



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

**RODNEI DENNIS ROSSONI**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Lactobacillus* spp.  
DA CAVIDADE BUCAL E SUA AÇÃO PROBIÓTICA SOB  
*Candida albicans*: FORMAÇÃO DE BIOFILME, INFECÇÃO  
DE MODELOS INVERTEBRADOS E EXPRESSÃO DOS GENES  
*EFG1*, *HWP1* e *ALS1***

2017

**RODNEI DENNIS ROSSONI**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Lactobacillus* spp. DA CAVIDADE BUCAL E SUA AÇÃO PROBIÓTICA SOB *Candida albicans*: FORMAÇÃO DE BIOFILME, INFECÇÃO EM MODELOS DE INVERTEBRADOS E EXPRESSÃO DOS GENES *EFG1*, *HWP1* E *ALS1***

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. Juliana Campos Junqueira

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).

Rossoni, Rodnei Dennis

Isolamento e caracterização de *Lactobacillus* spp. da cavidade bucal e sua ação probiótica sob *Candida albicans*: Formação de biofilme, infecção em modelos de invertebrados e expressão dos genes EFG1, HWP1 e ALS1 / Rodnei Dennis Rossoni. - São José dos Campos : [s.n.], 2017.

99 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: Juliana Campos Junqueira.

1. *Candida albicans*. 2. Cavidade oral. 3. Interações Hospedeiro-Patógeno. 4. Biofilme. 5. *Caenorhabditis elegans*. I. Junqueira, Juliana Campos, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira** (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Profa. Dra. Silvana Soléo Ferreira dos Santos**

Universidade de Taubaté (UNITAU)

Instituto Básico de Biociências

Campus Bom Conselho

**Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos Graner**

Universidade de Campinas (UNICAMP)

Faculdade de Odontologia

Campus de Piracicaba

**Profa. Tit. Maria José Soares Mendes Gianinni**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

Campus de Araraquara

São José dos Campos, 04 de dezembro de 2017.

## DEDICATÓRIA

A **Deus** pela presença constante nos meus dias e por me dar confiança e saúde em buscar os meus sonhos.

À minha avó, **Silvia Helena da Silva** por sempre estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida. Meu porto seguro!

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, Profa. Adj. **Juliana Campos Junqueira**, por todos os anos de trabalho e convivência. Sou muito grato pelos dez anos trabalhados na Microbiologia ao seu lado e por me tornar mestre e doutor sob sua orientação. Pela sua paciência, dedicação, amizade e pelas oportunidades antes nunca sonhadas. Meu eterno agradecimento!

Ao Prof. Tit. **Antonio Olavo Cardoso Jorge**, minha admiração pelo seu conhecimento e disposição em sempre ajudar. Desde a minha primeira iniciação científica na disciplina de Microbiologia sempre acompanhou meu desenvolvimento e me incentivou na vida acadêmica. Sou muito grato por ter o senhor como exemplo.

Toda a minha formação profissional devo a vocês dois. Meus eternos mestres!

## AGRADECIMENTOS

À minha família pelo amor, carinho, companheirismo e alegria em diversos momentos de minha vida.

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

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

Aos docentes do **Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal**.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão de Bolsa de estudos no país (Processo 2013/25181-8), Bolsa BEPE (Processo 2014/12458-4) e Auxílio à Pesquisa (Processo 2015/09770-9) que possibilitou a aquisição dos materiais necessários para a realização deste trabalho.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** por financiar as minhas pesquisas que desenvolvi desde 2007, sendo quatro Iniciações Científicas, Mestrado, Doutorado e Estágio no Exterior.

À **Profa. Dra. Silvana Soléo Ferreira dos Santos** que participou da minha vida na UNESP em vários momentos inclusive as “caronas” até Caçapava. Gratidão por ter sido seu aluno de graduação e tê-la na minha Qualificação do curso de Mestrado, Doutorado e agora na defesa da tese.

À amiga **Patrícia Pimentel de Barros**, que sempre me apoiou e ajudou no decorrer desses quatro anos e pelas palavras de incentivo quando eu mais precisei nos Estados Unidos. A nossa amizade vai além do âmbito profissional da UNESP e sou muito grato por isso. Obrigado por tudo!

Aos professores **Beth Burgwyn Fuchs** e **Eleftherios Mylonakis** por me permitir desenvolver parte desse estudo no laboratório de Doenças Infecciosas do Rhode Island Hospital, da Brown University que me proporcionou um crescimento profissional e pessoal enorme. Foi um dos maiores desafios da minha vida.

Aos amigos “conquistados” durante meu estágio em Providence que pude compartilhar os momentos da minha vida tornando-os mais alegres. Muito obrigado a **Soraya Eatemadpour**, **Noelly de Queiroz Ribeiro**, **Cleide Viviane Buzanello Martins** e **Thais Furtado Ferreira Magalhães**.

À amiga **Marisol dos Santos Velloso**, que foi minha “companheira de aventuras” nos primeiros meses nos Estados Unidos. Foi muito bom ter sua amizade e companhia naqueles dias. Muito obrigado!

À amiga **Fernanda Freire** por estar ao meu lado dividindo os bons e não tão bons momentos da pós-graduação. Juntos no curso de mestrado, estágio no exterior e em todo doutorado. Muito obrigado pela amizade e pelo carinho de sempre!

Aos meus amigos do laboratório, em especial à **Jéssica Diane dos Santos**, **Leileane Cohn**, **Mirian Marcolan de Melo**, **Tamara Carneiro**, **Liliana Scorzoni**, **Janaína Araújo de Alvarenga**, **Michele Peneluppi**, **Simone Furgeri Godinho Vilela**, **Ana Carolina Chipoletti**, **Maíra Terra Garcia**, **Luciana Ruano de Oliveira Fugisaki**, **Lívia Mara Figueiredo**, **Rafaella Braga**, **Adeline Larceda Jorjão** e **Elis de Andrade Lima Zutin**, por terem me dado força, amizade e carinho durante a realização deste trabalho.

Ao amigo **Felipe de Camargo Ribeiro** pela amizade, companheirismo e por toda ajuda que tem me dado recentemente na UNESP. Sou grato por ter sua companhia!

À amiga **Claudia Aparecida do Carmo** pela amizade sincera desde que entrei na UNESP. Muito obrigado pelo apoio e pela confiança em mim, sempre torcendo pelo meu sucesso!

Aos técnicos **Sérgio Giovanny Alves** e **Domingos Gonçalves Pontes**, pela colaboração e amizade durante todo os anos que estou no Laboratório de Microbiologia e Imunologia.

Aos funcionários da seção técnica de pós-graduação, **Bruno Shiguemitsu**, **Ivan Oliveira Damasceno**, **Rosemary de Fátima Salgado** e **Sandra Mara Cordeiro**, pela paciência, prontidão no atendimento, e amizade conquistada durante esses anos.

Ao **Carlos Alberto Guedes** e **Michele Ramos dos Santos** por toda a ajuda, colaboração e paciência nos trâmites relativos à FAPESP.

À Dra. **Thais Cachuté Paradella** pela ajuda das lindas fotos obtidas a partir da microscopia eletrônica de varredura.

À equipe da Biblioteca pela ajuda na elaboração deste trabalho, contribuindo com o acesso ao material bibliográfico e à bibliotecária **Renata Aparecida Couto Martins** que orientou sua normalização.

Aos meus amigos **Evelyn Luzia de Souza Santos**, **Tania Mara da Silva**, **Felipe Eduardo de Oliveira**, **Lucélia Lemes Gonçalves**, **Beatriz Maria da Fonseca** e **Rosemary Soares de Santana**. Obrigado pela amizade, as adversidades respeitadas, a sinceridade ímpar e todo carinho comigo desde sempre. Vocês são essências na minha vida!

*“Eu disse a uma amiga:*

*– A vida sempre superexigiu de mim.*

*Ela disse:*

*– Lembre-se que você também superexige dela. Sim.” - Clarice Lispector*

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMO .....                                                                                                                                                                 | 12 |
| ABSTRACT .....                                                                                                                                                               | 13 |
| 1 INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                                           | 14 |
| 2 PROPOSIÇÃO .....                                                                                                                                                           | 18 |
| 2.1 Objetivo geral.....                                                                                                                                                      | 18 |
| 2.1.1 Objetivos específicos.....                                                                                                                                             | 18 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                                                                                    | 19 |
| 3.1 Seleção de Pacientes .....                                                                                                                                               | 19 |
| 3.2 Coleta Microbiológica das Amostras.....                                                                                                                                  | 19 |
| 3.3 Identificação das amostras e seleção das cepas de <i>Lactobacillus</i> .....                                                                                             | 20 |
| 3.4 Cepas de Micro-organismos.....                                                                                                                                           | 20 |
| 3.5 Interação de <i>C. albicans</i> e <i>Lactobacillus</i> spp. em modelos de estudo <i>in vitro</i> .....                                                                   | 21 |
| 3.5.1 Estudo dos efeitos de <i>Lactobacillus</i> sobre biofilmes de <i>C. albicans</i> por meio da contagem de UFC/mL .....                                                  | 22 |
| 3.5.1.1 Preparo da suspensão padronizada de <i>C. albicans</i> e <i>Lactobacillus</i> .....                                                                                  | 22 |
| 3.5.1.2 Preparo do sobrenadante da cultura de <i>Lactobacillus</i> .....                                                                                                     | 22 |
| 3.5.1.3 Formação dos biofilmes de <i>C. albicans</i> .....                                                                                                                   | 23 |
| 3.5.1.4 Determinação do número de UFC/mL.....                                                                                                                                | 23 |
| 3.5.2 Estudo dos efeitos de <i>Lactobacillus</i> sobre a filamentação de <i>C. albicans</i> .....                                                                            | 24 |
| 3.5.3 Estudo dos efeitos de <i>Lactobacillus</i> sobre biofilmes de <i>C. albicans</i> pela quantificação da biomassa total .....                                            | 25 |
| 3.5.4 Estudo dos efeitos de <i>Lactobacillus</i> sobre biofilmes de <i>C. albicans</i> pela análise de Microscopia Eletrônica de Varredura.....                              | 25 |
| 3.5.5 Avaliação da expressão dos genes alvos <i>EFG1</i> , <i>HWP1</i> , <i>ALS3</i> e <i>CPH1</i> de <i>C. albicans</i> nos biofilmes mistos com <i>Lactobacillus</i> ..... | 26 |
| 3.5.5.1 Extração de RNA.....                                                                                                                                                 | 26 |
| 3.5.5.2 Transcrição Reversa (RT-PCR) .....                                                                                                                                   | 27 |
| 3.5.5.3 Reação em cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real .....                                                                                                             | 27 |

|                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.6 Interação de <i>C. albicans</i> e <i>Lactobacillus</i> spp. em modelos de estudo <i>in vivo</i> .....                                             | 28 |
| 3.6.1 Interação de <i>Lactobacillus</i> com <i>C. albicans</i> em modelo experimental de <i>Galleria mellonella</i> .....                             | 28 |
| 3.6.1.2 Verificação da suscetibilidade de <i>G. mellonella</i> à infecção por <i>Lactobacillus</i> .....                                              | 29 |
| 3.6.1.3 Efeitos de <i>Lactobacillus</i> na infecção por <i>C. albicans</i> em <i>G. mellonella</i> .....                                              | 29 |
| 3.6.1.4 Preparo da suspensão de <i>C. albicans</i> e <i>Lactobacillus</i> .....                                                                       | 29 |
| 3.6.1.5 Injeção de micro-organismos em <i>G. mellonella</i> .....                                                                                     | 30 |
| 3.6.1.6 Determinação da curva de sobrevivência da <i>G. mellonella</i> .....                                                                          | 30 |
| 3.6.1.7 Contagem de UFC/mL na hemolinfa de <i>G. mellonella</i> .....                                                                                 | 30 |
| 3.6.1.8 Determinação da Densidade Hemocitária .....                                                                                                   | 31 |
| 3.6.1.9 Efeitos de <i>Lactobacillus</i> na expressão dos genes de Gallerymicina e Galiomicina relacionados a peptídeos antifúngicos .....             | 31 |
| 3.6.1.10 Monitoramento da infecção experimental de <i>C. albicans</i> por análise de bioluminescência .....                                           | 33 |
| 3.6.2 Interação de <i>Lactobacillus</i> com <i>C. albicans</i> em modelo experimental de <i>Caenorhabditis elegans</i> .....                          | 34 |
| 3.6.2.1 Condições de Manipulação e Cultivo de <i>C. elegans</i> .....                                                                                 | 34 |
| 3.6.2.2 Efeitos de <i>Lactobacillus</i> na infecção experimental por <i>C. albicans</i> em <i>C. elegans</i> - Ensaio de Sobrevivência .....          | 35 |
| 3.6.2.3 Estudo da filamentação de <i>C. albicans</i> em <i>C. elegans</i> tratados com <i>Lactobacillus</i> .....                                     | 36 |
| 3.7 Forma de análise dos resultados .....                                                                                                             | 36 |
| 4 RESULTADO .....                                                                                                                                     | 38 |
| 4.1 Coleta e identificação das amostras de <i>Lactobacillus</i> .....                                                                                 | 38 |
| 4.2 Estudo dos efeitos de <i>Lactobacillus</i> sobre biofilmes de <i>C. albicans</i> por meio da contagem de UFC/mL .....                             | 42 |
| 4.3 Estudo dos efeitos de <i>Lactobacillus</i> sobre a filamentação de <i>C. albicans</i> .                                                           | 46 |
| 4.4 Análise dos efeitos diretos de <i>L. rhamnosus</i> 5.2, <i>L. fermentum</i> 20.3 e <i>L. paracasei</i> 28.4 em biofilmes <i>C. albicans</i> ..... | 50 |

|                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.5 Interferência de <i>L. rhamnosus</i> 5.2, <i>L. fermentum</i> 20.3 e <i>L. paracasei</i> 28.4 nos genes de virulência de <i>C. albicans</i> ..... | 55 |
| 4.6 Efeitos de <i>Lactobacillus</i> na candidose experimental em <i>G. mellonella</i> .....                                                           | 60 |
| 4.7 Efeitos de <i>L. paracasei</i> 28.4 na infecção por <i>C. albicans</i> em modelo invertebrado de <i>C. elegans</i> .....                          | 75 |
| 5 DISCUSSÃO .....                                                                                                                                     | 79 |
| 6 CONCLUSÃO .....                                                                                                                                     | 88 |
| REFERÊNCIAS .....                                                                                                                                     | 89 |
| ANEXOS .....                                                                                                                                          | 96 |

Rossoni RD. Isolamento e caracterização de *Lactobacillus* spp. da cavidade bucal e sua ação probiótica sob *Candida albicans*: Formação de biofilme, infecção em modelos de invertebrados e expressão dos genes *EFG1*, *HWP1* e *ALS1* [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2017.

## RESUMO

O estudo da atividade inibitória de *Lactobacillus* pode contribuir na descoberta de novas estratégias terapêuticas nas infecções por *Candida*. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi isolar e identificar *Lactobacillus* da cavidade bucal de indivíduos livres de cárie e avaliar seu potencial de inibição de *C. albicans* por meio de estudos *in vitro* e *in vivo*. Primeiramente, foram avaliados os efeitos de 30 isolados clínicos de *Lactobacillus* sobre o número de células viáveis (UFC) em biofilme de *C. albicans* e sobre a formação de hifas. Os isolados que obtiveram os maiores efeitos inibitórios sobre *C. albicans* foram selecionados para os testes de determinação da biomassa total dos biofilmes pela absorbância do cristal violeta, análise da arquitetura dos biofilmes por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e quantificação da expressão de genes de *C. albicans* (*ALS3*, *HWP1*, *EFG1* e *CPH1*) por qPCR. Esses isolados também foram submetidos a estudos *in vivo* usando os modelos de *Galleria mellonella* e *Caenorhabditis elegans*. Para o estudo em *G. mellonella*, a infecção experimental foi avaliada pela curva de sobrevivência, quantificação da carga fúngica na hemolinfa, densidade hemocitária, quantificação da expressão gênica de peptídeos antifúngicos (Gallerymicina e Galiomicina) e monitoramento da infecção de *C. albicans* por análise de bioluminescência. No modelo de *C. elegans*, a infecção foi avaliada por meio dos ensaios de curva de sobrevivência e estudo da filamentação de *C. albicans*. Os resultados dos ensaios *in vitro* demonstraram que *L. paracasei* 28.4, *L. rhamnosus* 5.2 e *L. fermentum* 20.4 foram as cepas com maior atividade antimicrobiana sobre os biofilmes de *C. albicans*. Nessas cepas, todos os genes analisados foram regulados negativamente na associação com *Lactobacillus* quando comparados com o grupo controle. No estudo *in vivo*, a injeção de *L. paracasei* 28.4 em *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* aumentou a sobrevivência das larvas, o número de hemócitos e a expressão de peptídeos antifúngicos, reduzindo assim a UFC de *C. albicans*. Em *C. elegans*, *L. paracasei* 28.4 também foi capaz de aumentar a sobrevivência dos vermes infectados com *C. albicans* e reduzir a filamentação. Conclui-se que *L. fermentum* 20.4, *L. paracasei* 28.4 e *L. rhamnosus* 5.2 tem potencial para serem usados como probióticos na cavidade bucal devido sua ação anti-biofilme e sua regulação negativa dos genes de virulência de *C. albicans*. *L. paracasei* 28.4 foi capaz de prolongar a sobrevivência nos dois modelos experimentais infectados com *C. albicans* por apresentarem ação antifúngica e imunomodulatória.

Palavras-chave: *Lactobacillus*. *Candida albicans*. Cavidade oral. Interações Hospedeiro-Patógeno. Biofilme. *Caenorhabditis elegans*.

Rossoni RD. Isolation and characterization of Lactobacillus spp. from oral cavity and their probiotic action in Candida albicans: biofilm formation, infection in invertebrate models and EFG1, HWP1 and ALS1 gene expression [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2017.

## ABSTRACT

The study of the antifungal activity of Lactobacillus may contribute to the discovery of new therapeutic strategies for Candida infections. In this context, the objective of this study was to isolate and identify Lactobacillus from the oral cavity of caries-free subjects and to evaluate its effects through in vitro and in vivo studies. First, the effects of 30 clinical isolates of Lactobacillus on the number of viable cells (CFU) in biofilms of C. albicans and on hyphae formation were evaluated. The isolates that obtained the highest inhibitory effects on C. albicans were selected for biofilm biomass determination by violet crystal absorbance, analysis of biofilm architecture by scanning electron microscopy (SEM) and quantification of the expression of C. albicans (ALS3, HWP1, EFG1 and CPH1) by real time PCR. These isolates were also submitted to in vivo studies using the Galleria mellonella and Caenorhabditis elegans models. For the study in the model of Galleria mellonella, the experimental infection was evaluated by the survival curve, quantification of the fungal load in the hemolymph, hemocytary density, the gene expression of antifungal peptides (Gallerymicin and Galiomicin) and monitoring of C. albicans infection by bioluminescence analysis. In the Caenorhabditis elegans model, the infection was evaluated by the survival curve assays and the study of C. albicans filamentation. The results of in vitro tests demonstrated that L. paracasei 28.4, L. rhamnosus 5.2 and L. fermentum 20.4 were the strains with the highest antimicrobial activity on the biofilms of C. albicans. In these strains, all analyzed genes were negatively regulated in association with Lactobacillus when compared to the control group. In the in vivo study, the injection of L. paracasei 28.4 into the G. mellonella increased survival of the larvae, the number of hemocytes and the expression of antifungal peptides, thus reducing the CFU of C. albicans. In C. elegans, L. paracasei 28.4 was also able to increase the survival of worms infected with C. albicans and reduce the filamentation. We conclude that L. fermentum 20.4, L. paracasei 28.4 and L. rhamnosus 5.2 have potential to be used as probiotics in the oral cavity due to their anti-biofilm action and their negative regulation of virulence genes of C. albicans. L. paracasei 28.4 was able to prolong survival of both experimental models infected with C. albicans for having antifungal and immunomodulatory action.

Keywords: Lactobacillus. Candida albicans. Oral cavity. Host-Pathogen Interactions. Biofilm. Caenorhabditis elegans.

## 1 INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é colonizada por diferentes espécies microbianas que normalmente encontram-se organizadas em biofilmes (Jarosz et al., 2009, Wade, 2013). Os biofilmes são comunidades microbianas tridimensionais aderidas a uma superfície sólida e embebidas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares mostrando características fenotípicas que os diferenciam da forma planctônica (Harriott, Noverr, 2011). Em uma comunidade microbiana heterogênea existe a comunicação entre os micro-organismos como por exemplo através de *quorum sensing* e a interação entre as espécies podem ser antagônicas, como a competição por mais nutrientes e consequente inibição do crescimento, ou sinérgicas estimulando o crescimento (Elias, Banin, 2012, Marsh, Zaura, 2017).

*Candida albicans* é uma levedura comensal comumente encontrada na cavidade bucal dos seres humanos, sendo isolada entre 50-70% dos indivíduos saudáveis. Esta levedura é um patógeno oportunista que pode causar infecções recorrentes na mucosa, como também infecções sistêmicas fatais (Sanitá et al., 2011; Ruhnke, 2012; Mayer et al., 2013; Lydia Rajakumari, Saravana Kumari, 2016). Infecções na cavidade bucal por *Candida* spp., como candidose pseudomembranosa, eritematosa e hiperplásica, são decorrentes da formação de biofilmes compostos por leveduras, pseudohifas e hifas (Samaranayake et al., 2009, Costa et al., 2013). A formação de hifas por *C. albicans* é um importante fator de virulência, principalmente, para a formação de biofilme e invasão tecidual. O mecanismo molecular que regula a formação de biofilme inicia-se com a aderência dessas leveduras, conferida pelos genes da família *ALS*, responsáveis por aderência e agregação a outros micro-organismos. O gene *HWP1* também codifica uma adesina, porém é expresso somente por hifas de *C. albicans* (ten Cate et al., 2009; Karkowska-Kuleta et al., 2009). Após a fase de aderência, segue-se a maturação do biofilme, conferido pela expressão do gene *EFG1*, que está envolvido na regulação da transição morfológica de leveduras para hifas e na habilidade de formar o corpo do biofilme (Blankenship, Mitchell, 2006, Nobile et al., 2006).

Probióticos são suplementos alimentares compostos de micro-organismos vivos ou componentes de células microbianas que influenciam benéficamente a

saúde do hospedeiro (Fuller, 1989; Markowiak, Śliżewska, 2017). Esses benefícios devem-se principalmente à regulação da microbiota residente, modulação do sistema imunológico das mucosas pela ativação das células linfóides e produção de moléculas antimicrobianas (Herbel et al., 2013). Os lactobacilos são bactérias que colonizam a cavidade bucal e o trato gastrointestinal dos seres humanos na condição de saúde. Espécies de *Lactobacillus* são utilizadas como probióticos, podendo alterar a composição microbiana do biofilme ou estimular a resposta imunológica do hospedeiro (Tsai et al., 2012; Vestman et al., 2013). O uso de várias espécies de *Lactobacillus* como probióticos tem sido associado com a redução de doenças inflamatórias crônicas e de infecções fúngicas do trato gastrointestinal (Thein et al., 2006; Hasslof et al., 2010).

Na cavidade bucal, os lactobacilos estão associados a progressão da cárie dentária por meio de suas características acidogênicas e acidúricas, por isso são frequentemente detectados em lesões de cáries profundas. Entretanto, estudos recentes, sugerem um papel benéfico adicional para os lactobacilos bucais. Determinadas cepas de *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* isoladas de indivíduos sem cáries foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* de espécies cariogênicas como *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* de forma mais eficiente do que cepas de *Lactobacillus* isoladas de indivíduos com cárie ativa (Simark-Mattsson et al., 2007; Million, Raoult, 2013).

Estudos *in vivo* são fundamentais para o estudo das interações microbianas, da patogenicidade de micro-organismos, e descoberta de novos agentes antimicrobianos. Um modelo animal deve reproduzir a patogênese da infecção correspondente nos seres humanos, incluindo colonização e invasão a partir de uma via específica de entrada e interação com o sistema imunológico do hospedeiro (De Repentigny, 2004; Chamilos et al., 2007). Nas últimas décadas, um grande número de modelos invertebrados, incluindo *Galleria mellonella*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e *Dictyostelium discoideum*, foram desenvolvidos e estão sendo utilizados para estudo da patogenicidade experimental (Arvanitis et al., 2013). Esses modelos têm proporcionado notável conhecimento em diferentes aspectos da infecção microbiana e apresentam inúmeras vantagens em relação aos modelos de mamíferos, como baixo custo na criação, facilidade de manuseio, rapidez na

obtenção de resultados e possibilidade de estudos em grande escala, servindo como triagem para os estudos em vertebrados, atendendo assim às questões éticas e legais do princípio dos 3Rs (*Reduction, replacement e refinement*), bem como da necessidade de se desenvolver métodos alternativos aos animais convencionais (Fedhila et al., 2010; Chibebe Junior et al., 2013a, 2013b; McMillan et al., 2015).

Vilela et al. (2015) estudaram a interação entre *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 e *Candida albicans* em modelo invertebrado de *G. mellonella* por meio da análise de curva de sobrevivência e quantificação de UFC/mL de *C. albicans* na hemolinfa das larvas. Os autores verificaram que a injeção de *L. acidophilus* em *G. mellonella* infectadas por *C. albicans* aumentou significativamente a sobrevivência desses animais. Além disso, o número de UFC/ mL de *C. albicans* na hemolinfa das larvas com candidose experimental foi menor no grupo que recebeu inoculação de *L. acidophilus* em relação ao grupo controle, demonstrando ação protetora dessas bactérias probióticas na candidose experimental *in vivo*.

O uso de *C. elegans* tem ganhado muita popularidade como modelo *in vivo* para uma ampla variedade de estudos de doenças infecciosas, entretanto pouco se conhece sobre os efeitos de bactérias probióticas na prevenção de infecções fúngicas e na resposta imunológica desses nemátodos. Kim e Mylonakis (2012) estudaram os efeitos de *L. acidophilus* NCFM em infecções bacterianas por *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* em *C. elegans*. Os autores verificaram que *L. acidophilus* não é patogênico para *C. elegans* e que as infecções induzidas nesses nemátodos diminuíram significativamente com a presença de *L. acidophilus*, além de prolongar a sobrevivência dos nemátodos.

Apesar da abundância de interações microbianas na natureza, pouco se sabe sobre os mecanismos que determinam estas interações e sua importância para a saúde humana (Peleg et al., 2010). Se determinadas cepas de *Lactobacillus* podem suprimir micro-organismos patogênicos, torna-se importante a identificação dessas cepas na cavidade bucal e o estudo da sua interação com *C. albicans*, auxiliando assim na identificação de cepas com potencial probiótico e na descoberta de novos métodos de prevenção e controle de lesões de *Candida*, principalmente, em pacientes imunocomprometidos. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi isolar e identificar cepas de *Lactobacillus* spp. da cavidade bucal de indivíduos livres

de cárie e avaliar sua ação probiótica sobre *C. albicans* por meio de estudos *in vitro* e *in vivo*.

## 2 PROPOSIÇÃO

### 2.1 Objetivo geral

Isolar e identificar cepas de *Lactobacillus* spp. da cavidade bucal de indivíduos saudáveis livres de cárie e avaliar sua ação probiótica sobre *C. albicans* por meio de estudos *in vitro* e *in vivo*.

#### 2.1.1 Objetivos específicos

- a) Isolar e identificar cepas de *Lactobacillus* da cavidade bucal de indivíduos saudáveis;
- b) Verificar a ação antifúngica dessas cepas sob *C. albicans* quanto à formação de biofilme e filamentação *in vitro*;
- c) Selecionar as cepas de *Lactobacillus* com maior capacidade de inibição contra *C. albicans*;
- d) Estudar a interação das cepas selecionadas com *C. albicans* em modelos de infecção experimental de *G. mellonella* e *C. elegans*;
- e) Avaliar os efeitos dessas cepas sobre a expressão dos genes *EFG1*, *HWP1*, *ALS3* e *CPH1* de *C. albicans* em modelos de biofilme *in vitro*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Seleção de Pacientes

Esse trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista (Unesp) Campus de São José dos Campos e aprovado sob número de parecer 560.479 (ANEXO A). Todos os indivíduos foram informados da pesquisa e os que concordaram em participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO B).

Foram selecionados 41 indivíduos livres de cárie entre os alunos de graduação e pós-graduação do curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista (Unesp) de São José dos Campos. Foram incluídos no estudo, indivíduos maiores de 18 anos de idade, sem distinção de sexo ou raça, sem lesões de cáries e apresentando os elementos dentários hígidos. Os indivíduos foram excluídos quando apresentaram qualquer lesão de cárie, restaurações ou ausência de elementos dentários, pois a presença de alguma dessas situações pode alterar a microbiota bucal.

#### 3.2 Coleta Microbiológica das Amostras

Amostras da saliva foram coletadas por meio de enxágue bucal com solução fisiológica tamponada com tampão fosfato (PBS) por 1 minuto. A seguir, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 5000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado 2,5 mL de PBS com o pellet e a partir dessa suspensão foram realizadas diluições seriadas e alíquotas de 0,1 mL semeadas em duplicata em *pour plate* em ágar Rogosa SL (Difco, Detroit, MI, EUA) por 4 dias a 37°C sob condições de microaerofilia (5% de CO<sub>2</sub>). Após o crescimento, colônias discóides sugestivas de *Lactobacillus* analisadas pela morfologia e coloração de Gram foram semeadas em

tubos de ensaio contendo ágar Man-Rogosa-Shape (MRS) (Difco, Detroit, MI, EUA) para obtenção da cultura pura e realização dos testes de identificação bioquímica. Além disso, para a confirmação por identificação molecular, essas cepas foram semeadas em Caldo Infuso Cérebro-Coração (BHI) e estocadas a -80°C.

### 3.3 Identificação das amostras e seleção das cepas de *Lactobacillus*

A identificação bioquímica foi realizada pelo sistema API 50 CHL (Bio Merieux, Saint-Vulbas, França) seguindo as recomendações do fabricante. As cepas identificadas como *Lactobacillus* foram submetidas à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando iniciadores da região ribossomal conforme descrito por Song et al. (2000). Os produtos amplificados foram submetidos ao sequenciamento automático, confirmando assim a identificação bioquímica das espécies de *Lactobacillus*.

Após os testes de identificação bioquímico e genético das espécies, todas as cepas identificadas como *Lactobacillus* foram submetidas aos ensaios *in vitro* para avaliar a sua ação probiótica em biofilmes e filamentação de *C. albicans*. E, posteriormente foram selecionadas as cepas que obtiveram maior redução na viabilidade de *C. albicans* para realização dos testes *in vivo* e de expressão gênica.

### 3.4 Cepas de Micro-organismos

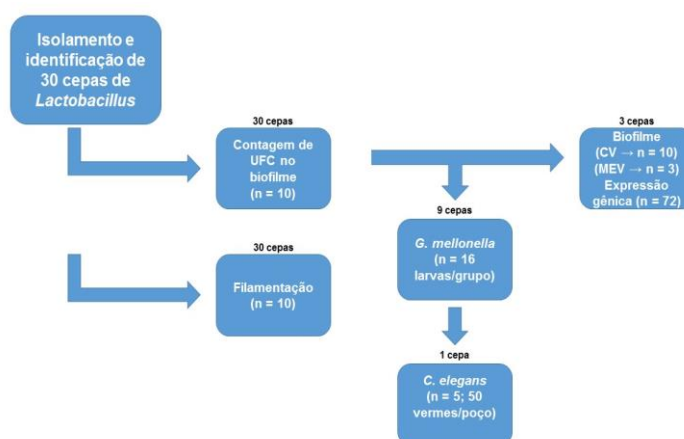
Foram utilizadas as cepas clínicas identificadas do gênero *Lactobacillus* e as cepas de *Candida albicans* (ATCC 18804 e MLR 62). A cepa ATCC 18804 foi mantida em freezer a -80°C no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/UNESP e a cepa MLR 62 foi mantida em freezer a -80°C no Laboratório de Doenças Infecciosas do Rhode Island Hospital, da Brown University. Para ativação desses micro-organismos, as cepas de *C. albicans* foram cultivadas em ágar Sabouraud Dextrose (Himedia Laboratories,

Mumbai, Índia) por 48 horas a 37°C e as cepas de *Lactobacillus* foram cultivadas em ágar Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Difco, Detroit, MI, EUA) por 48 h a 37°C sob condições de microaerofilia (5% de CO<sub>2</sub>).

### 3.5 Interação de *C. albicans* e *Lactobacillus* spp. em modelos de estudo *in vitro*

Nesta primeira etapa do estudo *in vitro* da interação entre *C. albicans* e *Lactobacillus*, foram avaliados os efeitos de todas as cepas identificadas como *Lactobacillus* sobre a formação de biofilme e filamentação por *C. albicans* para escolha das cepas com maior efeito antifúngico. Nestes dois testes, foram avaliados os efeitos diretos das células de *Lactobacillus* sobre *C. albicans* (n=10), os efeitos indiretos de *Lactobacillus* sobre *C. albicans* (n=10), utilizando apenas o sobrenadante da cultura de *Lactobacillus*, além dos grupos controles com caldo MRS sobre *C. albicans* (n=10) e somente PBS com *C. albicans* (n=10), totalizando 80 ensaios por cepa de *Lactobacillus*, sendo 40 ensaios para o estudo em biofilme e 40 ensaios para a filamentação. Todos os ensaios realizados e número de cepas usados em cada teste estão demonstrados na Figura 1.

Figura 1 – Design do estudo: distribuição dos ensaios realizados.



Fonte: Elaborada pelo autor.

### **3.5.1 Estudo dos efeitos de *Lactobacillus* sobre biofilmes de *C. albicans* por meio da contagem de UFC/mL**

#### **3.5.1.1 Preparo da suspensão padronizada de *C. albicans* e *Lactobacillus***

*C. albicans* foi cultivada a 37°C por 18 h em caldo Yeast Nitrogen Base (YNB- Difco, Detroit, MI, EUA) suplementado com glicose na concentração de 100 mM. *Lactobacillus* spp. foram cultivados em caldo MRS (Difco, Detroit, MI, EUA) a 37°C por 24 horas sob condições de microaerofilia (5% de CO<sub>2</sub>). Posteriormente, as células microbianas foram centrifugadas (2000 xg por 10 min), o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi suspenso em 6 mL de solução fisiológica tamponada com fosfato (PBS). A contagem do número de células da suspensão foi realizada através de espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, SP, Brasil) a uma concentração de 10<sup>7</sup> micro-organismos/mL para as cepas de *C. albicans* e *Lactobacillus*.

#### **3.5.1.2 Preparo do sobrenadante da cultura de *Lactobacillus***

Para o preparo do sobrenadante de *Lactobacillus*, a cepa foi incubada em caldo MRS a 37°C por 24 horas sob condições de microaerofilia (5% de CO<sub>2</sub>). Após este período foi realizada a suspensão padronizada de 10<sup>7</sup> células por mL conforme descrito anteriormente. Um volume de 1 mL da suspensão padronizada foi transferido para um tubo falcon contendo 6 mL de caldo MRS e incubados novamente a 37°C por 24 horas em estufa bacteriológica sob condições de microaerofilia (5% de CO<sub>2</sub>). Após este período, o caldo foi centrifugado (2000 xg por 10 min) e filtrado em membrana com poros de diâmetro de 0,22 µm (MFS, Dublin, EUA).

### 3.5.1.3 Formação dos biofilmes de *C. albicans*

Para a formação dos biofilmes foi utilizada a metodologia descrita por Thein et al. (2006) com algumas modificações. Os biofilmes foram formados no fundo da placa de microtitulação de 96 poços de fundo chato (Costar Corning, New York, NY, EUA). Para isso, inicialmente foram inoculados 100 µL da suspensão padronizada de *C. albicans* ( $10^7$  células/mL). A placa foi incubada em agitação a 75 rpm (Quimis, Diadema, São Paulo, SP, Brasil) a 37°C por 90 minutos para promover a adesão inicial dos micro-organismos. Após a fase de adesão, a suspensão de células foi aspirada e cada poço foi lavado duas vezes com PBS para remover as células não aderidas.

Em cada poço da placa de 96 poços, foi inoculado 50 µL da suspensão padronizada de *Lactobacillus* ou 50 µL do sobrenadante da cultura de *Lactobacillus*. No grupo controle, foi inoculado 50 µL de PBS. Para a promoção do crescimento do biofilme, 50 µL de YNB acrescido de 100 mM de glicose e 50 µL de caldo BHI foram adicionados a cada poço. O caldo foi trocado a cada 24 horas. As placas foram tampadas e incubadas a 37°C em estufa de incubação com agitação de 75 rpm por 48 horas.

### 3.5.1.4 Determinação do número de UFC/mL

O biofilme formado no fundo da placa de microtitulação de 96 poços (Costar Corning, Nova Iorque, NY, EUA) foi raspado com um palito de madeira estéril. A seguir, foi aspirado 100 µL de cada poço e transferido para um tubo falcon contendo 9,9 mL de solução fisiológica tampão fosfato (PBS). Os tubos foram homogeneizados por 30 segundos utilizando-se homogeneizador ultra-sônico (Sonoplus HD 2200 - Bandelin Eletronik, Berlin, Alemanha) com potência de 50 W, para desagregar o biofilme. A partir da solução obtida foram realizadas diluições seriadas, das quais alíquotas de 100 µL foram semeadas em placas de ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol. As placas de ágar Sabouraud dextrose foram

incubadas em estufa a 37°C por 48 horas. Após este período, as colônias foram contadas para o cálculo de UFC/mL.

### 3.5.2 Estudo dos efeitos de *Lactobacillus* sobre a filamentação de *C. albicans*

Para a realização desse experimento, após o crescimento em caldo, as cepas de *Lactobacillus* e *C. albicans* foram centrifugadas para o preparo de suspensões padronizadas de  $10^7$  células por mL conforme descrito no item 3.5.1.1. Foi preparado também o sobrenadante da cultura de *Lactobacillus* de acordo com o item 3.5.1.2. Em uma placa de cultura de células de 24 poços (Costar Corning, Nova Iorque, NY, EUA) foi adicionado 1 mL de água destilada suplementada com 10% de soro fetal bovino e 100 µL da suspensão padronizada de *C. albicans*. A seguir, em cada poço foi colocado 50 µL da suspensão padronizada de *Lactobacillus* ou 50 µL do sobrenadante da cultura de *Lactobacillus*. Nos grupos controle, foram colocados em cada poço 50 µL de PBS ou 50 µL de caldo MRS dependendo do grupo experimental. As placas contendo os inóculos foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica na presença de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas, 50 µL do inóculo contido em cada poço da placa de cultura de células de 24 poços (Costar Corning, Nova Iorque, NY, EUA) foi disperso sobre lâminas de vidro com os campos previamente demarcados no verso da lâmina.

O material sobre a lâmina foi recoberto por lamínula e as lâminas de microscopia observadas em microscópio óptico com aumento de 40x. Foram realizados 10 ensaios para cada grupo experimental. Os ensaios foram repetidos pelo menos duas vezes em momentos distintos. As imagens foram analisadas sob o aspecto morfológico e quantitativo. Para quantificação das hifas presentes, foram analisados 10 campos microscópios em cada lâmina, sendo que foi padronizado o ponto médio de cada campo para a análise. Em cada campo microscópio foi atribuído um escore, de acordo com o número de hifas presente, atribuindo-se os seguintes escores: 0, ausência de hifas; 1, de 1 a 15; 2, de 16 a 30 e 3, mais de 30.

Analisando a UFC/mL e a filamentação de *C. albicans* foram selecionadas as cepas de *Lactobacillus* que obtiveram maior potencial de inibição frente às células

de *C. albicans*. A partir desse momento todos os ensaios foram realizados utilizando apenas as cepas de *Lactobacillus* com maior ação inibitória contra *C. albicans*.

### **3.5.3 Estudo dos efeitos de *Lactobacillus* sobre biofilmes de *C. albicans* pela quantificação da biomassa total**

Após a formação do biofilme conforme descrito acima no item 3.5.1.3, a biomassa total foi quantificada pelo método colorimétrico de Cristal de Violeta (CV) descrito por Peeters et al. (2008) com modificações. Para fixação dos biofilmes, 100 µL de metanol foi adicionado (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) por 15 minutos. Os sobrenadantes foram removidos e as placas foram secas overnight em temperatura ambiente. Então 100 µL de uma solução a 1% de CV foi adicionado nos poços. Após 20 minutos, o excesso de CV foi removido por lavagem com tampão PBS. Por fim, foram adicionados 150 µL de ácido acético a 33% (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) nos poços para a liberação do corante e leitura da absorbância a 540 nm. Todos os passos foram realizados a temperatura ambiente. O ensaio de CV foi realizado em dois experimentos independentes com dez biofilmes por grupo.

### **3.5.4 Estudo dos efeitos de *Lactobacillus* sobre biofilmes de *C. albicans* pela análise de Microscopia Eletrônica de Varredura**

Discos de resina acrílica medindo 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura foram utilizados em placas de 24 poços para a formação dos biofilmes como previamente detalhado no item 3.5.1.3. Após a formação dos biofilmes, os corpos de prova foram fixados com 1 mL de glutaraldeído a 2,5% por 1 hora. Os espécimes foram desidratados com lavagens crescentes com etanol (10, 25, 50, 75 e 90%) por 20 minutos cada lavagem seguida pela imersão em álcool absoluto por 1 hora. As placas foram mantidas a 37°C por 24 horas para permitir a completa secagem dos espécimes.

Após a secagem, os espécimes foram transferidos para stubs de alumínio e cobertos com ouro por 160 segundos a 40 mA (Denton Vacuum Desk II, Moorestown, NJ, EUA). Os biofilmes formados foram examinados e fotografados pelo microscópio JEOL JSM5600 (JEOL Inc, Peabody, MA, EUA) pertencente a este instituto. Dois experimentos foram realizados em tempos diferentes com três biofilmes por grupo.

### **3.5.5 Avaliação da expressão dos genes alvos *EFG1*, *HWP1*, *ALS3* e *CPH1* de *C. albicans* nos biofilmes mistos com *Lactobacillus***

Amostras dos biofilmes de *C. albicans* formados conforme item 3.5.1.3 foram submetidos à avaliação da expressão dos genes *EFG1*, *HWP1*, *ALS3* e *CPH1*, em relação aos genes de referência (*RPP2B*, *RIP1*, *LSC2*, *PMA*). Foi realizada a avaliação dos genes alvos de *C. albicans* quando associado às cepas de *Lactobacillus* e somente *C. albicans* que foi utilizado como controle. As sequências dos iniciadores foram confirmadas no site do NCBI/ Gene Bank.

#### **3.5.5.1 Extração de RNA**

A extração de RNA foi realizada utilizando-se o Trizol (Ambion, Inc, AM1926, Waltham, MA, EUA). Após a extração, a concentração de RNA foi quantificada pelo aparelho Nanodrop 2000c UV- Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante, e os tubos armazenados no freezer a -80°C.

O RNA total extraído foi tratado com DNase I, Amplification Grade (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para que o DNA contaminante fosse removido, evitando assim, um aumento superestimado da expressão gênica.

### 3.5.5.2 Transcrição Reversa (RT-PCR)

O RNA total após o tratamento com DNase foi transcrito para cDNA utilizando o Kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), onde 1 µg de RNA foi adicionado a um microtubo de 200 µL contendo 10 µL de mix RT (2X), 2 µL de Enzima mix e água ultra pura Depec para um volume final de 20 µL. Esta mistura foi incubada em termociclador (Mastercycler-Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) com o ciclo de: 20 minutos a 25°C, 50°C por 30 minutos e 85°C por 5 minutos. Transcorrido esse ciclo, os tubos foram colocados no gelo e foi adicionado 1 µL de RNase H e incubados por mais 30 minutos a 37°C. O novo cDNA obtido foi armazenado a -20°C.

### 3.5.5.3 Reação em cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real

Os produtos da RT- PCR foram amplificados para a quantificação relativa da expressão dos genes citados acima. As reações de quantificação foram realizadas de acordo com as condições e parâmetros previamente descritos para cada um dos genes alvo. A expressão genética é apresentada como o *ratio* da concentração dos genes alvo, em relação à concentração do gene normalizador e representam a expressão média obtida de reações distintas de PCR em Tempo Real. Neste trabalho foram testados três genes normalizadores, sendo que, o gene normalizador escolhido teve que apresentar um Ct (*cycle threshold* - ou limiar) similar aos genes alvos analisados. O Ct é o ponto correspondente ao número de ciclos a partir do qual a amplificação atinge um dado limiar que permite a análise quantitativa da expressão do gene alvo avaliado. As médias dos valores de Ct, medidas em triplicata, foram utilizadas para calcular a expressão dos genes alvo com normalização a um controle interno. Os resultados foram obtidos como valores relativos da expressão gênica (com base na fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) em comparação a um alvo-interno de referência, previamente selecionado, e que resulta em valor 1. O método qRT-PCR avaliou a quantidade do produto cDNA na fase exponencial da

reação de amplificação. Para o sistema de detecção, foi utilizado o fluoróforo SYBR® Green (Kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG - Invitrogen) que seguirá a seguinte reação: em um microtubo de 200 µL, foi colocado 12,5 µL de Super mix Platinum SYBR Green, 1 µL de ROX (corante de referência), 10 µM de *primer* forward, 10 µM de *primer* reverse, solução de cDNA alvo e água dietil pirocarbonato para o volume final de 25 µL. Os microtubos foram incubados em um termociclador (LineGene K- Bioer Technology) com os seguintes ciclos: 50°C por 2 minutos, seguido de desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos e mais 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos. A detecção da fluorescência, no fim da etapa de cada ciclo da PCR, permitiu a monitoração da quantidade crescente de cDNA amplificado, sendo os dados obtidos analisados no Software do equipamento de real-time.

### **3.6 Interação de *C. albicans* e *Lactobacillus* spp. em modelos de estudo *in vivo***

Nesta etapa, estudos *in vivo* envolvendo a interação entre *C. albicans* e *Lactobacillus*, foram avaliados nos modelos invertebrados de *G. mellonella* e *C. elegans*. Em *G. mellonella*, foram realizados ensaios de sobrevivência, avaliação da carga fúngica na hemolinfa das larvas, contagem de hemócitos, análise da expressão gênica de peptídeos antifúngicos e por bioluminescência. No modelo de *C. elegans*, foi realizado o ensaio de sobrevivência e análise da filamentação *in vivo*.

#### **3.6.1 Interação de *Lactobacillus* com *C. albicans* em modelo experimental de *Galleria mellonella***

Para o estudo neste modelo invertebrado foram utilizadas as metodologias descritas por Mylonakis et al. (2005) e Vilela et al. (2015). Foram utilizadas larvas de *G. mellonella* em estágio final da fase larval com peso corporal de aproximadamente

de  $330 \pm 25$  mg (Vanderhorst Wholesale, St. Marys, OH, EUA). Estas foram armazenadas no escuro e utilizadas em um prazo máximo de 7 dias.

#### **3.6.1.2 Verificação da suscetibilidade de *G. mellonella* à infecção por *Lactobacillus***

Antes do estudo da interação de *C. albicans* e *Lactobacillus*, foi realizada uma análise da suscetibilidade de *G. mellonella* à infecção por *Lactobacillus* para determinação da concentração sub-letal de *Lactobacillus* nesses insetos. Para isso, foram inoculadas em *G. mellonella* várias suspensões padronizadas de *Lactobacillus* nas concentrações entre  $10^5$  a  $10^9$  células/larva. Para cada concentração inoculada, foi utilizado um grupo de 16 larvas. As suspensões padronizadas de *Lactobacillus* foram preparadas de acordo com o item 3.5.1.1. Um inóculo de 10  $\mu$ L de cada suspensão padronizada foi injetado em *G. mellonella* para determinação da curva de sobrevivência.

#### **3.6.1.3 Efeitos de *Lactobacillus* na infecção por *C. albicans* em *G. mellonella***

#### **3.6.1.4 Preparo da suspensão de *C. albicans* e *Lactobacillus***

*C. albicans* foi cultivada a 37°C por 18 horas em caldo Yeast Peptone Dextrose (YPD- Difco, Detroit, MI, EUA). A seguir, as células foram centrifugadas a 2000 xg por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado. O depósito foi ressuspensionado em PBS e homogeneizado em agitador de tubos por 30 segundos. Esta lavagem das células foi repetida por mais 2 vezes. As densidades celulares de *C. albicans* foram ajustadas em  $10^8$  células/mL por meio de hemocitômetro.

A suspensão padronizada de *Lactobacillus* foi realizada conforme descrito no item 3.5.1.1 na concentração sub-letal determinada nesse estudo.

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

Um inóculo de 10 µL da suspensão padronizada de *Lactobacillus* foi injetado com auxílio de seringas de precisão (Hamilton Inc., Manitowoc, WI, EUA) na hemolinfa de cada larva através da última proleg esquerda. Após uma hora, dez microlitros da suspensão padronizada de *C. albicans* foi inoculado na última proleg direita. Para os grupos com infecção por um único micro-organismo, 10 µL da suspensão do micro-organismo foi inoculada na última proleg esquerda e o mesmo volume de PBS na última proleg direita. Para cada micro-organismo foi utilizada uma seringa Hamilton. Em todos os experimentos foi realizado um grupo inoculado apenas com PBS para acompanhar o estado de saúde das larvas de *G. mellonella* durante todo o experimento.

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

Para determinação da curva de sobrevivência, nos grupos de interação as células de *Lactobacillus* foram injetadas na última proleg esquerda das larvas 1 hora antes da inoculação das células de *C. albicans*.

Após a inoculação, as larvas foram armazenadas em placas de Petri e incubadas a 37°C. O número de *G. mellonella* mortas foi anotado diariamente durante 7 dias. As larvas foram consideradas mortas quando não apresentarem nenhum movimento ao toque. A curva de morte e estimativa das diferenças na sobrevivência foi determinada pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox).

### 3.6.1.7 Contagem de UFC/mL 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 nos tempos de 4, 8 e 24

horas após a infecção, nos seguintes grupos experimentais: Interação *Lactobacillus* e *C. albicans* e grupo controle com *C. albicans* e PBS.

Para cada grupo e tempo foram utilizados quatro pools de 4 larvas para coletar hemolinfa suficiente e prosseguir com as diluições seriadas, totalizando 96 larvas infectadas para esse ensaio.

Em cada tempo, as larvas foram cortadas com bisturi no sentido céfalo caudal e espremidas para retirada da hemolinfa que foi colocada em um microtubo. A partir do pool da hemolinfa das larvas, foram feitas diluições seriadas e semeadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol para *C. albicans*. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após este período, as colônias foram contadas para o cálculo de UFC/larva.

#### **3.6.1.8 Determinação da Densidade Hemocitária**

Para este estudo foi utilizada a metodologia descrita por Mylonakis et al. (2005). Grupos de 16 larvas foram infectados para cada grupo experimental conforme descritos no item 3.7.4.3 e incubadas a 37°C durante 4, 8 e 24 horas. A hemolinfa de cada larva foi coletada separadamente em microtubos e diluída 1:10 em PBS e as células foram contadas utilizando hemocitômetro. Como o experimento foi realizado em triplicata, para cada grupo foram utilizadas 16 larvas, totalizando 144 larvas infectadas para todos os ensaios.

#### **3.6.1.9 Efeitos de *Lactobacillus* na expressão dos genes de Gallerymicina e Galiomicina relacionados a peptídeos antifúngicos**

O RNA larval foi extraído usando TRIzol (Ambion, Inc., Carlsbad, CA, EUA) como recomendado pelo fabricante nos tempos 4, 8 e 24 horas após a injeção de *Lactobacillus*. No total, 2 mL de TRIzol foi adicionado em um tubo de 15 mL contendo o tecido larval congelado e homogeneizado e incubado em temperatura

ambiente por 10 minutos. Subsequentemente, 400 µL de clorofórmio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi adicionado e os tubos foram centrifugados a 12.000 xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e 1 mL de isopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi adicionado. Após a centrifugação, o pellet obtido foi lavado com etanol a 70% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), centrifugado novamente e resuspenso em 50 µL de água livre de nuclease (Ambion Inc., Carlsbad, CA, EUA). A concentração, pureza e qualidade do RNA foram verificados utilizando o NanoVue Plus spectrophotometer (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA, EUA).

O RNA extraído total (1 µg) foi transcrito em DNA complementar (cDNA) utilizando Verso cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, EUA) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Os *primers* para os genes que codificam β-actina e Galiomicina foram desenhados pelo autor da tese. Os *primers* de Gallerymicina foram descritos e usados com indicado por Bergin et al. (2006) (Quadro 1). Os cDNAs transcritos foram amplificados e quantificados relativamente na expressão dos genes de Galiomicina e Gallerymicina em relação do gene de referência (β-actina).

Quadro 1 – *Primers* usados para amplificar as regiões dos genes envolvidos na resposta imune de *G. mellonella* e um gene de referência

| Gene            | Sequência 5'-3'       | Bp* | Referência            |
|-----------------|-----------------------|-----|-----------------------|
| Galiomicina F   | TCCAGTCCGTTTTGTTGTTG  | 123 | Este autor            |
| Galiomicina R   | CAGAGGTGTAATTCGTCGCA  | 123 | Este autor            |
| Gallerymicina F | GAAGATCGCTTTCATAGTCGC | 175 | Bergin et al., (2006) |
| Gallerymicina R | TACTCCTGCAGTTAGCAATGC | 175 | Bergin et al., (2006) |
| β-actina F      | ACAGAGCGTGGCTACTCGTT  | 104 | Este autor            |
| β-actina R      | GCCATCTCCTGCTCAAAGTC  | 104 | Este autor            |

F indica um primer forward. R indica um primer reverse.

\*Par de base (Tamanho do fragmento).

Fonte: Elaborada pelo autor.

O método de qPCR foi aplicado para avaliar o cDNA na fase exponencial da reação de amplificação. O sistema de detecção, iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA, EUA), foi utilizado na seguinte reação: 5 µL de iTaq Universal SYBR Green (2x), 300 nM do *primer* forward, 300 nM *primer* reverse, 2 µL de cDNA (diluído 1:10) e 2 µL de água livre de nuclease (Ambion Inc., Carlsbad, CA, EUA) para obter um volume final de 10 µL em cada poço numa placa de 96 poços (Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA, EUA). Como controle negativo, todos os reagentes foram adicionados nos últimos poços das placas com exceção do cDNA e por fim as placas foram seladas utilizando um adesivo óptico (Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA, EUA). Subsequentemente, as placas foram lidas em um aparelho CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA, EUA). Os seguintes parâmetros foram utilizados 95°C por 2 minutos para uma denaturação inicial seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos. Após o fim do último ciclo, as amostras foram analisadas pela dissociação da curva de *melting*. O método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  foi utilizado para analisar as mudanças relativas na expressão dos genes no experimento de RT-PCR (Livak, Schmittgen, 2001).

### **3.6.1.10 Monitoramento da infecção experimental de *C. albicans* por análise de bioluminescência**

As larvas foram infectadas conforme o item 3.6.1.5. Após 4 e 8 horas de infecção por *C. albicans*, o monitoramento em tempo real da candidose experimental foi realizado utilizando o sistema de imagem IVIS® Lumina Series III (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA) para a obtenção das imagens bioluminescentes. Este aparelho detecta e quantifica a emissão dos fótons emitidos pela célula fúngica, em vermelho (maior captação de fótons) e azul (menor captação). Neste ensaio, a infecção experimental por *C. albicans* foi realizada com a cepa MLR62 bioluminescente, que expressa constitutivamente a proteína fluorescente verde (GFP). Primeiramente foi obtido uma imagem em escala de cinza (sem bioluminescência) de cada placa para normalizar os dados, em seguida pela imagem bioluminescente da mesma placa, e

após isso o sinal bioluminescente foi quantificado com dados de calibração absoluta: fóton s-1 cm-2 sr-1, usando o software do IVIS. Nesse ensaio foi comparado o grupo controle de larvas infectadas por *C. albicans* com o grupo de larvas que receberam profilaticamente uma injeção de *Lactobacillus*.

### **3.6.2 Interação de *Lactobacillus* com *C. albicans* em modelo experimental de *Caenorhabditis elegans***

Para os ensaios de *C. elegans* foram utilizadas as metodologias descritas por Oh et al. (2012) e Kim e Mylonakis (2012). Em todos os ensaios experimentais, foram induzidas infecções em *C. elegans* pela associação de *Lactobacillus* com *C. albicans*. Como controle, infecções monoespécies também foram induzidas nos nemátodos pela inoculação isolada de *C. albicans* ou *Lactobacillus*.

#### **3.6.2.1 Condições de Manipulação e Cultivo de *C. elegans***

Foi utilizada a cepa de *C. elegans* AU37 *glp-4* (bn2); *sek-1* (km4). Essa cepa é comumente usada para testes de virulência, pois a mutação *glp-4* gera nemátodos estéreis a 25°C, mantendo a amostra constante durante todo experimento. Entretanto, uma única mutação em *glp-4* torna os ensaios muito longos devido a maior longevidade desses invertebrados, o que poderia gerar algumas variáveis deixando o resultado dos testes não confiáveis. Com isso, a mutação em *sek-1* torna os testes viáveis, pois este gene codifica uma p38 MAPK importante para a resposta celular, tornando esses nemátodos mais sensíveis as infecções experimentais (Mylonakis et al., 2005).

*C. elegans* foram cultivados em placas de Petri com meio de cultura de nemátodo (NGM) com *Escherichia coli* OP50 semeada previamente, a qual foi sua fonte de alimento. Este meio de cultura foi composto de 3 g de NaCl<sub>2</sub>, 2,5 g de peptona, 17 g de ágar, 1 mL de colesterol, 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 1M, 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 1 M e

25 mL de tampão  $\text{KHPO}_4$  para 1000mL de água destilada. Previamente a realização de cada ensaio, os nemátodos foram lavados 2 vezes com tampão M9, composto por 3 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 6 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 5 g de NaCl e 1000 mL de água destilada.

### **3.6.2.2 Efeitos de *Lactobacillus* na infecção experimental por *C. albicans* em *C. elegans* - Ensaio de Sobrevivência**

Primeiramente, *C. elegans* foram cultivados em placas de NGM, com uma cultura prévia de 12 horas de *E. coli* OP50, por 60 horas a 25°C para atingir o estágio de desenvolvimento denominado “*Young adults*”, ideal para trabalhar com *C. albicans* nesse modelo invertebrado. Decorrido esse tempo, os nemátodos foram lavados 2 vezes com tampão M9 e 3 vezes com caldo S, composto de 5,85 g NaCl, 1 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 6 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mL colesterol (5 mg/mL em etanol), para 1000 mL de água destilada, através de centrifugação (1100 rpm durante 30 segundos).

A fim de estudar os efeitos de *Lactobacillus* na candidose experimental em *C. elegans*, as cepas de *Lactobacillus* foram cultivadas em caldo MRS (Difco, Detroit, MI, EUA) a 37°C por 18 horas. A seguir a cultura bacteriana foi centrifugada e lavada 2 vezes com o meio M9 afim de padronizar a suspensão em  $10^9$  UFC/mL. Um inóculo de 500 µL da suspensão padronizada de *Lactobacillus* foi espalhado sobre uma placa de NGM. Placas de NGM acrescidas com *E. coli* OP50 foram utilizadas como controle.

Os nemátodos foram primeiramente infectados por *Lactobacillus* e após 2 horas por *C. albicans*. Desse modo, os nemátodos foram colocados em placas de ágar NGM previamente condicionadas com *Lactobacillus* e incubados a 25°C por 2 horas. Decorrido este período, os nemátodos foram lavados com tampão M9 e colocados em placas de Brain Heart Infusion (BHI – Difco, Detroit, MI, EUA) contendo *C. albicans* (25°C por 2 horas). A seguir, os nemátodos infectados foram transferidos para placas de cultura de células de 24 poços contendo 2 mL de meio líquido (80% de M9 e 20% de BHI). As placas foram seladas e incubadas a 25°C por 8 dias. Os nemátodos foram observados diariamente em estereomicroscópio e foram considerados mortos quando não apresentarem nenhum movimento ao toque

por agulha de platina. Foram utilizados aproximadamente 50 nemátodos por grupo experimental. A curva de morte e estimativa das diferenças na sobrevivência foi determinada pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox).

### **3.6.2.3 Estudo da filamentação de *C. albicans* em *C. elegans* tratados com *Lactobacillus***

Primeiramente os nemátodos de *C. elegans* foram infectados por *Lactobacillus* por um período de 4 horas a 25°C e posteriormente, foi realizado infecção de *C. elegans* por *C. albicans*. Para isso, os nemátodos foram colocados para se alimentarem do crescimento de *C. albicans* na superfície do ágar BHI (Difco, Detroit, MI, EUA) contendo kanamicina (45 µg/mL), ampicilina (100 µg/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), sendo incubados a 25°C por 4 horas. A seguir, os nemátodos foram lavados com Tampão M9 e transferidos por pipetagem (aproximadamente 50 nemátodos) para cada poço das placas de cultura de células de 6 poços (Costar Corning, Nova Iorque, NY, EUA) contendo 2 mL de meio líquido (80% de M9 e 20% de BHI). As placas foram incubadas a 25°C e analisadas após 60 horas para observação de nemátodos com filamentos de *C. albicans*. Essa análise foi feita em estereomicroscópio (Nikon SMZ645, Tóquio, Japão), procurando-se observar uma ruptura na cutícula do nemátodo pela filamentação de *C. albicans* no aumento de 50x. Foram comparadas as diferenças na filamentação dos nemátodos entre os grupos com infecções entre *Lactobacillus* e *C. albicans* e infecções somente com *C. albicans*.

## **3.7 Forma de análise dos resultados**

Os ensaios *in vitro* com os biofilmes de *C. albicans* (Contagem de UFC/mL; Análise da biomassa total), a comparação da expressão gênica dos genes de virulência de *C. albicans*, a contagem do número de *Candida* na hemolinfa das

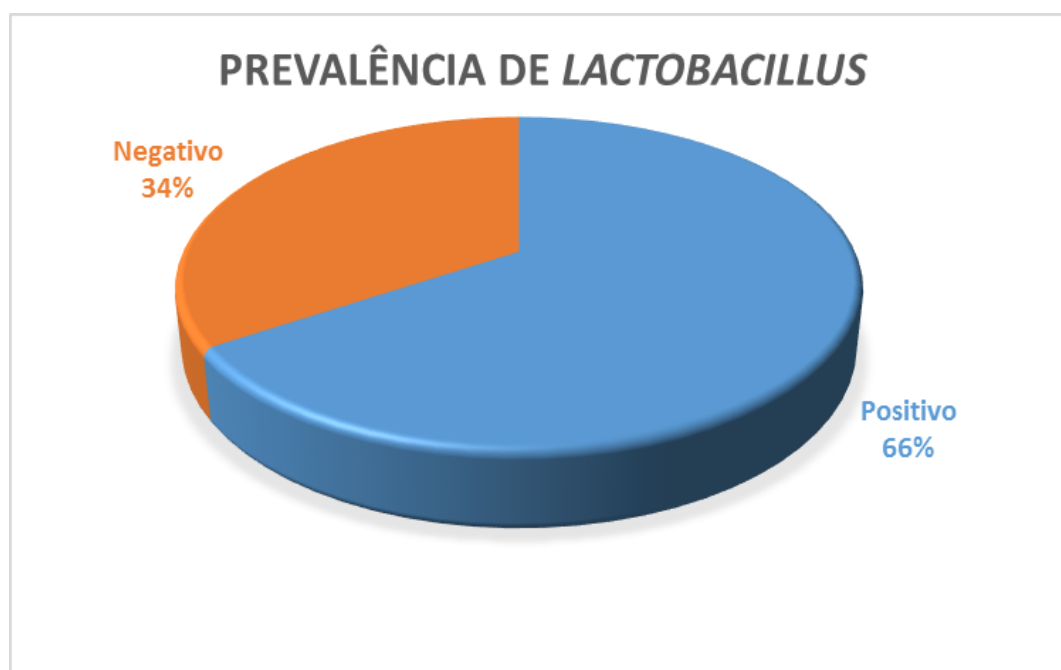
larvas (UFC/larvas) e a filamentação de *C. elegans* foram analisados pelo teste *t* de student. Os escores obtidos no ensaio de filamentação *in vitro* foram comparados utilizando os testes Kruskal-Wallis e Dunn. As curvas de sobrevivência de *G. mellonella* e *C. elegans* foram analisadas pelo teste de Kaplan-Meier. A contagem de hemócitos e a expressão gênica dos peptídeos antifúngicos produzidos por *G. mellonella* foram analisadas pelo teste de ANOVA e Tukey. Todos os testes estatísticos foram realizados no programa GraphPad Prism statistical software (GraphPad Software, Inc., California, CA, EUA) e um *p* valor  $\leq 0,05$  foi considerado significativo.

## 4 RESULTADO

### 4.1 Coleta e identificação das amostras de *Lactobacillus*

Foram coletadas amostras do lavado bucal de 41 indivíduos livres de cárie e semeados em *pour plate* em ágar Rogosa, no entanto somente 66% (27) dos participantes possuíram crescimento sugestivo de *Lactobacillus* nas placas (Figura 2). O crescimento das colônias de *Lactobacillus* no meio de cultura está demonstrado na Figura 3.

Figura 2 – Prevalência de *Lactobacillus* spp. da cavidade bucal de indivíduos livres de cárie



Fonte: Elaborada pelo autor.

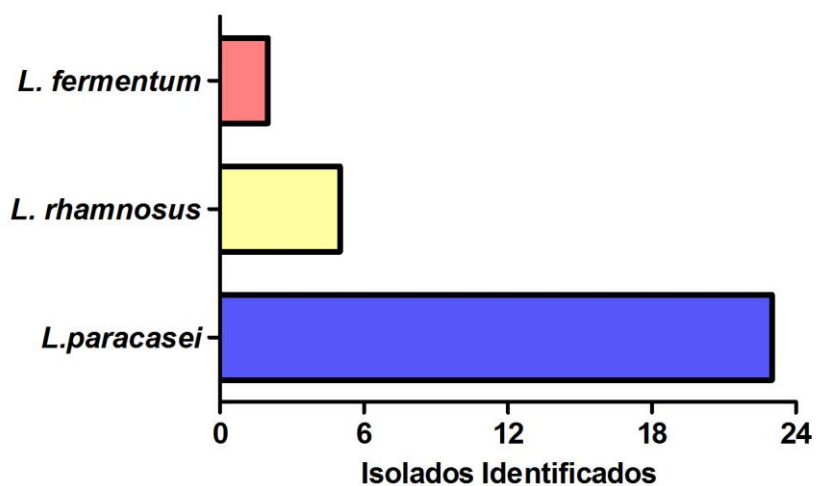
Figura 3 – Crescimento de colônias sugestivas de *Lactobacillus* em *pour plate* em ágar Rogosa



Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir do crescimento das colônias discóides nas placas de ágar Rogosa, foram obtidas culturas puras, totalizando 45 isolados. Foi realizada a análise da morfologia pela coloração de GRAM para todos os isolados. Entretanto somente 30 dos isolados foram identificados pelo sistema API 50 CHL e pela PCR pois eram bacilos Gram-positivos, incluindo as seguintes espécies: 23 isolados clínicos de *Lactobacillus paracasei*, 5 de *Lactobacillus rhamnosus* e 2 amostras de *Lactobacillus fermentum*. A distribuição das espécies identificadas está demonstrada na Figura 4.

Figura 4 – Distribuição das espécies de *Lactobacillus* dos 30 isolados clínicos identificados por biologia molecular



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os ensaios realizados para a identificação bioquímica pelo sistema API 50 CHL estão ilustrados na Figura 5.

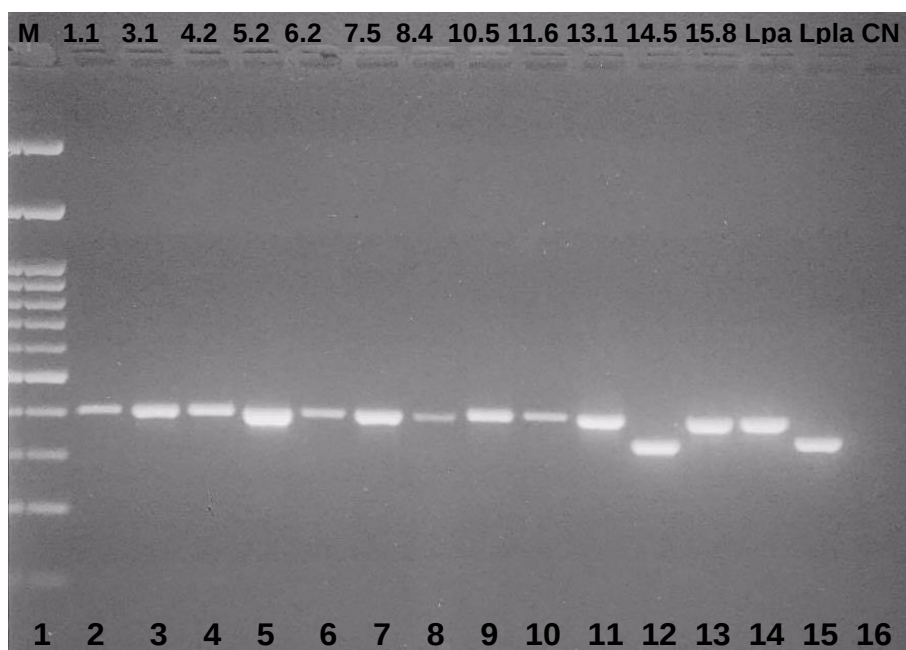
Figura 5 – Leitura das galerias do API 50 CHL: Coloração azul – negativo; Coloração amarela: positivo



Fonte: Elaborada pelo autor.

As provas de identificação molecular pela técnica de PCR estão representadas, respectivamente, nas Figuras 6 e 7.

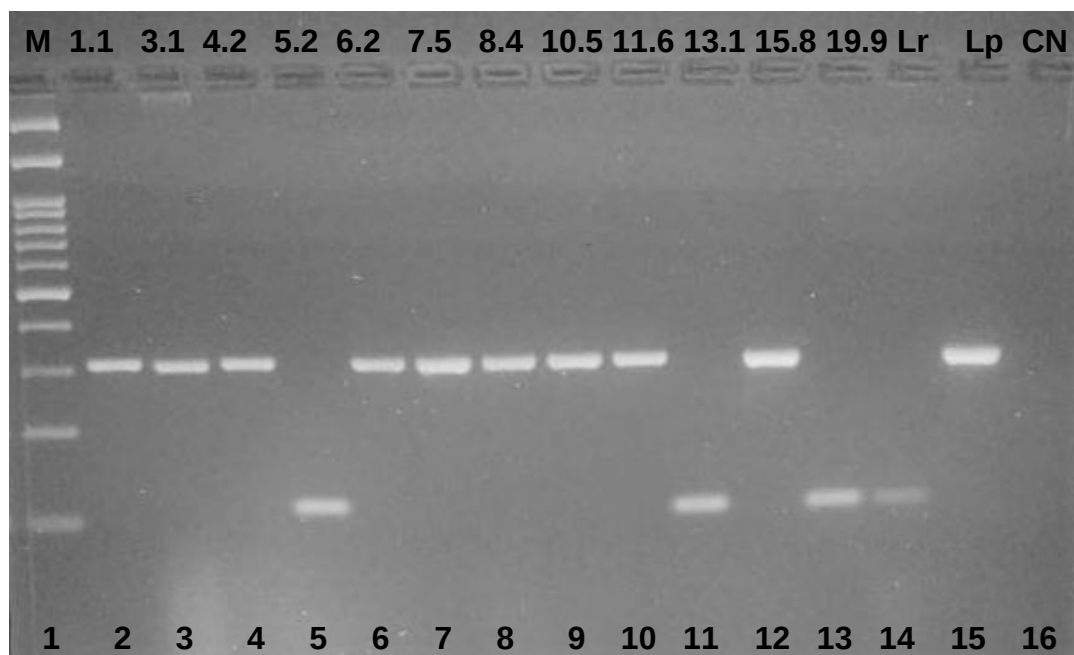
Figura 6 – Gel de agarose a 2% em 0,5x TBE corado por brometo de etídio



Legenda: PCR multiplex para identificação de *Lactobacillus* spp. Fragmento de 400 pb obtido para as espécies de *L. paracasei* e *L. rhamnosus* e de 350 pb para as espécies *L. plantarum* e *L. fermentum*. Can. 1- marcador de peso molecular Ladder 100 pb (M); Can. 2- amostra 1.1; Can. 3- amostra 3.1; Can. 4- amostra 4.2; Can. 5- amostra 5.2; Can. 6- amostra 6.2; Can. 7- amostra 7.5; Can. 8- amostra 8.4; Can. 9 amostra 10.5; Can. 10- amostra 11.6; Can. 11- amostra 13.1; Can. 12- amostra 14.5; Can. 13- amostra 15.8; Can 14- Lpa- *L. paracasei* ATCC; Can. 15- Lpla- *L. plantarum* ATCC; Can. 16- CN- Controle negativo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 7 - Gel de agarose à 2% em 0,5x TBE corado por brometo de etídio



Legenda: PCR multiplex específico para identificação das espécies de *L. paracasei* e *L. rhamnosus* com os fragmentos de 312 pb e 113 pb, respectivamente. Can. 1- marcador de peso molecular Ladder 100pb (M). Amostras identificadas como *L. paracasei* - Can. 2- amostra 1.1 Can. 3- amostra 3.1; Can. 4- amostra 4.2; Can. 6- amostra 6.2; Can. 7- amostra 7.5; Can. 8- amostra 8.4; Can. 9- amostra 10.5; Can. 10- amostra 11.6; Can. 12- amostra 15.8; Amostras identificadas como *L. rhamnosus* - Can. 5- amostra 5.2; Can. 11- amostra 13.1; Can. 13- amostra 19.9; Can. 14- *L. rhamnosus* ATCC (113pb); Can. 15- *L. paracasei* ATCC (312pb); Can. 16- CN- Controle negativo.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.2 Estudo dos efeitos de *Lactobacillus* sobre biofilmes de *C. albicans* por meio da contagem de UFC/mL

Após o isolamento e identificação de todos os isolados, foi estudada a interação de *C. albicans* e *Lactobacillus* spp. em modelos de estudo *in vitro* (biofilme e filamentação) e selecionadas as amostras clínicas de *Lactobacillus* que obtiveram melhor ação inibitória contra *C. albicans* para a realização dos ensaios de expressão gênica, a análise da biomassa e por MEV. Primeiramente, foi realizado o estudo da formação do biofilme de *C. albicans* associado com as células de *Lactobacillus* (efeito direto) ou seu sobrenadante (efeito indireto) e foi verificado uma redução na contagem de UFC/mL de *C. albicans* diferente para cada espécie e amostra clínica testada. A redução da UFC/mL de *C. albicans* para o grupo célula variou entre 0,72

Log a 0,01 Log e para o grupo sobrenadante foi de 0,68 Log a 0,06 Log (Tabela 1). Para comprovar se a composição do caldo MRS da cultura de *Lactobacillus* poderia ter ação sobre *C. albicans* e, portanto, interferir no experimento com o sobrenadante da cultura de *Lactobacillus*, foi realizado junto com os grupos acima mais um grupo, o grupo controle *C. albicans* e caldo MRS. Os resultados demonstraram que a utilização apenas do caldo MRS em substituição ao sobrenadante não promoveu inibição na contagem de UFC/ mL (Log) de *C. albicans* para todas as amostras clínicas estudadas.

Tabela 1- Média do número de UFC/mL ( $\log_{10}$ ) obtidas a partir da contagem de *C. albicans* nos biofilmes do Grupo Controle *C. albicans* e PBS, Grupo Controle *C. albicans* e caldo MRS, Grupo Interação *C. albicans* e célula de *Lactobacillus* e Grupo Interação *C. albicans* e sobrenadante da cultura de *Lactobacillus*

(continua)

| Amostra | <i>C. albicans</i><br>e PBS<br>(n=10) | <i>C. albicans</i><br>e MRS<br>(n=10) | <i>C. albicans</i> e<br>célula de<br><i>Lactobacillus</i><br>(n=10) | <i>C. albicans</i> e<br>sobrenadante de<br><i>Lactobacillus</i><br>(n=10) | Valor<br>de $p^*$ |
|---------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| 1.1     | 7,79                                  | 7,74                                  | 7,77                                                                | 7,78                                                                      | 0,8900            |
| 3.1     | 7,79                                  | 7,74                                  | 7,58                                                                | 7,62                                                                      | 0,0100            |
| 4.2     | 7,76                                  | 7,79                                  | 7,48                                                                | 7,44                                                                      | 0,0001            |
| 5.2     | 7,69                                  | 7,62                                  | 7,26                                                                | 7,27                                                                      | 0,0001            |
| 6.2     | 7,79                                  | 7,74                                  | 7,79                                                                | 7,73                                                                      | 0,7100            |
| 7.5     | 7,67                                  | 7,65                                  | 7,37                                                                | 7,26                                                                      | 0,0001            |
| 8.4     | 7,67                                  | 7,57                                  | 7,57                                                                | 7,47                                                                      | 0,2490            |
| 10.5    | 7,67                                  | 7,57                                  | 7,45                                                                | 7,51                                                                      | 0,0130            |
| 11.6    | 7,76                                  | 7,79                                  | 7,63                                                                | 7,57                                                                      | 0,0300            |
| 13.1    | 7,69                                  | 7,62                                  | 7,40                                                                | 7,30                                                                      | 0,0001            |
| 14.5    | 7,67                                  | 7,57                                  | 7,40                                                                | 7,26                                                                      | 0,0700            |
| 15.8    | 7,67                                  | 7,57                                  | 7,52                                                                | 7,42                                                                      | 0,0063            |
| 16.4    | 7,67                                  | 7,57                                  | 7,37                                                                | 7,31                                                                      | 0,0006            |
| 17.1    | 7,67                                  | 7,61                                  | 7,42                                                                | 7,54                                                                      | 0,0040            |

Tabela 1- Média do número de UFC/mL ( $\log_{10}$ ) obtidos a partir da contagem de *C. albicans* nos biofilmes do Grupo Controle *C. albicans* e PBS, Grupo Controle *C. albicans* e caldo MRS, Grupo Interação *C. albicans* e célula de *Lactobacillus* e Grupo Interação *C. albicans* e sobrenadante da cultura de *Lactobacillus*

(conclusão)

| Amostra | <i>C. albicans</i><br>e PBS<br>(n=10) | <i>C. albicans</i><br>e MRS<br>(n=10) | <i>C. albicans</i> e<br>célula de<br><i>Lactobacillus</i><br>(n=10) | <i>C. albicans</i> e<br>sobrenadante de<br><i>Lactobacillus</i><br>(n=10) | Valor<br>de $p^*$ |
|---------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| 19.3    | 7,71                                  | 7,69                                  | 7,37                                                                | 7,33                                                                      | 0,0001            |
| 19.9    | 7,72                                  | 7,69                                  | 7,17                                                                | 7,05                                                                      | 0,0001            |
| 20.3    | 7,69                                  | 7,69                                  | 7,37                                                                | 7,48                                                                      | 0,0001            |
| 20.4    | 7,71                                  | 7,69                                  | 7,25                                                                | 7,12                                                                      | 0,0001            |
| 21.4    | 7,76                                  | 7,79                                  | 7,54                                                                | 7,65                                                                      | 0,0100            |
| 23.4    | 7,76                                  | 7,79                                  | 7,51                                                                | 7,47                                                                      | 0,0001            |
| 24.1    | 7,67                                  | 7,61                                  | 7,41                                                                | 7,53                                                                      | 0,0060            |
| 25.4    | 7,67                                  | 7,57                                  | 7,38                                                                | 7,33                                                                      | 0,0003            |
| 26.1    | 7,72                                  | 7,69                                  | 7,24                                                                | 7,18                                                                      | 0,0001            |
| 27.1    | 7,72                                  | 7,69                                  | 7,21                                                                | 7,04                                                                      | 0,0001            |
| 28.4    | 7,72                                  | 7,69                                  | 7,00                                                                | 7,09                                                                      | 0,0001            |
| 30.1    | 7,79                                  | 7,74                                  | 7,51                                                                | 7,48                                                                      | 0,0001            |
| 31.4    | 7,71                                  | 7,69                                  | 7,45                                                                | 7,27                                                                      | 0,0006            |
| 36.4    | 7,67                                  | 7,57                                  | 7,40                                                                | 7,52                                                                      | 0,0173            |
| 37.1    | 7,67                                  | 7,61                                  | 7,45                                                                | 7,48                                                                      | 0,0080            |
| 39.2    | 7,67                                  | 7,61                                  | 7,66                                                                | 7,61                                                                      | 0,8250            |

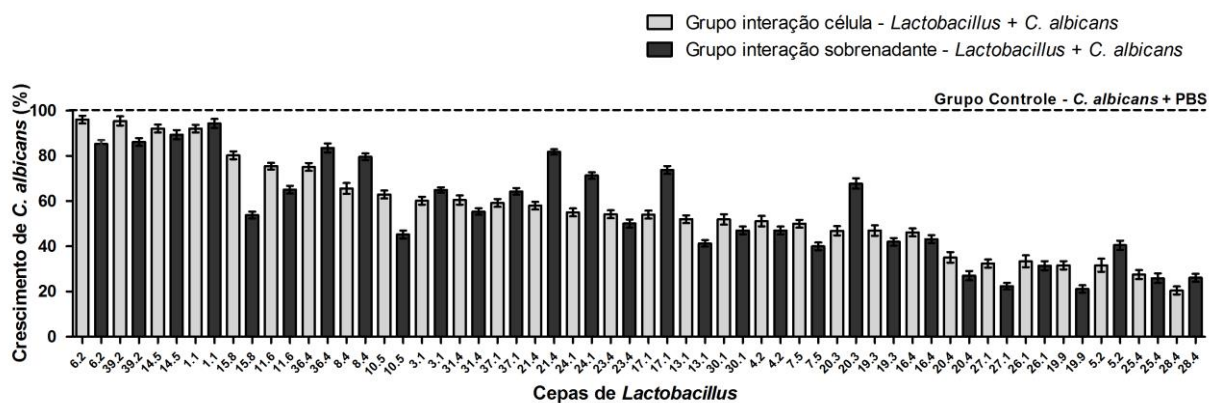
\*Valor de  $p$  obtido na comparação do grupo controle *C. albicans* e PBS, grupo controle *C. albicans* e MRS, Interação *C. albicans* e célula de *Lactobacillus* e Interação *C. albicans* e sobrenadante da cultura de *Lactobacillus* (Teste ANOVA,  $p \leq 0,05$ )

Fonte: Elaborada pelo autor.

O percentual de redução da UFC/mL de *C. albicans* para os grupos célula e sobrenadante comparado com o grupo controle (PBS) foi calculado para todos isolados clínicos conforme mostrado na Figura 8. Com a finalidade de tornar mais didático a escolha das cepas que obtiveram maior redução contra *C. albicans* na

formação de biofilme as amostras foram colocadas no gráfico em ordem crescente de redução de *C. albicans* (Figura 8).

Figura 8 – Percentual de redução expresso em valores médios (UFC/mL) mostrando a viabilidade de *C. albicans* submetidas aos grupos célula e sobrenadante da cultura de *Lactobacillus* spp. em relação ao grupo controle



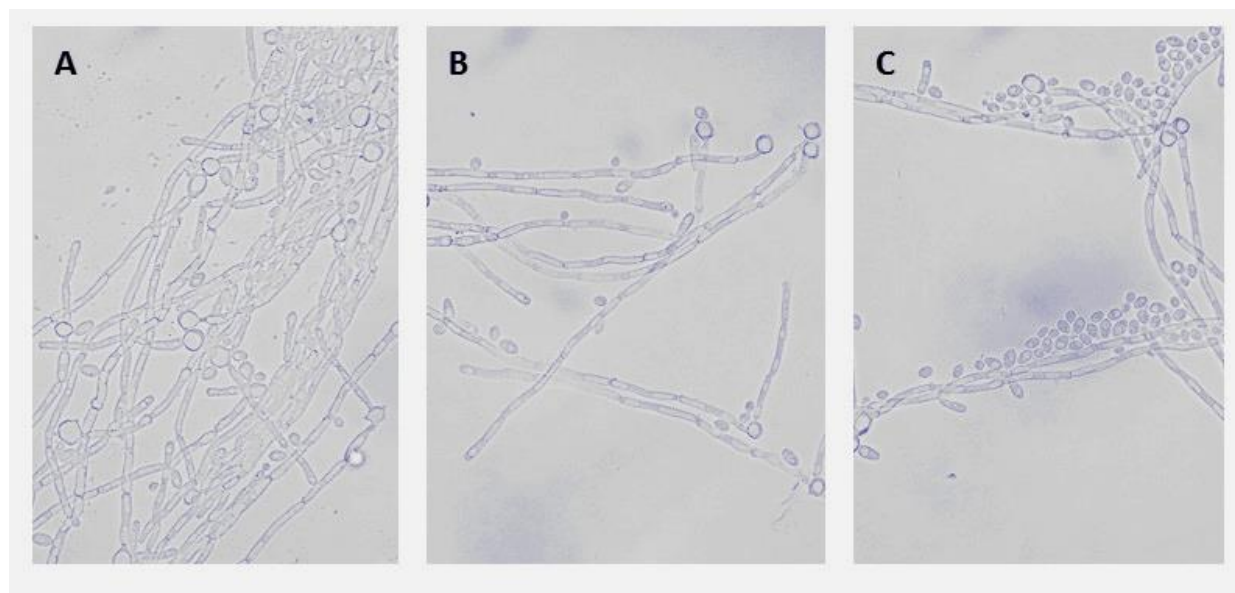
Fonte: Elaborada pelo autor.

Analisando a figura acima (Figura 8) podemos verificar que os isolados clínicos que tiveram melhor ação inibitória contra *C. albicans* foram: 28.4 (redução de 78,6% para o grupo célula e 73,54% para grupo sobrenadante), 25.4 (72,37%, 75,28%), 5.2 (69%, 59,50%), 19.9 (67,22%, 77,48%), 26.1 (66,80%, 68,58%), 27.1 (66,75%, 77,78%), 20.4 (64,60%, 71,82%), 16.4 (53,46%, 56,37%), 19.3 (53%, 58%) e 20.3 (52,31%, 32,53%) para os grupos célula e sobrenadante respectivamente. Podemos verificar também que das 10 cepas com maior ação inibitória contra *C. albicans*, 60% foram da espécie *L. paracasei* mostrando um possível potencial probiótico dessa espécie.

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

A análise da filamentação *in vitro* foi visualizada em microscopia óptica com aumento de 40x após a incubação de *C. albicans* por 24 horas em condições de microaerofilia (5% de CO<sub>2</sub>). A presença de hifas de *C. albicans* nos diferentes grupos experimentais foi analisada quanto aos aspectos morfológicos e quantitativos. Quanto à morfologia, analisando as imagens de alguns isolados podemos perceber que o grupo controle *C. albicans* e PBS e o grupo interação *C. albicans* e célula de *Lactobacillus* apresentaram morfologia semelhante com maior número de hifas em detrimento a presença de leveduras ou pseudohifas (Figura 9A e 9B). Já no grupo interação *C. albicans* e sobrenadante de *Lactobacillus*, verificou-se a presença de várias leveduras e um número reduzido de hifas comparado ao grupo controle *C. albicans* e PBS (Figura 9C).

Figura 9- Microscopia óptica da filamentação de *C. albicans in vitro*



Legenda: A) Grupo controle *C. albicans* e PBS; B) Grupo interação *C. albicans* e célula de *Lactobacillus*. C) Grupo interação *C. albicans* e sobrenadante de *Lactobacillus*; Verificam-se nas imagens A e B morfologia semelhante com presença predominante de hifas e na imagem C presença de hifas e leveduras, aumento original: 40x.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para verificar se a composição do caldo MRS mesmo sem a presença dos produtos obtidos a partir do crescimento bacteriano teria algum efeito sobre o aspecto morfológico da filamentação de *C. albicans in vitro*, foi realizado junto com o experimento comparando com grupo controle *C. albicans* e PBS um o grupo controle *C. albicans* e caldo MRS. Os resultados demonstraram que não houve diferença entre os grupos controle mostrando que o caldo MRS não altera a morfologia de *C. albicans* (Tabela 2). No geral, no estudo da filamentação *in vitro* de *C. albicans* associado com as células de *Lactobacillus* (efeito direto) ou seu sobrenadante (efeito indireto) foi verificado que 82% (23) dos isolados conseguiram reduzir a quantidade de hifas de *C. albicans* de forma variável de acordo com a espécie e amostra clínica testada conforme mostrado na figura 10.

Tabela 2- Mediana obtida a partir da contagem do número de hifas de *C. albicans* presentes após 24 horas da indução da filamentação *in vitro*

(continua)

| Amostra | <i>C. albicans</i><br>e PBS<br>(n=10) | <i>C. albicans</i><br>e MRS<br>(n=10) | <i>C. albicans</i> e<br>célula de<br><i>Lactobacillus</i><br>(n=10) | <i>C. albicans</i> e<br>sobrenadante de<br><i>Lactobacillus</i><br>(n=10) | Valor<br>de $p^*$ |
|---------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| 1.1     | 3                                     | 3                                     | 2                                                                   | 2                                                                         | 0,1359            |
| 3.1     | 3                                     | 3                                     | 2                                                                   | 2                                                                         | 0,2164            |
| 4.2     | 3                                     | 3                                     | 2                                                                   | 2                                                                         | 0,1033            |
| 5.2     | 3                                     | 3                                     | 1                                                                   | 1                                                                         | 0,0010            |
| 6.2     | 3                                     | 3                                     | 2                                                                   | 3                                                                         | 0,6632            |
| 7.5     | 3                                     | 3                                     | 3                                                                   | 2                                                                         | 0,0627            |
| 8.4     | 3                                     | 3                                     | 2                                                                   | 3                                                                         | 0,2102            |
| 10.5    | 3                                     | 3                                     | 3                                                                   | 3                                                                         | 0,8243            |
| 11.6    | 3                                     | 3                                     | 3                                                                   | 2                                                                         | 0,6632            |
| 13.1    | 3                                     | 3                                     | 2                                                                   | 2                                                                         | 0,0010            |
| 14.5    | 3                                     | 3                                     | 3                                                                   | 2                                                                         | 0,1860            |
| 15.8    | 3                                     | 3                                     | 2                                                                   | 2                                                                         | 0,0478            |
| 16.4    | 3                                     | 3                                     | 2                                                                   | 2                                                                         | 0,0478            |

Tabela 2- Mediana obtida a partir da contagem do número de hifas de *C. albicans* presentes após 24 horas da indução da filamentação *in vitro*

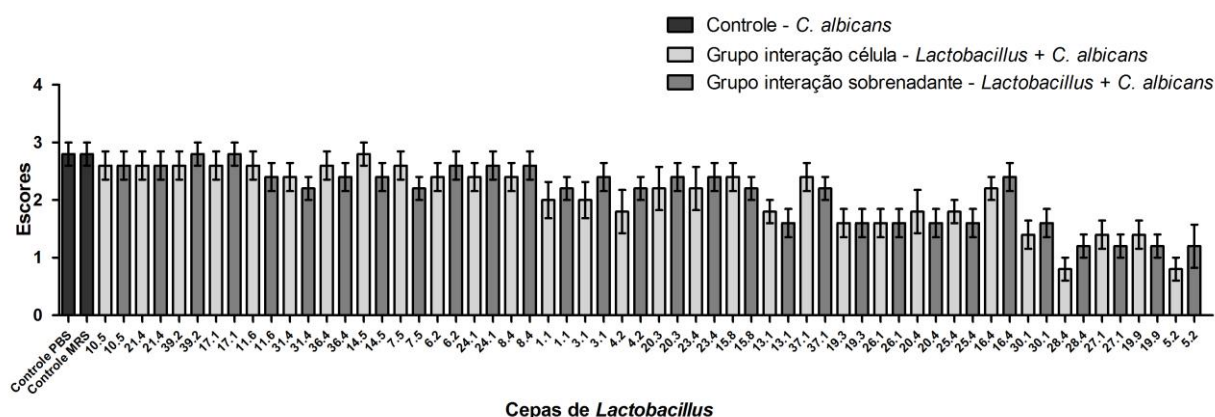
(conclusão)

| Amostra | <i>C. albicans</i><br>e PBS<br>(n=10) | <i>C. albicans</i><br>e MRS<br>(n=10) | <i>C. albicans</i> e<br>célula de<br><i>Lactobacillus</i><br>(n=10) | <i>C. albicans</i> e<br>sobrenadante de<br><i>Lactobacillus</i><br>(n=10) | Valor<br>de $p^*$ |
|---------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| 17.1    | 3                                     | 3                                     | 3                                                                   | 3                                                                         | 0,4900            |
| 19.3    | 3                                     | 3                                     | 2                                                                   | 2                                                                         | 0,0090            |
| 19.9    | 3                                     | 3                                     | 1                                                                   | 1                                                                         | 0,0030            |
| 20.3    | 3                                     | 3                                     | 2                                                                   | 2                                                                         | 0,0488            |
| 20.4    | 3                                     | 3                                     | 2                                                                   | 2                                                                         | 0,0297            |
| 21.4    | 3                                     | 3                                     | 3                                                                   | 3                                                                         | 0,8904            |
| 23.4    | 3                                     | 3                                     | 2                                                                   | 2                                                                         | 0,4888            |
| 24.1    | 3                                     | 3                                     | 2                                                                   | 3                                                                         | 0,6632            |
| 25.4    | 3                                     | 3                                     | 2                                                                   | 2                                                                         | 0,0111            |
| 26.1    | 3                                     | 3                                     | 2                                                                   | 2                                                                         | 0,0988            |
| 27.1    | 3                                     | 3                                     | 1                                                                   | 1                                                                         | 0,0018            |
| 28.4    | 3                                     | 3                                     | 1                                                                   | 1                                                                         | 0,0080            |
| 30.1    | 3                                     | 3                                     | 1                                                                   | 2                                                                         | 0,0072            |
| 31.4    | 3                                     | 3                                     | 2                                                                   | 2                                                                         | 0,2839            |
| 36.4    | 3                                     | 3                                     | 3                                                                   | 2                                                                         | 0,2102            |
| 37.1    | 3                                     | 3                                     | 2                                                                   | 2                                                                         | 0,0478            |
| 39.2    | 3                                     | 3                                     | 3                                                                   | 3                                                                         | 0,4983            |

\*Valor de  $p$  obtido na comparação do grupo controle *C. albicans* e PBS, grupo controle *C. albicans* e MRS, Interação *C. albicans* e célula de *Lactobacillus* e Interação *C. albicans* e sobrenadante da cultura de *Lactobacillus* (Teste KRUSKAL-WALLIS,  $p \leq 0,05$ )

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 10 – Quantificação de hifas no teste de filamentação de *C. albicans* *in vitro*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

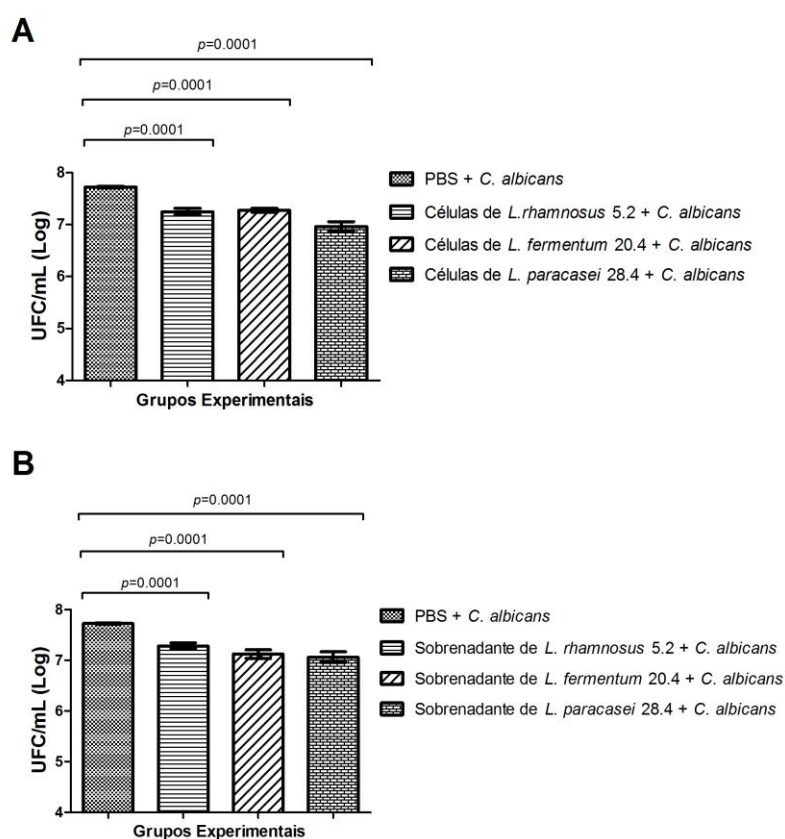
Analisando a figura 10 podemos verificar que os isolados clínicos que tiveram melhor ação inibitória contra formação de hifas de *C. albicans* (escore 1 para ambos os grupos interação quando comparados ao grupo controle) foram: 5.2, 19.9, 27.1, 28.4 e 30.1. Já as cepas 25.4, 20.4, 26.1, 19.3 e 16.4 obtiveram escore 2 para ambos os grupos interação quando comparados ao grupo controle. Com esses resultados verificamos que das cepas com maior ação inibitória contra hifas de *C. albicans*, 60% foram *L. paracasei* concordando com os resultados encontrados no estudo do biofilme.

Com a finalidade de elucidar a interferência dos isolados clínicos de *Lactobacillus* na formação do biofilme de *C. albicans*, nós realizamos ensaios de quantificação da biomassa total, microscopia eletrônica de varredura e qPCR para avaliar o nível de expressão de genes relacionados a formação de biofilme, filamentação e adesão. Para os próximos ensaios utilizamos as cepas *L. paracasei* 28.4, *L. rhamnosus* 5.2 e *L. fermentum* 20.4, essa escolha foi baseada nos isolados clínicos com maior capacidade de redução da UFC/mL do biofilme de *C. albicans* de cada espécie identificada, conforme demonstrado na Figura 8.

#### 4.4 Análise dos efeitos diretos de *L. rhamnosus* 5.2, *L. fermentum* 20.3 e *L. paracasei* 28.4 em biofilmes *C. albicans*

Esses três isolados reduziram significativamente a UFC/mL de *C. albicans*, com 0,72 Log de redução para 28.4 ( $p=0.0001$ ), 0,5 Log para 5.2 ( $p=0.0001$ ) e 0,45 Log para 20.4 ( $p=0.0001$ ). O grupo com o sobrenadante de *Lactobacillus* reduziu a UFC de *C. albicans* em 0,66 Log para a amostra 28.4 ( $p=0.0001$ ), 0,44 Log para 5.2 ( $p=0.0001$ ) e 0,6 Log para 20.4 ( $p=0.0001$ ) (Figura 11).

Figura 11 – Contagem de UFC/mL de *C. albicans* em biofilmes formados *in vitro*.

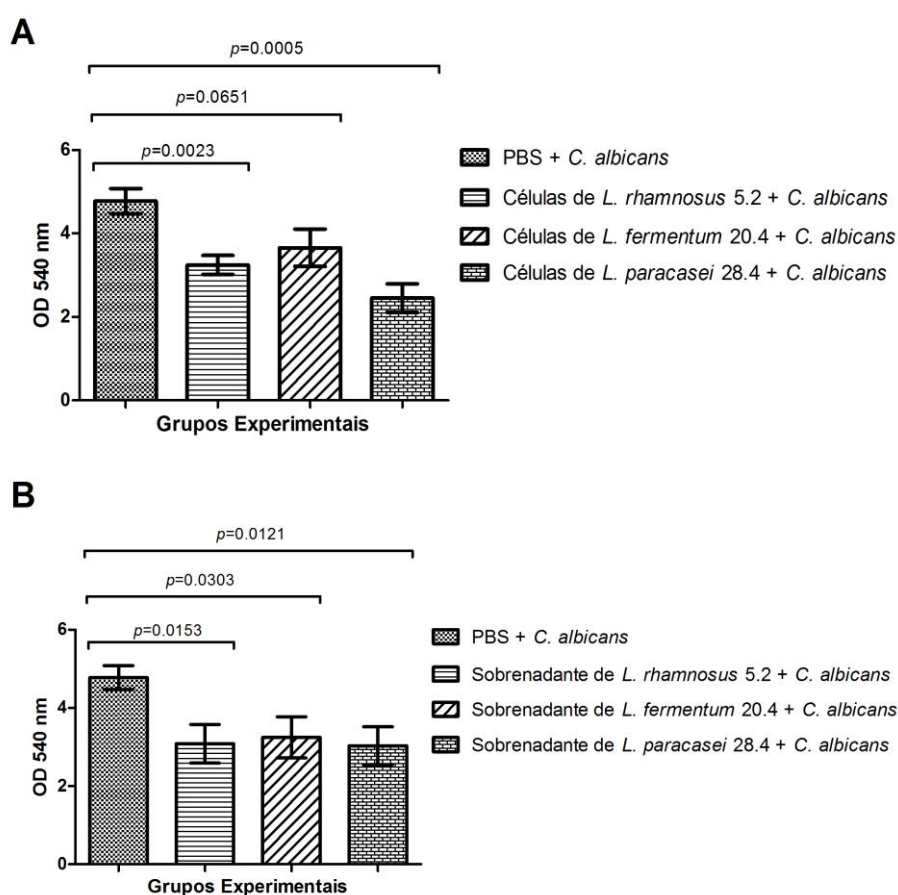


Legenda: Média e desvio padrão do número da UFC/mL (Log) de *C. albicans* no biofilme do grupo controle (*C. albicans* + PBS) e nos grupos com células de *Lactobacillus* ou seu sobrenadante. **A.** Interação de *C. albicans* e células de *Lactobacillus*. Houve diferença estatisticamente significativa entre todos grupos analisados ( $p=0.0001$ ); **B.** Interação de *C. albicans* e sobrenadante de *Lactobacillus*. Houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos analisados ( $p=0.0001$ ); O teste utilizado foi o *t*-student.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com a finalidade de quantificar a biomassa total do biofilme, nós também realizamos o ensaio colorimétrico com o Cristal Violeta para avaliar se os *Lactobacillus* podem afetar a estrutura do biofilme de *C. albicans*. Os biofilmes formados por *C. albicans* e células de *Lactobacillus* (Grupo interação) exibiram uma redução significativa na biomassa comparado com o grupo controle formado apenas por *C. albicans*. Em relação aos efeitos indiretos dos *Lactobacillus*, a presença do seu sobrenadante também reduziu a biomassa total (Figura 12). Esses resultados sugerem que essas bactérias interferem com o aumento da biomassa do biofilme de *Candida*.

Figura 12 – Avaliação da biomassa formada pelos biofilmes de *C. albicans*

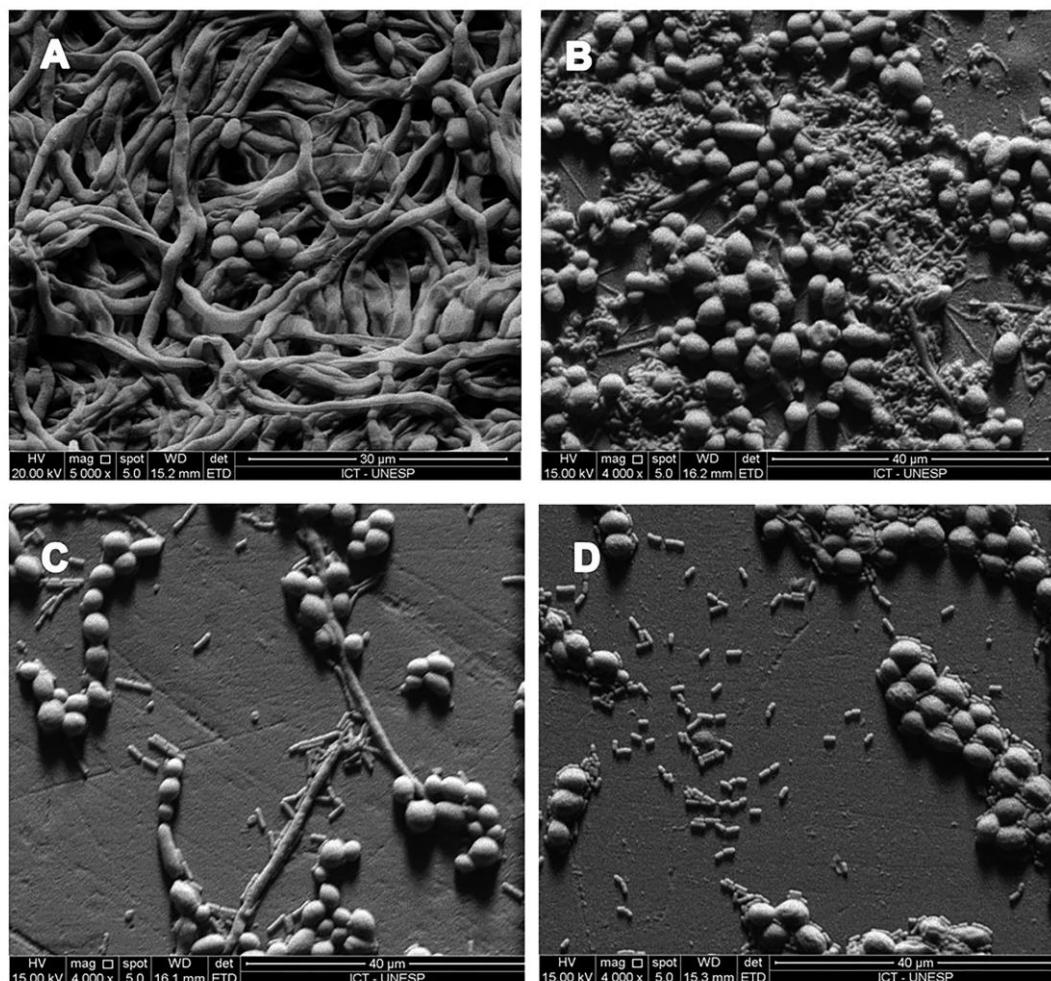


Legenda: Média e desvio padrão do valor de absorvância dos biofilmes do grupo controle (*C. albicans* + PBS) e nos grupos com células de *Lactobacillus* ou seu sobrenadante. **A.** Interação de *C. albicans* e células de *Lactobacillus*. **B.** Interação de *C. albicans* e sobrenadante de *Lactobacillus*. O teste utilizado foi o *t*-student.

Fonte: Elaborada pelo autor.

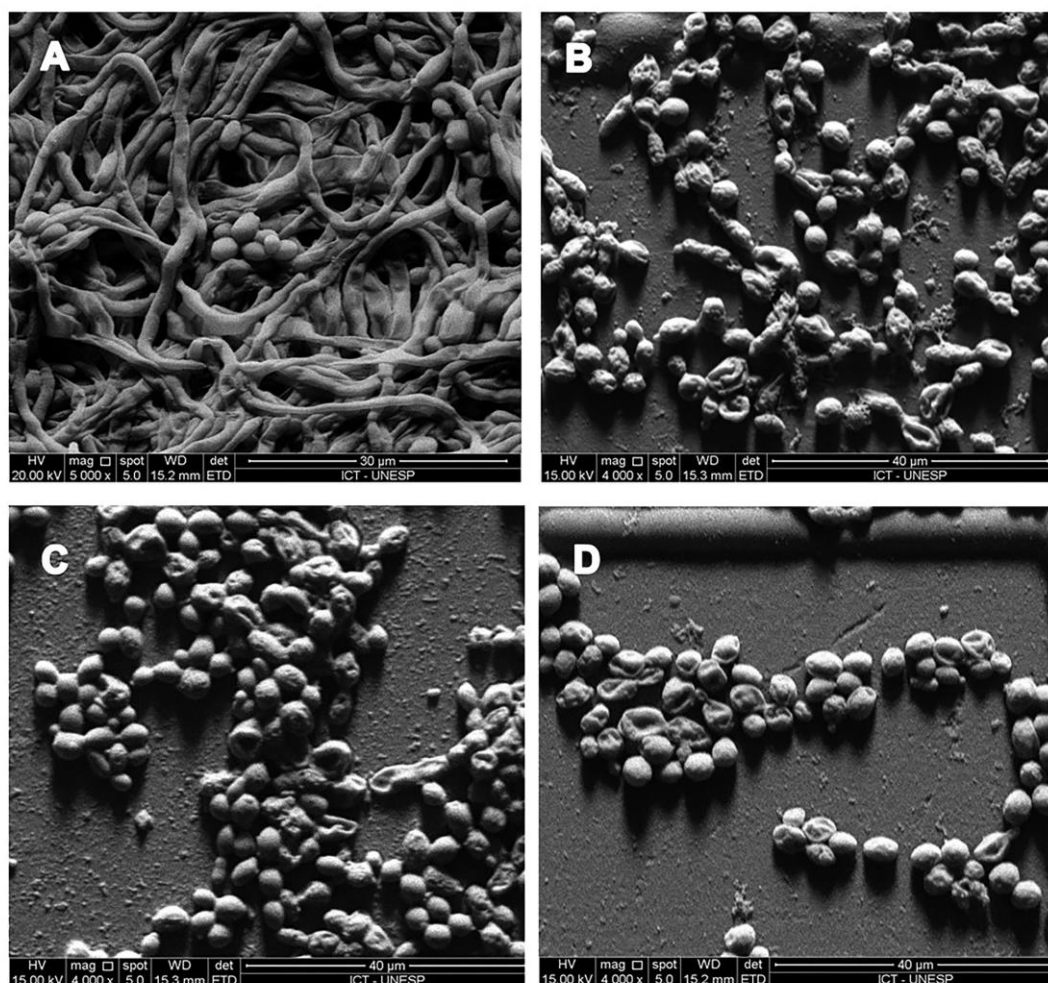
Os biofilmes formados *in vitro* também foram avaliados pelo MEV, nos quais foram observados um biofilme maduro nos discos de resina acrílica após 48 horas. As células de *C. albicans* observadas nos biofilmes sofreram variações morfológicas conforme o grupo experimental avaliado. Nos biofilmes controle formados apenas por *C. albicans* e PBS, foi observado grande quantidade de leveduras e hifas (Figura 13A). Nos biofilmes mistos com células de *Lactobacillus*, verificou-se aderência das células bacterianas nas leveduras e redução de hifas (Figura 13B, 13C, 13D). Já o sobrenadante de *Lactobacillus* causou redução de leveduras no biofilme de *C. albicans*, não formação de hifas e alteração na morfologia das células fúngicas, sugerindo que o sobrenadante pode afetar a viabilidade das leveduras no biofilme (Figura 14). As imagens do MEV estão de acordo com os resultados obtidos na contagem de UFC/mL e da quantificação de biomassa total mostrando que esses três isolados de *Lactobacillus* possuem potencial antifúngico.

Figura 13 - Microscopia eletrônica de biofilmes formados *in vitro*



Legenda: **A.** Grupo controle de *C. albicans* + PBS: Verifica-se a presença de inúmeras leveduras, hifas e pseudohifas; **B.** Grupo interação *C. albicans* + células de *L. rhamnosus* 5.2; **C.** Grupo interação *C. albicans* + células de *L. fermentum* 20.4; **D.** Grupo interação *C. albicans* + células de *L. paracasei* 28.4; Em todos o biofilmes mistos é possível observar redução das leveduras e hifas de *C. albicans* e íntima interação entre *C. albicans* e as células de *Lactobacillus*. Aumento original: 4000x. Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 14 - Microscopia eletrônica de biofilmes formados *in vitro*



Legenda: **A.** Grupo controle de *C. albicans* + PBS: Verifica-se a presença de inúmeras leveduras, hifas e pseudohifas; **B.** Grupo interação *C. albicans* + sobrenadante de *L. rhamnosus* 5.2; **C.** Grupo interação *C. albicans* + sobrenadante de *L. fermentum* 20.4; **D.** Grupo interação *C. albicans* + sobrenadante de *L. paracasei* 28.4; Em todos os biofilmes tratados com sobrenadante observa-se redução das leveduras e hifas de *C. albicans* e alteração na morfologia das leveduras. Aumento original: 4000x.

Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.5 Interferência de *L. rhamnosus* 5.2, *L. fermentum* 20.3 e *L. paracasei* 28.4 nos genes de virulência de *C. albicans*

Com a finalidade de elucidar a interferência dos isolados clínicos de *Lactobacillus* na formação do biofilme de *C. albicans*, nós utilizamos a qPCR para avaliar o nível de expressão de genes relacionados a formação de biofilme, filamentação e adesão. As amostras dos biofilmes de *C. albicans* associados aos isolados 28.4, 5.2 e 20.4 foram formados conforme item 3.5.1.3 para avaliação da expressão dos genes *EFG1*, *HWP1*, *CPH1* e *ALS3*, em relação aos genes de referência de *C. albicans* (*RPP2B*, *RIP1* e *LSC2*). Após a formação, todos os biofilmes obtidos (grupo controle de *C. albicans* e as associações com *Lactobacillus*) foram submetidos à extração do RNA total e quantificados na concentração de ng/μL pelo aparelho Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). A quantidade obtida e a pureza das amostras, a relação 260/280 nm foram maiores que 1,80, sendo assim, adequadas para o processo de transcrição reversa como indicado no Quadro 2.

Quadro 2 - Concentração e grau de pureza obtida de RNA após a extração dos biofilmes

(continua)

| Amostra do biofilme                      | Concentração ng/ μL | 260/280 nm | 260/230 nm |
|------------------------------------------|---------------------|------------|------------|
| <i>C. albicans</i> + PBS                 | 2377,5              | 2,11       | 2,08       |
| <i>C. albicans</i> + PBS                 | 4844,1              | 2,12       | 1,96       |
| <i>C. albicans</i> + PBS                 | 1617,8              | 2,02       | 1,83       |
| 28.4 + <i>C. albicans</i> (célula)       | 988,4               | 2,01       | 0,74       |
| 28.4 + <i>C. albicans</i> (célula)       | 1012,1              | 2,04       | 0,91       |
| 28.4 + <i>C. albicans</i> (célula)       | 1435,8              | 2,09       | 1,61       |
| 28.4 + <i>C. albicans</i> (sobrenadante) | 713,6               | 2,08       | 1,60       |
| 28.4 + <i>C. albicans</i> (sobrenadante) | 703,7               | 2,00       | 1,18       |
| 28.4 + <i>C. albicans</i> (sobrenadante) | 1.702,1             | 2,08       | 1,52       |

Quadro 2 - Concentração e grau de pureza obtida de RNA após a extração dos biofilmes

(conclusão)

| Amostra do biofilme                      | Concentração ng/ $\mu$ L | 260/280 nm | 260/230 nm |
|------------------------------------------|--------------------------|------------|------------|
| 5.2 + <i>C. albicans</i> (célula)        | 886,8                    | 2,12       | 1,75       |
| 5.2 + <i>C. albicans</i> (célula)        | 705,6                    | 2,10       | 1,29       |
| 5.2 + <i>C. albicans</i> (célula)        | 540,4                    | 1,94       | 0,78       |
| 5.2 + <i>C. albicans</i> (sobrenadante)  | 411,5                    | 1,93       | 0,89       |
| 5.2 + <i>C. albicans</i> (sobrenadante)  | 846,1                    | 2,12       | 1,97       |
| 5.2 + <i>C. albicans</i> (sobrenadante)  | 1.339,0                  | 1,97       | 1,03       |
| 20.4 + <i>C. albicans</i> (célula)       | 1186,9                   | 2,05       | 1,54       |
| 20.4 + <i>C. albicans</i> (célula)       | 1633,2                   | 2,13       | 1,96       |
| 20.4 + <i>C. albicans</i> (célula)       | 918,3                    | 1,98       | 0,71       |
| 20.4 + <i>C. albicans</i> (sobrenadante) | 1830,6                   | 2,07       | 1,90       |
| 20.4 + <i>C. albicans</i> (sobrenadante) | 1609,1                   | 2,12       | 1,96       |
| 20.4 + <i>C. albicans</i> (sobrenadante) | 530,6                    | 2,0        | 1,24       |

\* Todos os experimentos foram realizados em triplicatas

Para a realização da curva padrão de cDNA, foram preparadas diluições seriadas do cDNA (1:5) com a massa inicial de 300 ng do grupo controle, que neste estudo se refere a *C. albicans* + PBS. Cada diluição foi feita em triplicata para cada iniciador testado e a concentração ideal deste, foi padronizada em 300 mM. A massa de 300 ng de cDNA foi padronizada para todas as amostras pois obteve-se melhor amplificação.

Todos os iniciadores utilizados neste experimento apresentaram uma eficiência de entre 90 e 110%. Procurou-se observar em todas as curvas, eficiência  $\pm 100\%$ , Slope  $\pm 3,32$ , coeficiente de correlação  $\geq 0,99$ . Esses dados estão apresentados no Quadro 3.

Quadro 3 - Valores de Slope, correlação e eficiência da amostra *C. albicans* ATCC 18804

| Iniciador    | Slope  | Correlação ( $R^2$ ) | Eficiência |
|--------------|--------|----------------------|------------|
| <i>RPP2B</i> | -3,32  | 0,991                | 100%       |
| <i>RIP1</i>  | - 3,32 | 0,998                | 100%       |
| <i>LSC2</i>  | -3,45  | 0,995                | 92,3%      |
| <i>PMA1</i>  | 3,25   | 0,998                | 103%       |
| <i>EFG1</i>  | -3,44  | 0,993                | 95,4%      |
| <i>ALS3</i>  | - 3,23 | 0,992                | 101,94%    |
| <i>HWP1</i>  | -3,42  | 0,992                | 96%        |
| <i>CPH1</i>  | -3,34  | 0,995                | 98%        |

Fonte: Elaborada pelo autor.

O próximo passo foi a seleção do controle endógeno (gene de referência), que é utilizado para normalizar diferenças na quantidade de cDNA que é colocado nos poços de reação da PCR, e os níveis de expressão do controle endógeno devem ser semelhantes em todas as amostras do estudo. Essa análise foi realizada pelo website <http://www.leonxie.com>, no qual este avalia por quatro métodos diferentes: Delta CT, BestKeeper, NormFinder e Genorm. Após avaliação pelos quatro métodos, Delta CT, BestKeeper, NormFinder e Genorm, o website <http://www.leonxie.com> recomendou o gene *RPP2B* para realizar a quantificação relativa (Figura 15).

Figura 15 – Seleção do melhor gene de referência (*RPP2B*, *PMA*, *LSC2* e *RIP1*) pelo website (<http://www.leonxie.com>)

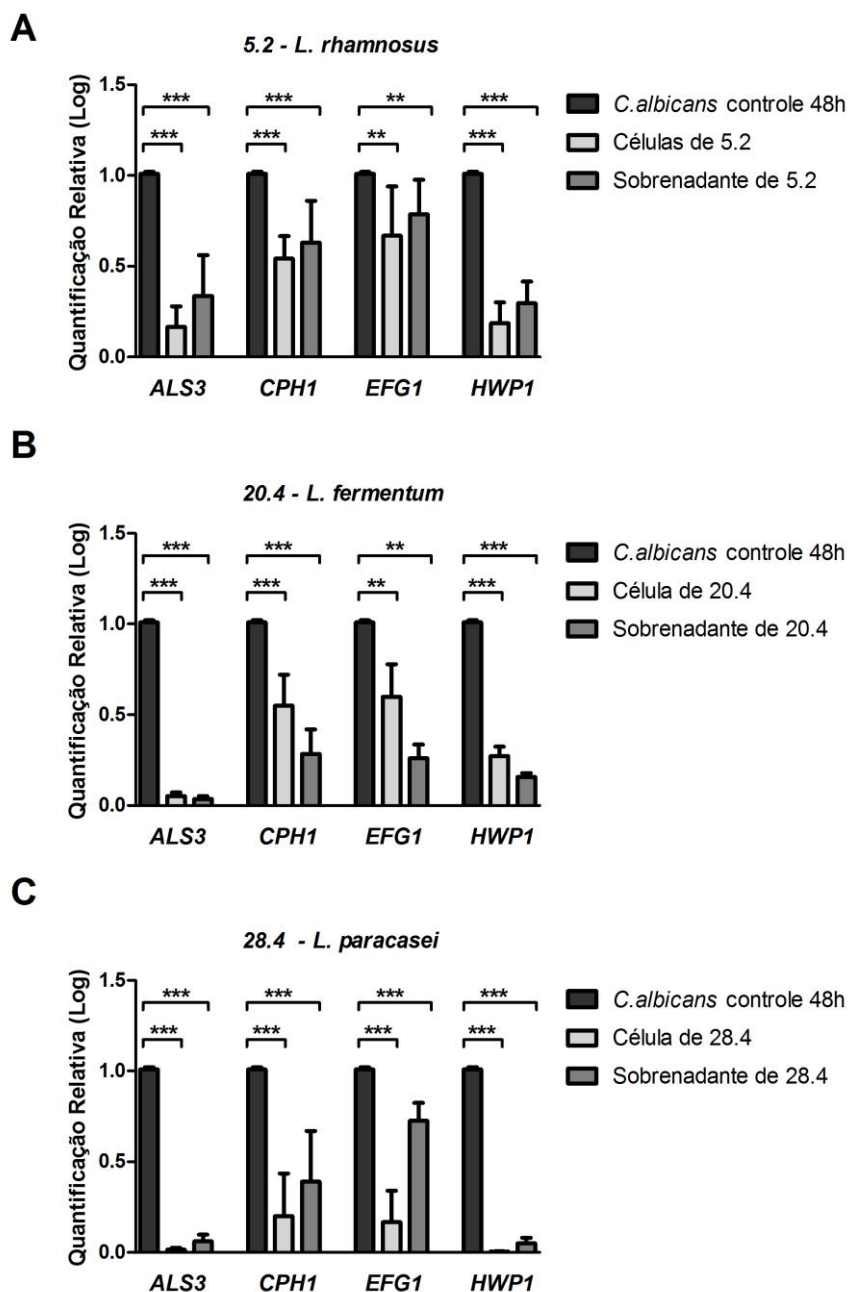


Fonte: Elaborada pelo autor e pelo site <http://www.leonxie.com>.

Os resultados da quantificação relativa representam a variação no nível de expressão dos genes alvos entre os biofilmes mistos de *C. albicans* e células ou sobrenadante de *Lactobacillus* em relação a amostra calibradora (*C. albicans* + PBS). Todas as reações foram feitas em triplicata. Os resultados foram obtidos como valores relativos da expressão gênica (com base na fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) em comparação a um alvo-interno de referência, previamente selecionado, e que resulta em valor 1. O experimento foi realizado pelo aparelho StepOnePlus™ System (Life Technologies, Carlsbad, California, EUA) que já calculou a quantificação relativa na base Log.

Expressão relativa dos genes alvos em biofilmes formados pela associação de *C. albicans* e as diferentes espécies de *Lactobacillus* estão demonstradas abaixo (Figura 16).

Figura 16 – Quantificação relativa de *ALS3*, *HWP1*, *CPH1* e *EFG1* em biofilmes monotípicos e mistos de *C. albicans* associados com células de *Lactobacillus* e seu sobrenadante



Legenda: **A.** Biofilmes de *C. albicans* associados com *L. rhamnosus* 5.2; **B.** Biofilmes de *C. albicans* associados com *L. fermentum* 20.4; **C.** Biofilmes de *C. albicans* associados com *L. paracasei* 28.4. Gene de adesão (*ALS3*), genes de biofilmes (*CPH1* e *EFG1*) e gene de filamentação (*HPW1*): Cada grupo avaliado foi normalizado e comparado com *C. albicans* +PBS (controle). Os valores foram expressos em média e desvio padrão. Teste *t* de Student foi utilizado para comparar a expressão dos genes entre os grupos estudados ( $p \leq 0.05$ ).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em associação com as células de *Lactobacillus* ou seu sobrenadante todos os genes alvos foram regulados negativamente com valores significantes comparados com o gene de referência. Em relação ao gene *ALS3*, foi verificado uma diminuição na sua expressão de 100 vezes ( $p=0.0001$ ) com associação com as células de 28.4 (16 vezes menos expresso para seu sobrenadante), 6-fold decrease ( $p=0.0001$ ) para associação com as células de 5.2 (3-fold decrease para seu sobrenadante) e 20-fold decrease ( $p=0.0001$ ) para a associação com as células de 20.4 (33-fold decrease para seu sobrenadante). Para o gene *CPH1* foi verificado uma diminuição na sua expressão em 5 vezes ( $p=0.0001$ ) quando associado com as células de 28.4 (2 vezes menos expresso para seu sobrenadante, 2-fold decrease ( $p=0.0001$ ) com a associação com as células de 5.2 (1.5-fold decrease para seu sobrenadante) e 2-fold decrease ( $p=0.0001$ ) para associação com 20.4 (3-fold decrease para o grupo com seu sobrenadante).

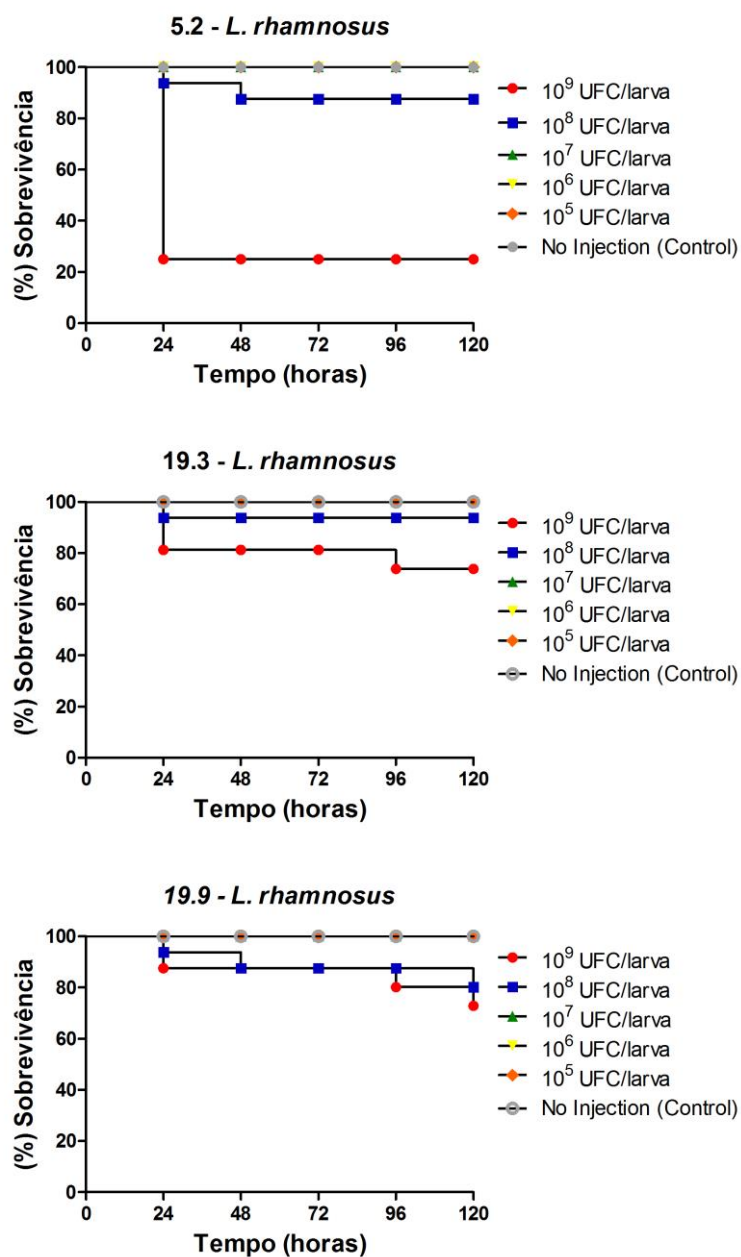
Em relação a quantificação relativa com gene *EFG1* foi observado 6-fold decrease ( $p=0.0001$ ) para associação com as células de 28.4 (1.5-fold decrease para seu sobrenadante), 1.5-fold decrease ( $p=0.0029$ ) na associação com 5.2 (1.2-fold decrease para o sobrenadante) e 1.7-fold decrease ( $p=0.0017$ ) na associação com 20.4 (3.8-fold decrease para o grupo sobrenadante). Para o gene *HWP1* verificou-se uma menor expressão de 333 vezes para a associação com 28.4 (20-fold decrease para o sobrenadante), 5.5-fold decrease ( $p=0.0001$ ) na associação com 5.2 (3-fold decrease para seu sobrenadante) e 3.7-fold decrease ( $p=0.0001$ ) associados com 20.4 (6.6-fold decrease para seu sobrenadante).

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

Baseado nos resultados *in vitro*, expandimos este estudo para os modelos de *G. mellonella* e *C. elegans* afim de verificar a habilidade de algum isolado possuir ação imunomodulatória. Primeiramente foi avaliado a capacidade de *Lactobacillus* em prolongar a sobrevivência das larvas de *G. mellonella* após a infecção por *C. albicans*. A suscetibilidade das larvas aos isolados de *Lactobacillus* foi avaliada anteriormente ao estudo da candidose experimental. Nós testamos as

concentrações entre  $10^5$ - $10^9$  célula/larva e apenas nas duas concentrações mais altas foi observado morte de algumas larvas (Figura 17, 18 e 19).

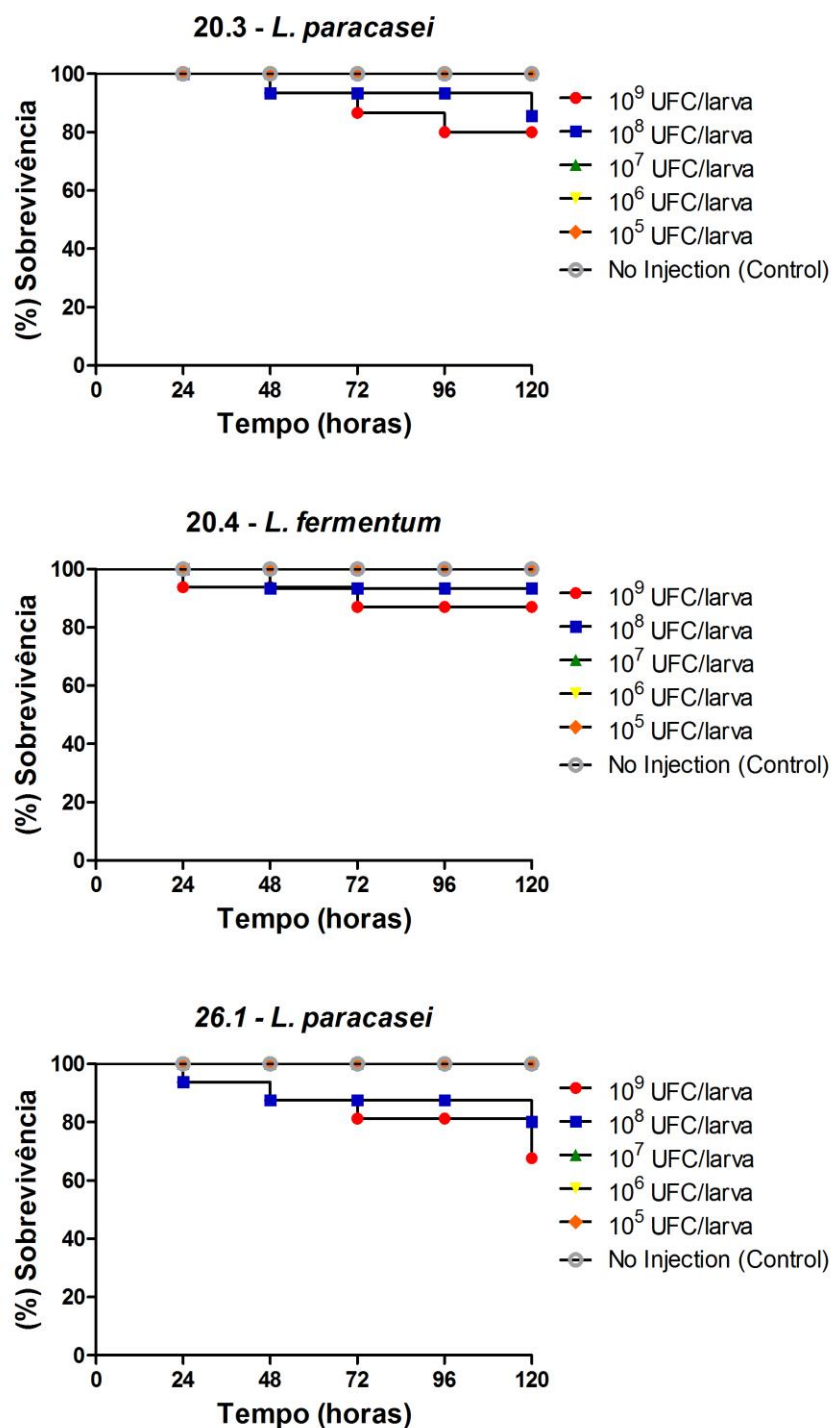
Figura 17 – Suscetibilidade de *G. mellonella* aos isolados de *Lactobacillus*.



Legenda: Concentrações seriadas de *Lactobacillus* foram injetadas para observar a longevidade dos animais.

Fonte: Elaborada pelo autor.

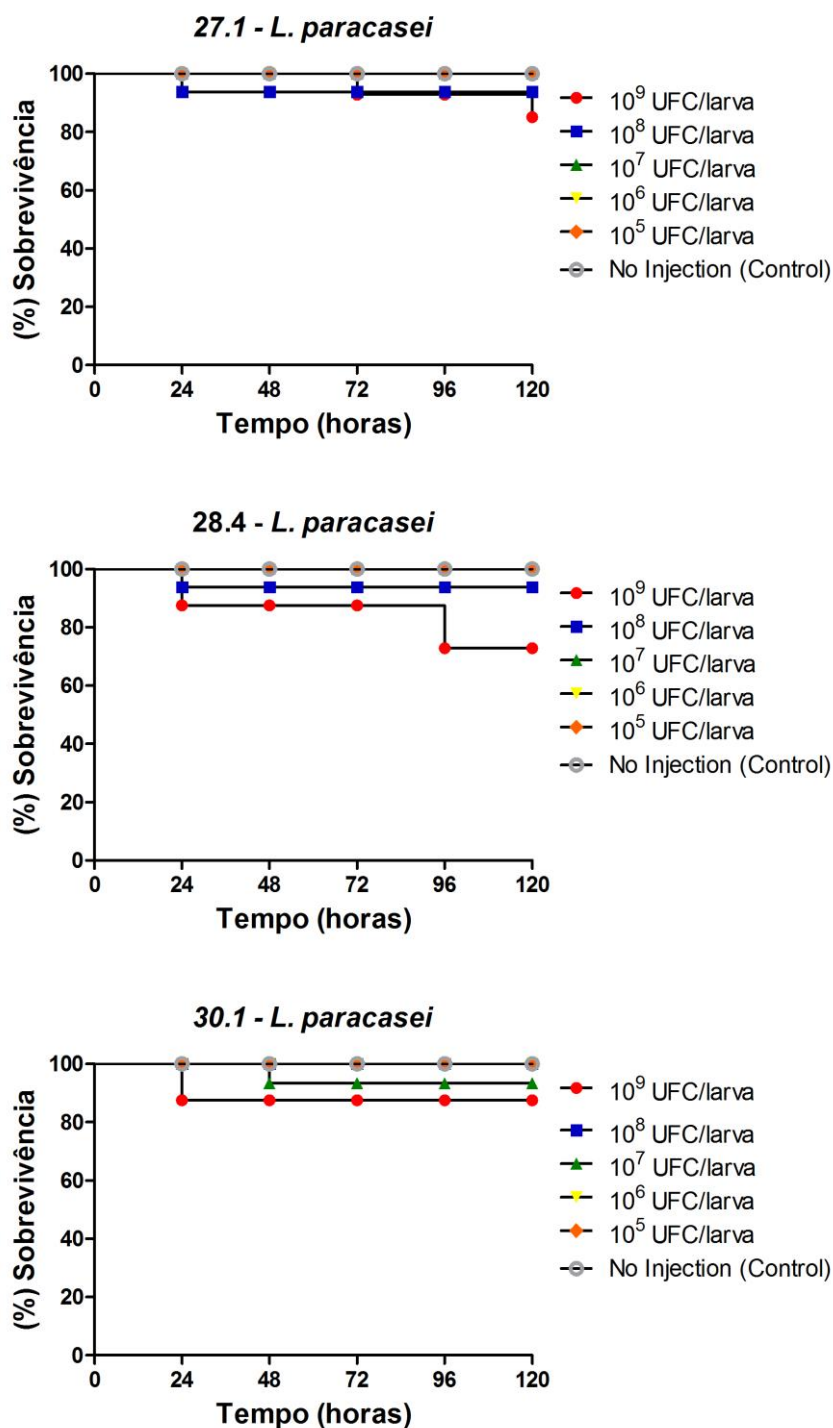
Figura 18 – Suscetibilidade de *G. mellonella* aos isolados de *Lactobacillus*



Legenda: Concentrações seriadas de *Lactobacillus* foram injetadas para observar a longevidade dos animais.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 19 – Suscetibilidade de *G. mellonella* aos isolados de *Lactobacillus*



Legenda: Concentrações seriadas de *Lactobacillus* foram injetadas para observar a longevidade dos animais.

Fonte: Elaborada pelo autor.

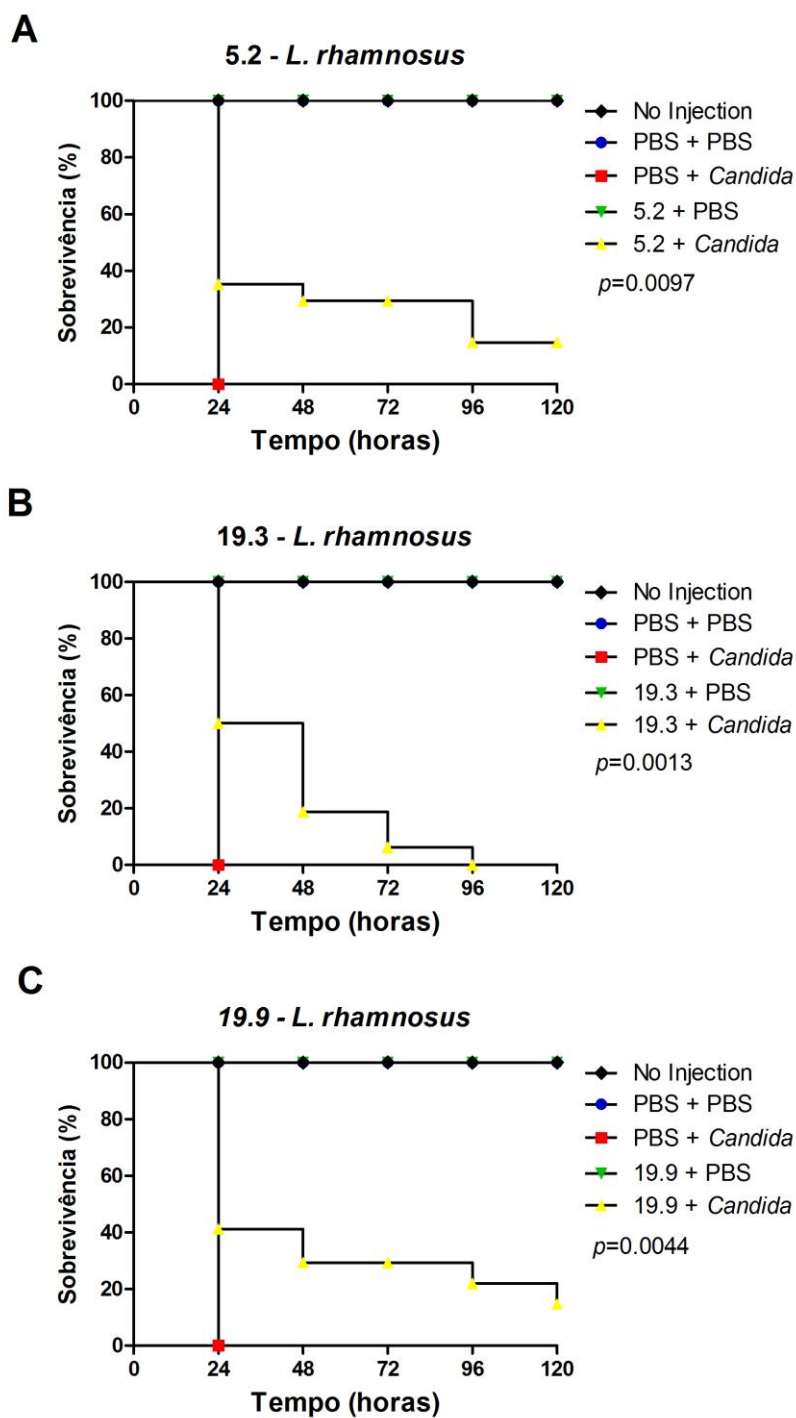
De acordo com os resultados acima, a concentração de  $10^6$  UFC/larva foi adotada para estudar os efeitos dos isolados de *Lactobacillus* na candidose experimental. Nós realizamos um *screening* com todos os isolados para determinar se algum deles poderia afetar a infecção letal por *C. albicans*. No grupo controle infectado apenas com *C. albicans*, 100% dos animais morreram em até 24 horas pós infecção. Quando as larvas receberam injeções de *Lactobacillus* profilaticamente a infecção por *C. albicans* a sobrevivência das larvas foi alterada conforme o isolado, mostrando que o resultado foi cepa dependente. Mais especificamente, entre os nove isolados analisados seis foram capazes de prolongar a sobrevida das larvas infectadas com *C. albicans* e o grupo tratado profilaticamente com *L. paracasei* 28.4 teve a maior taxa de sobrevivência (27%) comparado com os outros isolados (6 a 19%) (Tabela 3) (Figura 20, 21 e 22). Baseado nesses resultados, esse isolado foi selecionado para todos os ensaios subsequentes.

Tabela 3- Efeitos de *Lactobacillus* na candidose experimental baseado na análise de sobrevivência das larvas de *G. mellonella*

| Isolado                    | Sobrevida após 120 h (%) |
|----------------------------|--------------------------|
| 20.4 – <i>L. fermentum</i> | 0                        |
| 20.3 – <i>L. paracasei</i> | 12                       |
| 26.1 – <i>L. paracasei</i> | 19                       |
| 27.1 – <i>L. paracasei</i> | 6                        |
| 28.4 – <i>L. paracasei</i> | 27                       |
| 30.1 – <i>L. paracasei</i> | 0                        |
| 5.2 – <i>L. rhamnosus</i>  | 14                       |
| 19.3 – <i>L. rhamnosus</i> | 0                        |
| 19.9 – <i>L. rhamnosus</i> | 14                       |

Fonte: Elaborada pelo autor.

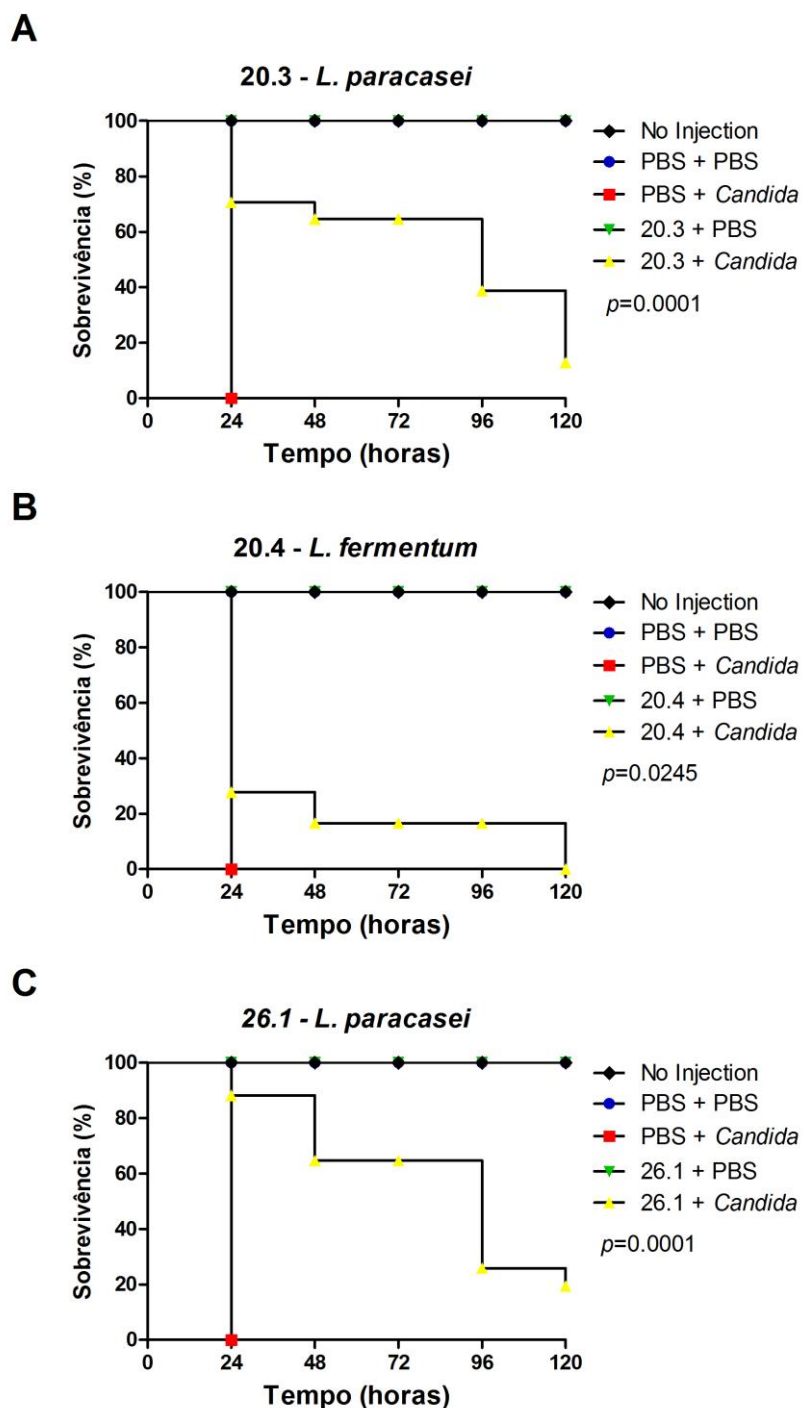
Figura 20 – *Lactobacillus* prolonga a sobrevivência de *G. mellonella* infectada por *C. albicans*



Legenda: Houve diferença estatisticamente significante entre os grupos “*Lactobacillus* + *C. albicans*” e “PBS + *C. albicans*”. A.  $p=0,0097$ ; B.  $p=0,0013$ ; C.  $p=0,0044$ ; Kaplan-Meier teste,  $p\leq 0.05$ .

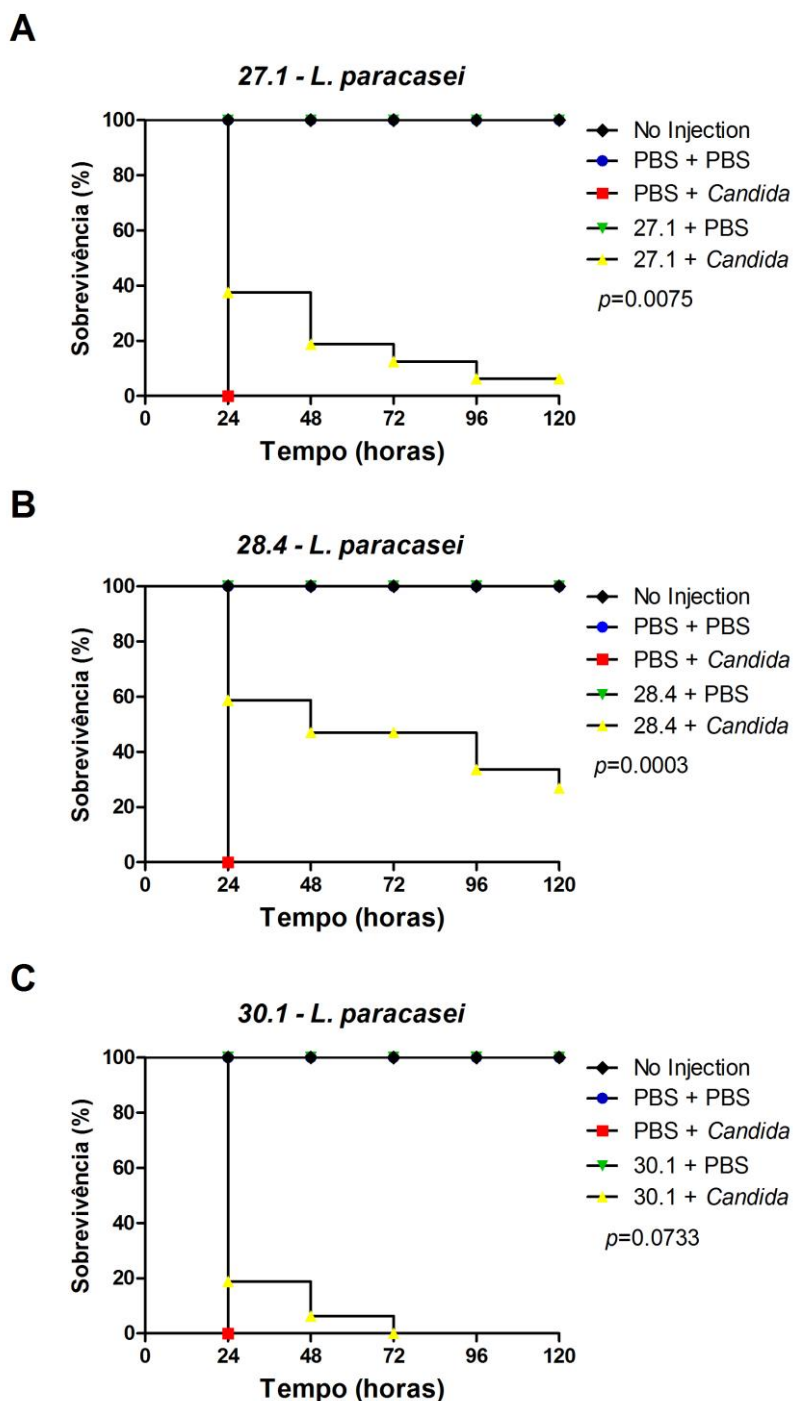
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 21 – *Lactobacillus* prolonga a sobrevivência de *G. mellonella* infectada por *C. albicans*



Legenda: Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos “*Lactobacillus* + *C. albicans*” e “PBS + *C. albicans*”. A.  $p=0,0001$ ; B.  $p=0,0245$ ; C.  $p=0,0001$ ; Kaplan-Meier teste,  $p \leq 0.05$ .  
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 22 – *Lactobacillus* prolonga a sobrevivência de *G. mellonella* infectada por *C. albicans*

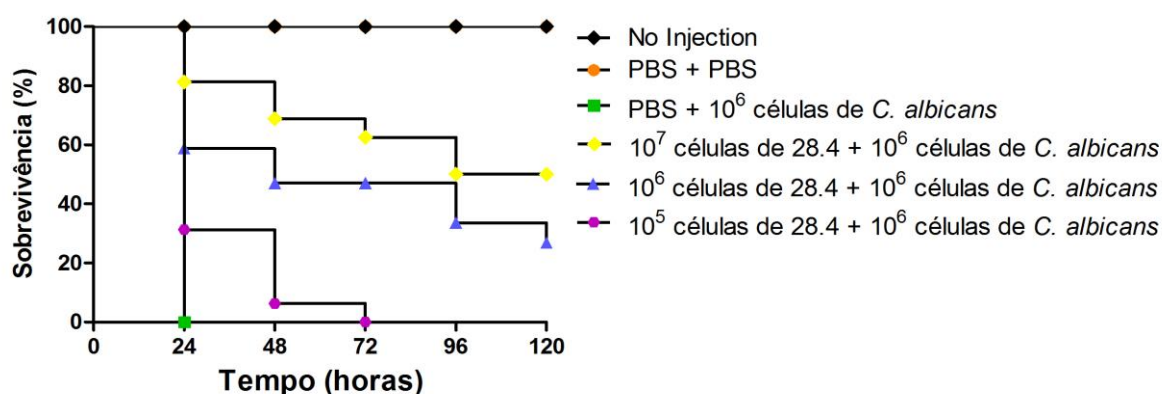


Legenda: Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos "*Lactobacillus* + *C. albicans*" e "PBS + *C. albicans*". A.  $p=0,0075$ ; B.  $p=0,0003$ ; C.  $p=0,0733$ ; Kaplan-Meier test,  $p \leq 0.05$ .

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com a finalidade de determinar se diferentes concentrações de *L. paracasei* 28.4 pode influenciar na taxa de sobrevivência das larvas infectadas por *C. albicans*, injetou-se profilaticamente concentrações de  $10^5$ - $10^7$  células/larva de *L. paracasei* e após 1 hora os animais receberam injeção de *C. albicans*. Nós observamos uma dose dependência em relação a taxa da sobrevida das larvas, no qual os grupos que receberam o inóculo de  $10^7$  células de *L. paracasei* alcançaram uma taxa maior de sobrevivência em relação as outras concentrações menores testadas ( $10^5$  e  $10^6$  células/larva) (Figura 23). Também observou uma menor melanização das larvas inoculadas profilaticamente com *L. paracasei* e posteriormente infectadas por *C. albicans* comparado ao grupo controle de *C. albicans* (Figura 24).

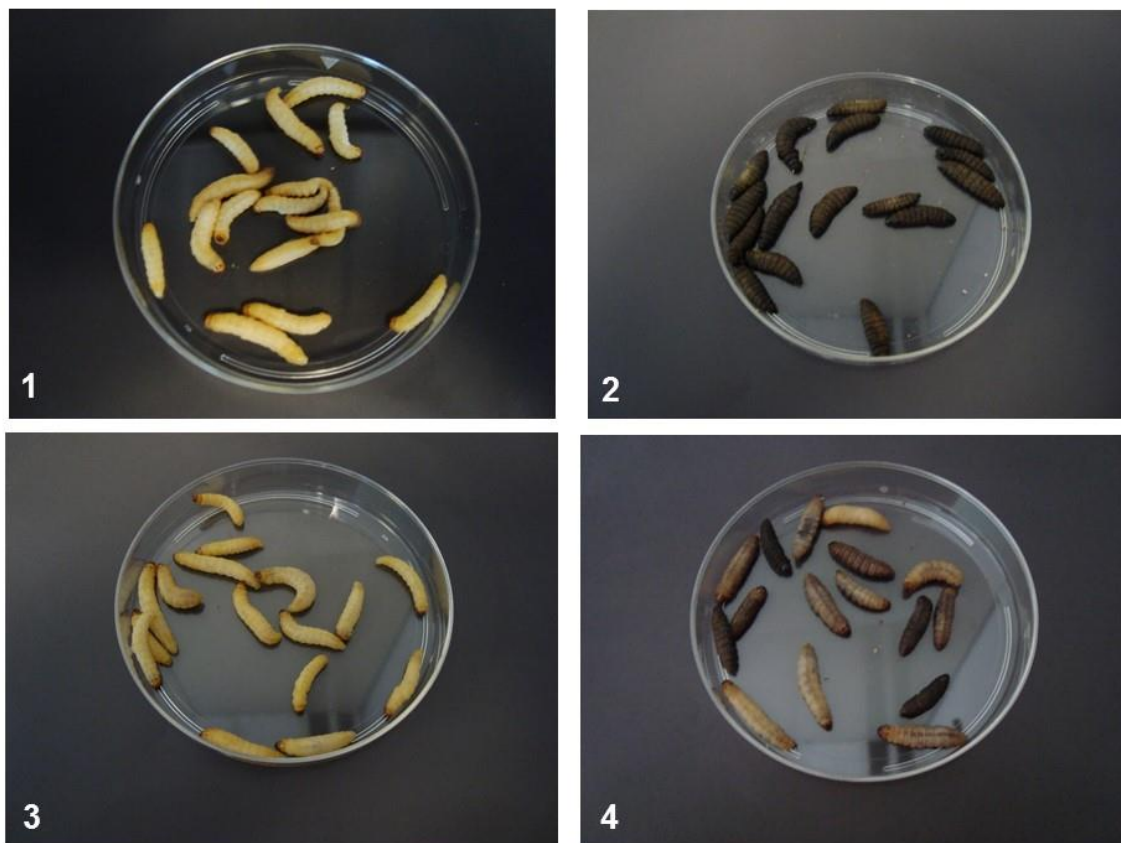
Figura 23 –*L. paracasei* 28.4 prolonga a sobrevida de *G. mellonella* infectada por *C. albicans*



Legenda: Curva de sobrevivência com diferentes concentrações de *L. paracasei*: diferenças significantes foram observadas para os grupos  $10^5$  células de 28.4 + *Candida* ( $p=0,0166$ ),  $10^6$  células de 28.4 + *Candida* ( $p=0,0003$ ) e  $10^7$  células de 28.4 + *Candida* ( $p=0,0001$ ) em relação com o grupo controle (PBS +  $10^6$  células de *Candida*).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 24 – Análise do processo de melanização após 24 horas do tratamento profilático com *L. paracasei* e infecção com *C. albicans*

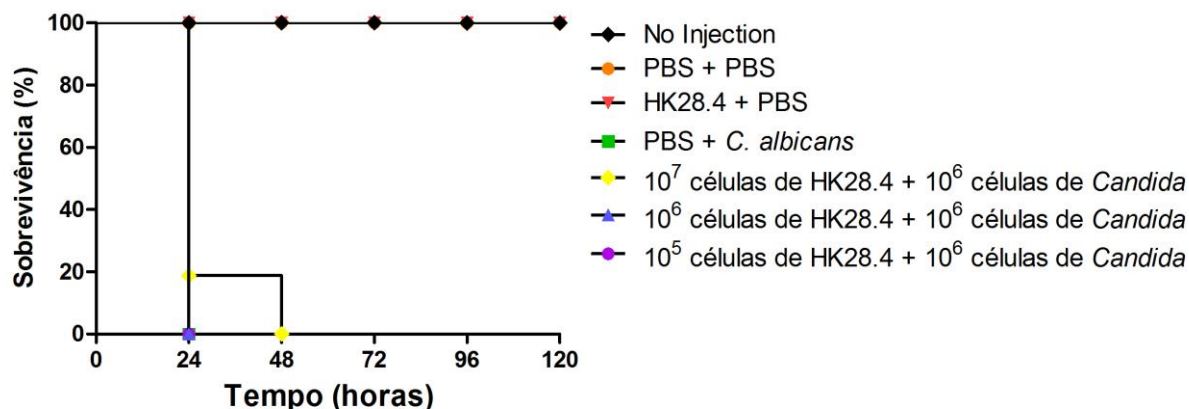


Legenda: Grupos: **1** – PBS + PBS; **2** – PBS + *C. albicans*; **3** – *L. paracasei* + PBS; **4** – *L. paracasei* + *C. albicans*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Além disso foi avaliado se a sobrevivência de *G. mellonella* poderia ser influenciada pela injeção de “heat-killed *L. paracasei* 28.4”. Nesse experimento foram utilizados os mesmos grupos descritos com as células vivas de *L. paracasei* 28.4, sendo substituído a injeção de células vivas por “heat-killed *L. paracasei* 28.4”. Interessantemente, “heat-killed *L. paracasei*” não promoveu proteção profilática e consequentemente não aumentou a sobrevivência das larvas infectadas com *C. albicans*. Esses dados indicam que a ação probiótica é consequência da bactéria viva e não morta (Figura 25).

Figura 25 – Taxa de sobrevivência das larvas tratadas com “Heat-killed *L. paracasei* 28.4”



Legenda: Não foi observado diferença estatisticamente significativa para os grupos  $10^5$  células de HK28.4 + *Candida* ( $p=1,000$ ),  $10^6$  células de HK28.4 + *Candida* ( $p=1,000$ ) e  $10^7$  células de HK28.4 + *Candida* ( $p=0,0733$ ) quando comparados com o grupo controle PBS + *C. albicans*. Kaplan-Meier teste,  $p \leq 0,05$ .

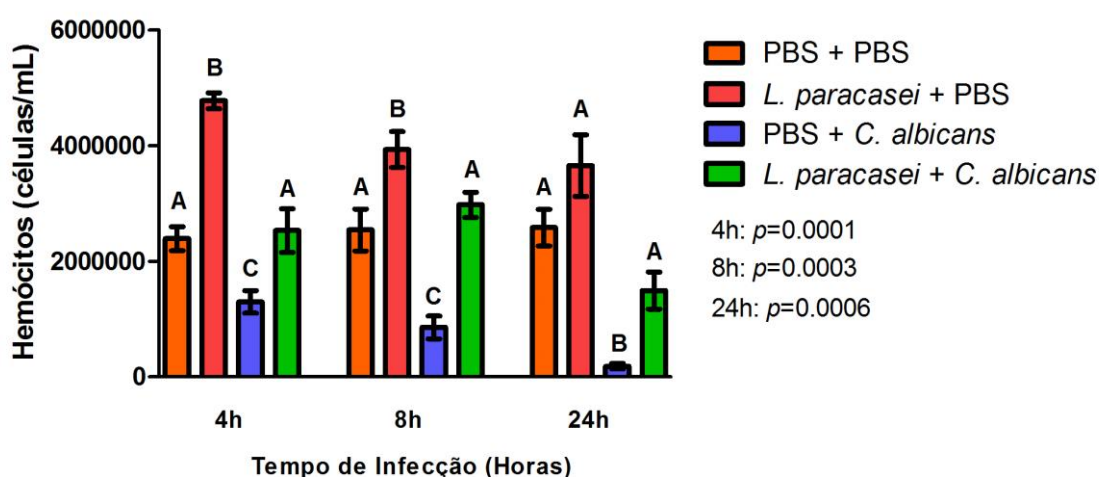
Fonte: Elaborada pelo autor.

Para investigar os mecanismos imunes associados com o efeito preventivo de *L. paracasei* na infecção por *C. albicans*, nós quantificamos o número de hemócitos na hemolinfa das larvas após 4, 8 e 24 horas após injeção de *C. albicans*. Como a maior taxa de sobrevivência dos animais foi alcançada com a concentração de  $10^7$  células/larva de *L. paracasei*, utilizamos essa concentração na realização desse ensaio. Primeiramente foi observado um aumento no número de hemócitos no grupo *L. paracasei* + PBS comparado com o grupo controle PBS em todos os tempos avaliados (4 h: 2-fold increase; 8 h: 1.54-fold increase e 24 h: 1.41-fold increase). Nas larvas infectadas com *C. albicans*, os grupos pré-tratados com *L. paracasei* também obtiveram um aumento no número de hemócitos comparado com o grupo controle de *C. albicans* em todos os períodos de tempo analisados (4 h: 1.96-fold increase; 8 h: 3.49-fold increase e 24 h: 8.27-fold increase).

Também foi observado que o grupo PBS + *C. albicans* mostrou uma redução no número de hemócitos comparado com o grupo controle de PBS, e quando as larvas foram tratadas com *Lactobacillus* (grupo *L. paracasei* + *C. albicans*) a quantidade de hemócitos encontrados foi similar aos valores do grupo controle de PBS (Figura 26). Esses resultados indicam que a infecção por *C. albicans* suprime a

contagem de hemócitos e o pré-tratamento com *L. paracasei* aumenta o número que hemócitos circulantes na hemolinfa.

Figura 26 – Número de hemócitos de *G. mellonella* aumenta com injeção de *L. paracasei*



Legenda: O grupo *L. paracasei* 28.4 + PBS aumentou o número de hemócitos comparado com o controle de PBS (PBS + PBS) em todos os períodos de tempo analisados. O grupo *L. paracasei* + *C. albicans* também aumentou a contagem de hemócitos comparado com o grupo controle de *C. albicans* (PBS + *C. albicans*). Os quatro grupos foram comparados em cada tempo avaliado pelo teste de ANOVA (4h:  $p=0,0001$ , 8h:  $p=0,0003$ , 24h:  $p=0,0006$ ). Os resultados do teste de Tukey estão indicados por letras diferentes (A, B e C) representando diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para cada tempo avaliado. Um  $p \leq 0,05$  foi considerado significativo.

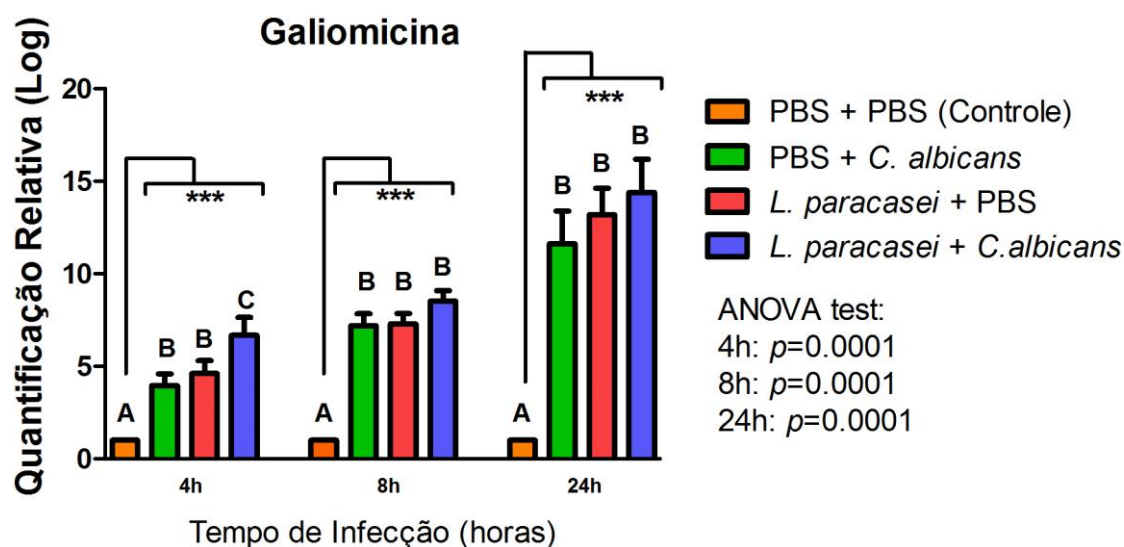
Fonte: Elaborada pelo autor.

O aumento no número de hemócitos circulantes sugere que *L. paracasei* 28.4 pode estimular a resposta imune das larvas de *G. mellonella*. Com isso foi utilizado a técnica de RT-PCR para avaliar se a inoculação de *L. paracasei* altera expressão de peptídeos antifúngicos. Foi quantificado a expressão dos genes que codificam a galiomicina, uma defensina em *G. mellonella* e gallerymicina um peptídeo antifúngico rico em cisteína.

Foi verificado que *L. paracasei* 28.4 é capaz que aumentar a expressão de ambos peptídeos analisados. Para o gene da galiomicina, o grupo pré-tratado com *L. paracasei* e infectado com *C. albicans* teve um aumento significativo ( $p=0,037$ ) em

relação ao grupo controle de *C. albicans* apenas no tempo de 4 horas. *L. paracasei* induziu um aumento da expressão do gene de 6,67 e 1,68 vezes comparado respectivamente com os grupos controle de PBS e o de *C. albicans* (Figura 27).

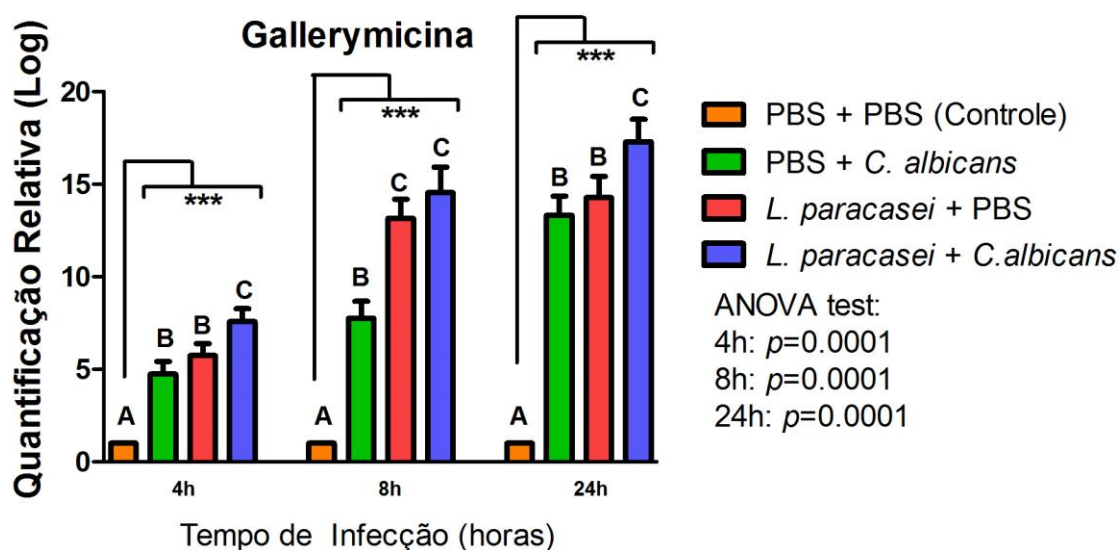
Figura 27 - *L. paracasei* aumenta a expressão de Galiomicina em *G. mellonella*



Legenda: Quantificação relativa (Log) de Galiomicina para os grupos tratados com PBS (controle), pré-tratados com PBS e infectados com *C. albicans*, apenas tratados com *L. paracasei* e pré-tratados com *L. paracasei* e infectados com *C. albicans*. As unidades do eixo Y foram calculadas baseadas no método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  e os valores estão expressos em média e desvio padrão. Cada gene foi normalizado e comparado com a expressão das larvas que receberam PBS (controle) utilizando o gene de referência  $\beta$ -actina. Diferentes letras (A, B e C) representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Teste de ANOVA e Tukey ( $p \leq 0,05$ ). \*\*\* $p \leq 0,001$ .  
 Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o gene da gallerymicina, o grupo que recebeu *L. paracasei* e foi infectado posteriormente com *C. albicans* teve um aumento significativo na expressão gênica comparada ao grupo controle de *C. albicans* em todos os tempos avaliados: 4 horas ( $p=0,009$ ), 8 horas ( $p=0,0001$ ) e 24 horas ( $p=0,0035$ ). *L. paracasei* aumentou a expressão da gallerymicina 17 vezes comparado com o grupo PBS após 24 horas (Figura 28). Esses dados mostram que a injeção profilaticamente de *L. paracasei* aumenta o nível de peptídeos antifúngicos e consequentemente atua no combate a *C. albicans* no modelo de *G. mellonella*.

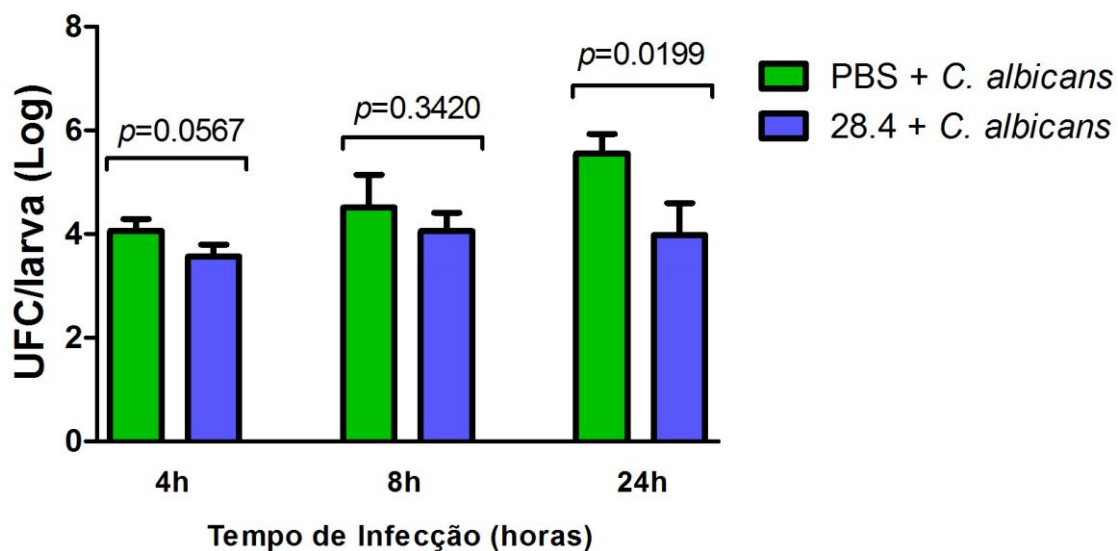
Figura 28 - *L. paracasei* aumenta a expressão de Gallerymicina em *G. mellonella*



Legenda: Quantificação relativa (Log) de Gallerymicina para os grupos tratados com PBS (controle), pré-tratados com PBS e infectados com *C. albicans*, apenas tratados com *L. paracasei* e pré-tratados com *L. paracasei* e infectados com *C. albicans*. As unidades do eixo Y foram calculadas baseadas no método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  e os valores estão expressos em média e desvio padrão. Cada gene foi normalizado e comparado com a expressão das larvas que receberam PBS (controle) utilizando o gene de referência  $\beta$ -actina. Diferentes letras (A, B e C) representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Teste de ANOVA e Tukey ( $p \leq 0,05$ ). \*\*\* $p \leq 0,001$ .  
Fonte: Elaborada pelo autor.

O estudo da cultura de *C. albicans* na hemolinfa de *G. mellonella* revelou menor crescimento fúngico nos grupos que receberam *L. paracasei* e infectados por *C. albicans* comparado ao grupo controle de *C. albicans* em todos os tempos analisados. Uma diferença significativa foi observada entre os grupos apenas no tempo 24 horas de infecção, com crescimento de 5,54 Log para o grupo controle de *C. albicans* e 3,98 Log para o grupo que recebeu *L. paracasei* (Figura 29).

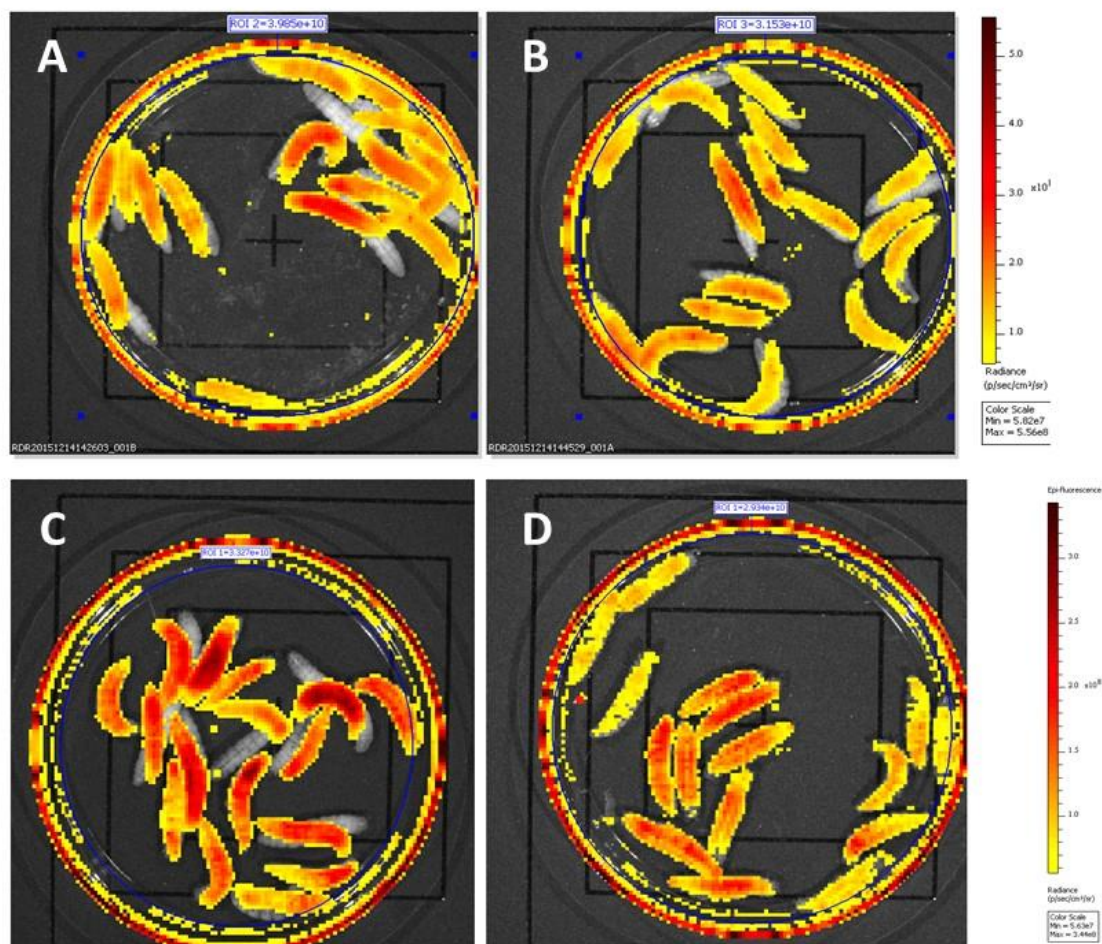
Figura 29 – *L. paracasei* diminui o número de UFC de *C. albicans* na hemolinfa de *G. mellonella*



Legenda: Média e desvio padrão da contagem de *C. albicans* (UFC/larva) na hemolinfa de *G. mellonella* após 4, 8 e 24 horas de infecção experimental. Os seguintes grupos foram comparados para cada tempo de infecção avaliado: PBS + *C. albicans* (controle) e *L. paracasei* + *C. albicans*. Uma diferença significativa foi observada entre os grupos apenas no tempo de 24 horas de infecção ( $p=0,0199$ ). Teste *t* foi avaliado sendo o valor de  $p \leq 0,05$  considerado significativo.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

Com relação a análise da bioluminescência das larvas durante a infecção por *C. albicans* foi verificado uma menor emissão de fótons/segundo nos grupos que receberam *L. paracasei* 28.4 profilaticamente a infecção por *C. albicans* em relação ao grupo controle de *C. albicans* nos dois tempos avaliados (Figura 30). Esses dados corroboram com a contagem de UFC de *C. albicans* na hemolinfa das larvas.

Figura 30 – Análise de bioluminescência de larvas de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* MLR62



Legenda: A: Grupo controle de *C. albicans* (PBS + *C. albicans*; ROI: 3,98 fótons/s), B: Grupo tratado com *L. paracasei* 28.4 (*L. paracasei* 28.4 + *C. albicans*; ROI: 3,15 fótons/s), Tempo: 4 horas pós-infecção de *C. albicans*. C: Grupo controle de *C. albicans* (PBS + *C. albicans*; ROI: 3,32 fótons/s), D: Grupo tratado com *L. paracasei* 28.4 (*L. paracasei* 28.4 + *C. albicans*; ROI: 2,93 fótons/s), Tempo: 8 horas pós-infecção de *C. albicans*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.7 Efeitos de *L. paracasei* 28.4 na infecção por *C. albicans* em modelo invertebrado de *C. elegans*

Devido à importância da formação de hifas na patogênese de *C. albicans* em mamíferos e como o modelo invertebrado de *C. elegans* é transparente e adequado para ensaios com filamentação (Figura 31), a interação entre *L. paracasei* 28.4 + *C.*

*albicans* foi expandido dos ensaios com *G. mellonella* para *C. elegans*. Primeiramente, nós investigamos a patogenicidade de *L. paracasei* 28.4 no modelo de *C. elegans*. Como grupo controle, foi empregado a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* OP50 que não é patogênica para este modelo animal. Não foi observado diferença estatisticamente significativa na sobrevivência dos nematódeos que ingeriram *E. coli* e com os que ingeriram *L. paracasei* ( $p=0,1893$ ), concluindo que a cepa *L. paracasei* 28.4 também não é patogênica para *C. elegans* (Figura 32).

Além disso, foi observado que quando *C. elegans* era infectado por 2 horas com *L. paracasei* e em seguida transferidos para placas de BHI com *C. albicans* por mais 2 horas, a morte dos vermes foi significativamente atenuada comparado com os vermes que foram infectados apenas com *C. albicans* ( $p= 0,0151$ ) (Figura 32).

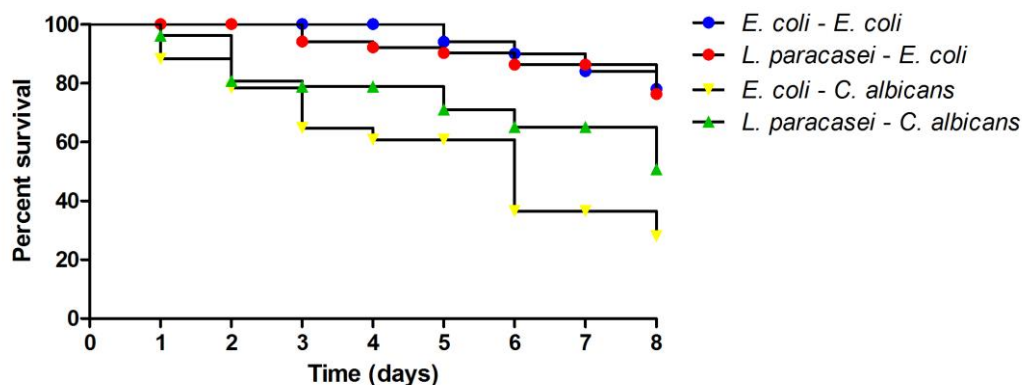
Figura 31 – Modelo invertebrado de *C. elegans* e sua anatomia



Legenda: *Caenorhabditis elegans* é um nematóide encontrado no solo e se alimenta de bactérias, pode ser hermafrodita ou macho, medindo aproximadamente um mm de comprimento.

Fonte: Elaborada pelo autor.

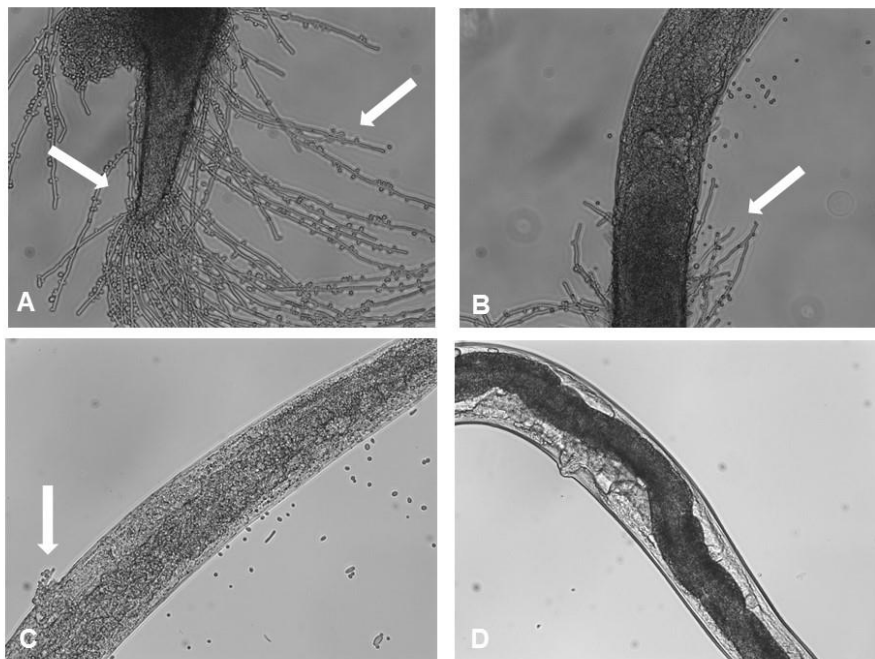
Figura 32 - *L. paracasei* prolonga a sobrevivência de *C. elegans* infectados com *C. albicans*



Legenda: Diferenças significativas foram encontrados entre os grupos *L. paracasei* – *C. albicans* e *E. coli* – *C. albicans* (teste Kaplan-Meier:  $p=0,0151$ ). Não houve diferença encontrada entre os grupos *E. coli* – *E. coli* e *L. paracasei* – *E. coli* (teste Kaplan-Meier:  $p=0,1893$ ). Os nemátodos do grupo controle se alimentaram de *E. coli* OP50. Sessenta a oitenta nemátodos foram utilizados por grupo.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

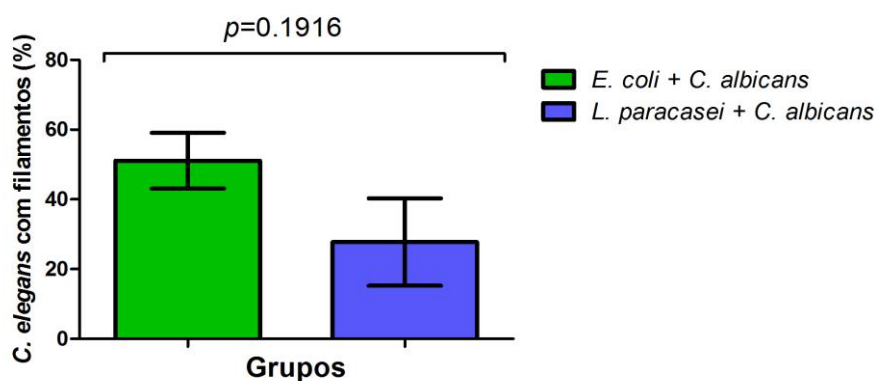
O próximo passo foi verificar se a cepa de *Lactobacillus* 28.4 é capaz de interferir no processo de filamentação de *C. albicans* na cutícula dos nemátodos. Quando a cepa de *C. elegans glp-4; sek-1* é infectada por *C. albicans* e então mantida em um meio líquido, a maioria dos vermes (50 – 60%) morrem com a penetração dos filamentos de *C. albicans* através da sua cutícula (Figura 33). A filamentação de *C. albicans* dentro dos nemátodos se inicia em 24 horas no meio líquido e alcança o pico em filamentos em 60 horas após infecção por *Candida*. Neste ensaio foi encontrado uma redução no número de vermes com filamentos (22%) que foram tratados com *L. paracasei* comparados ao grupo controle de *C. albicans* porém não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,1916$ ) (Figura 34).

Figura 33 – O uso profilático de *L. paracasei* inibe a filamentação de *C. albicans* em modelo de co-infecção com *C. elegans*



Legenda: A e B: Grupo controle de *C. albicans*: Pode-se observar a formação de hifas rompendo a cutícula dos nemátodos (60 horas após infecção). (↓). C e D: Grupo *L. paracasei* + *C. albicans*: Pode-se observar formação de poucas ou nenhuma hifa de *C. albicans* (↓) após 60 horas de infecção.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 34 – Percentual de *C. elegans* com filamentos de *C. albicans*



Legenda: Média e desvio padrão da porcentagem de *C. elegans* com filamentos após 60 horas de infecção com *C. albicans* (grupo C=controle). Comparado com o grupo que recebeu *L. paracasei* profilaticamente (grupo *L. paracasei* + *C. albicans*). Embora houve uma redução de 22% de vermes filamentosos não houve diferença entre os grupos (teste *t*-student:  $p=0,1916$ ).  
Fonte: Elaborada pelo autor.

## 5 DISCUSSÃO

Primeiramente, este estudo verificou a presença de bactérias do gênero *Lactobacillus* em 41 participantes adultos livres de cárie. Foi verificado que apenas 66% dos indivíduos livres de cárie eram colonizados por espécies de *Lactobacillus* na cavidade bucal. Esses dados concordam com Ramamurthy et al. (2014), que estudaram a prevalência de *Lactobacillus* em 50 crianças com idades entre 2-5 anos, sendo 25 crianças livres de cáries e 25 com lesões de cárie ativa. Os autores encontraram um aumento significativo de 22% na taxa de colonização por *Lactobacillus* na cavidade bucal de crianças com cárie ativa (88%) em comparação o grupo formado pelas crianças livres de cárie (60%). A presença de *Lactobacillus* na cavidade bucal está correlacionada com cáries ativas ou com uma maior predisposição as cáries. Esse fato é devido as propriedades acidogênicas e acidúricas de algumas cepas de *Lactobacillus* e sua capacidade de co-agregar com outros micro-organismos cariogênicos durante a colonização dental (Ahola et al., 2002; Badet, Thebaud, 2008).

Foram isolados e identificados 30 amostras clínicas de *Lactobacillus*, sendo *L. paracasei* a espécie mais prevalente, correspondendo a 76% do total dos isolados. Num estudo semelhante, Kõll-Klais et al. (2005) isolaram e identificaram espécies de *Lactobacillus* de 15 pacientes com doença periodontal crônica e encontraram 31 isolados. As cepas mais prevalentes foram *Lactobacillus gasseri* e *Lactobacillus fermentum*. Recentemente, Shimada et al. (2015) investigaram a distribuição de *Lactobacillus* bucais entre crianças japonesas na pré-escola com cárie ativa. *L. gasseri* e *L. salivarius* foram as espécies mais encontradas nas lesões de cárie, sugerindo que essas espécies contribuem para o desenvolvimento e progressão de cáries. Nossos resultados diferem desses estudos devido a nossa população alvo ser indivíduos sem cárie e com correta orientação de higienização bucal.

A fim de selecionar as melhores amostras clínicas com efeito antifúngico, todos os isolados de *Lactobacillus* foram acrescentados aos biofilmes de *C. albicans* em diferentes condições experimentais (grupo formado com células ou sobrenadante) para verificar o efeito direto e indireto desses isolados. Verificou-se

que cada isolado de *Lactobacillus* ou seu sobrenadante exerceu algum um efeito anti-biofilme sobre *C. albicans* alcançando uma redução de até 78% (0,72 Log) para o grupo associado com células. Esta redução parece ser específica para cada isolado de *Lactobacillus*, uma vez que a inibição sobre o biofilme de *C. albicans* variou entre os trinta isolados testados. Estudos anteriores sugerem que a inibição de *Candida* pode ser devido a produção de ácidos orgânicos provenientes do metabolismo dos *Lactobacillus* e pela redução acentuada do pH final do meio ambiente (Simark-Mattsson et al., 2009; Matsubara et al., 2016).

Em geral, as maiores reduções encontradas foram encontradas com o grupo de interação associado com células de *Lactobacillus*. Resultados semelhantes foram encontrados com Vilela et al. (2015) que avaliaram a influência de células e sobrenadante de *L. acidophilus* à formação de biofilme de *C. albicans*. A redução da UFC/mL de *C. albicans* do grupo célula foi de 57,5% em relação ao grupo controle e 45,1% para os biofilmes que foram tratados com sobrenadante. Van der Mei et al. (2014) também estudaram a formação de biofilmes de *C. albicans* com diferentes cepas de *Lactobacillus*. Para a formação dos biofilmes, discos de silicone foram imersos durante 5 horas em uma suspensão microbiana mista (*C. albicans* + *Lactobacillus*) e, após esse tempo, os discos foram incubados durante 192 horas a 37°C para a formação dos biofilmes. Os autores encontraram reduções na UFC de *C. albicans* de 99% nos biofilmes associados com *L. crispatus*, 98% com *L. acidophilus* e 95% com *L. paracasei*.

Também observamos que alguns grupos de interação com o sobrenadante da cultura de *Lactobacillus* levaram a uma redução significativa na contagem de UFC/mL de *C. albicans*. Estes dados demonstram uma relação competitiva entre as duas espécies testadas e sugerem que a presença de substâncias do metabólito bacteriano tornou o meio hostil ao crescimento de leveduras e hifas de *C. albicans*. Num estudo recente, Matsubara et al. (2016) avaliaram o efeito dos sobrenadantes de *L. rhamnosus*, *L. casei* e *L. acidophilus* em diferentes fases de crescimento, tais como 90 minutos, 24 horas e 48 horas de incubação da cultura dos probióticos. Foi observado que os sobrenadantes da primeira fase de incubação (90 min) foram incapazes de inibir o desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* e o efeito inibitório foi observado apenas com os sobrenadantes de 24 e 48 horas. Estes dados reforçam os resultados encontrados no presente estudo no qual foi utilizado um

sobrenadante com uma cultura de 24 horas. Além disso, podemos sugerir que os metabólitos secretados por *Lactobacillus* que interferem com o biofilme de *C. albicans* requerem um tempo mínimo de crescimento da cultura de probióticos para serem produzidos.

Em relação a contagem de UFC dos biofilmes de *C. albicans*, observamos que *L. rhamnosus* 5.2, *L. fermentum* 20.4 e *L. paracasei* 28.4 foram os isolados com maior capacidade para reduzir o biofilme fúngico. Assim, investigamos se esses isolados bacterianos são capazes de alterar a biomassa total dos biofilmes. Esta análise permite estimar a quantidade de células presentes no biofilme total e sua matriz extracelular em comparação com o método de contagem de UFC que quantifica apenas as células viáveis. Na quantificação total de biomassa, encontramos diferença estatisticamente significativa entre os biofilmes de *C. albicans* (controle) comparados aos biofilmes mistos com os isolados de *Lactobacillus*. Para o grupo associado com célula, as maiores reduções foram obtidas por *L. paracasei* 28.4, *L. rhamnosus* 5.2 e *L. fermentum* 20.4, respectivamente. Nos biofilmes tratados com o sobrenadante, não foi observado diferença entre as três amostras clínicas de *Lactobacillus* testadas. Estudos prévios demonstraram que as bactérias probióticas podem alterar a arquitetura dos biofilmes de *C. albicans* pela inibição de genes relacionados no desenvolvimento de biofilme, bem como aqueles associados à replicação e tradução do DNA (Kohler et al., 2012; Chew et al., 2015a; Matsubara et al., 2016).

Os biofilmes também foram avaliados por MEV, onde observamos a aderência dos isolados clínicos de *Lactobacillus* nas leveduras de *C. albicans*, mostrando uma íntima associação entre estes dois micro-organismos no biofilme formado. Além disso, foi possível verificar uma redução no número de leveduras e hifas quando o biofilme monotípico de *C. albicans* foi comparado ao biofilme misto. De acordo com as imagens do MEV, *L. rhamnosus* 5.2, *L. fermentum* 20.4 e *L. paracasei* 28.4 são capazes de reduzir a adesão das células de *C. albicans* na superfície abiótica utilizada para formação dos biofilmes, o que provavelmente causou a redução na contagem de UFC/mL e no ensaio de biomassa total. Uma possível hipótese para isso é a presença de biossurfactantes, que são compostos microbianos (por exemplo, metabólitos secretados nas culturas de *Lactobacillus*) capazes de reduzir a hidrofobicidade do substrato de superfície e consequentemente

alterar a adesão microbiana (Ahimou et al., 2000; Rodrigues et al., 2006). Ceresa et al. (2015) mostraram que o biosurfactante produzido por *Lactobacillus brevis* é capaz de reduzir a aderência e o biofilme de *C. albicans* em até 90% em discos de silicone. Este mecanismo pode ter ocorrido no presente estudo e reduzido a adesão de *C. albicans* nos biofilmes associados *Lactobacillus* ou seu sobrenadante.

Com a finalidade de elucidar os mecanismos envolvidos na redução da formação de biofilme e da filamentação de *C. albicans* observados em nossas análises de UFC, biomassa e MEV, expandimos nosso estudo ao nível da expressão gênica para determinar a interferência das células de *Lactobacillus* e seu sobrenadante na expressão gênica de *ALS3*, *CPH1*, *EFG1* e *HWP1*.

A capacidade de *C. albicans* em formar biofilme tem sido associada com a presença de genes transcricionais reguladores tais como *EFG1*, *BCR1*, *TEC1*, *NDT80* e *ROB1* (Maiti et al., 2015; Gulati, Nobile, 2016). A formação de hifas contribui para a estabilidade da arquitetura do biofilme e atua como um suporte para as leveduras e outras células microbianas no contexto de biofilmes mistos. Assim, a capacidade de formar hifas, bem como sua capacidade em aderir a uma outra célula, é essencial para o desenvolvimento e manutenção do biofilme (Gulati, Nobile, 2016). O gene *HWP1* é expresso na superfície das hifas e codifica uma proteína da parede celular de *C. albicans*, e segundo Nobile et al. (2006), os biofilmes que carecem desse gene são mais propensos ao desprendimento do substrato comparados a biofilmes com alta expressão de *HWP1*.

O gene *ALS3*, codifica uma proteína semelhante à alfa-aglutinina, desempenha um papel essencial na adesão de *C. albicans* e serve como um regulador positivo das vias Ras1-cAMP-Efg1 e MAPK (Maiti et al., 2015). *CPH1* age em conjunto com outro gene transcricional, o gene *EFG1*, que é um fator de transcrição da via cAMP-MAPK. Cepas de *C. albicans* com dupla mutação *cph1efg1Δ* exibiram perda de função de quase toda a maquinaria responsável pela a filamentação e consequentemente tornou-se não patogênico em modelo murino de candidose experimental (Lo et al., 1997). Recentemente, *CPH1* tem sido relacionado na manutenção e organização da parede celular, na formação de pseudo-hifas em resposta ao estresse oxidativo e na formação de biofilme (Einsman et al., 2006; Maiti et al., 2015).

Em nossos resultados de expressão gênica, todos os genes alvos de *C. albicans* estudados (*CPH1*, *ALS3*, *HWP1* e *EFG1*) foram regulados negativamente nos biofilmes mistos, seja nos grupos célula (contato direto célula-célula) ou nos grupos com sobrenadante. Esses resultados podem estar relacionados com a diminuição da contagem de UFC, biomassa total e, conseqüentemente, na formação de biofilme. Estudos prévios também mostraram que bactérias probióticas são capazes de afetar negativamente a expressão de genes de *C. albicans* (Köhler et al., 2012; Bandara et al., 2013; Ribeiro et al., 2017). Entretanto, os mecanismos moleculares exatos relacionados à ação dos *Lactobacillus* contra biofilmes de *C. albicans* ainda não estão elucidados e precisam ser investigados. Como por exemplo, o fracionamento e caracterização dos componentes do sobrenadante utilizando cromatografia líquida e espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

Baseado nos resultados obtidos dos ensaios *in vitro*, nós expandimos o estudo da ação dos isolados clínicos de *Lactobacillus* para modelos animais experimentais como *G. mellonella* e *C. elegans*. Primeiramente, avaliamos a suscetibilidade de *G. mellonella* aos isolados de *Lactobacillus* em larvas não infectadas por *C. albicans*. Foi observado que as cepas não causaram a morte das larvas em concentrações até  $10^7$  células/larva, demonstrando baixa patogenicidade no modelo de *G. mellonella*. Existem poucos estudos que utilizaram o modelo de *G. mellonella* para estudar bactérias probióticas, nas quais as cepas de bactérias também não foram patogênicas para este modelo de hospedeiro (Joyce, Gahan, 2010; Vilela et al., 2015). Observou-se que *L. acidophilus* ATCC 4356 (Vilela et al., 2015) e *Lactococcus lactis* NZ9000 (Joyce, Gahan, 2010) não foram patogênicos a *G. mellonella*, uma vez que nenhuma larva morreu após a injeção do inóculo bacteriano na concentração de  $10^7$  células/larva.

Através da coleta de isolados de *Lactobacillus* da cavidade bucal de pacientes livres de cárie, podemos verificar que algumas fornecem melhor proteção contra *C. albicans* do que outras. Observou-se que *L. paracasei* 28.4 foi a melhor amostra na prevenção da infecção experimental por *C. albicans* no modelo de *G. mellonella*. Com base nesses resultados, investigamos se essa amostra é capaz de estimular o sistema imunológico das larvas. O modelo de *G. mellonella* tem sido utilizado com sucesso no estudo da patogênese de *C. albicans*. Esse modelo invertebrado oferece uma série de vantagens sobre alguns modelos de vertebrados

(ratos e camundongos), principalmente porque permitem ensaios com um grande número de animais, de cepas microbianas e pela ausência de restrições éticas (Fuchs et al., 2010; Junqueira, 2012; Chibebe Junior et al., 2013a). Comparando com os animais vertebrados, o sistema imunológico dos insetos não é composto de imunoglobulinas e células imunes com memória de longo prazo. Mais especificamente, a resposta imune celular de *G. mellonella* é mediada por hemócitos que possui uma ação antimicrobiana e é capaz de fagocitar agentes invasores (Arvanitis et al., 2013). A resposta imune humoral está relacionada a produção de vários peptídeos antimicrobianos (AMP) que podem se ligar e matar patógenos que conseguiram escapar da resposta imune celular (Fallon et al., 2011).

A injeção profilática de *L. paracasei* 28.4 aumentou a taxa de sobrevivência de larvas de *G. mellonella*, acompanhada por um aumento no número de hemócitos. Tomados em conjunto, estes resultados indicam que *L. paracasei* é capaz de estimular a resposta imunológica celular das larvas. Ribeiro et al. (2017) também avaliaram a atividade anti-*Candida* de *L. rhamnosus* ATCC 9595 usando *G. mellonella* como modelo hospedeiro. O tratamento com o sobrenadante de *L. rhamnosus* em larvas infectadas com *C. albicans* aumentou a taxa de sobrevivência dos animais e a contagem de hemócitos, sugerindo que as cepas probióticas com atividade antifúngica podem ser usadas como um método alternativo para prevenir infecções por *Candida*.

Em nosso estudo, observamos também uma redução na quantidade de hemócitos na hemolinfa de larvas de *G. mellonella* após a infecção por *C. albicans* (grupo PBS + *C. albicans*). Além disso, observou-se que os níveis de hemócitos no grupo *L. paracasei* + *C. albicans* eram muito semelhantes aos resultados observados no grupo controle (PBS + PBS). Esses fatos sugerem que nosso tratamento profilático com *L. paracasei* foi capaz de restabelecer os níveis de hemócitos semelhantes às larvas não infectadas (grupo PBS + PBS). Bergin et al. (2003) realizaram um estudo para avaliar se as variações no número de hemócitos em larvas infectadas com diferentes leveduras poderiam ser usadas para determinar a patogenicidade das cepas testadas. Os resultados indicaram que as larvas inoculadas com cepas de *Candida* virulentas mostraram uma redução significativa na contagem de hemócitos, enquanto que larvas inoculadas com cepas de baixa patogenicidade demonstraram apenas uma ligeira variação no número de

hemócitos. Os autores confirmaram que os hemócitos podem ser utilizados na determinação da patogenicidade de micro-organismos e na modulação da resposta imune.

Em 2015, membros do nosso grupo de pesquisa desenvolveram um estudo para avaliar a ação probiótica de *L. acidophilus* ATCC 4356 na candidose experimental em *G. mellonella*. Vilela et al. (2015) demonstraram que a inoculação de *L. acidophilus* em *G. mellonella* infectada com *C. albicans* reduziu o número de leveduras na hemolinfa das larvas e aumentou a sobrevivência destes animais. Esses efeitos podem ser explicados pelos resultados obtidos no presente estudo, nos quais se demonstrou que os *Lactobacillus* podem imunomodular *G. mellonella* e consequentemente aumentar a sobrevivência durante as infecções fúngicas.

Também foram estudadas as alterações na resposta imune humoral das larvas através da quantificação relativa da expressão de AMPs, incluindo os genes que codificam gallerymicina e galiomicina. No modelo de *G. mellonella*, a produção de AMP representa a última linha de defesa. Estes peptídeos são secretados na hemolinfa para combater elementos da parede celular bacteriana ou fúngica (Ratcliffe, 1985; Mowlds, Kavanagh, 2008). AMPs são sintetizados como pré-proteínas numa taxa até 100 vezes mais rápida que a IgM em mamíferos e seu pequeno tamanho, menor que 10 kDa, permite sua rápida difusão através da hemolinfa para neutralizar patógenos invasores. No geral, o modo de ação dos AMPs é através da ligação à superfície de patógenos resultando em danos à membrana microbiana e levando o colapso dos gradientes eletroquímicos da membrana (Shai, 1999, 2002; Brown et al., 2009).

Até o presente momento, este é o primeiro estudo que analisa a expressão dos AMPs em *G. mellonella* que receberam bactérias probióticas. No entanto, a quantificação da expressão de genes para gallerymicina e galiomicina já é um método estabelecido na literatura para estudar a resposta imunológica das larvas contra infecções de *Candida* (Bergin et al., 2006; Mowlds, Kavanagh, 2008; Mowlds et al., 2010). Bergin et al. (2006) mostraram que a pré-exposição de *G. mellonella* a doses não-letais de *C. albicans* protege as larvas contra uma subsequente infecção letal com *C. albicans* devido ao aumento da expressão de AMPs. Eles também observaram que a expressão máxima de AMP ocorreu entre 8 e 24 horas após a administração da dose sub-letal das leveduras. Estes resultados concordam

com o nosso estudo em que expressões mais altas dos genes que codificam gallerymicina e galiomicina foram encontradas nos tempos de 8 e 24 horas.

Uma vez conhecida a quantidade exata do inóculo de *C. albicans* injetada diretamente na hemolinfa, avaliamos também os efeitos de *L. paracasei* sobre as células de *C. albicans* em diferentes tempos de infecção (4, 8 e 24 h). Os resultados mostraram que a amostra de *L. paracasei* 28.4 afeta o número de UFC de *C. albicans* na hemolinfa dos insetos em todos os momentos estudados. No entanto, uma diferença significativa entre os grupos foi observada apenas no tempo 24 horas de infecção. Estes resultados corroboram com os nossos dados de expressão de AMPs, nos quais se observaram níveis mais elevados de peptídeos antifúngicos expressos em *G. mellonella* no tempo de 24 horas em comparação com os outros tempos analisados. Grounta et al. (2016) investigaram os efeitos de *Lactobacillus pentosus* B281, *Lactobacillus plantarum* B282 e *L. rhamnosus* GG em *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* em modelo de *G. mellonella*. Os autores observaram que a injeção profilática de *Lactobacillus* nos tempos de 6 e 24 horas antes da infecção por *L. monocytogenes* e *S. aureus* foi capaz de aumentar a sobrevivência das larvas infectadas. Além disso, o número de *L. monocytogenes* e *S. aureus* na hemolinfa diminuiu em 1,0 e 1,8 Log comparado com o grupo de larvas infectadas e não tratadas com *Lactobacillus*, respectivamente. Estes resultados indicam que o uso profilático de probióticos pode ser uma alternativa na prevenção de doenças infecciosas.

Para o modelo experimental de *C. elegans*, utilizamos um conceito de condicionamento para estudar os efeitos da amostra clínica 28.4, a fim de verificar se esta amostra é capaz de atenuar a infecção por *C. albicans*. No ensaio de sobrevivência, o condicionamento com 28.4 em *C. elegans* aumentou 23% a sobrevivência dos vermes em comparação com o grupo controle de *C. albicans*. Concordando com estes resultados, Kim e Mylonakis (2012) observaram que *L. acidophilus* é capaz de diminuir a carga microbiana de *Enterococcus faecalis* no intestino dos vermes e prolongar sua sobrevivência. Os autores comprovaram que esta cepa de probiótico é capaz de ativar as principais vias de sinalização imunológica envolvidas nas defesas de *C. elegans* contra bactérias Gram-positivas, incluindo a via de proteína quinase (vias TIR-1 e PMK-1), via de sinalização das  $\beta$ -cateninas (via BAR-1) e homólogos do TGF- $\beta$ . Além disso, estudos recentes

sugerem que as bactérias probióticas são capazes de proteger contra o estresse oxidativo, aumentando a vida útil neste modelo invertebrado (Grompone et al., 2012; Park et al., 2014; Nakagawa et al., 2016).

Após verificar que *L. paracasei* aumenta a sobrevivência de *C. elegans*, nosso próximo ensaio foi estudar se a amostra 28.4 é capaz de diminuir a filamentação de *C. albicans* durante a infecção. Quando os nemátodos foram infectados sequencialmente com *L. paracasei* seguido de infecção com *C. albicans*, houve redução no número de vermes com filamentos (22%), mas não foi estatisticamente significativa. Este resultado sugere que *L. paracasei* não tem ação diretamente em *C. albicans* mas no seu sistema imunológico, concordando com os nossos achados no modelo de *G. mellonella*.

## 6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados *in vitro*, foi possível concluir que *L. fermentum* 20.4, *L. paracasei* 28.4 e *L. rhamnosus* 5.2 diminuíram a formação do biofilme de *C. albicans*, pela redução de células fúngicas, inibição na formação de hifas e desestabilização da arquitetura do biofilme. Esses efeitos também ocorreram quando o sobrenadante de *Lactobacillus* foi adicionado nos biofilmes de *C. albicans*. Além disso, esses efeitos inibitórios de *Lactobacillus* nos biofilmes de *C. albicans* estão associados com a regulação negativa dos genes *ALS3*, *HWP1*, *CPH1* e *EFG1*.

Nos ensaios *in vivo*, as cepas de *Lactobacillus* mostraram atividade probiótica variada contra *C. albicans* em *G. mellonella*. *L. paracasei* 28.4 foi capaz de prolongar a sobrevida nos dois modelos experimentais infectados com *C. albicans*. A ação probiótica em *G. mellonella*, decorrente a ativação do sistema imunológico, foi mediada pelo aumento dos hemócitos circulantes e pela produção de níveis elevados de Galiomicina e Gallerymicina. No modelo de *C. elegans*, o aumento da sobrevida dos vermes foi ocasionado pela redução da filamentação de *C. albicans* na cutícula dos nemátodos.

## REFERÊNCIAS\*

- Ahimou F, Jacques P, Deleu M. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme Microb Technol*. 2000 Dec;27(10):749-54. doi: 10.1016/S0141-0229(00)00295-7.
- Ahola AJ, Yli-Knuuttila H, Suomalainen T, Poussa T, Ahlström A, Meurman JH, et al. Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. *Arch Oral Biol*. 2002 Nov;47(11):799-804. doi: 10.1016/S0003-9969(02)00112-7.
- Arvanitis M, Glavis-Bloom J, Mylonakis E. *C. elegans* for anti-infective discovery. *Curr Opin Pharmacol*. 2013;13(5):769-74. doi: 10.1016/j.coph.2013.08.002.
- Badet C, Thebaud NB. Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. *Open Microbiol J*. 2008;2:38-48. doi: 10.2174/1874285800802010038.
- Bandara HM, K Cheung BP, Watt RM, Jin LJ, Samaranayake LP. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide inhibits *Candida albicans* hyphae formation and alters gene expression during biofilm development. *Mol Oral Microbiol*. 2013 Feb;28(1):54-69. doi: 10.1111/omi.12006.
- 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. doi: 10.1016/j.micinf.2003.09.019.
- Bergin D, Murphy L, Keenan J, Clynes M, Kavanagh K. Pre-exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides. *Microbes Infect*. 2006;8(8):2105-12. doi: 10.1016/j.micinf.2006.03.005.
- Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol*. 2006;9(6):588-94. doi: 10.1016/j.mib.2006.10.003.
- Brown SE, Howard A, Kasprzak AB, Gordon KH, East PD. A peptidomics study reveals the impressive antimicrobial peptide arsenal of the wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2009;39(11):792-800. doi: 10.1016/j.ibmb.2009.09.004.
- Ceresa C, Tessarolo F, Caola I, Nollo G, Cavallo M, Rinaldi M, et al. Inhibition of *Candida albicans* adhesion on medical-grade silicone by a *Lactobacillus*-derived biosurfactant. *J Appl Microbiol*. 2015 May;118(5):1116-25. doi: 10.1111/jam.12760.
- Chamilos G, Lionakis MS, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Role of mini-host models in the study of medically important fungi. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(1):42-55. doi: 10.1016/S1473-3099(06)70686-7.

\* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jun 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Chew SY, Cheah YK, Seow HF, Sandai D, Than LT. *In vitro* modulation of probiotic bacteria on the biofilm of *Candida glabrata*. *Anaerobe*. 2015 Aug;34:132-8. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.05.009.

Chibebe Junior J, Fuchs BB, Sabino CP, Junqueira JC, Jorge AO, Ribeiro MS, et al. Photodynamic and antibiotic therapy impair the pathogenesis of *Enterococcus faecium* in a whole animal insect model. *PLoS One*. 2013a;8(2):e55926. doi: 10.1371/journal.pone.0055926.

Chibebe Junior J, Sabino CP, Tan X, Junqueira JC, Wang Y, Fuchs BB, Jorge AO, et al. Selective photoinactivation of *Candida albicans* in the non-vertebrate host infection model *Galleria mellonella*. *BMC Microbiol*. 2013b;13:217. doi: 10.1186/1471-2180-13-217.

Costa AC, Pereira CA, Junqueira JC, Jorge AO. Recent mouse and rat methods for the study of experimental oral candidiasis. *Virulence*. 2013;4(5):391-9. doi: 10.4161/viru.25199.

De Repentigny L. Animal models in the analysis of *Candida* host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbio*. 2004;7:324-9. doi: 10.1016/j.mib.2004.06.001.

Eisman B, Alonso-Monge R, Román E, Arana D, Nombela C, Pla J. The Cek1 and Hog1 mitogen-activated protein kinases play complementary roles in cell wall biogenesis and chlamydospore formation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2006 Feb;5(2):347-58. doi: 10.1128/EC.5.2.347-358.2006.

Elias S, Banin E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev*. 2012 Sep;36(5):990-1004. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00325.x.

Fallon JP, Troy N, Kavanagh K. Pre-exposure of *Galleria mellonella* larvae to different doses of *Aspergillus fumigatus* conidia causes differential activation of cellular and humoral immune responses. *Virulence*. 2011 Sep-Oct;2(5):413-21. doi: 10.4161/viru.2.5.17811.

Fedhila S, Buisson C, Dussurget O, Serror P, Glomski IJ, Liehl P, et al. Comparative analysis of the virulence of invertebrate and mammalian pathogenic bacteria in the oral insect infection model *Galleria mellonella*. *J Invertebr Pathol*. 2010 Jan;103(1):24-9. doi: 10.1016/j.jip.2009.09.005.

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. doi:10.4161/viru.1.6.12985.

Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*. 1989; 66(5):365-78.

Grompone G, Martorell P, Llopis S, González N, Genovés S, Mulet AP, et al. Anti-inflammatory *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 strain protects against oxidative stress and increases lifespan in *Caenorhabditis elegans*. PLoS One. 2012;7(12):e52493. doi: 10.1371/journal.pone.0052493.

Grounta A, Harizanis P, Mylonakis E, Nychas GJ, Panagou EZ. Investigating the Effect of Different Treatments with Lactic Acid Bacteria on the Fate of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* Infection in *Galleria mellonella* Larvae. PLoS One. 2016;11(9):e0161263. doi: 10.1371/journal.pone.0161263.

Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. Microbes Infect. 2016 May;18(5):310-21. doi: 10.1016/j.micinf.2016.01.002.

Harriott MM, Noverr MC. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. Trends Microbiol. 2011;19(11):557-63. doi: 10.1016/j.tim.2011.07.004.

Hasslof P, Hedberg M, Twetman S, Stecksén-Blicks C. Growth inhibition of oral mutans streptococci and *Candida* by commercial probiotic lactobacilli-an *in vitro* study. BMC Oral Health. 2010;10:18. doi: 10.1186/1472-6831-10-18.

Herbel SR, Vahjen W, Wieler LH, Guenther S. Timely approaches to identify probiotic species of the genus *Lactobacillus*. Gut Pathog. 2013;5(1):27. doi: 10.1186/1757-4749-5-27.

Jarosz LM, Deng DM, van der Mei HC, Crielard W, Krom BP. *Streptococcus mutans* competence-stimulating peptide inhibits *Candida albicans* hypha formation. Eukaryot Cell. 2009;8:1658-64. doi: 10.1128/EC.00070-09.

Joyce SA, Gahan CG. Molecular pathogenesis of *Listeria monocytogenes* in the alternative model host *Galleria mellonella*. Microbiology. 2010;156(Pt 11):3456-68. doi: 10.1099/mic.0.040782-0.

Junqueira JC. *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens: recent studies and new perspectives. Virulence. 2012;3(6):474-6. doi: 10.4161/viru.22493.

Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. Acta Biochim Pol. 2009;56(2):211- 24.

Kim Y, Mylonakis E. *Caenorhabditis elegans* immune conditioning with the probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* strain NCFM enhances gram-positive immune responses. Infect Immun. 2012;80(7):2500-8. doi: 10.1128/IAI.06350-11.

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

Köll-Klais P, Mändar R, Leibur E, Marcotte H, Hammarström L, Mikelsaar M. Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity. *Oral Microbiol Immunol*. 2005 Dec;20(6):354-61. doi: 10.1111/j.1399-302X.2005.00239.x.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

Lo HJ, Köhler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*. 1997 Sep 5;90(5):939-49. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80358-X.

Lydia Rajakumari M, Saravana Kumari P. Prevalence of *Candida* species in the buccal cavity of diabetic and non-diabetic individuals in and around Pondicherry. *J Mycol Med*. 2016 Dec;26(4):359-67. doi: 10.1016/j.mycmed.2016.08.002.

Maiti P, Ghorai P, Ghosh S, Kamthan M, Tyagi RK, Datta A. Mapping of functional domains and characterization of the transcription factor Cph1 that mediate morphogenesis in *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol*. 2015 Oct;83:45-57. doi: 10.1016/j.fgb.2015.08.004.

Markowiak P, Śliżewska K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*. 2017 Sep 15;9(9). pii: E1021. doi: 10.3390/nu9091021.

Marsh PD, Zaura E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *J Clin Periodontol*. 2017 Mar;44 Suppl 18:S12-S22. doi: 10.1111/jcpe.12679.

Matsubara VH, Wang Y, Bandara HM, Mayer MP, Samaranayake LP. Probiotic lactobacilli inhibit early stages of *Candida albicans* biofilm development by reducing their growth, cell adhesion, and filamentation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016 Jul;100(14):6415-26. doi: 10.1007/s00253-016-7527-3.

Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013;4(2):119-28. doi: 10.4161/viru.22913.

McMillan S, Verner-Jeffreys D, Weeks J, Austin B, Desbois AP. Larva of the greater wax moth, *Galleria mellonella*, is a suitable alternative host for studying virulence of fish pathogenic *Vibrio anguillarum*. *BMC Microbiol*. 2015 Jun 23;15:127. doi: 10.1186/s12866-015-0466-9.

Million M, Raoult D. Species and strain specificity of *Lactobacillus* probiotics effect on weight regulation. *Microb Pathog*. 2013;55:52-4. doi: 10.1016/j.micpath.2012.09.013.

Mowlds P, Coates C, Renwick J, Kavanagh K. Dose-dependent cellular and humoral responses in *Galleria mellonella* larvae following beta-glucan inoculation. *Microbes Infect*. 2010;12(2):146-53. doi: 10.1016/j.micinf.2009.11.004.

- Mowlds P, Kavanagh K. Effect of pre-incubation temperature on susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Mycopathologia*. 2008;165(1):5-12. doi: 10.1007/s11046-007-9069-9.
- Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB, Idnurm A, Heitman J, Calderwood SB, et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect Immun*. 2005 Jul;73(7):3842-50.
- Nakagawa H, Shiozaki T, Kobatake E, Hosoya T, Moriya T, Sakai F, et al. Effects and mechanisms of prolongevity induced by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*. 2016 Apr;15(2):227-36. doi: 10.1111/ace.12431.
- Nobile CJ, Nett JE, Andes DR, Mitchell AP. Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation. *Eukaryot Cell*. 2006 Oct;5(10):1604-10. doi: 10.1128/EC.00194-06.
- Oh S, Go GW, Mylonakis E, Kim Y. The bacterial signalling molecule indole attenuates the virulence of the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Appl Microbiol*. 2012 Sep;113(3):622-8. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05372.x.
- Park MR, Yun HS, Son SJ, Oh S, Kim Y. Short communication: development of a direct in vivo screening model to identify potential probiotic bacteria using *Caenorhabditis elegans*. *J Dairy Sci*. 2014 Nov;97(11):6828-34. doi: 10.3168/jds.2014-8561.
- Peleg AY, Hogan DA, Mylonakis E. Medically important bacterial-fungal interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(5):340-9. doi: 10.1038/nrmicro2313.
- Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods*. 2008 Feb;72(2):157-65. doi: 10.1016/j.mimet.2007.11.010.
- Ramamurthy PH, Swamy HS, Bennete F, Rohini M, Nagarathnamma T. Relationship between severe-early childhood caries, salivary mutans streptococci, and lactobacilli in preschool children of low socioeconomic status in Bengaluru city. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2014 Jan-Mar;32(1):44-7. doi: 10.4103/0970-4388.127054.
- Ratcliffe NA. Invertebrate immunity--a primer for the non-specialist. *Immunol Lett*. 1985;10(5):253-70. doi: 10.1016/0165-2478(85)90100-2.
- Ribeiro FC, de 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. doi: 10.1111/jam.13324.
- Rodrigues LR, Teixeira JA, van der Mei HC, Oliveira R. Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2006 Apr 15;49(1):79-86. doi: 10.1016/j.colsurfb.2006.03.003.

Ruhnke M. Skin and mucous membrane infections. In: Calderone RA, editores. *Candida* and Candidiasis. Washington, DC: ASM Press; 2002. p. 307-25.

Samaranayake LP, Keung Leung W, Jin L. Oral mucosal fungal infections. *Periodontol* 2000. 2009;49:39-59. doi: 10.1111/j.1600-0757.2008.00291.x.

Sanitá PV, Pavarina AC, Giampaolo ET, Silva MM, Mima EG, Ribeiro DG, et al. *Candida* spp. prevalence in well controlled type 2 diabetic patients with denture stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011 Jun;111(6):726-33. doi: 10.1016/j.tripleo.2011.02.033.

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. doi: 10.1016/S0005-2736(99)00200-X.

Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 2002;66(4):236-48. doi: 10.1002/bip.10260. doi: 10.1002/bip.10260.

Shimada A, Noda M, Matoba Y, Kumagai T, Kozai K, Sugiyama M. Oral lactic acid bacteria related to the occurrence and/or progression of dental caries in Japanese preschool children. *Biosci Microbiota Food Health*. 2015;34(2):29-36. doi: 10.12938/bmfh.2014-015.

Simark-Mattsson C, Emilson CG, Hakansson EG, Jacobsson C, Roos K, Holm S. *Lactobacillus*-mediated interference of mutans streptococci in caries-free vs. caries-active subjects. *Eur J Oral Sci*. 2007;115:308-14. doi: 10.1111/j.1600-0722.2007.00458.x

Simark-Mattsson C, Jonsson R, Emilson CG, Roos K. Final pH affects the interference capacity of naturally occurring oral *Lactobacillus* strains against mutans streptococci. *Arch Oral Biol*. 2009 Jun;54(6):602-7. doi: 10.1016/j.archoralbio.2009.03.005.

Song Y, Kato N, Liu C, Matsumiya Y, Kato H, Watanabe K. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microbiol Lett*. 2000 Jun 15;187(2):167-73. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09155.x.

ten Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W, Groot PWJ. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. *J Dent Res*. 2009;88(2):105-15. doi: 10.1177/0022034508329273.

Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Arch Oral Biol*. 2006;51(8):672-80. doi: 10.1016/j.archoralbio.2006.02.005.

Tsai YT, Cheng PC, Pan TM. The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;96:853-62. doi: 10.1007/s00253-012-4407-3.

van der Mei HC, Buijssen KJ, van der Laan BF, Ovchinnikova E, Geertsema-Doornbusch GI, Atema-Smit J, et al. Voice prosthetic biofilm formation and *Candida* morphogenic conversions in absence and presence of different bacterial strains and species on silicone-rubber. *PLoS One*. 2014 Aug 11;9(8):e104508. doi: 10.1371/journal.pone.0104508.

Vestman NR, Timby N, Holgersson PL, Kressirer CA, Claesson R, Domellöf M, et al. Characterization and *in vitro* properties of oral lactobacilli in breastfed infants. *BMC Microbiol*. 2013;13:193. doi: 10.1186/1471-2180-13-193.

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. doi: 10.4161/21505594.2014.981486.

Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res*. 2013 Mar;69(1):137-43. doi: 10.1016/j.phrs.2012.11.006.

**ANEXO A – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos**

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 *Lactobacillus* spp. DA CAVIDADE BUCAL E SUA AÇÃO PROBIÓTICA SOB *Candida albicans*: 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 *Lactobacillus* spp. da cavidade bucal de indivíduos livres de cárie e avaliar sua ação probiótica sob *Candida albicans*.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Ausência de riscos.

Benefício: Identificar espécies de *Lactobacillus* com ação probiótica sob *Candida albicans*

**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:** SAO JOSE DOS CAMPOS

**Telefone:** (12)3947-9078

**Fax:** (12)3947-9010

**E-mail:** ceph@fosjc.unesp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO  
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



Continuação do Parecer: 560.479

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Colegiado aprova o parecer da relatora

SAO JOSE DOS CAMPOS, 18 de Março de 2014

Assinador por:  
**JANETE DIAS ALMEIDA**  
(Coordenador)

**Endereço:** Av.Engº Francisco José Longo 777

**Bairro:** Jardim São Dimas

**CEP:** 12.245-000

**UF:** SP

**Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS

**Telefone:** (12)3947-9078

**Fax:** (12)3947-9010

**E-mail:** ceph@fosjc.unesp.br

## ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caro(a) Aluno(a)

Eu, RODNEI DENNIS ROSSONI, aluno de doutorado do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos / UNESP, portador do CPF 325.375.798-60, estabelecido à Avenida Engenheiro Francisco José Longo, 633, apto 13, São José dos Campos/SP, telefone para contato nº (12) 99706-2541, vou realizar uma pesquisa cujo título é "ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Lactobacillus* spp. DA CAVIDADE BUCAL E SUA AÇÃO PROBIÓTICA SOB *Candida albicans*: FORMAÇÃO DE BIOFILME, INFECÇÃO EM MODELOS DE INVERTEBRADOS E EXPRESSÃO DOS GENES *EFG1*, *HWP1* e *ALS1*.

Os objetivos desse trabalho serão isolar e identificar *Lactobacillus* presentes na cavidade bucal e estudar a ação probiótica desses micro-organismos. Será estudada a capacidade desses micro-organismos em prevenir ou diminuir infecções causadas por leveduras do gênero *Candida*.

Serão coletadas amostras de enxágue bucal pelo bochecho com uma solução fisiológica tamponada. Essas amostras serão coletadas no Laboratório de Microbiologia e Imunologia, onde serão realizadas todas as etapas do estudo proposto. O Sr.(a) tem a garantia de acesso, em qualquer etapa do estudo, sobre qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas e sobre o andamento do trabalho. O benefício dessa pesquisa será a identificação de espécies de *Lactobacillus* presentes na cavidade bucal que tenham ação na prevenção e no controle de doenças fúngicas, como a candidose bucal. Não há risco envolvido na coleta das amostras e na execução da pesquisa para os participantes.

Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos / UNESP, situado na Av. Eng. Francisco José Longo, nº 777, Jardim São Dimas, CEP: 12245-000 - São José dos Campos-SP, Telefone: (12) 3947- 9000 Fax: (12) 3947-9010. Informo que será garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e assim deixar de participar do estudo. Também não haverá custo nem pagamento pela Colaboração.

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Acredito ter sido esclarecido(a) a respeito das informações que leram para mim, descrevendo o estudo a ser realizado e concordo em participar sabendo quais os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes, e que minha participação não implicará em nenhuma despesa.

NOME: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_ CPF: \_\_\_\_\_

ENDEREÇO: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador