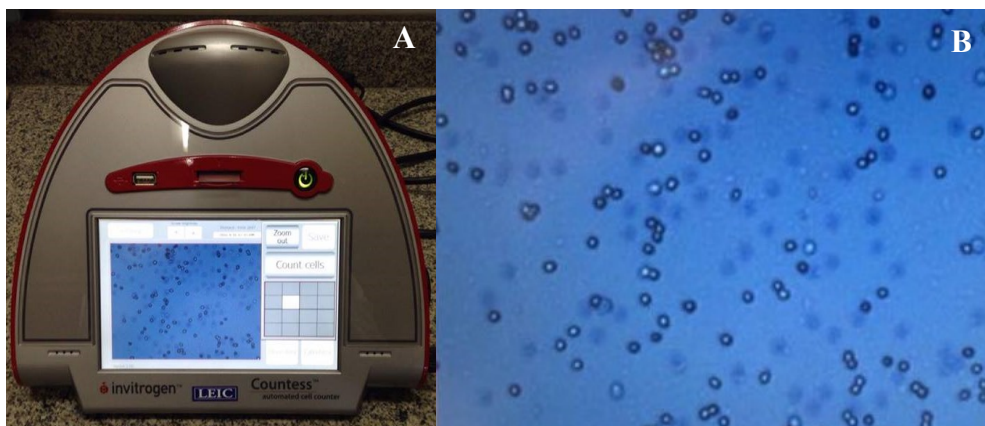
Para realização dos testes, foi realizada a contagem de células viáveis com o contador de células Countess (Invitrogen™) (Figura 1).

Os macrófagos foram distribuídos em microplacas de poliestireno de 24 poços (para os testes de detecção de citocinas e óxido nítrico) e 96 poços (para os testes de fagocitose e viabilidade celular), sendo que em cada placa foram colocadas 5×10^5 e 4×10^4 células viáveis/poço e meio DMEM completo até obter o volume final de 1 mL ou 200 μ L, respectivamente. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C e 5% de CO₂, para a aderência celular (Figura 2). Após, as células não aderidas foram removidas por meio de duas lavagens com soro fisiológico estéril e apirogênico. Foram acrescentados 500 μ L ou 100 μ L de meio DMEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Cross et al., 2004).

Alíquotas de 500 μ L ou 100 μ L de cada suspensão probiótica foram adicionadas, totalizando volume final de 1 mL ou 200 μ L. Para o grupo controle foi acrescentada solução fisiológica estéril e apirogênica. Em seguida, as placas foram incubadas por um período de 2,5 h a 37°C e 5% CO₂ (Figura 3A).

Após esse período, as placas tiveram seu conteúdo removido e passaram por nova lavagem com soro fisiológico estéril e apirogênico. Em seguida foram adicionados 500 ou 100 μ L de meio DMEM acrescido de penicilina e estreptomicina a 1% e 500 ou 100 μ L de uma das suspensões de *Candida* spp., perfazendo o volume final de 1 mL ou 200 μ L (Figura 3B). Para o grupo controle foi acrescentada solução fisiológica estéril e apirogênica. As placas foram novamente incubadas por um período de 2,5 h a 37°C e 5% CO₂.

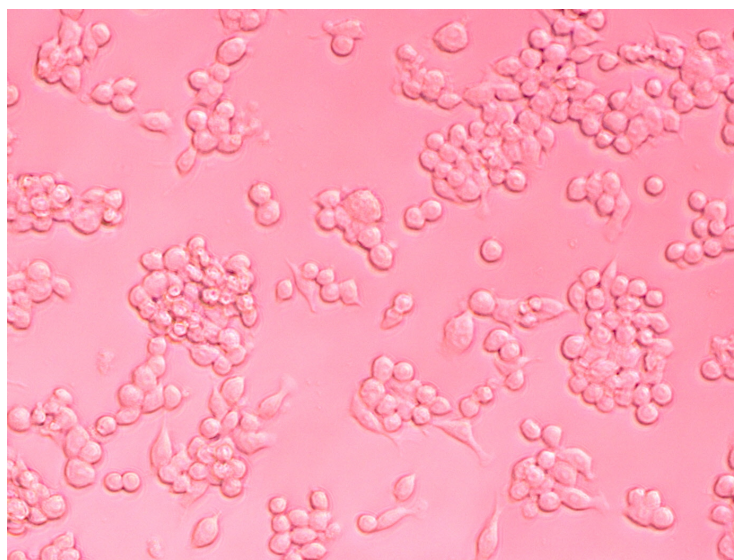
Figura 1 – Equipamento e procedimento utilizados para a contagem de células viáveis



Legenda: a) Contador de células Countess; b) Esquema mostrando as células viáveis (com a membrana celular impregnada por azul de Trypan e o citoplasma esbranquiçado) e não viáveis (células totalmente preenchidas pelo azul de Trypan).

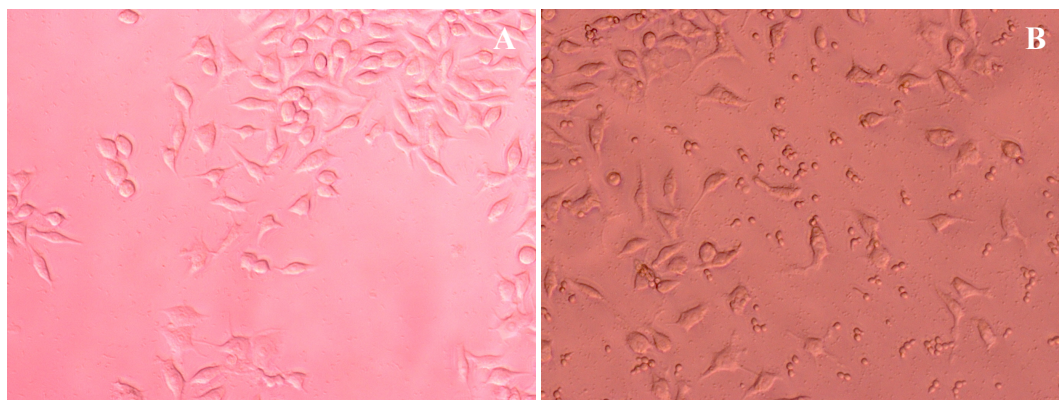
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 2 – Células aderidas ao fundo da placa, após 24 h de incubação (40 x)



Fonte: Elaborado pelo autor.

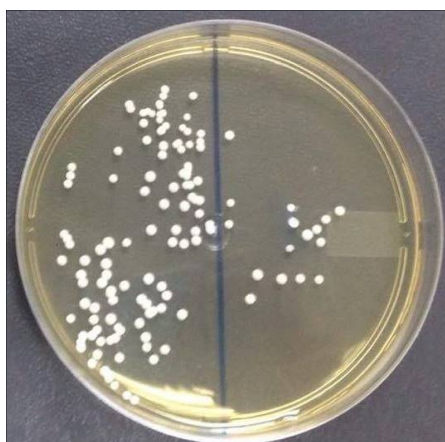
Figura 3 – Macrófagos após sua ativação



Legenda: a) Aspecto final dos poços após o acréscimo das suspensões de lactobacilos (40 x); b) Aspecto final após o acréscimo das suspensões fúngicas (40 x).
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os sobrenadantes das placas de 96 poços passaram por duas diluições seriadas (10^{-1} e 10^{-2}) (Figura 4). Dez microlitros de cada diluição seriada foram semeados em duplicata em Ágar Sabouraud dextrose (Himedia) com cloranfenicol e incubados a 37°C por 24 h para posterior contagem do número de unidades formadoras de colônia de cada placa. A contagem das células não fagocitadas foi feita de acordo com o cálculo de UFC/mL e comparadas estatisticamente.

Figura 4 – Diluições dos sobrenadantes de macrófagos em placas de 96 poços



Legenda: Esquema das diluições (10^{-1} à esquerda e 10^{-2} à direita) feitas do sobrenadante dos macrófagos com as UFC de *Candida* spp. não ingeridas.
Fonte: Elaborado pelo autor.

As demais placas foram lavadas e 1 mL ou 200 µL de meio fresco com penicilina, estreptomicina e anfotericina B a 1% foram acrescentados. Após nova incubação por 16 h a 37°C e 5% CO₂, o meio DMEM com o sobrenadante celular foi coletado, aliquotado e congelado em freezer (-80°C) para a posterior análise de citocinas e óxido nítrico e o teste de viabilidade foi realizado.

Os testes foram realizados em triplicata, sendo 4 repetições em cada, totalizando 12 amostras para cada grupo experimental.

3.1.5 Quantificação de citocinas

A quantificação de fator de necrose tumoral (TNF)-α, interleucina (IL)-1β, IL-6 e IL-17 foi realizada pelo teste imunoenzimático ELISA. Para tanto, placas de microtitulação de 96 poços (Nunc, Dinamarca) foram sensibilizadas com anticorpos de captura, específicos para cada citocina, de camundongo (anti-TNF-α, anti-IL-1β, anti-IL-6 ou anti-IL-17) (R&D Systems, NE), sendo distribuídos 100 µL/poço na concentração estabelecida pelo fabricante. As placas permaneceram *overnight* em temperatura ambiente.

Posteriormente, as placas foram lavadas com 300 µL de tampão de lavagem (PBS acrescido de 0,05% de Tween 20) por 3 vezes seguidas. Após, 300 µL/poço de tampão de bloqueio (PBS acrescido de 0,1% de Soro de Albumina Bovino - BSA) foram acrescidos em cada placa, as quais foram mantidas em temperatura ambiente por 1 h.

Após a lavagem, foram adicionados nas placas 100 µL/poço da curva-padrão de citocinas, com concentrações pré-estabelecidas de acordo com o fabricante ou 100 µL das amostras (sobrenadantes da cultura celular) (Figura

5A). Os testes foram realizados em duplicata. As placas foram mantidas por 2 h em temperatura ambiente.

Após os procedimentos de lavagem, foram acrescentados 100 μ L em cada poço das placas de anticorpo de detecção (anti-TNF- α , anti-IL-1 β , anti-IL-6) marcado com biotina. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 2 h. Novas lavagens foram realizadas e logo após foram adicionados 100 μ L/poço de estreptavidina conjugada com peroxidase. As placas foram protegidas da luz e mantidas em temperatura ambiente por 20 min.

Após a lavagem, 100 μ L/poço da solução de substrato cromogênico foram adicionados, composta por partes iguais de reagente A (peróxido de hidrogênio) e reagente B (tetrametilbenzidina). As placas foram mantidas ao abrigo da luz, à temperatura ambiente por 20 min (Figura 5B). Logo após, 50 μ L/poço da solução de parada da reação (ácido sulfúrico 2N) foram adicionados (Figuras 5C e 5D). As placas foram imediatamente levadas ao leitor de microplacas (Cambrex Elx808cse - Lonza), e as densidades ópticas correspondentes às amostras foram lidas sob o comprimento de onda de 450 nm, sendo feita uma leitura de correção com o comprimento de onda de 570 nm, segundo instrução do fabricante.

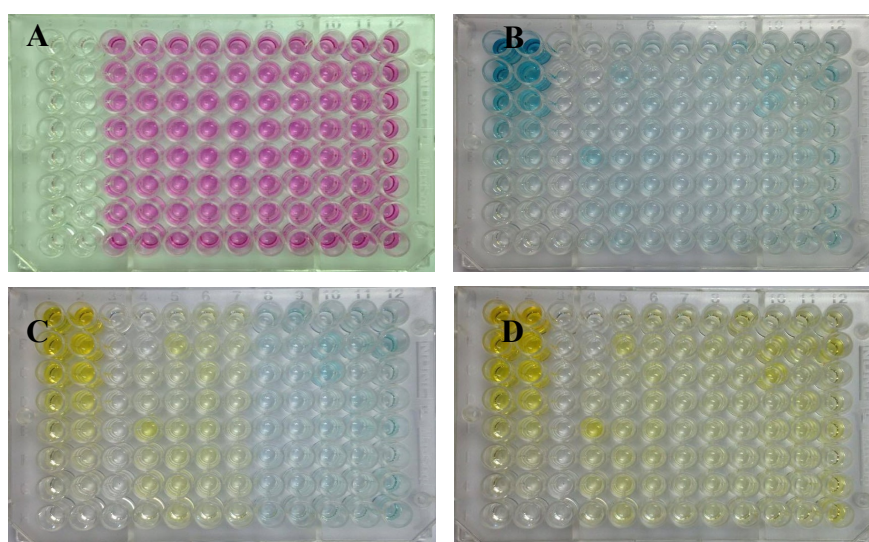
Os dados obtidos em forma de densidade óptica foram convertidos em concentração (pg/mL), usando o software GraphPad prism 5.0.

3.1.6 Quantificação de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico nos sobrenadantes da cultura de macrófagos foi determinada indiretamente pela concentração de nitrito detectada pelo reagente de Griess (03553-Sigma-Aldrich). As amostras (100 μ L) dos sobrenadantes foram acrescentadas aos poços de uma placa de 96 poços, a

seguir o mesmo volume do reagente de Griess foi acrescentado. Após 10 min, a leitura foi realizada utilizando leitor de microplacas com comprimento de onda 570 nm. Para o cálculo da concentração de nitrito das amostras, foram utilizadas amostras padrão de nitrito de 100 μM a 0,781 μM , constituindo a curva-padrão. Após a obtenção das densidades ópticas, as mesmas foram convertidas em para μM , usando o software GraphPad prism 5.0.

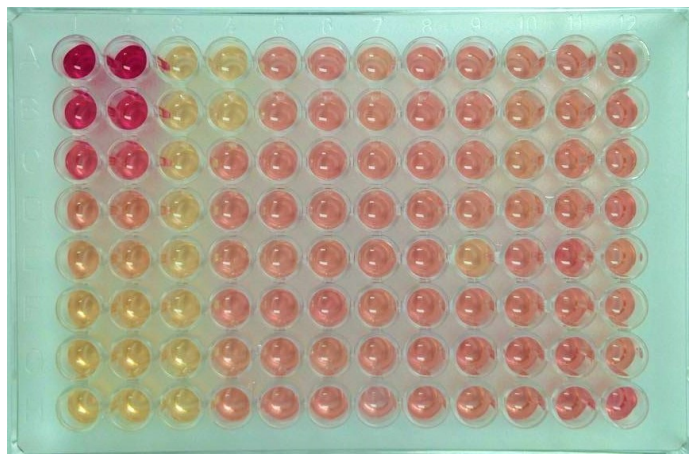
Figura 5 – Teste imunoenzimático ELISA



Legenda: a) Placa de 96 poços com a curva-padrão e as amostras, totalizando um volume de 100 μL /poço; b) Aspecto da placa 20 min após a colocação do substrato cromogênico; c) e d) Aspecto final durante e após o acréscimo de ácido sulfúrico 2N.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6 – Reação de Griess



Legenda: Aspecto final das amostras e curva-padrão de nitrito após 10 min da adição do reagente de Griess.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1.7 Ensaio de viabilidade de macrófagos ativados por *Lactobacillus* e *Candida* por azul de Alamar

O princípio deste teste é a redução da resazurina, um corante azul fracamente fluorescente, em resorufina, um corante rosa com alta fluorescência em vermelho, pelas enzimas desidrogenases, em células metabolicamente ativas.

Ao final do experimento de ativação e atividade fagocítica dos macrófagos, as células foram submetidas ao teste de viabilidade Azul de Alamar (Thermo Scientific – USA). Para tanto, uma alíquota do corante correspondente a 1/10 do volume de DMEM foi adicionada a cada poço e a placa foi incubada por 4 h. Em seguida, ela foi lida em leitor de microplacas (Cambrex Elx808cse – Lonza) sob comprimento de onda de 570 nm.

As densidades ópticas (DO) foram convertidas em porcentagem de viabilidade celular (Ferreira, 2010), empregando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade} = (\text{DO Grupo Tratado} \times 100) / \text{DO Grupo Controle}$$

3.1.8 Seleção das suspensões de lactobacilos

Foi realizada seleção da melhor suspensão de lactobacilos para cada cepa de *Candida*, de acordo com os resultados obtidos. A seleção levou em consideração a atividade fagocítica dos macrófagos, quantificação de citocinas, e sobrevivência das células aos tratamentos, seguindo esta ordem de importância. A atividade fagocítica e quantificação de citocinas obtiveram prioridade na escolha dos resultados que foram levados para o estudo *in vivo*, uma vez que refletem diretamente o papel das cepas de lactobacilos na modulação da resposta celular frente a infecção fúngica.

3.2 Análise das interações microbianas em *Galleria mellonella*: estudo *in vivo*

3.2.1 *Galleria mellonella*

Foram utilizadas larvas de *G. mellonella* em estágio final da fase larval (Figura 7) com massa corporal de aproximadamente de 330 ± 25 mg, criadas no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia – UNESP, Campus de São José dos Campos. Estas foram mantidas no escuro e utilizadas em um prazo máximo de 7 dias.

3.2.2 Verificação da susceptibilidade de *Galleria mellonella* a *Candida krusei* e *Candida glabrata*

As suspensões de cada cepa de *Candida* foram preparadas como descrito no item 3.1.3, até atingirem a concentração de 10^9 células viáveis/mL e por meio da diluição dessa suspensão foram obtidas outras duas com 10^8 e 10^7 células viáveis/mL.

Um inóculo de 10 μ L de cada suspensão de *Candida* foi injetado na hemolinfa de cada larva através da última proleg direita, utilizando seringa Hamilton com capacidade para 10 μ L (Figura 8). Para cada concentração inoculada, foi utilizado um grupo de 16 larvas.

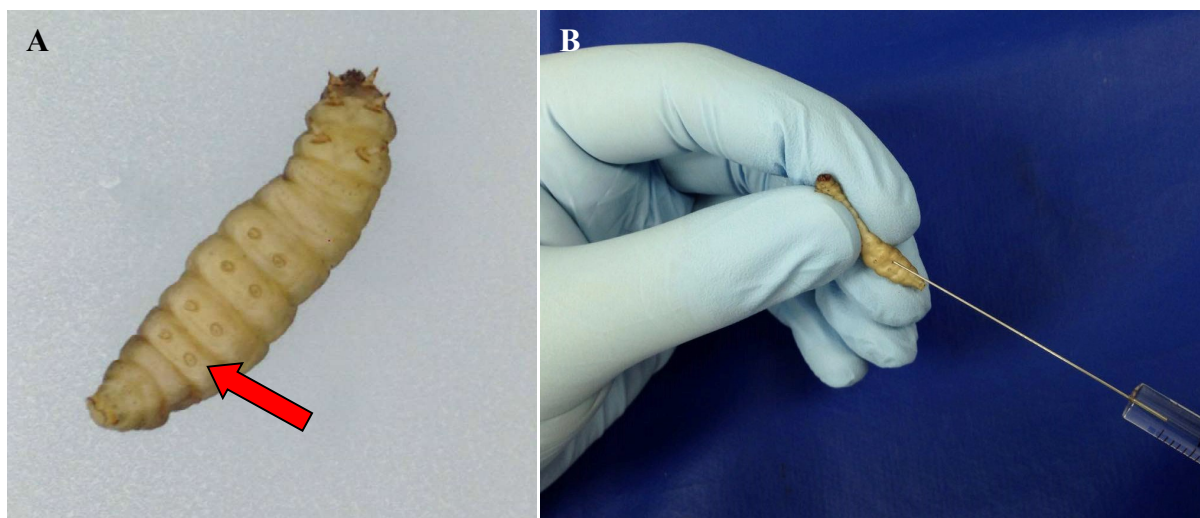
Após a injeção, as larvas foram armazenadas em placas de Petri a 37°C e o número de mortes foi anotado diariamente durante 7 dias. As larvas foram consideradas mortas quando não apresentavam nenhum movimento ao toque.

Figura 7 – *Galleria mellonella* em estágio larval final



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8 – Inoculação de suspensão microbiana em *G. mellonella*



Legenda: a) Região ventral da larva de *G. mellonella*, evidenciando a região das últimas *prolegs*, no sentido céfalo-caudal (seta vermelha); b) Inoculação de suspensão microbiana com auxílio da seringa de Hamilton.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2.3 Verificação da susceptibilidade de *Galleria mellonella* a *Lactobacillus rhamnosus*

As suspensões de cada cepa de *Lactobacillus rhamnosus* foram preparadas como descrito no item 3.1.2, até atingirem a concentração de 10^9 células viáveis/mL e por meio da diluição dessa suspensão foram obtidas outras duas, com 10^8 e 10^7 células viáveis/mL.

Um inóculo de 10 μ L de cada suspensão de *L. rhamnosus* foi injetado na hemolinfa de cada larva através da última proleg direita, utilizando seringa Hamilton de 10 μ L. Para cada concentração inoculada, foi utilizado um grupo de 16 larvas.

Após a injeção, as larvas foram armazenadas em placas de Petri a 37°C e o número de mortes foi anotado diariamente durante 7 dias. As larvas foram consideradas mortas quando não apresentavam nenhum movimento ao toque. A

curva de morte e estimativa das diferenças na sobrevivência foram determinadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox) utilizando o Programa GraphPad Prism 5.0.

3.2.4 Análise da sobrevivência de *G. mellonella* frente a infecção por *L. rhamnosus* e *C. albicans*

Para determinação da curva de sobrevivência, as células de *L. rhamnosus* foram injetados na última *proleg* direita das larvas. Um dia após a inoculação das células de *L. rhamnosus*, as células de *C. albicans* foram injetadas na última *proleg* esquerda das larvas.

Após a injeção dos micro-organismos, as larvas foram armazenadas em placas de *Petri* e incubadas a 37°C. O número de *G. mellonella* mortas foi anotado diariamente durante 7 dias.

3.2.5 Contagem de UFC/larva na hemolinfa de *G. mellonella*

Para quantificar a presença de *C. albicans* na infecção em *G. mellonella*, foram realizados experimentos com a eutanásia de larvas 12 e 24 h após a infecção, nos seguintes grupos experimentais: Interação *C. albicans* e *L. rhamnosus* e controle com cada cepa de *C. albicans*.

Para cada grupo e tempo foram utilizados 3 *pools* de 3 larvas para coleta de hemolinfa suficiente para realização das diluições seriadas. O experimento foi realizado em triplicata, para cada grupo e tempo avaliados. Em cada tempo, as larvas sofreram uma secção, feita com bisturi, no sentido céfalo-caudal e

foram comprimidas para retirada da hemolinfa, a qual foi colocada em um microtubo (Figura 9). A partir do *pool* da hemolinfa das larvas, foram feitas diluições (10^{-1} e 10^{-2}) seriadas e semeadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol, meio de cultura seletivo para *Candida* spp. As placas foram incubadas a 37°C por 48 h e então as colônias foram contadas para o cálculo de UFC/mL.

Figura 9 – Compressão da larva de *G. mellonella* para remoção de sua hemolinfa



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2.6 Contagem de hemócitos na hemolinfa de *G. mellonella*

Foi realizada a contagem total de hemócitos na hemolinfa para observar a influência dos lactobacilos sobre os mesmos. Para contagem total de hemócitos foi realizada a coleta da hemolinfa e, após centrifugação (9500 Xg/10 min a 4°C), a hemolinfa foi transferida para outro microtubo e o *pellet* ressuspenso em 1 mL de IPS (tampão anticoagulante estéril: 150 mM de

cloreto de sódio, 5 mM de cloreto de potássio, 10 mM de tris-HCl, pH 6,9, 10 mM de EDTA e 30 mM de citrato de sódio) gelado. Uma nova centrifugação foi feita e o *pellet* novamente ressuspensionado em 1 mL de IPS. A viabilidade celular foi avaliada por meio da contagem dos hemócitos em hemocítômetro.

3.3 Análise estatística

Os ensaios realizados neste trabalho foram avaliados com os testes estatísticos mais apropriados, de acordo com os resultados obtidos, como mostrado no quadro 2. Para tanto, aos resultados cabíveis, a distribuição normal foi analisada pelo teste Komolgorov-Smirnov. Toda a análise estatística foi feita com auxílio do programa estatístico GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., California, CA, USA) e o nível de significância adotado em todas as análises foi de 5% ($p < 0,05$).

Quadro 2 – Testes estatísticos aplicados para cada ensaio realizado

Ensaio	Teste estatístico
Fagocitose	Teste t (entre o grupo controle e o grupo com a menor média obtida)
Quantificação de citocinas e óxido nítrico	ANOVA e Tukey ou Kruskal-Wallis e Dunn
Viabilidade celular	Porcentagem
Curva de Sobrevivência	Log-rank (Mantel-Cox)
Contagem de UFC em hemolinfa	Teste t
Contagem de hemócitos	Teste t

Fonte: Elaborado pelo autor.

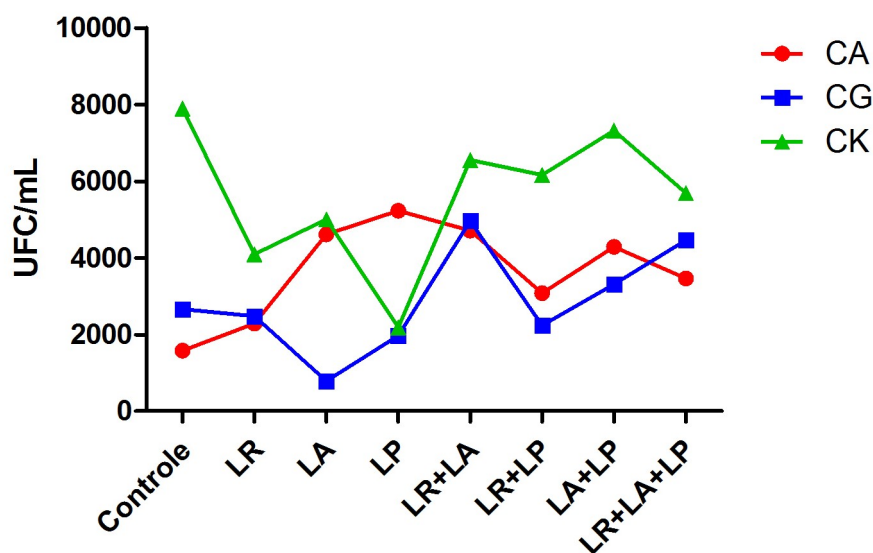
4 RESULTADO

4.1 Resultados *in vitro*

4.1.1 Análise da estimativa de fagocitose

Os resultados obtidos no ensaio de fagocitose foram dados de acordo com o número de células fúngicas não fagocitadas pelos macrófagos, como mostra a figura 10.

Figura 10 – Gráfico do ensaio de fagocitose, feito a partir da contagem de células fúngicas não fagocitadas



Legenda: CA = *Candida albicans*; CG = *C. glabrata*; CK = *C. krusei*; LR = *Lactobacillus rhamnosus*; LA = *L. acidophilus*; LP = *L. paracasei*; Controle = Macrófagos desafiados somente pelas respectivas espécies fúngicas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados obtidos neste ensaio mostram que a influência sobre a fagocitose para cada *Candida* spp. foi cepa dependente. Para a cepa de *C. albicans*, apenas a suspensão de *L. rhamnosus* não alterou significativamente ($p=0,1706$) a quantidade de células fúngicas não fagocitadas. Já para a cepa de *C. glabrata*, o número de células não fagocitadas diminuiu significativamente ($p=0,0002$) quando os macrófagos foram previamente tratados com a suspensão de *L. acidophilus*. Com relação a cepa de *C. krusei*, houve a diminuição do número de células não fagocitadas em todos os grupos, no entanto, essa diminuição foi estatisticamente significativa somente quando houve o tratamento prévio dos macrófagos com a suspensão de *L. paracasei* ($p=0.0005$).

4.1.2 Quantificação de citocinas e óxido nítrico

4.1.2.1 Fator de necrose tumoral- α

Os níveis de fator de TNF- α (pg/mL) estão apresentados na tabela 1. As letras representam a relação estatística entre as médias dos grupos indicando quando há diferença estatística ($p<0,05$).

Todas as suspensões de lactobacilos estimularam a produção de TNF- α pelos macrófagos, quando comparados aos grupos controle negativo e controle de *Candida* spp., sendo a única exceção o grupo controle de *C. krusei*, que não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) quando comparado com os grupos ativados previamente pelas suspensões de lactobacilos.

Tabela 1 – Média±Desvio Padrão da produção de TNF- α , em pg/mL, de acordo com a suspensão de lactobacilos e cepa fúngica utilizadas

TNF- α	CA	CK	CG	Soro fisiológico
LR	2393±39,44 A	2436±96,67 AB	2492±58,36 AB	2427±34,44 A
LA	2430±49,80 AB	2323±208,5 A	2529±40,73 A	2437±26,02 A
LP	2424±48,75 AB	2471±39,85 BC	2526±18,50 A	2425±33,08 A
LR+LA	2443±17,86 AB	2475±70,25 B	2521±31,07 A	2403±26,72 A
LR+LP	2483±28,73 B	2414±75,59 AB	2499±37,12 AB	2374±51,24 A
LA+LP	2447±35,31 AB	2354±70,03 AB	2399±106,5 B	2389±41,70 A
LR+LA+LP	2394±27,32 A	2343±74,26 AC	2465±39,01 AB	2368±30,02 A
Soro fisiológico	1958±108 C	2438±51,07 AB	1568±207,9 C	574±117,8 B

Legenda: *CA = *Candida albicans*; CG = *C. glabrata*; CK = *C. krusei*; LR = *Lactobacillus rhamnosus*; LA = *L. acidophilus*; LP = *L. paracasei*; ND = produção não detectável. A semelhança ou diferença estatística é expressa por letras iguais ou diferentes, respectivamente. Os grupos sem as letras não apresentaram diferença entre nenhuma das médias.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.2.2 Interleucina-1 β

Os níveis de IL-1 β (pg/mL) estão apresentados na tabela 2. As letras representam a relação estatística entre as médias dos grupos indicando quando há diferença estatística ($p < 0,05$).

Com base nos resultados obtidos, foi observado que o estímulo da produção de IL-1 β foi cepa dependente, uma vez que somente a suspensão de *L. rhamnosus* foi capaz de estimular o aumento da produção desta citocina em

macrófagos ativados por *C. albicans*. Com relação aos macrófagos desafiados por *C. krusei*, duas suspensões multiespécie estimularam a produção desta citocina: *L. acidophilus* + *L. paracasei* e *L. rhamnosus* + *L. acidophilus* + *L. paracasei*. Já os macrófagos desafiados por *C. glabrata* tiveram aumento da produção de IL-1 β propiciado por todas as suspensões de lactobacilos, sendo o resultado mais expressivo obtido pela suspensão multiespécie *L. rhamnosus* + *L. acidophilus* + *L. paracasei*.

Tabela 2 – Média $\pm$ Desvio Padrão da produção de IL-1 β , em pg/mL, de acordo com a suspensão de lactobacilos e cepa fúngica utilizadas

IL-1 β	CA	CK	CG	Soro fisiológico
LR	1,64 $\pm$ 1,97 A	1,73 $\pm$ 2,07 A	6,83 $\pm$ 5,56 A	ND
LA	0,79 $\pm$ 1,25 B	0,69 $\pm$ 0,86 A	7,25 $\pm$ 6,68 AB	ND
LP	1,17 $\pm$ 1,96 B	0,58 $\pm$ 0,85 A	3,88 $\pm$ 3,5 A	ND
LR+LA	0,87 $\pm$ 1,36 B	1,18 $\pm$ 2,09 A	9,81 $\pm$ 3,69 AB	ND
LR+LP	0,86 $\pm$ 1,37 B	0,76 $\pm$ 1,03 A	8,47 $\pm$ 6,36 AB	ND
LA+LP	3,47 $\pm$ 11,55 B	48,12 $\pm$ 7,28 B	7,45 $\pm$ 5,86 AB	ND
LR+LA+LP	0,17 $\pm$ 0,41 B	51,76 $\pm$ 6,34 B	19,41 $\pm$ 7,91 B	ND
Soro fisiológico	0,21 $\pm$ 0,74 B	1,83 $\pm$ 2,08 A	0,76 $\pm$ 1,60 C	ND

Legenda: *CA = *Candida albicans*; CG = *C. glabrata*; CK = *C. krusei*; LR = *Lactobacillus rhamnosus*; LA = *L. acidophilus*; LP = *L. paracasei*; ND = produção não detectável. A semelhança ou diferença estatística é expressa por letras iguais ou diferentes, respectivamente. Os grupos sem as letras não apresentaram diferença entre nenhuma das médias.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.2.3 Interleucina-6

Os níveis de fator de IL-6 (pg/mL) estão apresentados na tabela 3. As letras representam a relação estatística entre as médias dos grupos indicando quando há diferença estatística ($p < 0,05$).

A produção de IL-6 pelos macrófagos desafiados por *Candida* spp. foi aumentada por todas as suspensões de lactobacilos, tanto mono quanto multiespécie, de maneira estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 3 – Média±Desvio Padrão da produção de IL-6, em pg/mL, de acordo com a suspensão de lactobacilos e cepa fúngica utilizadas

IL-6	CA	CK	CG	Soro fisiológico
LR	13,13±4,04 A	8,71±4,34 A	7,70±2,03 A	28,10±10,80 AC
LA	23,87±5,15 B	13,28±6,13 B	20,44±8,35 B	51,14±7,24 B
LP	16,47±6,61 A	8,75±1,70 A	11,01±1,77 A	29,09±3,75 AC
LR+LA	19,34±4,25 B	8,97±2,85 A	15,51±4,48 B	38,05±12,25 AB
LR+LP	21,18±3,55 B	5,79±3,33 A	11,58±4,67 A	42,68±30,72 AB
LA+LP	23,67±2,10 B	5,48±1,56 A	10,71±5,49 A	43,95±10,84 AB
LR+LA+LP	12,82±3,80 A	5,54±1,82 A	15,94±3,86 B	53,41±29,54 AB
Soro fisiológico	ND C	0,40±0,62 C	0,46±0,55 C	ND C

Legenda: *CA = *Candida albicans*; CG = *C. glabrata*; CK = *C. krusei*; LR = *Lactobacillus rhamnosus*; LA = *L. acidophilus*; LP = *L. paracasei*; ND = produção não detectável. A semelhança ou diferença estatística é expressa por letras iguais ou diferentes, respectivamente. Os grupos sem as letras não apresentaram diferença entre nenhuma das médias.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.2.4 Interleucina-17

Os níveis de fator de IL-17 (pg/mL) estão apresentados na tabela 4. As letras representam a relação estatística entre as médias dos grupos indicando quando há diferença estatística ($p < 0,05$).

Embora as suspensões de lactobacilos não tenham estimulado a produção de IL-17 nos macrófagos ativados por *C. glabrata* e *C. krusei*, a suspensão monoespécie de *L. rhamnosus* foi capaz de aumentar a produção desta citocina ($p < 0,05$) em macrófagos desafiados por *C. albicans*.

Tabela 4 – Média±Desvio Padrão da produção de IL-17, em pg/mL, de acordo com a suspensão de lactobacilos e cepa fúngica utilizadas

IL-17	CA	CK	CG	Soro fisiológico
LR	2,18±0,99 A	0,083±0,28	0,22±0,54	0,13±0,32
LA	0,83±0,62 AB	ND	0,05±0,12	ND
LP	0,35±0,48 BC	ND	0,02±0,08	ND
LR+LA	0,43±0,43 BC	ND	0,24±0,45	ND
LR+LP	ND C	0,19±0,68	0,25±0,88	0,23±0,75
LA+LP	0,21±0,38 B	ND	0,02±0,08	ND
LR+LA+LP	1,12±1,05 AB	ND	0,28±0,65	ND
Soro fisiológico	0,33±0,40 B	ND	0,16±0,48	ND

Legenda: *CA = *Candida albicans*; CG = *C. glabrata*; CK = *C. krusei*; LR = *Lactobacillus rhamnosus*; LA = *L. acidophilus*; LP = *L. paracasei*; ND = produção não detectável. A semelhança ou diferença estatística é expressa por letras iguais ou diferentes, respectivamente. Os grupos sem as letras não apresentaram diferença entre nenhuma das médias.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.2.5 Óxido nítrico

Os níveis de óxido nítrico (μM) estão apresentados na tabela 5. As letras representam a relação estatística entre as médias dos grupos indicando quando há diferença estatística ($p < 0,05$).

A produção de óxido nítrico pelos macrófagos não foi alterada significativamente ($p > 0,05$) nos grupos desafiados por *C. albicans*. Nos grupos desafiados por *C. glabrata*, duas suspensões multiespécie de lactobacilos foram capazes de aumentar significativamente ($p < 0,05$) a produção de óxido nítrico: *L. rhamnosus* + *L. acidophilus* e *L. acidophilus* + *L. paracasei*. Para os grupos desafiados por *C. krusei* foi possível observar o aumento da produção de óxido nítrico pelos macrófagos influenciado por todas as suspensões de lactobacilos, sendo aumento mais expressivo obtido com o tratamento prévio com a suspensão de *L. rhamnosus*.

Tabela 5 – Média±Desvio Padrão da produção de óxido nítrico, em pg/mL, de acordo com a suspensão de lactobacilos e cepa fúngica utilizadas

Óxido nítrico	CA	CK	CG	Soro fisiológico
LR	1,38±1,10	10,54±5,64 A	5,03±2,65 AB	12,91±1,06 AB
LA	2,11±2,10	8,46±3,28 AB	4,54±2,83 AB	12,51±1,48 AB
LP	1,00±1,00	5,57±1,41 BC	4,46±2,19 AB	10,67±1,95 A
LR+LA	1,46±0,66	5,45±1,65 BC	5,68±3,08 A	13,47±0,71 BC
LR+LP	1,00±0,74	4,32±1,65 C	4,23±1,46 AB	11,80±1,32 AB
LA+LP	0,90±0,64	6,70±2,12 BC	5,60±2,59 A	13,36±1,42 BC
LR+LA+LP	1,75±1,04	5,75±1,85 BC	4,10±1,30 AB	15,58±2,99 C
Soro fisiológico	0,82±0,99	4,10±1,72 D	2,61±1,09 B	0,55±0,38 D

Legenda: *CA = *Candida albicans*; CG = *C. glabrata*; CK = *C. krusei*; LR = *Lactobacillus rhamnosus*; LA = *L. acidophilus*; LP = *L. paracasei*; ND = produção não detectável. A semelhança ou diferença estatística é expressa por letras iguais ou diferentes, respectivamente. Os grupos sem as letras não apresentaram diferença entre nenhuma das médias.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.3 Ensaio de viabilidade de macrófagos ativados por *Lactobacillus* e *Candida* por azul de Alamar

A viabilidade celular dos macrófagos testados está expressa em porcentagem na tabela 6. O grupo controle negativo, que não recebeu nenhum micro-organismo, foi considerado como o grupo com a viabilidade de 100%. A viabilidade celular não foi considerada afetada por nenhum dos tratamentos, uma vez que, em nenhum dos grupos, ela foi menor que 50%.

Tabela 6 – Viabilidade celular, expressa em porcentagem, de acordo com a suspensão de lactobacilos e cepa fúngica utilizadas

Viabilidade Celular (%)	CA	CK	CG	Soro fisiológico
LR	102,94	75,01	110,87	109,42
LA	95,64	90,53	110,12	95,55
LP	96,84	100,08	105,72	109,09
LR+LA	99,83	89,82	103,65	98,25
LR+LP	100,95	89,91	104,44	92,32
LA+LP	93,60	82,19	99,54	89,78
LR+LA+LP	91,98	93,52	106,76	103,03
Soro fisiológico	97,65	90,79	99,01	100

Legenda: *CA = *Candida albicans*; CG = *C. glabrata*; CK = *C. krusei*; LR = *Lactobacillus rhamnosus*; LA = *L. acidophilus*; LP = *L. paracasei*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.4 Seleção das suspensões de lactobacilos

Com base nos critérios já mencionados anteriormente, no item 3.1.8, as suspensões escolhidas foram *L. rhamnosus* para *C. albicans*, *L. acidophilus* para *C. glabrata* e *L. paracasei* para *C. krusei*.

4.2. Resultados *in vivo*

4.2.1 Verificação da susceptibilidade de *G. mellonella* a *C. krusei* e *C. glabrata*

Na candidose experimental em modelo invertebrado de *G. mellonella*, notamos que a patogenicidade da espécie *C. krusei* só se faz mais evidente em concentrações mais elevadas. O grupo infectado com a suspensão de *C. krusei* na concentração de 10^9 células viáveis/larva foi o único grupo que apresentou alteração no percentual de sobrevivência, de modo a matar todas as larvas do grupo dentro de um período de 24 h, diferindo estatisticamente do grupo controle, inoculado apenas com PBS ($p < 0.001$) (Figura 11A).

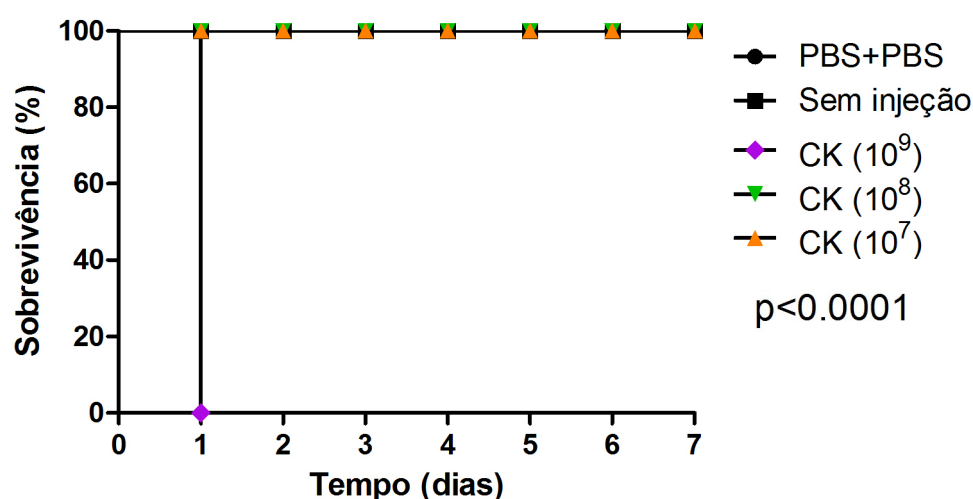
Já com relação a *C. glabrata*, obtivemos um resultado semelhante, uma vez que somente a suspensão na concentração de 10^9 células viáveis/larva foi letal para as larvas, levando 3 dias para matar todas, diferindo estatisticamente do grupo controle, inoculado apenas com PBS ($p < 0.001$) (Figura 11B).

Todas as demais suspensões, de *C. krusei* ou *C. glabrata*, nas concentrações de 10^7 e 10^8 células viáveis/larva não foram capazes de alterar o

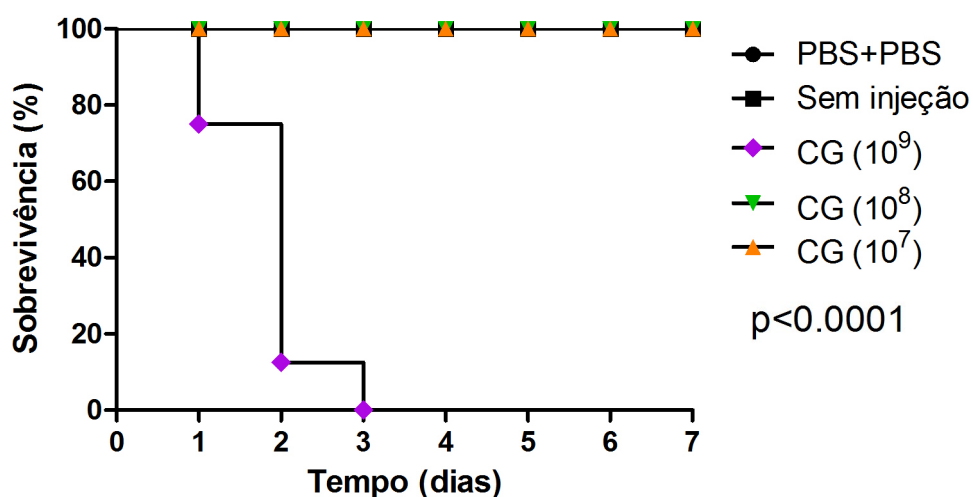
porcentual de sobrevivência das larvas, obtendo os mesmos resultados de sobrevivência que os grupos controle negativo (PBS+PBS) e sem injeção.

Figura 11 – Curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* infectadas por cepas de *Candida* em concentrações de 10^7 a 10^9 células viáveis/lagarta

A



B



Legenda: a) Infecção das larvas por *C. krusei* em suspensões com 10^7 a 10^9 células viáveis/larva; b) Infecção das larvas por *C. glabrata* em suspensões com 10^7 a 10^9 células viáveis/larva. PBS = tampão fosfato salino; Sem injeção = grupo de larvas no qual nenhum procedimento foi realizado; CK = *C. krusei*; CG = *C. glabrata*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Um aspecto importante a ser mencionado é que a susceptibilidade de *G. mellonella* a candidose induzida por *C. albicans* não foi testada, uma vez que a mesma já se encontra estabelecida em literatura em 1×10^6 células viáveis/larva (Chibebe Junior et al., 2013; Tan et al., 2014; de Barros et al., 2016).

4.2.2 Adequação da metodologia aos resultados obtidos em modelo invertebrado de *G. mellonella*

Uma vez que somente a concentração de 1×10^9 células viáveis/larva foi letal para as larvas infectadas por ambas as cepas não-*albicans* e que essa concentração é muito elevada, prosseguir os testes *in vivo* com elas se tornaria inviável por não apresentar aplicabilidade. Sendo assim, optou-se por centralizar atenção deste estudo na espécie de *C. albicans* e, por esse motivo, duas cepas clínicas da mesma espécie foram adicionadas: *C. albicans* 21 e *C. albicans* 60. Além disso, por se tratar da espécie mais patogênica, *C. albicans* serve como padrão de estudo do gênero *Candida*.

Com isso, as cepas de lactobacilos escolhidas anteriormente, por meio dos testes *in vitro* para *C. krusei* e *C. glabrata* também foram excluídas do estudo, sendo nosso alvo de estudo a cepa probiótica de *L. rhamnosus*.

Finalmente, uma vez redesenhado o perfil deste estudo, as concentrações usadas para a infecção em *G. mellonella* foram de 1×10^6 células viáveis/larva para todas as cepas de *C. albicans*.

4.2.3 Cepas clínicas de *C. albicans*

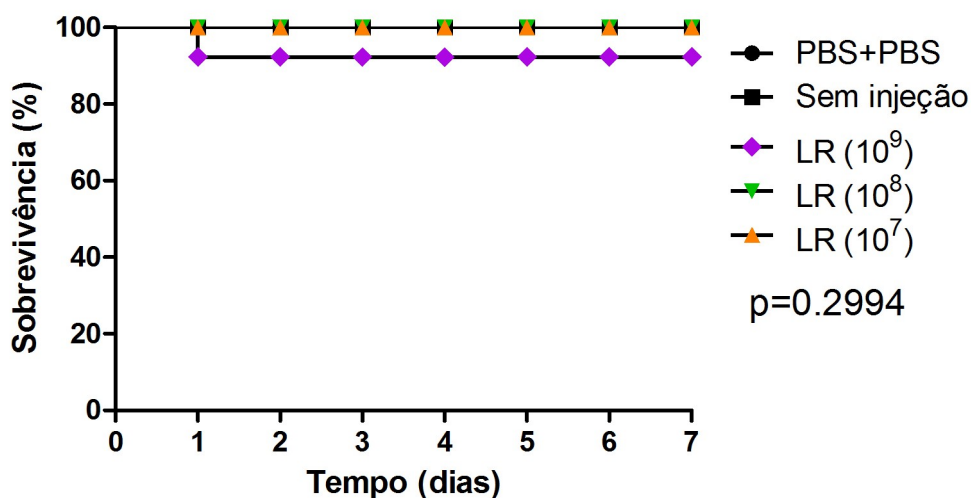
Foram utilizadas as cepas as clínicas *C. albicans* 21 e *C. albicans* 60, isoladas de pacientes HIV-positivos com lesão de candidose orofaríngea no Instituto de Infectologia Emílio Ribas, de acordo com a aprovação do Comitê de Ética sob o protocolo 051/2009-PH/CEP (ANEXO B). Todos os micro-organismos estavam mantidos em freezer a -80°C no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/UNESP.

As suspensões dessas cepas foram feitas de acordo com o item 3.1.3, elucidado anteriormente.

4.2.4 Verificação da susceptibilidade de *G. mellonella* a *L. rhamnosus*

Na infecção de modelo invertebrado de *G. mellonella* por *L. rhamnosus*, verificou-se que o mesmo não é letal para as larvas em nenhuma das concentrações testadas, como mostrado na figura 12. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo inoculados com a suspensão de *L. rhamnosus* na concentração de 10^9 células bacterianas por larva ($p=0,2994$), onde houve a morte de uma única larva.

Figura 12 – Curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* infectadas por *L. rhamnosus* em suspensões com 10^7 a 10^9 células viáveis/larva



Legenda: PBS = tampão fosfato salino; Sem injeção = grupo de larvas no qual nenhum procedimento foi realizado; LR = *L. rhamnosus*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Sendo assim, a concentração de uso escolhida para *L. rhamnosus* foi de 1×10^6 células viáveis/larva, a mesma concentração usada para *C. albicans*, letal para *G. mellonella* quando usada para as suspensões de *C. albicans* e incapaz de afetar a sobrevivência das larvas quando usada para as suspensões de *L. rhamnosus*.

4.2.5 Análise da sobrevivência de *G. mellonella* frente ao tratamento com *L. rhamnosus* e infecção por *C. albicans*

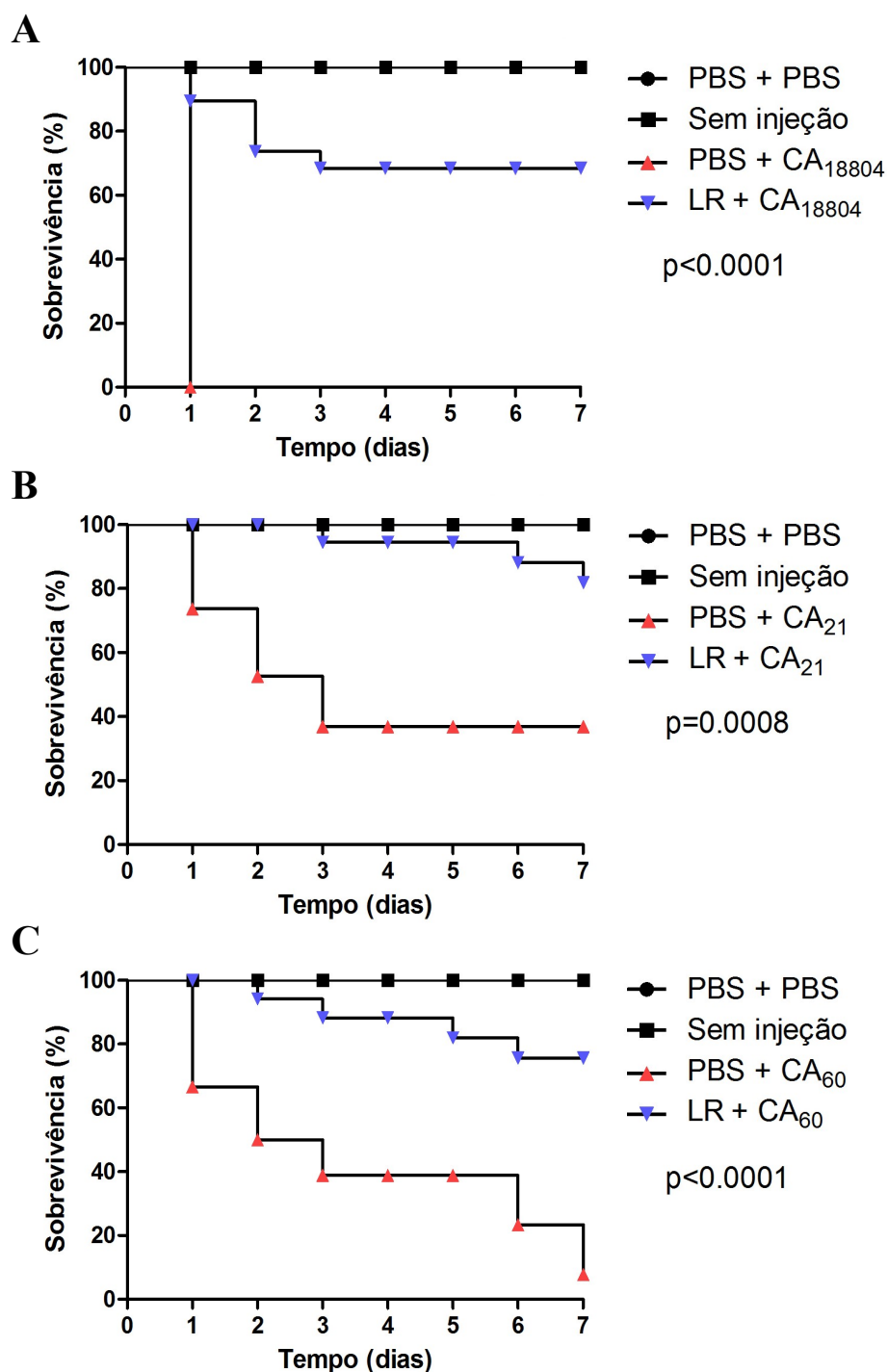
Após a o tratamento profilático com *L. rhamnosus* ou apenas com PBS e infecção com as cepas de *C. albicans*, foi avaliada a curva de sobrevivência das lagartas. Neste teste, foi avaliada somente a diferença estatística entre os grupos de interesse, uma vez que os grupos controle (PBS+PBS) e sem injeção

mantiveram todas as larvas vivas, ou seja, 100% de sobrevivência.

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para todas as cepas de *Candida* testadas, conforme mostra a figura 13. Em cada gráfico com a curva de sobrevivência, encontramos o p respectivo a comparação entre os grupos infectados com *Candida* com e sem tratamento profilático.

De acordo com os resultados encontrados, houve um aumento de sobrevivência de 37,5%, 56,25% e 47,6% para os grupos infectados com *C. albicans* ATCC 18804, *C. albicans* 21 e *C. albicans* 60, respectivamente.

Figura 13 – Curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* tratadas profilaticamente por *L. rhamnosus* e infectadas pelas cepas de *C. albicans*



Legenda: Comparação entre a curva de sobrevivência de *G. mellonella* tratada profilaticamente com *L. rhamnosus* ou PBS (controle) e infectada por a) *C. albicans* ATCC 18804; b) *C. albicans* 21; c) *C. albicans* 60. PBS = tampão fosfato salino; Sem injeção = grupo de larvas no qual nenhum procedimento foi realizado; CA₁₈₈₀₄ = *C. albicans* ATCC 18804; CA₂₁ = *C. albicans* 21; CA₆₀ = *C. albicans* 60; LR = *L. rhamnosus*. O valor de p faz referência a comparação somente entre os grupos infectados por *Candida*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.6 Contagem de UFC/larva na hemolinfa de *G. mellonella*

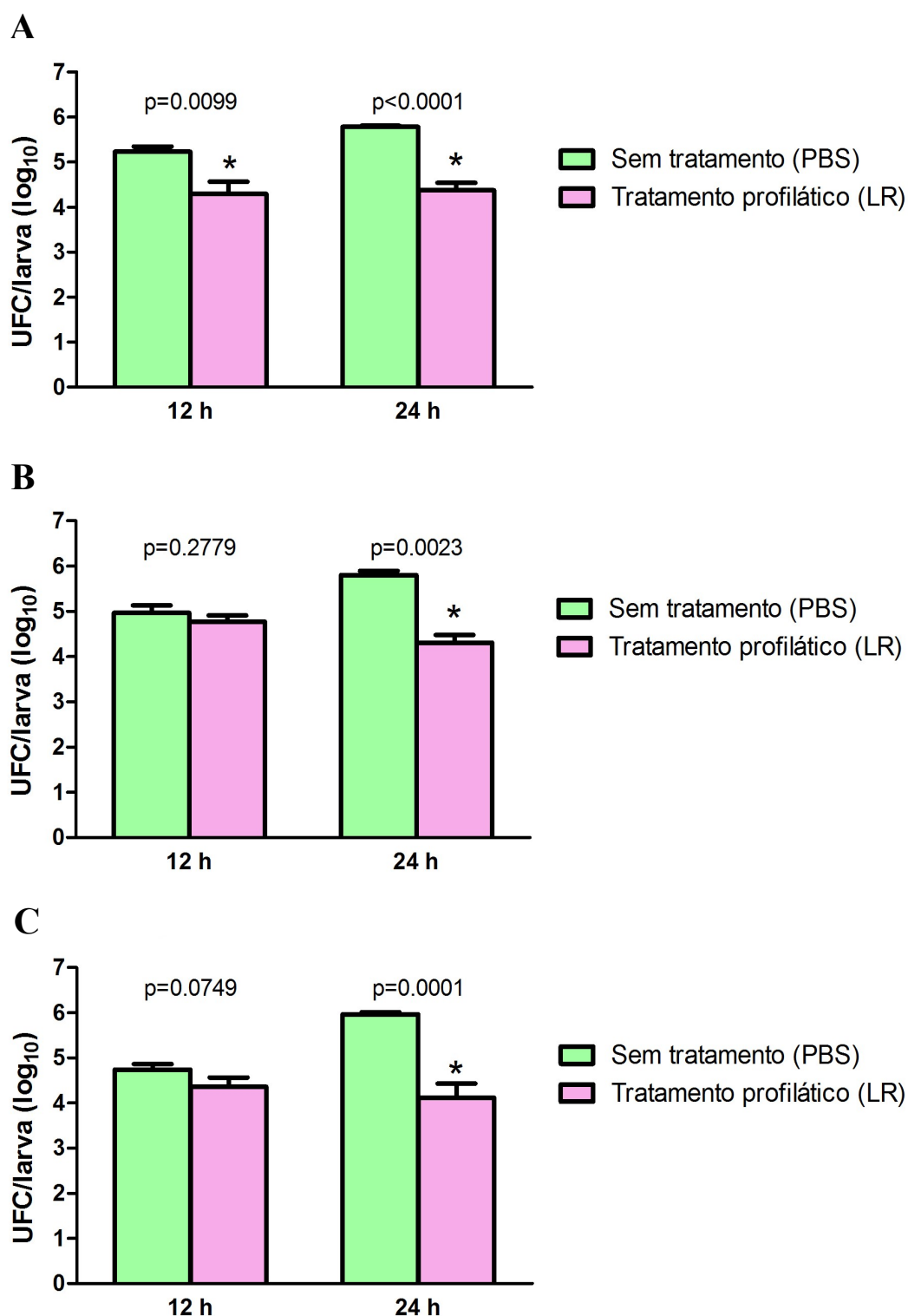
Após a contagem de UFC/mL na hemolinfa de *G. mellonella* verificou-se como padrão geral que a presença de *L. rhamnosus* estabiliza o crescimento fúngico no período de 12 h e que no período de 24 h, o número de células fúngicas permanece semelhante.

Nos grupos infectados por *C. albicans* ATCC 18804, houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado previamente com *L. rhamnosus* e o grupo não tratado nos períodos de 12 h ($p=0,0099$) e 24 h ($p<0,0001$) e reduções de 88,34 e 96,2% na contagem de UFC/larva, respectivamente (Figura 14A).

Já nos grupos infectados por *C. albicans* 21, houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado previamente com *L. rhamnosus* e o grupo não tratado somente no período de 24 h ($p=0,0023$) e uma redução de 96,8% na contagem de UFC/larva (Figura 14B).

Com relação aos grupos infectados por *C. albicans* 60, observou-se o mesmo perfil de crescimento fúngico encontrado na cepa de *C. albicans* 21, com diferença estatística entre os grupos somente no período de 24 h ($p=0,0001$) e uma redução de 98,6% na contagem de UFC/larva (Figura 14C).

Figura 14 – Média e desvio padrão ($\log_{10}$) da contagem de UFC/larva dos diferentes grupos experimentais nos tempos de 12 e 24 h



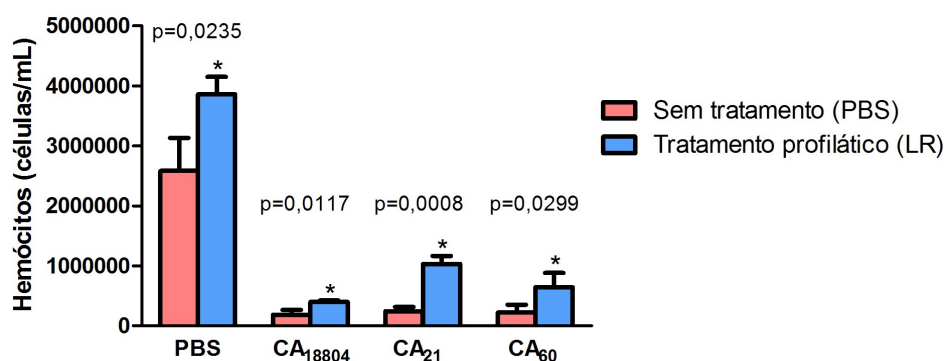
Legenda: a) Grupos infectados por *C. albicans* ATCC 18804 com e sem tratamento profilático; b) Grupos infectados por *C. albicans* 21 com e sem tratamento profilático; c) Grupos infectados por *C. albicans* 60 com e sem tratamento profilático. PBS = Tampão fosfato salino; LR = *L. rhamnosus*.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.7 Contagem de hemócitos na hemolinfa de *G. mellonella*

Os melhores resultados obtidos na contagem de UFC/larva se concentraram no tempo de 24 h, no qual houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para todos os grupos. Sendo assim, este tempo foi eleito para se realizar o teste de contagem de hemócitos na hemolinfa de *G. mellonella*.

Na contagem de hemócitos da hemolinfa de *G. mellonella*, foi obtida diferença estatística para todos os grupos ($p < 0,05$). O tratamento profilático com *L. rhamnosus* foi capaz de aumentar o número de hemócitos em todos os grupos infectados com as cepas fúngicas e no grupo controle negativo, onde foi injetado apenas PBS. Os aumentos obtidos nos grupos infectados por *C. albicans* ATCC18804 foram de $2,13 \times 10^5$ hemócitos/larva (2,15 vezes), *C. albicans* 21 de $7,88 \times 10^5$ hemócitos/larva (4,26 vezes) e *C. albicans* 60 de $4,22 \times 10^5$ hemócitos/larva (2,89 vezes) e no grupo controle (PBS) esse aumento foi de $1,27 \times 10^6$ hemócitos/larva (1,5 vezes). As médias obtidas assim como o valor de p para a comparação entre os grupos estão na figura 15.

Figura 15 – Média e desvio padrão do número de hemócitos na hemolinfa de *G. mellonella*



Legenda: PBS = tampão fosfato salino; CA₁₈₈₀₄ = *C. albicans* ATCC 18804; CA₂₁ = *C. albicans* 21; CA₆₀ = *C. albicans* 60.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Atualmente, tratamentos alternativos contra micro-organismos patogênicos resistentes têm conquistado grande atenção no campo científico. Dentre os tratamentos emergentes mais estudados podemos citar o uso de probióticos (Demirel et al., 2013; Kulakova et al., 2013; Kumar et al., 2013a; Kumar, Singhi, 2013b; Li D et al., 2014; Roy et al., 2014; Jorjão et al., 2015, Ribeiro et al., 2017). É importante ressaltar que probióticos se tratam de micro-organismos comensais, que possuem diversas atividades benéficas para o seu hospedeiro, destacando-se suas propriedades anti-infecciosa (Liévin-Le Moal, Servin, 2014) e imunomoduladora (Díaz-Ropero et al., 2007; Rajput et al., 2013), foco deste estudo.

As suspensões de lactobacilos com propriedades probióticas podem ser constituídas pelo micro-organismo íntegro, seu sobrenadante, partes de sua parede (Jorjão et al., 2015; Deidda et al., 2016; Sadeghzadeh et al., 2016) ou até mesmo pela mistura de diferentes cepas ou espécies (Lan et al., 2016; Roberts et al., 2016; Zhang et al., 2016), assim como testado em nosso estudo, no qual havia suspensões monoespécie e multiespécie. Sendo assim, as funções imunomoduladora e antimicrobiana de suspensões de lactobacilos poderão sofrer interferência da cepa sobre a qual elas atuarão, constituintes utilizados para a obtenção dessas suspensões (célula bacteriana íntegra, micro-organismo morto ou sobrenadante) ou associações utilizadas (suspensões monoespécie ou multiespécie).

5.1 Análise das interações microbianas em macrófagos de camundongo: estudo *in vitro*

Os testes realizados neste estudo, em macrófagos de camundongo (RAW 264.7), refletem diretamente dois dos principais mecanismos de defesa do sistema imune inato: ativação da fagocitose, acompanhada posteriormente da maturação do fagossomo em fagolisossomo, onde os micro-organismos são digeridos (Zhen, Stenmark, 2015) e a resposta inflamatória (Weiss, Schaible, 2015; Pandey et al., 2015) com a produção de mediadores químicos como citocinas e óxido nítrico, essenciais na defesa do hospedeiro (Carpenter et al., 2014). Desse modo, pudemos avaliar diretamente o efeito anti-*Candida*, elucidado pelo teste de fagocitose e o efeito imunomodulador, representado pelo teste de produção de citocinas e óxido nítrico. Além disso, após a ativação e infecção dos macrófagos, foi verificada a viabilidade dos mesmos para a validação dos demais testes, uma vez que uma elevada taxa de morte celular tornaria os resultados obtidos duvidosos. Jesus et al. (2015) consideraram que viabilidade celular acima de 50% indica que o tratamento feito não foi citotóxico e Li J et al. (2016) também consideraram em seu estudo que houve redução de viabilidade celular no tratamento adotado quando a mesma atingiu aproximadamente 50%, sendo ambos os estudos com macrófagos de camundongo (RAW 264.7). No entanto, de acordo com as normas International Organization for Standardization (1992), ISO 10993-5, adotamos 70% como valor padrão para considerar o tratamento de ativação e infecção dos macrófagos citotóxico ou não.

Com relação a atividade fagocítica dos macrófagos, bons resultados foram obtidos quando usamos as suspensões monoespécie de lactobacilos, ao contrário dos resultados obtidos quando misturamos as cepas. Pelos resultados, notamos que a ativação da fagocitose foi espécie dependente já que para cada

espécie não-*albicans* uma espécie de lactobacilos foi melhor. Não houve uma única suspensão de lactobacilos que apresentou uma maior ativação da fagocitose para todas as espécies do gênero *Candida*. Além disso, a fagocitose dos macrófagos frente a infecção por *C. albicans* não foi favorecida.

É importante destacar que o efeito dos probióticos na imunidade celular é cepa dependente e que apenas alguns deles conseguem estimular a fagocitose (Dvorožňáková et al., 2016) e que, portanto, alguns dos probióticos usados neste estudo podem não estimular a fagocitose, como foi o caso do *L. rhamnosus* sozinho, que não foi capaz de diminuir estatisticamente ($p > 0.05$) o número de células fúngicas não fagocitadas em nenhum dos grupos. Também não foram encontrados resultados promissores para as associações de probióticos com relação a ativação da atividade fagocítica. Horvath et al. (2016) testaram uma suspensão probiótica multiespécie em neutrófilos e notaram que houve diminuição na taxa de fagocitose, assim como visto em nosso estudo com alguns grupos. Outro fator importante que pode influenciar na resposta probiótica, demonstrado pelos resultados de Ren et al. (2015) é a concentração da suspensão de lactobacilos. Em seu estudo, foi constatado que somente concentração mais alta, de 1×10^9 UFC/rato de *Lactobacillus plantarum*, depois de 20 dias de tratamento dos animais, foi capaz de aumentar a taxa de fagocitose, sugerindo que alterações na concentração das suspensões seriam capazes de interferir em sua influência sobre as células. Sornplang et al. (2015) sugeriram que suspensões multiespécie ou doses iguais ou superiores a 1×10^6 UFC/mL de suplementação probiótica mostraram um efeito positivo na erradicação de infecção intestinal. Se por um lado este estudo corrobora com a hipótese de que maiores concentrações podem tornar os efeitos dos lactobacilos mais evidentes, por outro ele discorda dos resultados obtidos neste estudo, no qual somente as cepas isoladas apresentaram uma boa resposta com relação ao estímulo da fagocitose.

Neste estudo foi possível constatar diferenças estatisticamente significantes na indução das citocinas, sendo que essas diferenças variaram de acordo com suspensão de lactobacilos e a cepa fúngica utilizados. Alguns autores já descreveram a modulação propiciada por lactobacilos como sendo controversa, uma vez que eles podem aumentar, diminuir ou não causar nenhuma alteração nos níveis de citocinas (Torii et al., 2007; Segawa et al., 2008; Jang et al., 2012).

Das células infectadas com *C. albicans* e *C. glabrata*, os grupos tratados com as suspensões de lactobacilos apresentaram maior produção de TNF- α quando comparados ao grupo controle que não recebeu os lactobacilos, com exceção das células infectadas por *C. krusei*, nas quais não houve diferença entre os grupos tratados e o controle. Segundo Romani (2011), algumas cepas virulentas de *Cryptococcus neoformans* tem a capacidade de inibir a produção de TNF- α e induzir a produção de IL-10, assim inibindo a ativação de macrófagos. Embora se tratem de espécies fúngicas diferentes, podemos notar esse perfil de baixa produção de citocinas, quando da infecção apenas por *Candida*, em todo o nosso estudo. No entanto, nos grupos tratados previamente com as suspensões de lactobacilos, houve aumento da produção de TNF- α , revelando o perfil imunomodulador com relação a esta citocina. Outro aspecto importante a ser mencionado é que a modulação se fez cepa dependente, uma vez que os grupos tratados previamente com os lactobacilos e infectados com *C. krusei* não apresentaram diferença dos grupos inoculados apenas com o fungo.

Vonk et al. (2006) e Hise et al. (2009) mostraram também que ratos com deficiência nos níveis de IL-1 β tinha sobrevida reduzida e aumento da carga fúngica quando comparados com ratos saudáveis, mostrando a importância da produção das citocinas pró-inflamatórias para a defesa do hospedeiro contra infecções fúngicas. Nos resultados podemos perceber que os grupos inoculados somente com *Candida* apresentam médias de produção de IL-1 β baixas e que

essas médias aumentam na maioria dos casos ou se mantem semelhantes, de acordo com a cepa fúngica e suspensão de lactobacilos utilizada. Seguindo esse raciocínio, o estímulo da produção de IL-1 β propiciado pelas suspensões de lactobacilos pode ter um papel benéfico contra a infecção fúngica, uma vez que esta citocina é crucial para a defesa do hospedeiro nas respostas contra infecções e injúrias (Dinarello, 1996).

Os níveis de IL-6 das células infectadas por *Candida* sofreram modulação evidente quando houve tratamento prévio com lactobacilos, com aumento estatisticamente significativo em todos os grupos. A IL-6 apresenta papel multifuncional (Ishihara, Hirano, 2002), mediando o sentido da resposta inflamatória, incluindo os mecanismos de transição da resposta imune inata para adquirida (Hoebe et al., 2004; Jones, 2005). Altos níveis desta citocina estão associados com uma série de doenças como como artrite reumatóide, doença de Crohn, diabetes e câncer (Ishihara, Hirano, 2002; Naugler, Karin, 2008). Por outro lado, a deleção genética dos mecanismos de produção de IL-6 em camundongos foi verificada em 1994 (Kopf et al.), ocasionando uma resposta fortemente prejudicada contra infecções, defeito severo na produção de anticorpos regulados por células T e ausência da resposta de fase aguda a infecção ou trauma. Isso sugere que a produção de IL-6 se faz importante para o combate a infecções fúngicas, além de servir como um sinal para coordenar os macrófagos (Kopf et al., 1994). Em nosso estudo, os resultados mostram que todas as suspensões de lactobacilos são capazes de aumentar a produção de IL-6, aspecto importante esse, já que os grupos desafiados por *Candida* apresentaram uma produção muito baixa ou até não detectável (como foi o caso das células infectadas com *C. albicans*) desta citocina, importante na resposta contra *Candida*.

Em nosso estudo, foram analisados os níveis de IL-17, produzidos por macrófagos frente aos desafios propostos neste estudo. Os resultados revelam

que, de todos os grupos experimentais, somente o grupo tratado profilaticamente com *L. rhamnosus* e desafiado por *C. albicans* mostrou aumento estatisticamente significativo com relação ao grupo apenas desafiado por *C. albicans*. Esses resultados são promissores na busca por tratamentos de infecções por *Candida*, uma vez que *C. albicans* é a espécie mais patogênica do gênero e que IL-17 apresenta um importante papel nas respostas inatas e adaptativas contra infecções nas interfaces mucosas e cutâneas, como exemplificado pela ocorrência de candidose mucocutânea crônica, que se trata de uma infecção recorrente de *C. albicans*, em pacientes com defeitos genéticos que prejudicam a resposta imune relacionada a IL-17 (Ling, Puel, 2014). Além disso, em pacientes tratados com antagonistas de IL-17, uma maior taxa de incidência de infecções causadas por *Candida* é esperada (Yiu, Griffiths, 2016). Todos esses estudos recentes mostram a importância da busca por um agente alternativo de tratamento que possa melhorar as respostas do hospedeiro sem induzir o aparecimento de cepas microbianas resistentes.

Na análise de óxido nítrico, nossos resultados revelam que algumas suspensões de lactobacilos foram capazes de estimular de maneira significativa a sua produção. A única exceção encontrada, foi para os grupos desafiados por *C. albicans*, tratados ou não com lactobacilos, nos quais não houve alterações estatísticas na produção de óxido nítrico. O óxido nítrico é um fator antimicrobiano que é gerado por óxido nítrico sintetase, em macrófagos ativados, e tem grande importância na eliminação de bactérias, protozoários e fungos (Alspaugh, Granger, 1991; Chan et al., 1992). Estudos com camundongos tem mostrado que óxido nítrico gerado por macrófagos contribui para a resistência as infecções por *C. albicans* (Cenci et al., 1993; Vasquez-Torres et al., 1994), sugerindo que os resultados obtidos para as cepas não-*albicans* se fizeram devido ao estímulo dos macrófagos, demonstrado por meio do aumento da produção de óxido nítrico.

Uma resposta imune celular contra os fungos é essencial para controlar a infecção. Dentre essas células do sistema imune, os macrófagos são as mais importantes no controle do crescimento fúngico (Romani, 2004). De modo geral, ao avaliar quando os macrófagos são desafiados apenas por *Candida*, neste estudo, notamos que a concentração média destas citocinas, na maioria das vezes, são menores que as concentrações encontradas nos grupos previamente tratados com probióticos. Isso sugere a capacidade deste patógeno de escapar do reconhecimento do sistema e não ativar os mecanismos de defesa do hospedeiro.

Outro aspecto importante a ser levado em consideração é a composição da parede microbiana dos lactobacilos. Ácido lipoteicoico (LTA) e peptídeoglicano são importantes componentes da parede de bactérias Gram-positivas, capazes de estimular a resposta imune. No entanto, a habilidade de influenciar as respostas é cepa dependente, uma vez que o LTA e o peptídeoglicano podem sofrer modificações de acordo com a espécie (Matsuguchi et al., 2003; Wang et al., 2003; van Amersfoort et al., 2003; Kim HG et al., 2008; Vollmer et al., 2008a; Vollmer, 2008b; Park et al., 2013; Egan et al., 2017). Modificações nessas estruturas podem refletir em diferentes padrões de ativação fagocítica e modulação da produção de citocinas e óxido nítrico.

5.2 Análise das interações microbianas em *G. mellonella*: estudo *in vivo*

Insetos possuem apenas um sistema imune inato, que compreende respostas humoral e celular. A resposta celular compreende as células da hemolinfa, os hemócitos, cuja principal função é a fagocitose de corpos

estranhos ou seu sequestro em estruturas chamadas cápsulas ou nódulos. Como parte da resposta humoral, os insetos sintetizam peptídeos antimicrobianos, pequenas moléculas com atividade contra bactérias e fungos pela desestabilização das membranas microbianas (Shai, 1999; Vertyporokh et al., 2015).

No entanto, novos estudos tem desfeito este paradigma, sugerindo que as respostas imunes dos invertebrados são mais complexas e específicas do que pensado. A exposição primária de invertebrados a patógenos aumentam sua resistência a um desafio patogênico posterior (Wu et al., 2015). Esse mecanismo foi reportado em outros modelos invertebrados (Sadd, Schmid-Hempel, 2006; Pham et al., 2007; Roth et al., 2009; Wu et al., 2015). Os resultados obtidos em nosso estudo corroboram com os estudos citados anteriormente, embora o micro-organismo injetado primeiramente não possa ser considerado patógeno, uma vez que o mesmo não afetou a taxa de sobrevivência das larvas em nenhuma das concentrações testadas.

Em todos os ensaios de sobrevivência do nosso estudo obtivemos diferenças estatisticamente significantes quando comparamos os grupos tratados profilaticamente por *L. rhamnosus* e os não tratados. A suspensão de lactobacilos foi capaz de aumentar a taxa de sobrevivência das larvas infectadas pelas cepas de *C. albicans* de maneira estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em todos os casos, sugerindo assim que a cepa de *L. rhamnosus* ATCC 7469, usada para a preparação das larvas, possui um papel modulador da sua resposta imune. Nosso estudo avaliou a sobrevivência de larvas de *G. mellonella* de maneira muito semelhante a Ribeiro et al. (2017), que trataram profilaticamente as larvas com *L. rhamnosus* ATCC 9595 antes da infecção por *C. albicans* ATCC 18804. Em ambos os estudos foram obtidos aumento na taxa de sobrevivência das larvas.

O resultado do teste de contagem de UFC na hemolinfa de *G. mellonella*

mostrou que houve diminuição da carga fúngica de todas as cepas avaliadas neste estudo, quando as lagartas recebiam o tratamento profilático com *L. rhamnosus*, em todos os períodos avaliados. No entanto, somente no tempo de 24 h, obtivemos reduções estatisticamente significantes em todos os grupos, que variaram de 96,2 a 98,6%. Nossos resultados são semelhantes aos encontrados por outros autores. Ribeiro et al. (2017) encontraram redução de 52,2% na contagem de UFC no biofilme de *C. albicans* ATCC 18804 quando havia a adição de células de *L. rhamnosus* ATCC 9595. Vilela et al. (2015), encontraram redução estatisticamente significativa da carga fúngica de hemolinfa de *G. mellonella* nos grupos tratados com células de *L. acidophilus* ATCC 4356 somente no tempo de 24 h, embora tenham analisado outros períodos. O resultado obtido para o período de 12 h, no grupo infectado por *C. albicans* ATCC 18804 difere dos encontrados por Vilela et al. (2015). Em nosso estudo, houve redução estatisticamente significativa da carga fúngica de *C. albicans* ATCC 18804 no tempo de 12 h. É possível que essa diferença tenha se dado devido ao uso de diferentes cepas de lactobacilos. Como dito anteriormente, a modulação da resposta imune é cepa dependente, ou seja, depende tanto da cepa do patógeno quanto da cepa de lactobacilos utilizada. Este conceito se aplica tanto para estudos *in vivo*, como evidenciado pelos resultados obtidos neste trabalho e nas pesquisas citadas anteriormente, quanto para estudos *in vitro*, como discutido anteriormente para o modelo de cultura celular.

Além disso, foi avaliada a contagem de hemócitos em nosso estudo, células presentes na hemolinfa de *G. mellonella* e que tem um papel fundamental na defesa contra patógenos fúngicos. Embora haja seis tipos diferentes de hemócitos (pró-hemócitos, coagulócitos, esferulócitos, oenocitóides, plasmatócitos e granulócitos), em nosso estudo essa diferenciação não foi feita. A densidade hemocitária e sobrevivência de *Galleria* são indicadores de patogenicidade (Cotter et al., 2000; Bergin et al., 2003). Fungos

não patogênicos resultam em alta densidade hemocitária, enquanto fungos patogênicos numa redução dos níveis de hemócitos (Bergin et al., 2003). Os resultados obtidos em nosso estudo comprovam o poder modulador da resposta imune da suspensão de *L. rhamnosus* utilizada. Em todos grupos tratados profilaticamente, houve aumento estatisticamente significativo da densidade hemocitária.

Densidade hemocitária e sobrevivência de *Galleria* relacionam-se por indicar a patogenicidade fúngica, o que foi verificado por nossos resultados. Por exemplo: nos grupos tratados com *L. rhamnosus* e infectados por *C. albicans* ATCC 18804, obtivemos o menor aumento de sobrevivência, cerca de 37,5%, e também o menor aumento da densidade hemocitária (2,15 vezes). O mesmo se deu para as outras cepas de *C. albicans*: houve aumento de sobrevivência de 56,25% nos grupos infectados por *C. albicans* 21 com aumento de densidade hemocitária de 4,26 vezes e para *C. albicans* 60, um aumento de 47,6% de sobrevivência, seguido de um aumento de 2,89 vezes. Desse modo, pode-se relacionar o aumento de sobrevivência com o aumento da densidade hemocitária, confirmando os resultados obtidos.

Com relação a *C. albicans* ATCC 18804, resultados muito similares aos de Ribeiro et al. (2017) foram encontrados em nosso estudo, no qual houve um aumento da densidade hemocitária de 2,15 vezes e no estudo de Ribeiro et al. (2017) esse aumento foi de 2,1 vezes. Com base nestes resultados, podemos afirmar que a cepa mais virulenta do nosso estudo foi a cepa ATCC 18804, seguida das cepas clínicas 60 e 21.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que as suspensões monoespécie de lactobacilos obtiveram melhor resposta na modulação da resposta imune em macrófagos, sendo que essa modulação foi dependente da cepa fúngica utilizada já que, para cada cepa fúngica, uma suspensão de lactobacilos apresentou um melhor resultado.

Além disso, verificou-se que, as cepas de *Candida* não-*albicans* apresentam baixa virulência quando comparadas a cepa de *C. albicans*. A suspensão de *L. rhamnosus* ATCC 7469 apresentou resultados promissores na modulação da resposta imune de *G. mellonella* em todos os testes.

REFERÊNCIAS*

- Alili N, Türp JC, Kulik EM, Waltimo T. Volatile compounds of *Salvadora persica* inhibit the growth of oral *Candida* species. *Arch Oral Biol*. 2014;59(5):441-7.
- Alspaugh JA, Granger DL. Inhibition of *Cryptococcus neoformans* replication by nitrogen oxides supports the role of these molecules as effectors of macrophage-mediated cytostasis. *Infect Immun*. 1991;59:2291-6.
- Amital H, Gilburd B, Shoenfeld Y. Probiotic supplementation with *Lactobacillus casei* Actimel induces a TH1 response in an animal model of antiphospholipid syndrome. *Ann NY Acad Sci*. 2007;1110:661-9.
- Anibal PC, Peixoto IT, Foglio MA, Höfling JF. Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum* L and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of *Candida* spp. *Braz J Microbiol*. 2013 Dec 17;44(3):839-48.
- Ashraf R, Shah NP. Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2014;54(7):938-56.
- Badiee P, Hashemizadeh Z. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis and clinical management. *Indian J Med Res*. 2014;139(2):195-204.
- Bergin D, Brennan M, Kavanagh K. Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes Infect*. 2003;5(15):1389-95.
- Bourgeois C, Majer O, Frohner IE, Tierney L, Kuchler K. Fungal attacks on mammalian hosts: pathogen elimination requires sensing and tasting. *Curr Opin Microbiol* 2010;13:401-8.
- Brown GD. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. *Annu Rev Immunol* 2011;29:1-21.
- Carpenter S, Ricci EP, Mercier BC, Moore MJ, Fitzgerald KA. Post-transcriptional regulation of gene expression in innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2014;14: 361-76.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 20 ago 2013; acesso em 25 out 2014]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Cenci E, Romani L, Mencacci A, Spaccapelo R, Schiaffella E, Puccetti P, et al. Interleukin-4 and interleukin-10 inhibit nitric oxide-dependent macrophage killing of *C albicans*. *Eur J Immunol*. 1993;23:1034–8.

Cha YS, Seo JG, Chung MJ, Cho CW, Youn HJ. A mixed formulation of lactic acid bacteria inhibits trinitrobenzene-sulfonic-acid-induced inflammatory changes of the colon tissue in mice. *J Microbiol Biotechnol*. 2014;24(10):1438-44.

Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR. Killing of virulent mycobacterium tuberculosis by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med*. 1992;175:1111–22.

Chibebe Junior J, Sabino CP, Tan X, Junqueira JC, Wang Y, Fuchs BB, et al. Selective photoinactivation of candida albicans in the non-vertebrate host infection model galleria mellonella. *BMC Microbiol*. 2013;13:217.

Chiu YH, Hsieh YJ, Liao KW, Peng KC. Preferential promotion of apoptosis of monocytes by lactobacillus casei rhamnosus soluble factors. *Clin Nutr*. 2010;29(1):131–40.

Clancy R. Immunobiotics and the probiotic evolution. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003;38(1):9-12.

Coppola MM, Turnes CG. Probióticos e resposta imune. *Ciência Rural*. 2004;34(4):1297-303.

Cotter G, Doyle S, Kavanagh K. Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000;27(2):163-9.

Cross ML, Ganner A, Teilab D, Fray LM. Patterns of cytokine induction by gram-positive and gram-negative probiotic bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2004;42(2):173-80.

Cross ML. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2002;34(4):245-53.

de Barros PP, Rossoni RD, Ribeiro FC, Junqueira JC, Jorge AO. Temporal profile of biofilm formation, gene expression and virulence analysis in candida albicans strains. *Mycopathologia*. 2016 Nov 9. In press 2016.

de Freitas-Pontes KM, Gomes CE, Carvalho BM, Sabóia RD, Garcia BA. Photosensitization of in vitro biofilms formed on denture base resin. *J Prosthet*

Dent. 2014;112(3):632-7. doi: 10.1016/j.prosdent.2014.01.001.

Deidda F, Amoroso A, Allesina S, Pane M, Graziano T, Del Piano M, et al. In vitro activity of lactobacillus fermentum LF5 against different candida species and gardnerella vaginalis: a new perspective to approach mixed vaginal infections?. J Clin Gastroenterol. 2016;50 Suppl 2:S168-S70.

Demirel G, Celik IH, Erdeve O, Saygan S, Dilmen U, Canpolat FE. Prophylactic saccharomyces boulardii versus nystatin for the prevention of fungal colonization and invasive fungal infection in premature infants. Eur J Pediatr. 2013;172(10):1321-6.

Desalermos A, Fuchs BB, Mylonakis E. Selecting an invertebrate model host for the study of fungal pathogenesis. PLoS Pathog. 2012;13:1002451.

Díaz-Ropero MP, Martín R, Sierra S, Lara-Villoslada F, Rodríguez JM, Xaus J, et al. Two lactobacillus strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune response. J Appl Microbiol. 2007;102(2):337-43.

Dinareello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood. 1996;87(6):2095-147.

Dong H, Rowland I, Yaqoob P. Comparative effects of six probiotic strains on immune function in vitro. Br J Nutr. 2012;108(3):459-70.

Dubovskiy IM, Whitten MM, Yaroslavtseva ON, Greig C, Kryukov VY, Grizanova EV, et al. Can insects develop resistance to insect pathogenic fungi?. PLoS One. 2013;8(4):e60248.

Dvorožňáková E, Bucková B, Hurníková Z, Revajová V, Lauková A. Effect of probiotic bacteria on phagocytosis and respiratory burst activity of blood polymorphonuclear leukocytes PMNL in mice infected with trichinella spiralis. Vet Parasitol. 2016;231(16):69-76.

Egan AJ, Cleverley RM, Peters K, Lewis RJ, Vollmer W. Regulation of bacterial cell wall growth. FEBS J. 2017;284(6):851-67. doi: 10.1111/febs.13959.

Ferreira MB, Myiagi S, Nogales CG, Campos MS, Lage-Marques JL. Time and concentration-dependent cytotoxicity of antibiotics used in endodontic therapy. J Appl Oral Sci. 2010;18(3):259-63.

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

Ganguli K, Meng D, Rautava S, Lu L, Walker WA, Nanthakumar N. Probiotics prevent necrotizing enterocolitis by modulating enterocyte genes that regulate innate immune-mediated inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013;304(2):132–41.

Haidaris CG, Foster TH, Waldman DL, Mathes EJ, McNamara J, Curran T. Effective photodynamic therapy against microbial populations in human deep tissue abscess aspirates. *Lasers Surg Med*. 2013;45(8):509-16.

Hise AG, Tomalka J, Ganesan S, Patel K, Hall BA, Brown GD, et al. An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Host Microbe*. 2009;5(5):487–97.

Hlivak P, Odraska J, Ferencik M, Ebringer L, Jahnova E, Mikes Z. One-year application of probiotic strain *Enterococcus faecium* M-74 decreases serum cholesterol levels. *Bratisl Lek Listy*. 2005;106(2):67-72.

Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*. 2004;5(10):971–4.

Horvath A, Leber B, Schmerboeck B, Tawdrous M, Zettel G, Hartl A, et al. Randomised clinical trial: the effects of a multispecies probiotic vs. placebo on innate immune function, bacterial translocation and gut permeability in patients with cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016 Nov;44(9):926-35

Huang Q, Xu X, Mao YL, Huang Y, Rajput IR, Li WF. Effects of *Bacillus subtilis* B10 spores on viability and biological functions of murine macrophages. *Anim Sci J*. 2013 Mar;84(3):247-52.

International Organization for Standardization. ISO 10993-5: biological evaluation of medical devices part 5: testes for cytotoxicity: in vitro methods. Geneva: International Organization for Standardization; 1992.

Ishihara K, Hirano T. IL–6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002;13(4-5):357–68.

Jain S, Yadav H, Sinha PR. Stimulation of innate immunity by oral administration of dahi containing probiotic *Lactobacillus casei* in mice. *J Medic Food*. 2008;11(4):652–56.

Jang SO, Kim HJ, Kim YJ, Kang MJ, Kwon JW, Seo JH, et al. Asthma prevention by *Lactobacillus rhamnosus* in a mouse model is associated with CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2012 May;4(3):150–6.

Jesus D, Oliveira JR, Oliveira FE, Higa KC, Junqueira JC, Jorge AO, et al. *Persea americana* glycolic extract: in vitro study of antimicrobial activity against *candida albicans* biofilm and cytotoxicity evaluation. *Scientific World Journal*. 2015;2015:531972. doi: 10.1155/2015/531972.

Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol*. 2005;175(6):3463–8.

Jorjão AL, Oliveira FE, Leão MV, Carvalho CA, Jorge AO, Oliveira LD. Live and heat-killed *lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 may induce modulatory cytokines profiles on macrophages RAW 264 7. *ScientificWorldJournal*. 2015;2015:716749.

Kanmani P, Satish Kumar R, Yuvaraj N, Paari KA, Pattukumar V, Arul V. Probiotics and its functionally valuable products-a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2013;53(6):641-58.

Kim HG, Lee SY, Kim NR, Ko MY, Lee JM, Yi TH, et al. Inhibitory effects of *lactobacillus plantarum* lipoteichoic acid LTA on *staphylococcus aureus* LTA-induced tumor necrosis factor- α production. *J Microbiol Biotechnol*. 2008 Jun;18(6):1191–6.

Kim J, Joo I, Kim H, Han Y. 18 β -glycyrrhetinic acid induces immunological adjuvant activity of Th1 against *candida albicans* surface mannan extract. *Phytomedicine*. 2013;20(11):951-5.

Kim YC, Song SB, Lee SK, Park SM, Kim YS. The Nuclear Orphan Receptor NR4A1 is Involved in the Apoptotic Pathway Induced by LPS and Simvastatin in RAW 264.7 Macrophages. *Immune Netw*. 2014;14(2):116-22.

Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, et al. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature*. 1994;368(6469):339-42.

Kosalec I, Kopjar N, Kremer D. Antimicrobial activity of willowherb *epilobium angustifolium* L leaves and flowers. *Curr Drug Targets*. 2013;14(9):986-91.

Kourkoumpetis T, Manolakaki D, Velmahos GC, et al. *Candida* infection and colonization among non-trauma emergency surgery patients. *Virulence*. 2010;1(5):359-66. doi: 10.4161/viru.1.5.12795.

Kulakova IuV, Aleshkin AV, Afanas'ev SS, Zhilenkova OG. Zh development of polycomponent metabolite probiotic mikrobiol epidemiol immunobiol. 2013;(5):80-6.

Kullberg BJ, Netea MG, Vonk AG, van der Meer JW. Modulation of neutrophil function in host defense against disseminated *Candida albicans* infection in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1999 Dec;26(3-4):299-307. Review.

Kumar S, Bansal A, Chakrabarti A, Singhi S. Evaluation of efficacy of probiotics in prevention of candida colonization in a PICU-a randomized controlled trial. *Crit Care Med*. 2013a;41(2):565-72.

Kumar S, Singhi S. Role of probiotics in prevention of candida infection in critically ill children. *Mycoses*. 2013b;56(3):204-11.

Lan RX, Lee SI, Kim IH. Effects of multistrain probiotics on growth performance, nutrient digestibility, blood profiles, faecal microbial shedding, faecal score and noxious gas emission in weaning pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr*. 2016 Dec;100(6):1130-8.

LeBlanc AM, Matar C, LeBlanc N, Perdigon G. Effects of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 on a murine breast cancer model. *Breast Cancer Res*. 2005;7(4): 477-86.

Li D, Li Q, Liu C, Lin M, Li X, Xiao X, et al. Efficacy and safety of probiotics in the treatment of candida-associated stomatitis. *Mycoses*. 2014;57(3):141-6.

Li J, Tan B, Mai K, Ai Q, Zhang W, Liufu Z, et al. Immune responses and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* induced by probiotic bacterium *Arthrobacter* XE-7 in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J World Aquac Soc*. 2008;39(4):477-89.

Li J, Yin Y, Wang L, Liang P, Li M, Liu X, et al. Synthesis, characterization, and anti-inflammatory activities of methyl salicylate derivatives bearing piperazine moiety. *Molecules*. 2016 Nov;21(11):e1544.

Liévin-Le Moal V, Servin AL. Anti-infective activities of *Lactobacillus* strains in the human intestinal microbiota: from probiotics to gastrointestinal anti-infectious biotherapeutic agents. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Apr;27(2):167-99.

Ling Y, Puel A. IL-17 and infections. *Actas Dermosifiliogr*. 2014 Oct;105 Suppl 1:34-40. doi: 10.1016/S0001-7310(14)70016-X.

Liu CF, Tseng KC, Chiang SS, Lee BH, Hsu WH, Pan TM. Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus* exopolysaccharides. *J Sci Food Agric*. 2011;91(12):2284-91.

Marr KA, Patterson T, Denning D. Aspergillosis pathogenesis, clinical manifestations, and therapy. *Infect Dis Clin North Am*. 2002;16:875-94.

Mastromarino P, Brigidi P, Macchia S, Maggi L, Pirovano F, Trinchieri V, et al. Characterization and selection of vaginal lactobacillus strains for the preparation of vaginal tablets. *J Appl Microbiol.* 2002;93:884-93.

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

Matsuguchi T, Takagi A, Matsuzaki T, Nagaoka M, Ishikawa K, Yokokura T, et al. Lipoteichoic acids from Lactobacillus strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10(2):259–66.

Mendonça FH, Santos SS, Ida SF, Silva CRG, Jorge AO, Leão MV. Effects of probiotic bacteria on candida presence and IgA anti-candida in the oral cavity of elderly. *Braz Dent J.* 2012;23(5):534-8.

Miyazawa K, He F, Kawase M, Kubota A, Yoda K, Hiramatsu M. Enhancement of immunoregulatory effects of lactobacillus gasseri TM0356 by heat treatment and culture medium. *Lett Appl Microbiol.* 2011;53(2):210-6

Morita H, He F, Fuse T, Ouwehand AC, Hashimoto H, Hosoda M, et al. Cytokine production by the murine macrophage cell line J774 1 after exposure to lactobacilli. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2002;66(9):1963-6.

Muench DF, Kuch DJ, Wu H, Begum AA, Veit SJ, Pelletier ME, et al. Hydrogen peroxide-producing lactobacilli inhibit gonococci in vitro but not during experimental genital tract infection. *J Infect Dis.* 2009;199(9):1369-78.

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67:400-28.

Naugler WE, Karin M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends Mol Med.* 2008;14(3):109-19.

Ohashi Y, Ushida K. Health-beneficial effects of probiotics: its mode of action. *Anim Sci J.* 2009;80(4):361-71.

Okwuosa OM, Chukwura EI, Chukwuma GO, Okwuosa CN, Enweani IB, Agbakoba NR, et al. Phytochemical and antifungal activities of uvaria chamae leaves and roots, spondias mombin leaves and bark and combretum racemosum leaves. *Afr J Med Med Sci.* 2012;41 Suppl:99-103.

Oliveira JR, Almeida RBA, Vilela PGF, Oliveira FE, Rocha RF, Jorge AOC, et

al. Control of microorganisms of oral health interest with arctium lappa L burdock extract non-cytotoxic to cell culture of macrophages RAW 264 7. Arch Oral Biol. 2014 May;59(8):808-14.

Pandey S, Kawai T, Akira S. Microbial sensing by tolllike receptors and intracellular nucleic acid sensors. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015 Oct;7(1):a016246. doi: 10.1101/cshperspect.a016246.

Park OJ, Han JY, Baik JE, Jeon JH, Kang SS, Yun CH, et al. Lipoteichoic acid of enterococcus faecalis induces the expression of chemokines via TLR-2 and PAFR signaling pathways. J Leukoc Biol. In press 2013.

Paz-Cristobal MP, Royo D, Rezusta A, Andrés-Ciriano E, Alejandro MC, Meis JF, et al. Photodynamic fungicidal efficacy of hypericin and dimethyl methylene blue against azole-resistant candida albicans strains. Mycoses. 2014;57(1):35-42.

Pfaller MA, Diakema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol 2007;20:133-63.

Pham LN, Dionne MS, Shirasu-Hiza M, Schneider DS. A specific primed immune response in drosophila is dependent on phagocytes. PLoS Pathog. 2007;3(3):e26.

Phiphatwatcharaded C, Topark-Ngarm A, Puthongking P, Mahakunakorn P. Anti-inflammatory activities of melatonin derivatives in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264 7 cells and antinociceptive effects in mice. Drug Dev Res. 2014 Jun;75(4):235-45. doi: 10.1002/ddr.21177.

Posteraro B, Posteraro P, Sanguinetti M. Update on antifungal resistance and its clinical impact. Curr Fungal Infect Rep. 2013;7(3),224–34.

Quishida CC, Carmello JC, Mima EG, Bagnato VS, Machado AL, Pavarina AC. Susceptibility of multispecies biofilm to photodynamic therapy using photodithazine®. Lasers Med Sci. 2015 Dec;30(9):2303-12. doi: 10.1007/s10103-015-1811-9.

Rajput IR, Li LY, Xin X, Wu BB, Juan ZL, Cui ZW, et al. Effect of saccharomyces boulardii and bacillus subtilis B10 on intestinal ultrastructure modulation and mucosal immunity development mechanism in broiler chickens. Poult Sci. 2013;92(4):956-65.

Ren D, Li C, Qin Y, Yin R, Du S, Liu H, et al. Evaluation of immunomodulatory activity of two potential probiotic lactobacillus strains by in vivo tests. Anaerobe. 2015 Oct;35(Pt B):22-7. doi:

10.1016/j.anaerobe.2015.06.008.

Ribeiro FC, Barros PP, Rossoni RD, Junqueira JC, Jorge AO. *Lactobacillus rhamnosus* inhibits *Candida albicans* virulence factors in vitro and modulates immune system in *Galleria mellonella*. *J Appl Microbiol*. 2017 Jan;122(1):201-11.

Roberts JD, Suckling CA, Peedle GY, Murphy JA, Dawkins TG, Roberts MG. An exploratory investigation of endotoxin levels in novice long distance triathletes, and the effects of a multi-strain probiotic prebiotic, antioxidant intervention. *Nutrients*. 2016 Nov 17;8(11). pii: E733.

Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:275-88.

Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:1-23.

Rossoni RD, Barbosa JO, de Oliveira FE, de Oliveira LD, Jorge AO, Junqueira JC. Biofilms of *Candida albicans* serotypes A and B differ in their sensitivity to photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*. 2014;29(5):1679-84.

Roth O, Sadd BM, Schmid-Hempel P, Kurtz J. Strain-specific priming of resistance in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Proc Biol Sci*. 2009;276(1654):145-51.

Roy A, Chaudhuri J, Sarkar D, Ghosh P, Chakraborty S. Role of Enteric Supplementation of Probiotics on Late-onset Sepsis by *Candida* species in Preterm Low Birth Weight Neonates: A Randomized, Double Blind, Placebo-controlled Trial. *N Am J Med Sci*. 2014;6(1):50-7.

Ryan KA, O'Hara AM, van Pijkeren JP, Douillard FP, O'Toole PW. *Lactobacillus salivarius* modulates cytokine induction and virulence factor gene expression in *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol*. 2009;58(Pt 8):996-1005.

Sadd BM, Schmid-Hempel P. Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure *Curr. Biol*. 2006;16(12):1206–10.

Sadeghzadeh J, Vakili A, Sameni HR, Shadnough M, Bandegi AR, Zahedi Khorasani M. The Effect of Oral Consumption of Probiotics in Prevention of Heart Injury in a Rat Myocardial Infarction Model: a Histopathological, Hemodynamic and Biochemical Evaluation. *Iran Biomed J*. 2016 Nov 22. pii: IBJ-A-10-697-1. [Epub ahead of print]

Segawa S, Wakita Y, Hirata H, Watari J. Oral administration of heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 ameliorates alcoholic liver disease in ethanol-containing diet-fed C57BL/6N mice. *Int J Food Microbiol*. 2008;128(2):371–7.

Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1462(1-2):55-70.

Shieh Ming-Jer, Shang Huey-fang, Liao Fang-Hsuean, Zhu Jia-Shi. *Lactobacillus fermentum* improved intestinal bacteria flora by reducing *Clostridium perfringens*. *e-SPEN, Eur E J Clin Nutr Metab*. 2011;6:e59-e63.

Silva EO, de Carvalho TC, Parshikov IA, Dos Santos RA, Emery FS, Furtado NA. Cytotoxicity of lapachol metabolites produced by probiotics. *Lett Appl Microbiol*. 2014 Jul;59(1):108-14. doi: 10.1111/lam.12251.

Sornplang P, Leelavatcharamas V, Soikum C. Heterophil Phagocytic Activity Stimulated by *Lactobacillus salivarius* L61 and L55 Supplementation in Broilers with *Salmonella* Infection. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2015 Nov;28(11):1657-61.

Tan X, Fuchs BB, Wang Y, Chen W, Yuen GJ, Chen RB, et al. The role of *Candida albicans* SPT20 in filamentation, biofilm formation and pathogenesis. *PLoS One*. 2014 Apr 14;9(4):e94468.

Tinrat S, Saraya S, Traidej Chomnawang M. Isolation and characterization of *Lactobacillus salivarius* MTC 1026 as a potential probiotic. *J Gen Appl Microbiol*. 2011;57(6):365–78.

Torii A, Torii S, Fujiwara S, Tanaka H, Inagaki N, Nagai H. *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 regulates the production of Th1 cytokine as well as Th2 cytokines. *Allergol Int*. 2007;56(3):293–301.

Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(3):379–414.

Van Hai N, Buller N, Fotedar R. The use of customized probiotics in the cultivation of western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye, 1896). *Fish Shellfish Immunol*. 2009;27(2):100-4.

Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Balish E. Candidacidal activity of macrophages from immunocompetent and congenitally immunodeficient mice. *J Infect Dis*. 1994;170:180–8.

Vertyporokh L, Taszłow P, Samorek-Pieróg M, Wojda I. Short-term heat shock affects the course of immune response in *Galleria mellonella* naturally infected with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J Invertebr Pathol*. 2015;130:42-51.

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.

Villéger R, Saad N, Grenier K, Falourd X, Foucat L, Urdaci MC, et al. Characterization of lipoteichoic acid structures from three probiotic *Bacillus* strains: involvement of D-alanine in their biological activity. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2014 Oct;106(4):693-706.

Villena J, Chiba E, Tomosada Y, Salva S, Marranzino G, Kitazawa H, et al. Orally administered *Lactobacillus rhamnosus* modulates the respiratory immune response triggered by the viral pathogen-associated molecular pattern poly (I:C). *BMC Immunol*. 2012;13:53.

Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* 2008a;32:149–67.

Vollmer W. Structural variation in the glycanstrands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiol Rev*. 2008b;32:287–306.

Vonk AG, Netea MG, van Krieken JH, Iwakura Y, van der Meer JW, Kullberg BJ. Endogenous interleukin (IL)–1 alpha and IL–1 beta are crucial for host defense against disseminated candidiasis. *J. Infect. Dis*. 2006;193(10):1419–26.

Wang JE, Dahle MK, McDonald M, Foster SJ, Aasen AO, Thiemermann C. Peptidoglycan and lipoteichoic acid in gram-positive bacterial sepsis: receptors, signal transduction, biological effects, and synergism. *Shock*. 2003;20(5):402–14.

Watson CJ, Grando D, Fairley CK, Chondros P, Garland SM, Myers SP, Pirotta M. The effects of oral garlic on vaginal candida colony counts: a randomized placebo controlled double-blind trial. *BJOG*. 2014;121(4):498-506.

Weiss G, Schaible UE. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol Rev*. 2015;264:182–203.

Wickens K, Black PN, Stanley TV, Mitchell E, Fitzharris P, Tannock GW, et al. A differential effect of 2 probiotics in the prevention of eczema and atopy: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122(4):788-94.

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

Wollowski I, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr*. 2001;73(2 Suppl):451S-455S.

World Health Organization. Food and agriculture organization of the United Nations. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic and bacteria. Cordoba, 2001.

Wu G, Yi Y, Lv Y, Li M, Wang J, Qiu L. The lipopolysaccharide (LPS) of *Photobacterium luminescens* TT01 can elicit dose- and time-dependent immune priming in *Galleria mellonella* larvae. *J Invertebr Pathol*. 2015;127:63-72.

Yang HJ, Min TK, Lee HW, Pyun BY. Efficacy of Probiotic Therapy on Atopic Dermatitis in Children: A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Trial. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2014;6(3):208-15.

Yiu ZZ, Griffiths CE. Interleukin 17-A inhibition in the treatment of psoriasis. *Expert Rev Clin Immunol*. 2016;12:1-4.

Yoon H, Park YS, Lee DH, Seo JG, Shin CM, Kim N. Effect of administering a multi-species probiotic mixture on the changes in fecal microbiota and symptoms of irritable bowel syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Biochem Nutr*. 2015;57(2):129-34.

Yun B, Oh S, Griffiths MW. *Lactobacillus acidophilus* modulates the virulence of *Clostridium difficile*. *J Dairy Sci*. 2014;97(8):4745-58. doi: 10.3168/jds.2014-7921.

Zakostelska Z, Kverka M, Klimesova K, Rossmann P, Mrazek J, Kopecny J, et al. Lysate of probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 ameliorates colitis by strengthening the gut barrier function and changing the gut microenvironment. *PLoS One*. 2011;6(11):e27961.

Zhang W, Zhu YH, Zhou D, Wu Q, Song D, Dicksved J, Wang JF. Oral administration of a select mixture of *Bacillus* probiotics affects the gut microbiota and goblet cell function in newly weaned MUC4 resistant pigs following *Escherichia coli* challenge. *Appl Environ Microbiol*. 2016 Nov 23. pii: AEM.02747-16. [Epub ahead of print]

Zhao HM, Huang XY, Zuo ZQ, Pan QH, Ao MY, Zhou F, et al. Probiotics increase T regulatory cells and reduce severity of experimental colitis in mice. *World J Gastroenterol*. 2013;19(5):742-9.

Zhao JJ, Feng XP, Zhang XL, Le KY. Effect of *Porphyromonas gingivalis* and *Lactobacillus acidophilus* on secretion of IL1B, IL6, and IL8 by gingivalepithelial cells. *Inflammation*. 2012;35(4):1330-7.

Zhen Y, Stenmark H. Cellular functions of Rab GTPases at a glance. *J Cell Sci.* 2015;128:3171–3176 6.

ANEXO A — Certificado do Comitê de Ética envolvendo seres humanos para a cepa de *L. paracasei*, utilizada nesta tese

INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA CAMPUS SÃO JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP		
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE <i>Lactobacillus</i> spp. DA CAVIDADE BUCAL E SUA AÇÃO PROBIÓTICA SOB <i>Candida albicans</i>: FORMAÇÃO DE BIOFILME, INFECÇÃO EM MODELOS DE INVERTEBRADOS E EXPRESSÃO DOS GENES EFG1, HWP1 e ALS1		
Pesquisador: Rodnei Dennis Rossoni		
Área Temática:		
Versão: 2		
CAAE: 27166714.4.0000.0077		
Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP		
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 560.479		
Data da Relatoria: 11/03/2014		
Apresentação do Projeto:		
Adequado		
Objetivo da Pesquisa:		
O objetivo desse estudo será isolar e identificar cepas de <i>Lactobacillus</i> spp. da cavidade bucal de indivíduos livres de cárie e avaliar sua ação probiótica sob <i>Candida albicans</i>.		
Avaliação dos Riscos e Benefícios:		
Ausência de riscos.		
Benefício: Identificar espécies de <i>Lactobacillus</i> com ação probiótica sob <i>Candida albicans</i>		
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:		
Foram realizadas as alterações solicitadas		
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:		
Adequados		
Recomendações:		
Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777		
Bairro: Jardim São Dimas		CEP: 12.245-000
UF: SP	Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS	
Telefone: (12)3947-9079	Fax: (12)3947-9010	E-mail: osp@fosjo.unesp.br

Página 01 de 02

ANEXO B – Certificado do Comitê de Ética envolvendo seres humanos para as cepas de *Candida albicans* 21 e *Candida albicans* 60, utilizadas nesta tese

 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - Al. São Diniz
CUP 12201-070 - F. (12) 3947-9028
Fax (12) 3947-9010 / janete@foc.usp.br



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Com Seres Humanos

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 051/2009-PH/CEP, sobre “Diversidade genética e sensibilidade à fotossensibilização in vitro de candida albicans isoladas de pacientes com candidose orofaríngea”, sob a responsabilidade de JULIANA CAMPOS JUNQUEIRA, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, com seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 21 de agosto de 2009.



Profa. Adjunto JANETE DIAS ALMEIDA
Coordenadora