VICTOR HARUO MATSUBARA

**Efeito de bactérias probióticas sobre *Candida albicans*:
ensaios em cultura de macrófagos e de biofilme**

São Paulo

2016

VICTOR HARUO MATSUBARA

**Efeito de bactérias probióticas sobre *Candida albicans*:
ensaios em cultura de macrófagos e de biofilme**

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas para obter o título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Prótese Dentária

Orientador: Profa. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Matsubara, Victor Haruo.

Efeito de bactérias probióticas sobre *Candida albicans*: ensaios em cultura de macrófagos e de biofilme / Victor Haruo Matsubara ; orientador Marcia Pinto Alves Mayer. -- São Paulo, 2016.

143 p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Prótese Dentária. - Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão original.

1. Probióticos. 2. Lactobacillus. 3. Candida albicans. 4. Macrófagos. 5. Biofilmes. I. Mayer, Marcia Pinto Alves. II. Título.

Matsubara VH. Efeito de bactérias probióticas sobre *Candida albicans*: ensaios em cultura de macrófagos e de biofilme. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: / /2016

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais, Paulo e Mieko, grandes incentivadores da minha carreira acadêmica, sempre presentes e dispostos a ajudar. O amor e a dedicação de vocês foram essenciais na concretização deste trabalho.

Ao meu irmão, Igor, e minha cunhada, Daniela, pelo apoio e torcida pelo meu sucesso.

À minha namorada e companheira, Monalisa, por todo seu amor, incentivo e por ter estado firme ao meu lado durante todos esses anos, mesmo eu estando ausente muitas vezes.

À minha avó, Hana Matsubara, pelo apoio e incentivo.

Às minhas tias, por toda ajuda e suporte tanto na minha vida profissional e quanto na vida pessoal.

Aos meus tios e primos, sempre dando apoio nessa jornada.

A todos os meus amigos, parceiros para todas as horas.

Em especial ao meu avô, Yasumassa Watanabe, grande responsável pela pessoa que eu sou hoje e que está sempre iluminando meu caminho.

A todos vocês, eu dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, na pessoa de seu diretor Prof. Dr. Waldyr Antônio Jorge e do chefe do Departamento de Prótese Prof. Dr. Atlas Edson Moleros Nakamae.

À Faculdade de Odontologia da The University of Queensland, Austrália, na pessoa de seu então diretor Prof. Dr. Lakshman Perera Samaranayake.

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da USP, presidida pela Profa. Dra. Marcia Martins Marques e ao Coordenador do Programa Prof. Dr. Edgar Michel Crosato.

À minha orientadora, Profa. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer, não somente pela orientação na minha pesquisa de doutorado, mas também por todo incentivo e apoio para minha evolução acadêmica, dando condições para que eu realizasse um doutorado sanduíche.

Ao meu orientador estrangeiro, Prof. Dr. Lakshman P. Samaranayake, uma pessoa incrível com quem aprendi muito sobre pesquisa e que hoje é uma inspiração para mim.

Ao Prof. Dr. Marcelo José Strazzeri Bonecker por ter sido meu orientador acadêmico quando ingressei no doutorado e ao Prof. Dr. Pedro Tortamano Neto por ter sido meu orientador no primeiro ano de meu doutorado.

À doutora Karin Hitomi Ishikawa, por todo o apoio e ajuda nos experimentos, e com a qual pude contar durante todo o doutorado.

Aos pós-doutores Bruno Bueno-Silva, Ellen Sayuri Ando-Suguimoto e Priscila Longo, e pós-graduandos, Maike Paulino, Dione Kawamoto, Lucas Almeida, Pâmela Amado e Marcela Yang, do Departamento de Microbiologia do ICB-USP, por terem passado todo o conhecimento necessário para a realização da minha pesquisa e terem contribuído diretamente para a sua conclusão. A amizade de todos vocês tornaram o trabalho no laboratório muito mais prazeroso.

Ao pós-doutorandos da The University of Queensland, Nihal Bandara e Chris Wang, pela amizade e por terem contribuído diretamente para a minha pesquisa realizada na Austrália.

Ao técnico do laboratório de Microbiologia Oral, ICB-USP, Leo Cruz, pelo suporte

em meus experimentos laboratoriais.

À empresa Danisco, por fornecer as amostras de bactérias probióticas usadas no estudo.

Ao Prof. Dr. Atlas Edson Moleros Nakamae, por ser um mentor e um apoiador da minha carreira acadêmica. O seu incentivo para eu ingressar no doutorado foi essencial para eu chegar neste estágio.

Aos Professores da Disciplina de Prótese Total da Faculdade de Odontologia da USP, Prof. Dra. Maria Cecília Miluzzi Yamada, Profa. Dra. Regina Tamaki, Prof. Dr. Roberto Nobuaki Yamada, Prof. Dr. Vyto Kiausinis pelo apoio e conhecimentos transmitidos.

Aos meus amigos da Disciplina de Prótese Total da Faculdade de Odontologia da USP, Roger, Tatinha, Danilo, Carol, Juliana, Jun, Wallace, Márcio e Priscila.

Aos funcionários do Departamento de Prótese Dentária da FOUSP, em especial ao Luis, Paula, Sandra, Cora e Márcia.

Às funcionárias do Serviço de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da USP e aos funcionários do Serviço de Documentação Odontológica da FOUSP.

"O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice.
Colhe, pois, a sabedoria.
Armazena suavidade para o amanhã."

Leonardo da Vinci

RESUMO

Matsubara VH. Efeito de bactérias probióticas sobre *Candida albicans*: ensaios em cultura de macrófagos e de biofilme [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Original.

Apesar das evidências sobre o efeito de bactérias probióticas sobre *Candida albicans*, os mecanismos envolvidos nesta interação não estão totalmente esclarecidos. Visando contribuir com o entendimento sobre os mecanismos pelos quais bactérias probióticas interferem na colonização por *C. albicans*, o presente estudo testou a hipótese de que *Lactobacillus* probióticos interferem na resposta de macrófagos humanos induzida por *C. albicans* e inibem o desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*. Macrófagos humanos THP-1 foram pré-tratados com *Lactobacillus rhamnosus* LR32, *Lactobacillus casei* L324m e *Lactobacillus acidophilus* NCFM, e desafiados com *C. albicans* e/ou lipopolissacarídeos (LPS) de *Escherichia coli*, em ensaio de co-cultura. Após incubação, foram determinados o perfil de citocinas por ELISA, a transcrição relativa do gene *clec7a* por RT-qPCR. Biofilmes de *C. albicans* ATCC SC5314 e 75 (isolado clínico) em fase de adesão inicial, colonização inicial e maturação foram tratados com suspensão de *Lactobacillus* probióticos. Além disso, os biofilmes de *C. albicans* foram tratados com meio condicionado com *L. rhamnosus* após diferentes períodos experimentais. O efeito dos probióticos foi avaliado por contagem de células de *C. albicans* viáveis e avaliação da morfologia celular por microscopia confocal e eletrônica de varredura. O pré-tratamento com bactérias probióticas promoveu alteração no perfil de citocinas produzidas por macrófagos desafiados com LPS e *C. albicans*, induzindo um aumento nos níveis de IL-10 e redução de IL-12 ($p < 0,05$). Além disso, o pré-tratamento com probióticos provocou redução do nível de transcritos de *clec7a*, que codifica o receptor Dectina-1 ($p < 0,05$), indicando a redução da expressão de Dectina-1 nestas células. A interação entre cepas de *Lactobacillus* e *C. albicans* promoveu significativa redução ($p < 0,05$) no número de células de *C. albicans* no biofilme (25,5-61,8%), na dependência da cepa probiótica e da fase do biofilme de *C. albicans*. Todos os *Lactobacillus* testados impactaram negativamente na diferenciação levedura-hifa de *C. albicans* e na formação do biofilme. Análises microscópicas revelaram que as suspensões de *L.*

rhamosus reduziram a diferenciação de *Candida* em hifas, levando a uma predominância de crescimento em levedura. O meio condicionado com *L. rhamnosus* não exerceu efeito significativo sobre biofilme maduro ($p>0,05$), mas promoveu redução significativa do número de UFC de *C. albicans* quando utilizado nos estágios iniciais da formação do biofilme ($p<0,01$). Os resultados sugerem que *Lactobacillus* probióticos são capazes de interferir na expressão de receptores de macrófagos para o reconhecimento de *C. albicans* e reduzir a resposta de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, os resultados indicam que *Lactobacillus* probióticos são capazes de inibir a diferenciação de *C. albicans* de leveduras para hifas, e o desenvolvimento de biofilme de *C. albicans*, particularmente na fase de colonização inicial da levedura, por interações célula-célula e secreção de exometabólitos. O conjunto de dados deste estudo contribui para elucidar os mecanismos pelos quais *Lactobacillus* atuam como probióticos, dando suporte para o seu uso como terapia suplementar contra infecções de mucosas por *C. albicans*.

Palavras-chave: Probióticos. *Lactobacillus*. *Candida albicans*. Macrófagos. Biofilme.

ABSTRACT

Matsubara VH. Effect of probiotic bacteria against *Candida albicans*: macrophages cell culture and biofilm assays [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Original.

The infection rates of *Candida albicans* in human may be reduced by probiotics. However, the mechanisms involved in the interaction between *C. albicans* and probiotic bacteria are largely unknown. The present study comprised two parts. The first aimed to test the hypothesis that probiotics may impair the signaling induced by *C. albicans* in human macrophages, thus lowering the inflammatory challenge. The second aimed to evaluate the inhibitory effects of *Lactobacillus* on different phases of *C. albicans* biofilm development. In the first part, macrophages were pretreated with a probiotic strain (*Lactobacillus rhamnosus* LR32, *Lactobacillus casei* L324m and *Lactobacillus acidophilus* NCFM) and challenged with *C. albicans* and/or lipopolysaccharide (LPS) of *Escherichia coli* in a co-culture assay. After incubation, cytokine profile of macrophage's supernatant was assessed by ELISA and the expression of *clec7a* gene was determined by RT-qPCR. Probiotic strains altered the cytokine profile of macrophages stimulated with LPS and *C. albicans*, leading to increased levels of IL-10 and reduced levels of IL-12 ($p < 0.05$), and reducing the relative expression of *clec7a* gene encoding Dectin-1 receptor ($p < 0.05$). In the second part, quantification of biofilm growth and microscopic analyses were performed on *C. albicans* biofilms treated with *Lactobacillus* cell suspensions and their supernatants. Lactobacilli induced a significant reduction ($p < 0.05$) in the number of biofilm cells (25.5–61.8%) dependent on the probiotic strain and the biofilm phase. *L. rhamnosus* supernatants had no significant effect on the mature biofilm ($p > 0.05$), but significantly reduced the early stages of *Candida* biofilm formation ($p < 0.01$). Microscopic analyses revealed that *L. rhamnosus* suspensions reduced *Candida* hyphal differentiation, leading to a predominance of budding growth. All lactobacilli negatively impacted *C. albicans* yeast-to-hyphae differentiation and biofilm formation. The inhibitory effects of *Lactobacillus* on *C. albicans* involved both cell-cell interactions and secretion of exometabolites. To conclude, the probiotic lactobacilli reduce inflammation by impairing the recognition of *C. albicans* by macrophages and altering the production of

proinflammatory cytokines. It was also clarified, for the first time, the mechanics of how the *Lactobacillus* species antagonize *C. albicans* colonization, particularly in the critical, early colonization phase of the yeast. Taken all together, our data elucidated the inhibitory mechanisms of lactobacilli that define their probiotic candidicidal activity, supporting the use of these probiotics as a supplemental therapy against mucosal infections by *C. albicans*.

Keywords: Probiotics. *Lactobacillus*. *Candida albicans*. Macrophages. Biofilm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Linha do tempo do ensaio de co-cultura.....	75
Figura 4.2 - Linha do tempo do ensaio de co-cultura <i>Lactobacillus</i> e <i>Candida</i>	78
Figura 4.3 - Linha do tempo do ensaio com sobrenadante de <i>L. rhamnosus</i>	80
Figura 4.4 - Linha do tempo de ensaios com microscopia.....	81
Figura 5.1 - Valores de Densidade óptica (DO) a 495 nm obtidos de cultura de <i>Candida albicans</i> SC5314 em diferentes intervalos de tempo	83
Figura 5.2 - Valores de Densidade óptica (DO) a 495 nm obtidos de cultura de cepas de <i>Lactobacillus</i> em diferentes intervalos de tempo	84
Figura 5.3 - Número de células THP-1 viáveis determinado por exclusão por azul de trypan. Dados de ensaio com <i>L. rhamnosus</i> LR32.....	85
Figura 5.4 - Níveis de citocinas TNF- α (a), IL-10 (b), IL-1 β (c), MCP-1 (d) e IL-12 (e) produzidas por macrófagos após desafio por LPS, <i>C. albicans</i> ou pré-tratamento com LPS e desafio por <i>C. albicans</i>	87
Figura 5.5 - Produção de citocinas determinada por ELISA a partir de sobrenadante de macrófagos.	88
Figura 5.6 - Transcrição relativa do gene <i>clec7a</i> nos diferentes grupos de estudo. Oito grupos foram realizados usando <i>L. rhamnosus</i> LR32, <i>L. casei</i> L324m e <i>L. acidophilus</i> NCFM.	91
Figura 5.7 - Viabilidade de células de <i>C. albicans</i> durante as fases de colonização inicial (24 h) e de maturação (48 h) da formação do biofilme de <i>Candida</i> após tratamento com suspensão de bactérias probióticas, determinado através de quantificação de UFCs.....	94

Figura 5.8 - Variação do pH dos sobrenadantes do biofilme de <i>C. albicans</i> SC5314 após incubação com suspensão de células de <i>Lactobacillus</i> (1×10^7 céls/ml).	95
Figura 5.9 - Efeitos do sobrenadante de <i>L. rhamnosus</i> LR32 sobre biofilmes de <i>C. albicans</i> ATCC SC5314, determinados por ensaio de redução de XTT.	96
Figura 5.10 -Imagens de microscopia de varredura por laser confocal (MVLC)	98
Figura 5.11 -Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (SEM) de biofilmes de <i>C. albicans</i> ATCC 5314 durante a fase de colonização inicial e imagens de microscopia de varredura por laser confocal (MVLC) de biofilmes de <i>C. albicans</i> ATCC SC5314 durante a fase de colonização inicial	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Estudos <i>in vitro</i> evidenciando efeitos antifúngicos dos probióticos.....	52
Tabela 2.2- Estudos clínicos evidenciando o efeito antifúngico de probióticos na cavidade oral, tratos urogenital e gastrointestinal em humano.....	61
Tabela 5.1- Porcentagem de redução de células viáveis de <i>C. albicans</i> nos biofilmes após tratamento com suspensão de bactéria probiótica (1×10^7 céls/ml), durante as fases de colonização inicial (24 h) e maturação (48 h).....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	Infusão de cérebro e coração (Brain Heart Infusion)
CARD	Domínio de recrutamento e ativação de caspase
CCR2	Receptor de quimiocina CC
CD	Célula dendrítica
CD14 ⁺	Monócitos sanguíneos periféricos humanos
CEK	Quinase de <i>Candida albicans</i> reguladas por sinal extracelular
Céls	Células
CLIs	Células linfoides inatas
CLRs	Receptores de lectina tipo-C
CO ₂	Dióxido de carbono
CVV	Candidíase vulvo-vaginal
DC	Células dendríticas
DC-SIGN	Moléculas de adesão intracelular não-integrinas específicas de células dendríticas
DO	Densidade óptica
DP	Desvio padrão
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (enzyme-linked immunosorbent assay)
GI	Gastrointestinal
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida humana (human immunodeficiency virus)
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INF	Interferon
IPC	Índice periodontal de comunidade
LPS	Lipopolissacarídeos
MAC	Complexo de ataque à membrana (membrane attack complex)
MAPK	Proteína-quinase ativada por mitógenos
MCP	Proteína quimioatrativa de monócito
MIP	Proteínas inflamatórias de macrófagos

MMLA	N ^G -monometil-L-arginina
MRS	Man, Rogosa e Sharpe
MS	Mutans streptococci
MVLC	Microscopia de varredura por laser confocal
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos (neutrophil extracellular traps)
NO	Ácido nítrico
NOD	Domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeo
NF-κβ	Nuclear fator-kappa β
NK	Células natural killer
NLRs	Receptores de domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeo (NOD-like receptors)
NLRP	Receptores de domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeo e domínio pirina
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Solução salina fosfato-tamponada
PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polymerase chain reaction)
RCT	Ensaio controlados randomizados (Randomized controlled trial)
RLRs	Receptores similares ao gene 1 induzido por ácido retinóico (RIG-I-like receptors)
PMA	Porbol 12-miristato 13-acetato (phorbol 12-myristate 13-acetate)
RAF	Quinase de fibrosarcoma rapidamente acelerado
RPM	Rotações por minuto
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão
RTqPCR	PCR quantitativo em tempo real
SDA	Ágar Sabouraud dextrose
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
SeNPs	Nanopartículas de selênio
SFB	Soro fetal bovino
Spp	Espécies
SYK	Quinase tirosina de baço (spleen tyrosine kinase)
T _H	Linfócito T auxiliar (T helper cells)
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral

VAS	Escala análoga visual (visual analogue scale)
VS	Versus
UFC	Unidades formadoras de colônia

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
%	porcentagem
s	segundo
min	minuto
h	hora
g	gramas
ml	mililitro
mg	miligrama
Å	absorbância
µL	microlitro
mM	milimolar
α	alfa
β	beta
Xg	Veze a gravidade (times gravity)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	27
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	31
3	PROPOSIÇÃO.....	69
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	71
5	RESULTADOS	83
6	DISCUSSÃO.....	103
7	CONCLUSÕES.....	115
	REFERÊNCIAS	117

1 INTRODUÇÃO

Theodor Escherich, cujos estudos identificaram o bacilo *Escherichia coli*, afirmou em 1886 que a interação entre o hospedeiro e as bactérias é muito importante e que a composição da microbiota intestinal é essencial para a saúde e bem-estar do ser humano (1).

Sabe-se que a microbiota, tanto do trato gastrointestinal quanto da cavidade oral, é constituída por diversos micro-organismos, bactérias, arqueas e fungos. *Candida* é o fungo oportunista mais comumente isolado da cavidade oral, tanto em doentes quanto em indivíduos saudáveis (2). A alta prevalência de indivíduos infectados por HIV (“vírus da imunodeficiência adquirida humana”) e de outras populações imunocomprometidas resultou na ressurgência de infecções orais por *Candida* (2).

Idosos são também mais suscetíveis às infecções por organismos do gênero *Candida*, particularmente devido a maior prevalência de doenças crônicas, uso de medicação, higiene oral precária, diminuição do fluxo salivar e deficiências do sistema imune (3).

Candida é um organismo comensal, que habita metade da população como um patógeno oportunista do trato gastrointestinal (GI) e vaginal (4). Quando fatores predisponentes estão presentes e o equilíbrio microbiota-hospedeiro é rompido, este fungo é capaz de causar candidíases superficiais e profundas, incluindo fungemias (3). Entre os fatores predisponentes para candidíases podem-se destacar a imunossupressão; má-nutrição; desordens sanguíneas como leucemia aguda; perturbação do ecossistema oral causada por antibioticoterapia e uso de corticosteróide; estados hipoendócrinos como hipotireoidismo, diabetes mellitus e hipossalivação causada por radiação ou síndrome de Sjorgren; e hospitalização prolongada (2, 5, 6).

Oito espécies de *Candida* já foram associadas a quadros de doença, especialmente em pessoas imunossuprimidas: *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. viswanathii* e *C. glabrata* (7). Dentre essas espécies, a *C. albicans* é a mais comumente isolada e a mais prevalente nas superfícies mucosas do ser humano, tanto no estado de saúde como na doença (8).

As manifestações clínicas da infecção por *C. albicans* são as mais variadas, podendo ser subaguda, aguda ou crônica. As lesões podem estar localizadas na boca, garganta, couro cabeludo, vagina, dedos, unhas, brônquios, pulmões, trato gastrointestinal, ou a infecção pode ser generalizada, como septicemia, endocardite e meningite. Os processos patológicos causados por espécies do gênero *Candida* também são variados, indo desde irritação e inflamação, até uma resposta granulomatosa e supurativa (2, 5-7, 9).

O mecanismo exato de penetração da levedura na pele e mucosas ainda não está completamente elucidado. Alguns pesquisadores defendem que ela ocorra através de blastoconídios, enquanto a maioria sugere que a forma de hifa está associada à maior invasividade (10-12).

Atualmente, o tratamento de candidíase oral baseia-se na administração de antifúngicos como nistatina (ação tópica), anfotericina B e fluconazol (ambos de ação sistêmica) (13, 14). No entanto, devido aos efeitos colaterais e à toxicidade associados aos antifúngicos de uso sistêmico principalmente (9), além do potencial surgimento de cepas resistentes a essas drogas (15, 16), o tratamento e principalmente a profilaxia antifúngica não têm sido totalmente bem sucedidos (13). Com isso, o desenvolvimento de terapias alternativas para prevenir e tratar infecções por *Candida* é urgentemente necessário.

No atual cenário, desenhado pela limitação dos antimicrobianos, o uso de bactérias probióticas surge como uma alternativa contra infecções microbianas, incluindo candidíase oral (17, 18). Atualmente, os probióticos podem ser definidos como microrganismos vivos, que, quando ingeridos em quantidades adequadas, exercem benefícios à saúde, além da nutrição básica inerente (19-22). Podem ser usados como suplementos na dieta com o objetivo de melhorar a saúde dos consumidores (23).

Bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e, em menor escala, *Enterococcus* (como *E. faecium*), são mais frequentemente empregadas como suplementos probióticos em alimentos, uma vez que estas foram associadas ao trato gastrointestinal do humano saudável (24).

O espectro de atividades dos probióticos envolve efeitos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos (25). Eles reduzem fatores de risco para determinadas doenças e promovem melhora das funções naturais do corpo, ajudando com isso, a manter a saúde gastrointestinal e modulação benéfica do sistema imune (23).

Muitas espécies de bactérias estão sendo usadas e testadas como probióticos, sem haver uma definição de qual seria a mais eficaz no combate de *C. albicans* na cavidade oral. O efeito antimicrobiano dos probióticos é considerado cepa-específico, ou seja, depende simultaneamente da cepa probiótica e do patógeno a ser combatido, necessitando estudos caso-a-caso para selecionar o melhor probiótico para cada situação (26).

A seleção de bactérias probióticas tem como base critérios que envolvem segurança para uso humano; histórico de não provocarem doenças ou não estarem associadas a doenças, tais como endocardite; ausência de genes que codificam resistência aos antibióticos; capacidade de aderir à mucosa e de colonizar, ao menos temporariamente, o trato gastrointestinal e urogenitário humano; capacidade de produzir compostos antimicrobianos; e ser metabolicamente ativo no intestino (24, 27-37). Alguns destes critérios foram definidos tendo-se em mente o controle da microbiota intestinal, e nem todos, tais como a resistência ao ambiente ácido e aos sais de bile, ou a colonização do intestino, são necessários para a seleção de probióticos visando o controle da microbiota oral.

Determinadas bactérias probióticas são capazes de combater a infecção por *Candida* na cavidade oral (17, 18, 38, 39), no trato gastrointestinal e na vagina (40-43). Ainda na cavidade oral, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* mostraram serem capazes de inibir estreptococos cariogênicos (44).

Bactérias ácido lácticas são consideradas seguras e convenientes para o consumo humano. Entre as bactérias lácticas pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, destacam-se como probióticos as espécies *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. casei* - *subsp. paracasei* e *subsp. tolerans*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius* (19, 29, 30). Poucos casos de infecções foram associados a essas espécies, enquanto vários estudos publicados mostraram a sua segurança para o consumo (27, 32, 33, 45-50). Especificamente, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus rhamnosus* têm sido consumidos em leites fermentados e outros produtos alimentares por décadas, além de estarem listados no Inventário de Microrganismos com História Documentada de Uso em Alimento Humano (51) e na lista de Presunção Qualificada de Segurança feita pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (52).

Três possíveis mecanismos de atuação são atribuídos aos probióticos. O primeiro deles seria a supressão do número de células viáveis da levedura, através

da produção de compostos com atividade antimicrobiana, competição por nutrientes e competição por sítios de adesão. O segundo desses mecanismos seria a alteração do metabolismo microbiano, através do aumento ou da diminuição da atividade enzimática. O terceiro seria o estímulo da imunidade do hospedeiro, através do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos (17, 21, 28, 53, 54). No entanto, os mecanismos pelos quais os probióticos atuam no organismo combatendo patógenos ainda não estão completamente elucidados.

Na literatura é possível encontrar estudos em modelo animal (55) e *in vitro* avaliando a resposta celular frente a um desafio fúngico (56-62). Por sua vez, o impacto dos probióticos sobre células do sistema imune ainda foi muito pouco aprofundado (63). Não há estudos avaliando a influência de bactérias probióticas em células humanas de defesa desafiadas por *C. albicans*.

O efeito direto sobre o biofilme de *C. albicans* pode ser uma outra via de ação dos probióticos que justifique o seu potencial no controle biológico. *Lactobacillus* spp. já mostraram potencial para suprimir a formação de biofilme, assim como a formação de hifas (64).

O presente estudo procurou contribuir com novas informações a respeito do efeito de bactérias probióticas sobre macrófagos humanos quando desafiados por células fúngicas, além de elucidar a ação dos probióticos e seus produtos na formação do biofilme de *C. albicans*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CANDIDIASE ORAL

Candida é um microrganismo comensal e o fungo mais comumente isolado da cavidade oral (65). A presença de fatores predisponentes no hospedeiro favorece a patogenicidade deste fungo, levando a defini-lo como um patógeno oportunista (2). Alguns dos fatores predisponentes envolvem fatores naturais, como a deficiência imune, estados hipoendócrinos, como hipotireoidismo e gravidez; fatores mecânicos, como o uso de próteses dentárias; e fatores iatrogênicos, como administração de contraceptivos, antibióticos e corticoides (2).

A espécie de *Candida* mais prevalente na cavidade oral é a *C. albicans*, tanto no indivíduo com candidíase oral quanto no indivíduo saudável (8). Outras espécies como a *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. glabrata* são menos frequentemente isoladas da cavidade oral (7).

Em cultivo *in vitro*, as espécies de *Candida* formam colônias de coloração creme, com odor característico e se desenvolvem em condições aeróbicas, pH entre 2,5 – 7,5 e temperatura entre 20°C e 38°C. Microscopicamente, *C. albicans* exibe polimorfismo, no qual há uma transição dos blastosporos com brotamento ovóide (levedura) para hifas distribuídas paralelamente, podendo ainda apresentar-se como pseudohifas (4). Do ponto de vista clínico, a forma de levedura é importante para a dispersão sistêmica, enquanto a forma filamentosa é necessária para a patogenicidade (66).

Sendo a espécie *C. albicans* comumente encontrada na cavidade oral de indivíduos saudáveis, várias rotas de inoculação por *C. albicans* em humanos são conhecidas, podendo a contaminação ocorrer em qualquer fase da vida. Na infância por exemplo, a transmissão da *C. albicans* da vagina da mãe para a boca do recém-nascido durante o parto (transmissão vertical) é uma via reconhecida (7). A fonte oral primária de *C. albicans* é o dorso da língua, enquanto outros sítios orais como a mucosa e a placa dentária são colonizados secundariamente (2, 6).

Um dos fatores que afetam a distribuição da levedura *Candida* na cavidade oral é a saliva. Estudos sugerem que a saliva promove redução da adesão de *C. albicans*

ao acrílico (67, 68). No entanto, outros dados indicam que proteínas salivares e mucina agem como receptores de manoproteínas da superfície do fungo (69).

Um dos estudos que mostrou a importância da saliva na prevenção da candidíase oral foi o de Elguezabal et al. (70), no qual investigaram a influência da saliva na adesão de *C. albicans* e *C. dubliniensis* às células epiteliais humanas (CEH). Avaliaram ainda o efeito de seis anticorpos monoclonais (quatro Imunoglobulinas M e duas Imunoglobulinas G contra componentes da parede celular das leveduras, durante a adesão dessas duas espécies de *Candida* às CEH. Verificou-se que imunoglobulinas A (IgA) salivares inibiram a adesão de *C. albicans* e *C. dubliniensis* às CEH. Além disso, alguns dos anticorpos monoclonais testados conseguiram mimetizar a inibição da adesão de *C. albicans* às CEH promovida pelo IgA salivar, sugerindo que estes anticorpos poderiam ser usados na prevenção de candidíase oral em pacientes com hipossalivação.

Outro fator que influencia a distribuição da *Candida* na cavidade oral é o pH, sendo que o efeito do pH sobre a adesão de *C. albicans* na superfície da mucosa varia de acordo com a origem da célula da mucosa e com a cepa de *Candida* em questão. Por exemplo, a adesão ótima de duas cepas de *C. albicans* às células da mucosa jejunal ocorreu em valores de pH diferentes, mas próximos do neutro. Já a adesão ótima das mesmas cepas de *C. albicans* às células da mucosa gástrica ocorreu em pH ácido (6). Além disso, a hidrofobicidade da superfície celular da *Candida* também interfere na sua adesão às células epiteliais humanas. As alterações na composição da parede externa do fungo são responsáveis pelas mudanças na hidrofobicidade da superfície celular (71). *C. albicans* é tipicamente hidrofílica quando cresce a 37°C (72). No entanto, a conversão de hidrofílico para hidrofóbico pode ocorrer rapidamente dependendo das condições ambientais. Por exemplo, *C. albicans* hidrofílicas cultivadas em meio Sabouraud dextrose caldo (SDB) fresco ou meio de cultura de tecidos, tanto em temperatura ambiente (22 a 25°C), quanto a 37°C, tornaram-se gradualmente hidrofóbicas dentro de 60 min (72). A exposição de componentes hidrofóbicos da parede celular pode estar causando esta mudança (72). Células fúngicas hidrofóbicas parecem ter maior eficiência na ligação às células do hospedeiro durante a sua disseminação, ligando-se à vários tipos de tecidos, inclusive àqueles pobres em macrófagos, ao contrário das células hidrofílicas que se ligam predominantemente às áreas ricas em macrófagos (73). Estas características fazem com que as células hidrofóbicas de *Candida* sejam menos susceptíveis à ação de

fagócitos, indicando que este fenótipo é mais virulento do que as células hidrofílicas (73). Assim, como as hifas de *C. albicans* são necessárias para o desenvolvimento da candidíase e são significativamente hidrofóbicas, a patogenicidade do fungo pode estar associado à hidrofobicidade da sua parede celular (74).

Como descrito anteriormente, *Candida* pode apresentar-se na forma de levedura e de hifa, sendo esta última associada à invasividade e patogenicidade, uma vez que proteinases e fosfolipases produzidas durante a formação de hifa estão envolvidas na destruição da integridade da mucosa oral (4).

Uma vez instalada a infecção por *Candida* na cavidade oral, a apresentação clínica da doença pode variar basicamente dentro da clássica tríade: variações pseudomembranosa, eritematosa (atrófica) ou hiperplásica (75). Além disso, existem lesões associadas às infecções por *Candida* em que a etiologia é multifatorial, nas quais se incluem: estomatite sob prótese, queilite angular ou estomatite angular, glossite rombóide mediana e, o recentemente descrito, eritema gengival linear, cuja etiologia é ainda inconclusiva (2, 5).

A forma pseudomembranosa aparece clinicamente como placas branco-creme, não queratóticas, que ao serem removidas expõem uma mucosa eritematosa, acometendo as mucosas da língua, palato mole, bochecha, gengiva e/ou faringe, podendo ser pequena ou cobrir uma grande área. A forma aguda atrófica não apresenta as placas superficiais, apresentando somente eritema, dor e sensação de queimação. Quando a língua é envolvida, o dorso apresenta áreas despapiladas, doloridas e com coloração avermelhada. Por sua vez, a forma crônica hiperplásica ou leucoplásica está geralmente associada com usuários de tabaco e nesta, a hifa invade o epitélio e não somente coloniza a superfície. Neste tipo de manifestação, normalmente ocorrem lesões únicas, próximas da comissura labial ou da língua, como placas brancas na mucosa oral, firmes e resistentes à remoção (2, 4, 5, 7, 9).

As lesões relacionadas com o uso de próteses totais são consideradas crônicas atróficas, sendo geralmente assintomáticas, caracterizando-se como mucosites eritematosas, limitadas à área de contato da prótese com a mucosa. No entanto, quando a candidíase associada à prótese é sintomática, pode ocorrer sangramento na mucosa e edema, sendo acompanhados de sensação de queimação, dor, halitose, gosto desagradável e boca seca. Existem três tipos de candidíase associada à prótese, classificados de acordo com a Classificação de Newton (1962). O tipo I corresponde à fase inicial, com pequenos pontos localizados de hiperemia. O

tipo II apresenta um eritema difuso e edema das áreas da mucosa do palato, recobertas pela prótese. O tipo III é uma evolução do tipo II quando não tratado, no qual há uma reação hiperplásica, resultando em uma lesão nodular no centro do palato, geralmente associado com áreas atróficas e hiperplasia papilar (4, 7).

A queilite angular é outra forma geralmente associada à candidíase atrófica crônica. Os seus fatores predisponentes envolvem deficiência de ferro ou de vitamina B12, dimensão vertical inadequada devido ao desgaste dos dentes artificiais e rugosidade na pele no canto da boca. Ela é caracterizada por eritema e fissura na comissura bucal (4, 6).

Quanto à chamada glossite rombóide mediana, não se sabe ao certo se a *Candida* é agente etiológico da lesão ou se simplesmente é um organismo oportunista, invasor do tecido que se encontra alterado por outro mecanismo (2, 4, 5, 7, 9). Esta lesão de etiologia desconhecida apresenta-se como uma placa avermelhada ou vermelho-esbranquiçada no dorso da língua, na localização mediana (5).

2.2 INFECÇÕES EXTRAORAIS E SISTÊMICAS POR *CANDIDA*

C. albicans é um organismo residente da pele e das superfícies mucosas do ser humano, como cavidade oral, trato gastrointestinal e trato geniturinário. A proliferação exacerbada da levedura pode levar a doenças mucocutâneas, principalmente no trato urogenitário, causando vaginites por exemplo (76). Essas doenças são comumente recorrentes devido à presença de fatores predisponentes difíceis de serem contornados, como o uso de antibióticos (8).

Candidíase vulvovaginal (CVV) é a segunda causa mais comum de vaginites após as vaginoses bacterianas. A transmissão vertical da *Candida* presente na vagina da mãe para a cavidade bucal dos filhos é a principal via de contaminação de recém-nascidos, podendo levar ao desenvolvimento da candidíase oral em crianças, popularmente conhecida como “sapinho” (76).

A *C. albicans* mostrou-se ser o fungo mais frequentemente encontrado em altas concentrações no trato gastrointestinal (GI), incluindo intestino delgado e grosso (77). Dentro do trato GI, o sítio mais comumente infectado pela *Candida* é o esôfago. Além disso, ela pode estar associada à úlcera gástrica, agindo como um patógeno

oportunista que atrasa a cicatrização e agrava a lesão (78). A destruição das barreiras fisiológicas normais, como a acidez gástrica e perturbações da microbiota indígena do intestino, facilita o crescimento exacerbado de *Candida* (8).

Muitas das infecções envolvendo *Candida* são adquiridas endogenamente a partir do trato GI (8). Em pacientes de risco, como indivíduos criticamente debilitados e/ou imunossuprimidos, a levedura pode deslocar-se para a corrente sanguínea através da mucosa gastrointestinal e se disseminar para outros órgãos, levando a uma candidíase disseminada (candidemia) (79). Candidemia está ranqueada como a quarta causa mais comum de infecções sanguíneas nosocomiais (80). *Candida* spp. são os fungos que mais causam infecções fúngicas invasivas ou sistêmicas em indivíduos hospitalizados. Os principais fatores predisponentes para candidemia nestes pacientes são: uso de antibióticos de amplo espectro, a presença de dispositivos intravasculares, ingresso a unidades de cuidados intensivos e cirurgias recentes (81).

A candidíase neonatal é outra manifestação sistêmica em indivíduos debilitados, tendo a sua incidência aumentada nos últimos anos (80). Esta doença está associada a um risco de morte significativa e ao desenvolvimento de problemas mentais por danos no sistema nervoso central em recém-nascidos com baixo peso corporal, sendo uma consequência de complicação da candidemia (80).

Endocardites infecciosas e infecções de dispositivos intracardíacos implantados são as principais manifestações de infecções endovasculares por *Candida* (80). A maioria dos casos ocorre após cirurgia valvular cardíaca, uso de medicações injetáveis, quimioterapia e endocardite bacteriana prévia.

Existe ainda a osteomielite vertebral, com e sem discites, que é uma desordem associada às candidemias não reconhecidas e não tratadas. Ela já foi associada a várias espécies de *Candida* e os sintomas normalmente manifestam-se algumas semanas ou meses após um episódio de candidemia (80). Infecções ósseas por *Candida* também podem ocorrer em diversos sítios e são normalmente consequências de infecções sanguíneas pelo fungo (82). Endoftalmites e candidíase hepatoesplênica são outros exemplos de doenças associadas ou consequentes da candidemia (80).

2.3 DEFESA IMUNE CONTRA INFECÇÕES POR *CANDIDA ALBICANS*

A resposta imune do hospedeiro contra infecções por *Candida* spp. é complexa. Ela envolve uma cascata de mecanismos, iniciada pelo reconhecimento do fungo pelas células epiteliais e macrófagos nos tecidos, fato que leva a uma resposta inflamatória e ativação do sistema imune inato (ou celular). Na sequência, a quebra da barreira epitelial leva ao reconhecimento por células dendríticas, apresentação de antígeno e indução de uma resposta linfocitária antifúngica específica (83). O sistema imune inato é essencial para a defesa contra candidíase local (ex: mucosa) e sistêmica, enquanto a defesa adaptativa está primordialmente envolvida com a ação antifúngica localizada na mucosa (83).

Em linhas gerais, o hospedeiro apresenta defesas contra a infecção por *Candida* que incluem as interações microbianas; fatores salivares não-imunológicos (ferro, lisozima, polipeptídeos salivares ricos em histidina, lactoferrina, lactoperoxidase, glicoproteínas salivares) e fatores imunológicos do hospedeiro (granulócitos, células mediadoras da imunidade e anticorpos) (2).

A primeira linha de defesa contra infecções orais por *Candida* é representada pela barreira epitelial. Um epitélio e endotélio intacto constitui uma importante barreira mecânica contra invasão tecidual por fungos (83). A partir do momento que o patógeno rompe essa barreira, uma segunda linha de defesa representada pelo sistema imune inato ou celular passa a ter um papel fundamental no combate à infecção.

Macrófagos presentes nos tecidos são considerados fundamentais para a defesa antifúngica, apresentando atividade candidicida (84). Além disso, os macrófagos produzem citocinas inflamatórias e quimiocinas que recrutam e ativam outras células imunes no local da infecção (83). Estudos em modelo animal mostraram que a depleção de macrófagos em camundongos acelerou a proliferação do fungo nos tecidos e aumentou a mortalidade (85). Já alterações de receptores em macrófagos, como o receptor de quimiocina CX₃CR1, mostraram uma redução no acúmulo de macrófagos no fígado e um consequente aumento no risco para candidíase sistêmica (86).

Como dito anteriormente, a *C. albicans* é um frequente colonizador de superfícies mucosas em indivíduos saudáveis sem causar prejuízos à saúde. Esse comportamento comensal está associado à tolerância do sistema imune do hospedeiro, com participação ativa de macrófagos, como as células de Langerhans na mucosa e pele. Macrófagos residentes exibem um fenótipo variado, podendo transformar-se em macrófagos M1 inflamatórios, os quais produzem citocinas pró-

inflamatórias em resposta à *C. albicans*, ou macrófagos M2 anti-inflamatórios que participam da reparação tecidual. Ambos mostram efeitos antagônicos, o macrófago M1 controla as infecções por *Candida* através de fagocitose e indução da inflamação. Já o macrófago M2 pode matar células fúngicas por fagocitose, mas também produzem citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento que levam a uma tolerância imune à *Candida* (87). A inibição dos receptores Dectina-1 e receptores tipo Toll (TLR), ambos importantes reconhecedores de *C. albicans* (descritos na próxima sessão), nos macrófagos M1 reduz a sua produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α (87). Isso mostra que o perfil de citocinas nos macrófagos está diretamente ligado ao reconhecimento da *Candida* pelos receptores das células imunes.

Existem ainda evidências na literatura que mostram que a exposição de células tronco progenitoras hematopoiéticas (CTPH) à *C. albicans* (reconhecidos principalmente por Dectina-1 e receptores tipo Toll 2 - TLR2, como descrito na próxima sessão) geram macrófagos melhores preparados para lidar com infecções, uma vez que produzem mais citocinas inflamatórias e apresentam maior atividade fungicida. Por outro lado, ligantes específicos de TLR2 e TLR4 geram macrófagos à partir de CTPH com menor capacidade de produzir mediadores inflamatórios (88). Assim, a exposição de células do sistema imune inato à determinados produtos ou micro-organismos é capaz de alterar a resposta dos macrófagos frente a uma infecção.

Os monócitos também exercem papel importante na defesa contra *Candida*. Além de serem células precursoras de macrófagos, eles apresentam atividade candidicida (89) e a deficiência do receptor de quimiocina CC (CCR2), essencial para o recrutamento de monócitos no tecido inflamado, é associada a maior susceptibilidade à candidíase sistêmica (84).

Neutrófilos, por sua vez, são muito importantes na resposta contra *Candida*, uma vez que a neutropenia aumenta o risco de infecções fúngicas invasivas (90). A ativação de células epiteliais e de macrófagos presentes nos tecidos libera quimiocinas que recrutam neutrófilos para o sítio da infecção por *Candida* (91). O efeito antifúngico dos neutrófilos se dá através da produção de antimicrobianos como lisozima, lactoferrina, elastase, β -defensina, gelatinase e catepsina G (92). Estas células são ainda capazes de inibir a diferenciação de *Candida* de leveduras para hifas (93).

Células matadoras naturais (natural killer - NK), juntamente com macrófagos, monócitos e neutrófilos, contribuem no combate aos patógenos invasores, mas não representam um mecanismo de defesa essencial para evitar infecções sistêmicas por *Candida* (94).

As células dendríticas (DC) são importantes para o processamento e apresentação de antígenos fúngicos para ativação de linfócitos T auxiliar (T_H cells) (83). Por sua vez, células T_H *Candida*-específico produzem interleucina 17 (IL-17) e interferon gama (IFN γ) quando ativados (95). A produção de IFN γ é importante para a atividade de macrófagos e neutrófilos (96, 97). Já a citocina próinflamatória IL-17 induz o recrutamento e a ativação de neutrófilos, além de ativar a liberação de β -defensinas (98). Células T auxiliar produzem IL-17A e IL-17F, ambos membros da família IL-17. IL-17A e IL-17F, juntamente com IL-22, promovem uma imunidade antifúngica mucocutânea através da ativação de células epiteliais, aumento do recrutamento de neutrófilos e indução da produção de quimiocinas e peptídeos antimicrobianos (99). Deficiência nesta imunoglobulina pode estar associada à candidíase mucocutânea crônica (100).

As células linfoides inatas (CLIs) também podem contribuir para a defesa contra *Candida* spp (101). Ainda não é claro como estas células contribuem para a resposta imune durante infecções fúngicas, mas IL-17 produzido por CLIs parece mediar o controle fúngico na cavidade oral.

Plaquetas também participam, mesmo que fracamente, da defesa contra *C. albicans*, através da produção de mediadores imunes com atividade antifúngicas, sendo que o plasma rico em plaquetas é capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* (102).

Em situações em que a infecção por *Candida* spp. não é controlada pelo sistema imune inato, o sistema imune adaptativo ou humoral estabelece-se como uma linha de defesa adicional, com uma participação mais modesta quando comparada com a defesa celular (83). Um importante braço do sistema imune inato e do sistema imune adaptativo é o sistema complemento, o qual favorece a opsonização e a morte intracelular de *C. albicans* (103). O fungo é capaz de ativar as vias desse sistema (104), no entanto, diferentemente de bactérias patogênicas, o complexo de ataque à membrana (MAC) parece não atuar diretamente na lise de *C. albicans* devido à espessura da parede celular fúngica, que presumidamente bloqueia a formação de MAC (105). Por outro lado, o sistema complemento aparentemente contribui para a

indução de uma resposta imune adequada na produção de citocinas pró-inflamatórias no hospedeiro, como IL-6 e IL-1 β , que ajudam na defesa contra infecções fúngicas em um primeiro momento (104).

Estudos em modelo animal, promovendo infecções orais por *Candida* spp., demonstraram alterações no sistema imune humoral e na produção de citocinas inflamatórias após a introdução de *C. albicans* em um sistema livre do fungo. Chakir et al. (55), por exemplo, verificaram que durante a infecção experimental das mucosas de camundongos por *C. albicans* houve um recrutamento de células T CD4⁺ e CD8⁺ e de células MAC-1⁺ (leucócitos). Houve um recrutamento de linfócitos T $\gamma\delta$ em um tempo específico que coincide com uma redução dramática dos níveis de *Candida* na mucosa.

Em outro estudo (106) foram verificados níveis maiores de imunoglobulinas G (IgG) e anticorpos salivares IgA nos camundongos BALB/c, os quais são mais resistentes às infecções orais por *C. Albicans* em comparação aos camundongos DBA/2. O aumento precoce nos níveis de IL-4, IFN- γ e IL-12 foi correlacionado com a rápida eliminação de *C. albicans*. A neutralização de IL-4, através da injeção de anticorpos anti-IL-4, resultou em atraso no controle dos fungos.

Em 2001, Elahi et al. (107), a fim de verificar o envolvimento de óxido nítrico (NO) na resistência às infecções por *C. albicans*, examinaram o efeito do NO no crescimento de *C. albicans* e a produção de IL-4 e INF- γ nos nódulos linfáticos regionais de camundongos. Foi verificado que, após a infecção, houve um aumento nos níveis de NO detectados na saliva. Amostras de saliva pós-infecção inibiram o crescimento do fungo *in vitro*. O tratamento com N^G-monometil-L-arginina (MMLA), um inibidor da síntese de NO, causou uma redução na produção de NO, e aumento no crescimento de *C. albicans*. A redução da produção de NO, após o tratamento com MMLA, correlacionou com a redução na produção de interleucina-4 (IL-4), mas não de interferon- γ (INF- γ). Foi verificada ainda uma relação funcional entre IL-4 e a produção de NO, em camundongos tratados com anticorpos monoclonais anti-IL-4, que mostraram uma inibição na produção de NO na saliva e em culturas de células dos linfonodos cervicais estimuladas por antígenos de *C. albicans*. Os resultados deram suporte às conclusões de que IL-4 está associada com resistência à candidíase oral e sugerem que NO está envolvido no controle da colonização da superfície da mucosa oral por *C. albicans*.

A imunidade humoral é também representada pelos anticorpos salivares e anticorpos séricos presentes na mucosa (108). Anticorpos salivares podem interferir na colonização pela levedura, pela sua capacidade de inibir a aderência de *Candida* às células epiteliais bucais (109).

Apesar das investigações, os mecanismos de imunidade do hospedeiro contra infecções por *Candida* ainda são pouco compreendidos (108).

2.4 RECONHECIMENTO DAS CÉLULAS DE *CANDIDA ALBICANS*

O primeiro passo para o desenvolvimento de uma resposta imune contra *Candida* é o reconhecimento do fungo invasor via receptores de reconhecimento padrão (PRRs), os quais incluem receptores do tipo Toll (TLRs), receptores de lectina tipo-C (CLRs), receptores de domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeo (NOD-like receptors - NLRs) e RIG-I-like (receptores similares receptor ao gene 1 induzido por ácido retinoico) (RLRs) (83). Existem diferenças na forma como as variadas populações de células do sistema imune inato (ex. macrófagos) reconhecem a *Candida* spp. No entanto, em todas as células de defesa mantêm-se uma estrutura padrão de reconhecimento que envolve padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), os quais se mantêm conservados (83) e são reconhecidos pelos PRRs.

Na parede celular de *C. albicans* pode-se diferenciar duas camadas, uma externa composta basicamente por glicoproteínas O- e N-ligadas, e uma interna formada por polissacarídeos, β -1,3-glucanos e β -1,6-glucanos, que conferem forma e resistência às células (83). Estes β -glucanos representam os principais PAMPs reconhecidos pelos PRRs do hospedeiro.

Dentre a família de receptores que reconhecem *C. albicans*, pode-se destacar as CLRs. Estes receptores, presentes principalmente em monócitos e macrófagos, reconhecem os β -glucanos da parede celular fúngica, induzindo a uma resposta inflamatória e consequente defesa do hospedeiro (58, 110). O receptor de lectina tipo-C mais bem estudado é o chamado Dectina-1, o qual é codificado pelo gene *Clec7a* (111). Células da linhagem monocítica humana THP-1 e monócitos sanguíneos periféricos humanos (CD14⁺) recém isolados expressam baixos níveis de receptor Dectina-1. No entanto, a estimulação destas células por lipopolissacarídeos (LPS)

pode induzir o aumento da expressão de Dectina-1, resultando em aumento de fagocitose das células fúngicas (57) .

Os receptores Dectina-1 reconhecem *C. albicans* na forma de leveduras, mas não na forma de hifa (112), devido às diferenças estruturais na parede celular das leveduras e das hifas, associadas à camada de polissacarídeos (113). A forma da *C. albicans* é associada com diferenças na exposição dos β -glucanos da parede. Na forma de levedura, o crescimento é iniciado pela formação de brotamentos na parede celular da célula mãe. Quando as células filhas separam-se da célula mãe, formam-se cicatrizes que expõem os β -glucanos da parede celular. Na forma filamentosa, as células filhas não se separam das células mãe, não expondo os β -glucanos da camada interna da parede celular (112). Assim, os β -glucanos das hifas ficam protegidos pela camada externa de glicoproteínas, sendo menos susceptíveis ao reconhecimento por Dectina-1. Novos dados sugerem ainda que diferenças químicas nos polissacarídeos da parede celular podem ser um modo adicional de discriminação entre levedura e hifa (113).

A exposição de β -glucanos na parede celular fúngica é controlada pela via proteíno-quinase ativada por mitógenos (MAPK), por intermédio de quinase de *Candida albicans* regulada por sinal extracelular (CEK). Esta via é ativada quando há o remodelamento da parede celular associado ao crescimento fúngico. A inativação desta via aumenta significativamente a exposição de β -glucanos na parede celular, consequentemente, as células fúngicas são mais reconhecidas pelos receptores Dectina-1 e fagocitadas por células do sistema imune inato (114).

A ativação dos CLRs induz a produção de citocinas e internalização das células fúngicas através da formação de uma sinapse fagocítica (59, 60). A dectina-1 induz sinalização intracelular através de vias mediadas por quinase tirosina de baço (*spleen tyrosine kinase* - SYK), domínio de recrutamento e ativação de caspase (CARD), proteína quinase C δ e via de sinalização de quinase de fibrosarcoma rapidamente acelerado (RAF) (110, 115-117). Dectina-1 ainda amplifica a resposta associada a TLR2 e TLR4 (118) e previne a liberação descontrolada das armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs - *neutrophil extracellular traps*), produzidas por neutrófilos durante a infecção fúngica, prevenindo uma destruição tecidual extensa durante a resposta imune (119).

Apesar da grande importância da ativação dos CLRs, nem todas as cepas de *C. albicans* são reconhecidas por Dectina-1, ou seja, a interação é cepa-específica, devido a diferenças na composição e natureza da parede celular (120). *C. albicans* ATCC SC5314 é uma das cepas reconhecidas por Dectina-1 (111, 120).

Mananas e manoproteínas, importantes componentes da parede celular de *Candida*, são também reconhecidas por CLRs, como o receptor de manose e o receptor Dectina-2 (83). O receptor de manose, expresso principalmente em macrófagos, reconhece N-mananas e induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-17 (121). Por sua vez, Dectina-2, expresso geralmente em células dendríticas (CDs), macrófagos e neutrófilos, reconhece α -mananas e modula a resposta de linfócitos T auxiliar 17 (T helper 17 – T_H17) (122). Dectina-2 ainda pode formar heterodímeros com Dectina-3 durante a infecção por *C. albicans*, levando a uma resposta pró-inflamatória, com a produção de TNF, IL-1 β e IL-6 (123). Moléculas de adesão intracelular não-integrinas específicas de células dendríticas (DC-SIGN), presentes não só em células dendríticas, mas também em macrófagos, reconhecem mananas N-ligadas de *Candida*. A ativação de DC-SIGN, por sua vez, induz a expressão de citocinas que levam a ativação e diferenciação de células T auxiliar (124).

As TLRs, por sua vez, reconhecem manoproteínas da parede celular de fungos, e sua inativação pode provocar aumento na susceptibilidade à candidíase cutânea (125). Além disso, o reconhecimento de quitina por TLR9 resulta na produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10) que modulam a resposta imune (126).

A família de receptores denominados RLRs reconhece ácidos nucleicos citoplasmáticos e é importante no reconhecimento de vírus, apesar de recentemente terem sido envolvidos também no reconhecimento de *C. albicans* (127).

Por fim, NLRs são receptores citoplasmáticos com importantes funções biológicas, incluindo o reconhecimento de peptidoglicanos bacterianos, o processamento/apresentação de antígenos e a ativação de inflamassomas. Em relação às infecções por *Candida*, estes receptores reconhecem e mediam respostas mediadas por quitina, levando principalmente à produção de IL-10 (126). Um outro importante efeito biológico dos NLRs é a sua função como componente de inflamassomas, por exemplo o inflamassoma com receptores de domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeo e domínio pirina (NLRP3), que contém o domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeo (NOD) e o domínio pirina. No

inflamassoma, ocorre ativação de caspase 1 e processamento de pro-IL-1 β e pro-IL-18 para suas formas biologicamente ativas. O inflamassoma NLRP3 pode ser ativado por *C. albicans* na forma de hifa, mas não de levedura, e esse fato pode explicar como o hospedeiro discrimina a colonização da invasão por *Candida* (128). Alguns pesquisadores sugerem que a ativação diferenciada de inflamassomas pelas hifas estaria ligada às fibrilas de mananas. As fibrilas de mananas, componentes da parede externa da célula de *C. albicans*, seriam mais curtas e menos abundantes na superfície das hifas em comparação com as leveduras. Isso causaria maior exposição das PAMPs internas nas hifas, o que facilitaria o seu reconhecimento pelos receptores dos macrófagos, ativando inflamassomas e ocasionando a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β (129).

A ativação de NLRP3 por *C. albicans* também pode levar à piroptose (morte celular programada dependente de caspases) em macrófagos (130). Este processo representa um segundo mecanismo de dano ao macrófago pelo fungo, sendo o primeiro a destruição mecânica da integridade da membrana causada pela hifa (83). Recentemente, o inflamassoma denominado NLRC4 (contendo NOD e CARD) mostrou ter também papel na defesa da mucosa contra *C. albicans*, através da indução de citocinas pró-inflamatórias e peptídeos antimicrobianos (131).

2.5 TRATAMENTO DE CANDIDÍASE

Uma grande variedade de agentes de ação tópica ou sistêmica estão disponíveis no mercado para o tratamento da candidíase. Em casos de candidíase oral sem complicações ou agravantes, a primeira linha de tratamento baseia-se no uso de antifúngicos tópicos, como nistatina, anfotericina B, miconazol e clotrimazol. Dentre estes, podemos destacar a nistatina, que pode apresentar-se como suspensão oral, creme ou pastilha oral (132). Ela não é absorvida no trato gastrointestinal, por isso o seu uso tópico é a via de administração mais popular na odontologia (133)

Por sua vez, antifúngicos sistêmicos, como fluconazol e itraconazol, são indicados para o tratamento da candidíase oral em pacientes que não respondem ou que apresentam intolerância ao tratamento tópico, além de pacientes com alto risco de desenvolverem infecções sistêmicas por *Candida* (132).

Candida é de longe o principal alvo da profilaxia antifúngica em pacientes imunodeficientes (5). Por algumas décadas, agentes antifúngicos foram usados com sucesso na prevenção da colonização e infecções fúngicas (13, 14). Podemos destacar os antifúngicos tópicos e sistêmicos mais usados: azóis (fluconazol, itraconazol, miconazol, voriconazol, posaconazol), polienos (anfotericina B e nistatina), flucitosina e o mais recente echinocandinas (caspofungina, micafungina, anidulafungina) (16, 134). No entanto, a ocorrência de efeitos colaterais após a administração destes fármacos, tanto os de uso tópico quanto sistêmico, além do potencial surgimento de cepas resistentes, comprometem o sucesso da terapia antifúngica (13). Os efeitos colaterais envolvem transtornos gastrointestinais transitórios, como náusea, vômito e diarreia, os quais levam a uma baixa adesão do paciente ao tratamento mais longo, principalmente (135). Outros efeitos decorrem de interação medicamentosa, como entre miconazol e a varfarina, que induz alterações na coagulação sanguínea (136). Assim, apesar da grande variedade de drogas, seus efeitos colaterais, a possibilidade de interações medicamentosas e a redução da susceptibilidade de espécies de *Candida* aos antifúngicos disponíveis limitam a aplicabilidade destes agentes (132).

A resistência da *Candida* aos antifúngicos pode ser classificada em microbiológica ou clínica (137). A resistência microbiológica é definida pela presença de um mecanismo de resistência adquirido ou mutagênico à droga que está sendo usada, dependendo diretamente do microrganismo. Pode ser dividida em resistência primária ou inata, quando o fungo é resistente previamente à exposição do fármaco, ou resistência secundária ou adquirida, que surge em resposta ao contato com a droga (137). A maior expressão de genes que codificam bombas de efluxo na parede celular está entre as principais causas da aquisição de resistência (137). Já na resistência clínica, chamada também de falha de tratamento, o microrganismo é definido como susceptível ao antimicrobiano, mas a infecção fúngica persiste (137). A formação de biofilmes nas superfícies mucosas pode ser uma das causas da resistência clínica, já que no biofilme de *Candida* há a produção de material exopolimérico que inibe ou restringe a penetração da droga no interior do biofilme, mantendo a viabilidade das células fúngicas nessa região (137, 138). Tal fato justifica a maior resistência aos antifúngicos da *Candida* na forma de biofilme em comparação com a sua forma planctônica (137, 138).

Assim, o espectro limitado e a toxicidade dos antifúngicos disponíveis, além do gradual crescimento da resistência a estes fármacos, geraram a urgente necessidade de desenvolver terapias alternativas para combater infecções por *Candida* spp. As alternativas exploradas até o momento incluem produtos naturais como peptídeos, óleos e polifenóis obtidos de chás (139) e extratos de plantas (140-146). Apesar dos resultados promissores destes estudos, a toxicidade destes produtos ainda não foi totalmente estabelecida e a biotolerância ainda não foi determinada (134). Além disso, estes produtos são considerados agentes terapêuticos alternativos contra candidíase, e não profiláticos. Como esta doença é recorrente, torna-se importante o controle dos níveis de colonização de *Candida* em pacientes de maior risco (por exemplo usuários de prótese total, idosos e imunocomprometidos), de maneira a prevenir a infecção nas superfícies mucosas e a sua evolução para candidíase sistêmica (147, 148).

2.6 PROBIÓTICOS

Nesse cenário, o uso de bactérias probióticas contra infecções microbianas emergiu como uma promissora terapia alternativa contra infecções por *Candida*, tendo em vista as atuais limitações dos antimicrobianos disponíveis (17) e a necessidade de redução dos níveis de colonização por *C. albicans* em pacientes de maior risco (147).

Probióticos podem ser definidos como microrganismos vivos que, uma vez ingeridos em quantidades adequadas, exercem benefícios à saúde (19-22). Durante as duas últimas décadas, probióticos têm sido adicionados a vários produtos alimentares (iogurte, leite, queijo), suplementos alimentares (pílulas, cápsulas) e drogas (medicamentos), de acordo com a regulamentação alimentar do país (28, 49).

Os microrganismos mais comumente usados como probióticos pertencem aos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Saccharomyces*, *Enterococcus*. Estes são os mais utilizados, pois estão presentes na microbiota intestinal, são usados tradicionalmente na produção de produtos fermentados e são geralmente considerados seguros (24, 29).

Os benefícios trazidos ao homem pelo consumo de probióticos envolvem a interferência, exclusão e antagonismo de patógenos, imunoestimulação e

imunomodulação e as atividades anticarcinogênicas e antimutagênicas em modelo animal (28). Seus efeitos se estendem à manutenção da saúde do trato geniturinário (149), à redução da pressão sanguínea em hipertensos (150) e dos níveis plasmáticos de colesterol (151, 152). Eles também melhoram o funcionamento do trato gastrointestinal, através da redução da incidência e duração de diarreias; aliviam os sintomas da intolerância à lactose, que incluem dores abdominais, náusea e flatulência, e combatem a diarreia associada ao uso de antibióticos (53). Ainda no trato gastrointestinal, os probióticos controlam quadros de desordens intestinais, como a síndrome do intestino irritado, e também combatem e previnem colite pseudomembranosa, pois o probiótico ocuparia o sítio que o patógeno normalmente ocuparia (21, 49).

A microbiota intestinal pode ser associada ao desenvolvimento de câncer, visto que bactérias intestinais podem ser capazes de produzir componentes tóxicos e carcinogênicos. Por outro lado, certos probióticos são capazes de reduzir a atividade de enzimas associadas a estes componentes. Assim, estudos utilizando modelos experimentais de indução de tumores em ratos mostraram que probióticos foram capazes de reduzir a incidência e velocidade de crescimento de tumores no cólon (21). Ainda, os dados sugerem o efeito dos probióticos na modulação de biomarcadores de câncer colorretal (153-155).

Uma revisão publicada por Meurman (17) mostrou que *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* podem exercer efeitos benéficos na cavidade oral, através da inibição de *Streptococos* cariogênicos e *Candida* sp. No entanto, são poucas as informações sobre a ação dos probióticos na cavidade oral.

Uma bactéria é considerada probiótica e viável de ser incorporada em alimentos do dia a dia quando atende a determinados critérios. Estes podem ser divididos em quatro categorias: apropriação, adequação tecnológica, competitividade e performance/funcionalidade. Na categoria apropriação inclui-se a origem humana dos probióticos, a ausência de toxicidade e a patogenicidade. Na adequação tecnológica inclui-se: possibilidade de produção em massa e estocagem; viabilidade em altas populações; estabilidade das características desejadas durante a preparação da cultura, estocagem e entrega; promoção de qualidades desejadas quando incluído em alimentos e processos de fermentação; estabilidade genética; manutenção da viabilidade e das propriedades benéficas dos microrganismos até o seu consumo; tolerância a baixo pH e bacteriófagos em produtos alimentares manufaturados; e

tolerância a conservantes e a outros microrganismos presentes nos alimentos. Na categoria competitividade, inclui-se: capacidade de sobrevivência, proliferação e atividade metabólica em um sítio alvo *in vivo*; tolerância ao trânsito pelo ambiente gástrico e do intestino delgado; tolerância aos sais de bile; capacidade de crescer no lúmen do trato gastrointestinal; capacidade de competir com a microbiota normal; ser potencialmente resistente às bacteriocinas e outros antimicrobianos produzidos pela microbiota residente; aderência e colonização preferencialmente; ter capacidade de adesão ao epitélio e às mucinas de mucosas; produção de exopolímeros, cujas funções incluem a promoção da adesão e estabilização do biofilme, além da promoção de resistência à imunidade inata e específica do hospedeiro; e por fim ter capacidade de co-agregação com outros micro-organismos. Na categoria performance/funcionalidade incluem-se: capacidade de exercer um ou mais benefícios clínicos à saúde; promoção de resistência à colonização por patógenos; amenização da intolerância à lactose; estimulação do sistema imune, favorecendo o combate de patógenos e reduzindo a duração de diarreias; redução do câncer colorretal; diminuição do risco de problemas cardiovasculares, por redução da absorção intestinal de colesterol exógeno e endógeno e/ou inibem a produção de colesterol no fígado, reduzindo assim a taxa de colesterol no sangue; antagonismo às bactérias patogênicas; produção de substâncias antimicrobianas; imunoestimulação; antimutagenicidade; anticarcinogênico; e produção de compostos bioativos. Assim, a escolha de qual micro-organismo será adicionado aos alimentos envolve um conhecimento das propriedades individuais dos probióticos (24, 28, 29, 34, 35, 156). Observa-se que muitas destas propriedades referem-se a probióticos cujo efeito é desejado no intestino, como a resistência a sais de bile, e não seriam necessárias em probióticos usados em outros sítios. Por outro lado, certas propriedades como promoção de resistência à colonização por patógenos ou efeito anticarcinogênico são desejáveis em probióticos ativos em qualquer nicho do corpo humano.

A capacidade de autoagregação (ligação entre micro-organismos da mesma espécie) é um importante pré-requisito para a colonização e infecção por patógenos no trato gastrointestinal. Já a capacidade de agregar e co-agregar (ligação entre micro-organismos de espécies diferentes) dos probióticos usados em alimentos pode favorecer sua colonização e dificultar a colonização por patógenos. É interessante observar que várias cepas probióticas apresentam capacidade de co-agregação a patógenos, favorecendo a interação entre as espécies, e sugerindo ser esta

característica importante para determinar se a bactéria probiótica será potencialmente benéfica para o ser humano (157).

Os efeitos benéficos trazidos pelos probióticos dependem da permanência dessas bactérias no sítio alvo. Estudos mostram que os probióticos como *L. rhamnosus* e *L. acidophilus* não permanecem muito tempo no trato gastrointestinal, ou seja, não colonizam permanentemente essa região. Doses regulares das bactérias probióticas são necessárias para que esses organismos colonizem permanentemente, e os efeitos benéficos dos probióticos terminam quando o seu número cai (53, 156).

Sabemos que *Lactobacillus* fazem parte da microbiota normal da cavidade oral, trato gastrointestinal e geniturinário. A capacidade deste gênero em interagir com células epiteliais do trato intestinal é uma importante propriedade para seu efeito probiótico. No entanto, os mecanismos através dos quais estes organismos ligam-se às células intestinais e a outras superfícies mucosas ainda não são totalmente esclarecidos. No genoma de *Lactobacillus acidophilus* NCFM são codificadas quatro proteínas potencialmente envolvidas na adesão celular (proteína ligadora de mucina, ligadora de fibronectina, proteína da camada superficial e proteína homóloga a R28 estreptocócica). A avaliação de mutantes deficientes nos genes que codificam essas proteínas permitiu demonstrar que estas são capazes de contribuir individualmente para ligação do organismo às células intestinais *in vitro* (158).

L. acidophilus NCFM, assim como *L. rhamnosus* GR-1 e *L. fermentum* RC-14, estes últimos conhecidos por colonizar a vagina, aderem às células do trato urogenital e produzem biossurfactantes capazes de inibir significativamente a adesão de uropatógenos. Além disso, a adesão de *L. acidophilus* NCFM às células pode reduzir a ligação de uropatógenos, por mecanismo de competição por sítios de ligação, indicando seu potencial como probiótico para aplicação no trato urogenital (159).

Por sua vez, *Lactobacillus casei* mostrou-se capaz de ativar macrófagos em camundongos, após administração oral e intraperitoneal (160). Um dado relevante foi que esta bactéria probiótica acelerou a função fagocítica dos macrófagos quando administrada por ambas as vias oral e intraperitoneal.

A ciência probiótica é beneficiada por ferramentas moleculares, as quais podem ser usadas para investigar as interações microbianas complexas entre as culturas probióticas e a microbiota residente. O sequenciamento de regiões do rRNA é cada vez mais utilizado para a identificação de novas espécies de probióticos. No

entanto, para a determinação do seu efeito, há a necessidade do conhecimento das suas propriedades, com base não somente no fenótipo, mas também no genótipo. A determinação da sequência do genoma das bactérias probióticas permitirá melhor compreensão do seu metabolismo, das adesinas e de suas outras propriedades. Tal conhecimento propiciará novas aplicações, melhoria da sua funcionalidade, aprimoramento da sua seleção e até a obtenção de recombinantes que apresentem propriedades combinadas de espécies benéficas (49, 156).

2.7 EVIDÊNCIAS *IN VITRO* DO EFEITO ANTIFÚNGICO DOS PROBIÓTICOS

Uma série de estudos *in vitro* mostrou efeitos antifúngicos de bactérias probióticas contra cepas de *C. albicans* isoladas clinicamente da cavidade oral, trato urogenital ou trato GI (44, 54, 161-170). Micro-organismos específicos ou a combinação destes devem ser selecionados no combate a patógenos específicos (26).

A tabela 2.1 ilustra a variedade e extensão de cepas bacterianas testadas contra *Candida* spp. Existem vários métodos laboratoriais para a detecção da atividade antimicrobiana de bactérias probióticas. O teste *in vitro* mais comum e tradicional para determinação de antagonismo é o ensaio de difusão em ágar.

O efeito de muitas bactérias contra *Candida* spp., especialmente *C. albicans*, já foi investigado. Estão incluídas nessa lista *Streptococcus salivarius* K12 (162), *L. rhamnosus* GR-1, *L. reuteri* RC-14 (164), e isolados clínicos de *Lactobacillus* (54, 166, 169, 171). Muitos estudos visaram selecionar uma cepa com maior capacidade inibitória contra *Candida* spp., além de procurarem trazer informações sobre os mecanismos de ação envolvidos na atividade antifúngica dos probióticos. A produção de peróxido de hidrogênio pelas bactérias e o seu efeito candidida são fenômenos frequentemente observados nos estudos (54, 166, 169).

Além de bactérias, fungos também já foram testados como microrganismos probióticos contra *C. albicans*, como *Saccharomyces boulardii*, um organismo relacionado às leveduras usadas na culinária. Testes *in vitro* avaliaram o efeito de compostos secretados por *S. boulardii* sobre a filamentação e desenvolvimento de biofilme de *C. albicans* SC5314, dois fatores de virulência cruciais para a

patogenicidade da *Candida*. O extrato de *S. boulardii* foi fracionado, obtendo-se os compostos: ácido capríco, ácido caprílico, ácido cáprico. Foi demonstrado que tanto o extrato do fungo, quanto o ácido cáprico, foram capazes de inibir a formação de hifas, a adesão e o desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*, reduzindo também a expressão dos genes associados a estes fatores de virulência. Já os outros dois compostos ativos não apresentaram efeitos significantes sobre a *C. albicans*. Apesar do resultado positivo do ácido cáprico, o seu efeito foi três vezes menor que do extrato, indicando a presença de outros compostos não identificáveis e capazes de interferir nos fatores de virulência da *C. albicans* (165).

Coman et al. (161) basearam-se na difusão de substâncias inibitórias produzidas pelo probiótico em meio sólido para testar o efeito antimicrobiano de duas cepas probióticas, *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 e *Lactobacillus paracasei* IMC 502. Estes probióticos foram testados contra oito cepas de *Candida*, seis bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus*, *Enterococcus faecium*, *Listeria gray*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*) e nove Gram-negativas (*Escherichia coli*, *E. coli* EPEC, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumonia*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* e *Shigella sonnei*). Usando quatro diferentes tipos de ensaio (método de sequência cruzada modificada, método de inibição radial, método de difusão em poços e o método de co-cultura), os autores verificaram que a maioria dos fungos e bactérias patogênicas foi inibida pelos probióticos testados, em diferentes graus. O estudo ainda demonstrou a importância de realizar pelo menos duas técnicas para a obtenção de dados válidos e confiáveis.

A capacidade dos probióticos inibirem o crescimento de *Candida* é específica para cada tipo de cepa, como mostrado por Hasslof et al. (44). O efeito antifúngico e antibacteriano de oito cepas de *Lactobacillus* (*L. plantarum* 299v, *L. plantarum* 931, *L. rhamnosus* GG ATCC 53103, *L. rhamnosus* LB21, *L. paracasei* F19 and *L. reuteri* PTA 5289, *L. reuteri* ATCC 55730 e *L. acidophilus* La5) foi determinado contra *C. albicans* e *S. mutans*. Todos os probióticos testados apresentaram efeito antifúngico, mas em geral este efeito foi mais fraco que a ação contra *S. mutans*. Interessante notar que *L. reuteri* e *L. acidophilus* foram os únicos que não inibiram *C. albicans* quando estavam em altas concentrações (10^9 e 10^7 CFU/mL).

Alguns pesquisadores testaram bactérias suplementadas com adjuvantes químicos, adicionados ao meio de cultura, na tentativa de potencializar os efeitos antimicrobianos dos probióticos. Por exemplo, o selênio, um micro-mineral essencial

que regula o metabolismo e conhecido por melhorar a imunidade, foi testado com esse propósito (172, 173). *Lactobacillus plantarum* e *L. johnsonii* enriquecidos por nanopartículas de selênio mostraram um aumento substancial na atividade antifúngica contra *C. albicans*, não somente quando o probiótico enriquecido estava em direto contato com o fungo, mas também quando esta foi tratada com o sobrenadante do probiótico cultivado com dióxido de selênio. Este efeito pode ser resultado de maior produção de exometabólitos com atividade antifúngica, os quais precisam ser investigados com mais profundidade (163).

Estudos *in vitro* testaram também a capacidade de bactérias probióticas em prevenir a contaminação de produtos alimentares, por exemplo, a adição de *Lactobacillus amylovorus* DSM19280 em pães produziu um efeito antifúngico contra diversos fungos que formam bolores, como *Aspergillus fumigatus* e *Fusarium culmorum*, aumentando o tempo de prateleira destes produtos (174). Em um outro estudo, a incorporação de *Lactococcus* à levedura comercial usada na confecção de pães promoveu um retardo no tempo de contaminação dos pães por *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporum*, e preveniu a contaminação por *F. moniliforme*, em comparação com os produtos produzidos com *Lactococcus* sozinho ou com a levedura comercial sozinha (175).

Na natureza, muitos organismos se apresentam na forma de biofilmes, e assim é necessário que o probiótico seja efetivo também nestas comunidades microbianas organizadas. Algumas cepas bacterianas podem interferir no desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* através da redução da formação de hifas, limitando o seu crescimento (167, 170). No estudo de Ujaoney et al. (168), biofilmes de *C. albicans* 10341 foram cultivados em tiras de resinas acrílica e tratados com quatro produtos probióticos disponíveis no mercado (Accuflora® - *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*, *Bifidobacterium bifidum* e *Streptococcus thermophilus*; Align® - *B. infants*; Culturelle® - *Lactobacillus* GG; Sustenex® - *Bacillus coagulans*), na forma de suspensões celulares ou sobrenadantes das culturas bacterianas livres de células. Ao final da fase de adesão das células de *Candida* (90 min), as tiras com biofilme foram incubadas em suspensões probióticas ou no sobrenadante. A avaliação da viabilidade por ensaios de redução de XTT, permitiu demonstrar que os produtos contendo *Lactobacillus* foram os únicos que inibiram significativamente o desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*. Além disso, os efeitos dos sobrenadantes foram mais acentuados que os da suspensão probiótica. Apesar dos resultados

confirmarem o efeito candidicida dos *Lactobacillus* spp., os dados são questionáveis uma vez que o estudo não expõe o tempo de incubação dos biofilmes com as suspensões probióticas ou com os sobrenadantes, e também não informa em qual fase do biofilme de *Candida* o experimento foi realizado.

O efeito candidicida de *L. rhamnosus* e *L. reuteri* também foi testado contra isolados vulvovaginais de *Candida glabrata* (176). Suspensões probióticas e sobrenadantes dos lactobacilos livres de células foram testados sobre o crescimento da *C. glabrata*, usando ensaio de sobreposição pontual e ensaio de microtitulação em placa, respectivamente. Ensaio de viabilidade celular Vivo/Morto usando microscópio confocal foi ainda usado para observar o efeito candidicida dos probióticos e a autoagregação dos lactobacilos foi analisada através de um ensaio de autoagregação espectrofotométrica. Verificou-se que a atividade metabólica de todas as cepas de *C. glabrata* testadas foi significativamente reduzida em resposta ao desafio pelas cepas probióticas. *L. rhamnosus* e *L. reuteri* produziram zonas de inibição visíveis para todas as cepas fúngicas, indicando a inibição do crescimento da *C. glabrata*. Além disso, ambas as cepas de *Lactobacillus* exibiram forte autoagregação e coagregação na presença da *Candida*, o que indica que estes probióticos podem estar agindo através da formação de agregados que previnem a colonização fúngica.

Atualmente, existem na literatura dados convincentes que indicam o efeito antifúngico dos probióticos contra *Candida* spp. *in vitro*. O desafio agora é esclarecer os mecanismos envolvidos nessa ação antimicrobiana.

Tabela 2.1 - Estudos *in vitro* evidenciando efeitos antifúngicos dos probióticos

REFERÊNCIA	PROBIÓTICO	PATÓGENO	MÉTODO (<i>in vitro</i>)	RESULTADOS	COMENTÁRIOS
Sookhee et al. 2001 (166)	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> e <i>L. rhamnosus</i> .	Amostras clínicas e laboratoriais de bactérias e <i>Candida</i> (<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. glabrata</i>).	- Caracterização antimicrobiana: produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e bacteriocinas, e sensibilidade ao pH, enzima e calor; - Atividade antimicrobiana: método de difusão em ágar.	- Catalase, pH, enzimas proteolíticas e temperatura afetaram a atividade antimicrobiana do <i>Lactobacillus</i> ; - <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> e <i>L. rhamnosus</i> : efeitos antibacteriano, antifúngico ou ambos.	- Atividade antimicrobiana: mais ativo em pH ácido; - Efeito antimicrobiano através de ácidos orgânicos, H_2O_2 e bacteriocinas
Strus et al. 2005 (54)	14 diferentes cepas de <i>L. fermentum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. plantarum</i> , e <i>L. acidophilus</i> .	<i>C. albicans</i> e <i>C. pseudotropicalis</i>	- Antagonismo em ágar.	- Todos os probióticos inibiram o crescimento de <i>C. albicans</i> em um certo grau; - A maioria dos <i>Lactobacillus</i> foi capaz de inibir <i>C. pseudotropicalis</i> .	- Atividade candidicida relacionada com produção de H_2O_2 e mecanismos alternativos.
Thein et al. 2006 (167)	<i>L. acidophilus</i> , <i>Actinomyces israelii</i> , <i>Prevotella nigrescens</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , e <i>S. intermedius</i> .	<i>C. albicans</i> 2560 g	- Ensaios com biofilme (microscopia eletrônica de varredura).	- 48 h co-cultura: todas as bactérias, exceto <i>S. mutans</i> e <i>S. intermedius</i> , reduziram a viabilidade fúngica; - Biofilme de <i>C. albicans</i> + <i>P. aeruginosa</i> : redução da formação de hifa comparado com biofilme sem probiótico.	- Bactéria modula formação de biofilme de <i>C. albicans</i> em ambientes com espécies variadas e afeta a morfogênese da levedura.

Continua

Continuação

Hasslöf et al. 2010 (44)	<i>L. plantarum</i> 299v, <i>L. plantarum</i> 931, <i>L. rhamnosus</i> GG ATCC 53103, <i>L. rhamnosus</i> LB21, <i>L. paracasei</i> F19, <i>L. reuteri</i> PTA 5289, <i>L. reuteri</i> ATCC 55730 e <i>L. acidophilus</i> La5.	Mutans streptococci (MS): - Cepas laboratoriais: <i>S. mutans</i> NCTC 10449, <i>S. mutans</i> Ingbritt, e <i>S. sobrinus</i> OMZ176; - Isolados clínicos: <i>S. mutans</i> P1:27 e <i>S. mutans</i> P2:29. <i>Candida albicans</i> : - Cepas de referência: <i>C. albicans</i> ATCC 28366, <i>C. albicans</i> ATCC 10231; - Isolados clínicos: <i>C. albicans</i> 1957, <i>C. albicans</i> 3339 e <i>C. albicans</i> GDM8.	- Teste de interferência em ágar Quatro concentrações de probióticos testadas (10^9 , 10^7 , 10^5 e 10^3 CFU/ml).	- 10^9 até 10^5 CFU/ml: todos as cepas inibiram o crescimento MS (exceção <i>L. acidophilus</i> La5). - 10^3 CFU/ml: somente <i>L. plantarum</i> 299v e <i>L. plantarum</i> 931 inibiram totalmente todos MS. <i>L. rhamnosus</i> GG ATCC 53103 inibiu fracamente o crescimento de três MS. - 10^9 até 10^7 CFU/ml: todos os <i>Lactobacillus</i> exceto <i>L. acidophilus</i> La5 e <i>L. reuteri</i> PTA 5289 inibiram completamente todas cepas de <i>Candida</i> . - 10^5 CFU/ml: cepas de <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. paracasei</i> e <i>L. reuteri</i> PTA 5289 apresentaram leve inibição. <i>L. acidophilus</i> La5 não mostrou inibição. <i>L. plantarum</i> e <i>L. reuteri</i> ATCC 55730 apresentaram inibição total. - 10^3 CFU/ml: nenhuma inibição foi registrada, exceto para <i>L. plantarum</i> .	- <i>L. acidophilus</i> La5: menor capacidade inibitória em comparação com outras cepas probióticas ($p < 0,05$). - Todas as cepas de <i>Lactobacillus</i> testadas reduziram o crescimento de <i>Candida</i> , mas o efeito no geral foi mais fraco que o observado contra MS.
Murzyn et al. 2010 (165)	<i>Saccharomyces boulardii</i> .	<i>C. albicans</i> SC5314.	- Ensaio de formação de hifas; - Ensaio de adesão; - Ensaio de expressão de genes	- Compostos ativos de probióticos reduziram fatores de virulência da <i>Candida</i> (formação de hifa, adesão celular e formação de biofilme) - Extrato de levedura e ácido cáprico reduziram a expressão dos genes HWP1, INO1 e CSH1 em <i>C. albicans</i> .	- Ácido cáprico foi o principal componente a afetar a formação de hifas, adesão de <i>Candida</i> e formação de biofilmes.
Ishijima et al. 2012 (162)	<i>Streptococcus salivarius</i> K12.	<i>C. albicans</i> (isolado clínico).	- Formação de tubo germinativo e crescimento de micélio de <i>C. albicans</i> (adesão ao substrato plástico); - Ensaio de faixas deferidas.	- <i>S. salivarius</i> reduziu a adesão de micélio ao substrato plástico, aumentou o número de células planctônicas de <i>Candida</i> no meio de cultura, mas não foi inibiu as cepas de <i>Candida</i> . - Bactérias probióticas ligam-se preferencialmente às hifas.	- <i>S. salivarius</i> K12 não foi diretamente fungicida, mas aparentemente inibe a adesão de <i>Candida</i> ao substrato.
Köhler et al. 2012 (164)	<i>L. rhamnosus</i> GR-1 e <i>L. reuteri</i> RC-14 (testes). <i>L. johnsonii</i> PV016 e <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (controles).	<i>C. albicans</i> SC5314.	- Antagonismo em placas de ágar e caldo.	- 48 h: <i>Lactobacillus</i> GR-1 e RC-1 mostraram zonas de inibição de crescimento fúngico; - <i>L. johnsonii</i> : zona de inibição muito fraca; - <i>S. aureus</i> : ausência de zona de inibição; - Crescimento de <i>C. albicans</i> foi suprimido em baixo pH pelo sobrenadante de culturas de <i>Lactobacillus</i> .	- Ácido láctico em baixo pH: importante papel na inibição do crescimento fúngico. A exaustão de glucose ou outro nutriente não parece ser a causa da inibição. Produção de H_2O_2 pode ser um fator anti- <i>Candida</i> .
Coman et al. 2014 (161)	<i>L. rhamnosus</i> IMC 501® <i>L. paracasei</i> IMC 502® Combinação de ambos (SYNBIO®)	Bactérias Gram-positiva e Gram-negativa. <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> .	- Método de faixas cruzadas modificada; - Método de faixas radiais; - Método de difusão em placas de ágar.	- Atividade inibitória contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e contra duas cepas de <i>C. albicans</i> (ATCC 10261 e ISS7). - Efeito inibitório sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, especialmente <i>S. aureus</i> e <i>Proteus mirabilis</i> ; - Todas as espécies de <i>Candida</i> foram inibidas, exceto <i>C. glabrata</i> e <i>C. tropicalis</i> . - Atividade inibitória contra a maioria das bactérias e fungos, especialmente <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> .	- <i>L. paracasei</i> IMC 502®: maior atividade contra todos os patógenos, especialmente cepas de <i>Candida</i> ; - Forte inibição registrada para SYNBIO®
Verdenelli et al. 2014 (169)	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. rhamnosus</i> IMC 501®, <i>L. paracasei</i> IMC 502®	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> (isolados clínicos).	- Métodos de difusão em placas de ágar e radial (determinar atividade antifúngica); - Ensaio de coagregação.	- Ensaio de difusão: nenhuma inibição contra <i>Candida</i> spp.; - Método radial: todos <i>Lactobacillus</i> tiveram capacidade de inibir <i>Candida</i> em diferentes graus.	- Capacidade de inibição e habilidade de coagregação variam de acordo com a cepa de <i>Lactobacillus</i> e do patógeno envolvido.
Kheradmand et al. 2014 (163)	<i>L. plantarum</i> (ATCC 8014) e <i>L. johnsonii</i> (isolado clínico). Nanopartículas enriquecidas com dióxido de selênio (SeNPs).	<i>C. albicans</i> (ATCC 14053)	- Método de difusão em placas convencionais e ensaio de tempo de morte usando sobrenadante probiótico (crescimento com e sem dióxido de selênio).	Difusão em placas convencionais: - Sobrenadante de <i>L. plantarum</i> e <i>L. johnsonii</i> com dióxido de selênio mostraram potente atividade anti- <i>Candida</i> ; - Nenhum efeito antifúngico observado com sobrenadante sem selênio. Ensaio de tempo de morte: - Nenhuma <i>C. albicans</i> viável estava presente após 4 h de incubação com sobrenadante com dióxido de selênio; - Células viáveis de <i>C. albicans</i> estavam presentes mesmo após 24 h de incubação com sobrenadante sem dióxido de selênio.	- Efeito antifúngico direto foi observado quando <i>Lactobacillus</i> spp. enriquecidos com SeNPs foram cultivados com <i>C. albicans</i> . - A maior inibição de <i>Candida</i> por sobrenadantes de <i>Lactobacillus</i> enriquecidos com SeNPs indica a liberação de potentes exometabólitos.

Continua

Conclusão

Ujaoney et al. 2014 (168)	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>B. infantis</i> , <i>Lactobacillus GG</i> , <i>Bacillus coagulans</i> BC30	<i>C. albicans</i> 10341	- Ensaio de biofilme usando suspensão probiótica ou sobrenadante (quantificação de XTT).	- Sobrenadante de probióticos geraram uma forte e significativa inibição na formação de biofilme, comparado com o seu correspondente bacteriano.	- Depleção de nutrientes no meio de cultura por bactérias probióticas pode inibir o crescimento fúngico.
Vilela et al. 2015 (170)	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	<i>C. albicans</i> ATCC 18804	- Ensaio de biofilme e de filamentação de <i>C. albicans</i> usando microscópio de luz.	- Filtrado de culturas de <i>L. acidophilus</i> reduziu o crescimento de <i>C. albicans</i> em 45.10%. - Menor formação de hifas na presença de células de <i>L. acidophilus</i> ou seu filtrado.	- <i>L. acidophilus</i> produziu substâncias com atividade anti- <i>Candida</i> , apresentando um efeito indireto sobre o fungo.
Chew et al. 2015 (176)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1 e <i>Lactobacillus reuteri</i> RC-14	<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001 e isolados clínicos	- Ensaio de ponto de sobreposição; - Ensaio de microtitulação à base de placa; - Ensaio de viabilidade de <i>Candida</i> usando microscópio confocal; - Ensaio de agregação; - Ensaio de adesão microbiana em hidrocarbono	- Ambas as cepas probióticas exibiram inibição do crescimento fúngico (células bacterianas e sobrenadante) e atividade candidida contra <i>C. glabrata</i> ; - Ambas as cepas probióticas exibiram forte autoagregação e coagregação na presença de <i>Candida</i> .	- <i>Lactobacillus</i> pode prevenir colonização de <i>C. glabrata</i> através da formação de agregados. Redução de pH participa do efeito antifúngico, mas não o H ₂ O ₂ .

2.8 EVIDÊNCIAS *IN VIVO* DO EFEITO ANTIFÚNGICO DOS PROBIÓTICOS – ESTUDOS EM HUMANOS E MODELO ANIMAL

Nos últimos dez anos, estudos em animais e em seres humanos foram realizados objetivando a demonstração da atividade antifúngica dos probióticos e o entendimento dos mecanismos de ação destas bactérias benéficas. A cavidade oral, os tratos urogenital e gastrointestinal são os principais sítios de ação dos probióticos contra *Candida* spp. (8). (Tabela 2.2)

2.8.1 Cavidade Oral

Apesar de *Candida* colonizar rapidamente a cavidade oral de indivíduos imunocomprometidos, esta é um dos sítios menos estudados para o uso de probióticos contra infecções por *Candida*. Os poucos estudos *in vivo* existentes mostraram resultados favoráveis para o uso de probióticos no combate à candidíase oral, como uma alternativa de terapia profilática e/ou adjuvante terapêutico.

Estudos em modelo animal demonstraram o efeito candidida dos probióticos na cavidade oral de camundongos. Um dos primeiros estudos publicados verificou que

a suplementação de *L. acidophilus* na alimentação de camundongos DBA/2 por duas semanas resultou em redução significativa da duração da colonização oral por *C. albicans*, comparada à do grupo que não recebeu o probiótico (39). Em outro estudo, nós demonstramos, usando um modelo de colonização oral por *Candida* desenvolvido em camundongos DBA/2 imunossuprimidos, que o consumo de probióticos é eficaz na ação candida profilática e terapêutica (38). O consumo diário de *L. acidophilus* NCFM e *L. rhamnosus* LR32 por duas semanas previamente à infecção oral por *C. albicans* foi capaz de reduzir significativamente os níveis de colonização oral inicial pelo fungo em relação ao controle que recebeu placebo. A redução da infecção oral fúngica observada no grupo tratado com *L. rhamnosus* chegou a ser superior à do grupo controle positivo tratado com nistatina, ao invés do probiótico (38).

Em um ensaio clínico randomizado, duplo-cego e placebo-controlado foi verificado que o consumo diário de queijo contendo *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103), *L. rhamnosus* LC705 e *Propionibacterium freudenreichii* ssp *shermanii* JS por 16 semanas reduziu o risco de alta contagem de levedura ($>10^4$ UFC/mL) em 75%, na cavidade oral de idosos. A prevalência de *C. albicans* reduziu no grupo probiótico de 30% para 21% (32% de redução), já no grupo controle houve um aumento na prevalência de 28% para 34%. Curiosamente, observou-se também que o risco de hipossalivação após o consumo do queijo com probiótico foi reduzido significativamente (18).

Um outro estudo randomizado duplo-cego avaliou o efeito a curto prazo de probióticos na redução de infecção oral por *Candida* em idosos usuários de próteses totais (177). O grupo experimental recebeu amostras liofilizadas de *Lactobacillus rhamnosus* HS111, *Lactobacillus acidophilus* HS101 e *Bifidobacterium bifidum*. O produto, seja probiótico ou placebo, foi aplicado diariamente na superfície palatina da prótese superior, ficando em direto contato com a mucosa. Após cinco semanas, amostras da mucosa palatina foram coletadas através de *swab* e foi observado que a taxa de detecção de *Candida* spp. foi de 92,0% no grupo placebo após o tratamento, enquanto no grupo probiótico foi de apenas 16,7%. A redução promovida pelos probióticos foi independente do nível inicial de colonização por *Candida*, da idade da prótese e da espécie de *Candida* isolada.

A ação em conjunto de bactérias probióticas (*Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophiles*) no tratamento de estomatite associada à *Candida* foi verificada em um ensaio clínico randomizado. Todos os

pacientes receberam um tratamento tópico com antifúngico (2% de bicarbonato de sódio por 30 segundos e aplicação de nistatina 2% após 10 min), associado ou não a probiótico, por quatro semanas e aplicando três vezes ao dia. Amostras da cavidade oral foram coletadas através de swab, sendo avaliado também a hiperemia no dorso da língua e a dor relatada pelo paciente através da escala VAS (visual analogue scale). A taxa de detecção de *Candida* spp. em amostras de saliva e dorso da língua que era de 100% antes do tratamento foi reduzida para 8,21% no grupo experimental e 34,6% no grupo controle após o tratamento, indicando a efetividade da terapia com probióticos como adjuvante ao tratamento da estomatite associada à *Candida* (178).

Por sua vez, o efeito de um produto contendo *Lactobacillus reuteri* (DSM 17938 e ATCC PTA 5289) na colonização oral por *Candida* spp foi avaliado através de um ensaio clínico randomizado com idosos. Um total de 215 indivíduos consumiram pastilhas com os probióticos ou placebo, duas vezes por dia, durante 12 semanas. Verificou-se que o probiótico reduziu a contagem de *Candida* na saliva e na placa dentária ($p < 0,05$). Entretanto, nenhuma diferença entre os grupos em relação ao nível de placa supragengival ou sangramento a sondagem foi observada (179).

Atualmente, existem no mercado diferentes produtos incorporando probióticos em sua formulação. O consumo de uma bebida amplamente conhecida no mercado à base de *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium breve*, três vezes por semana por 30 dias, foi capaz de reduzir a prevalência de *Candida* (de 92,9% para 85,7%) na cavidade oral de indivíduos saudáveis. Análises imunológicas demonstraram o aumento significativo nos níveis de IgA anti-*Candida* após o consumo do produto (180). Por outro lado, em outro estudo realizado em usuários de próteses totais, o mesmo produto não afetou a microbiota oral residente, incluindo a colonização por *Candida*, após o seu consumo por quatro semanas (181). Similarmente, o efeito da mesma bebida probiótica foi avaliado na cavidade oral, em indivíduos dentados e saudáveis, após quatro semanas de consumo do produto. Nenhuma mudança ecológica considerável foi verificada e a quantidade de *Candida* isolada do dorso da língua e da saliva não foi alterada (182).

2.8.2 Trato Urogenitário

Medidas preventivas e de suporte, como a aplicação de probióticos, são de extrema utilidade em casos de candidíase vulvovaginal (CVV). Kovachev et al. (149) testaram a eficácia clínica e microbiológica da associação da terapia padrão com azóis (fluconazol e fenticonazol), combinada com probióticos, no tratamento de infecções vaginais por *C. albicans*. No grupo teste, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus* e *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* foram administrados a partir do quinto dia da terapia com os antifúngicos tradicionais. Queixas clínicas persistiram em 79,7% das mulheres no grupo tratado somente com azóis. Por outro lado, no grupo tratado com a terapia adicional de probióticos as queixas reduziram para 31,1%. Assim, a associação com probióticos conseguiu melhorar a eficácia do tratamento convencional e as análises microbiológicas mostraram que os probióticos podem prevenir recidiva da infecção.

Mulheres em condições imunossupressoras, como infectadas por HIV, são altamente susceptíveis à candidíase vaginal recorrente. Hu et al. (183) avaliaram a colonização de *Candida* na cavidade oral e vagina, em pacientes HIV positivo e negativo, antes e depois do consumo de dois iogurtes probióticos existentes no mercado (DanActiveTM e YoPlusTM). Uma menor colonização fúngica vaginal foi observada nas mulheres que consumiram os produtos, apesar do número reduzido de pacientes avaliados no estudo. Essa significativa redução na colonização foi observada também nas mulheres HIV positivo após o consumo de DanActiveTM, comparado com o grupo sem intervenção ($p=0,03$). Por sua vez, Vicariotto et al. (76) testaram em mulheres com CVV, a efetividade da associação de duas cepas probióticas (*L. fermentum* LF10 and *L. acidophilus* LA02) formuladas em um produto vaginal de liberação lenta. Após 28 dias, o produto probiótico foi capaz de reduzir significativamente os sintomas da CVV em 86,6% das pacientes, e no final do segundo mês, as recorrências foram observadas em somente 11,5% das mulheres.

Um ensaio clínico randomizado, duplo-cego e placebo-controlado mostrou que *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 foram capazes de aumentar a eficácia do fluconazol contra CVV, quando administrados juntamente com o antifúngico padrão. O grupo probiótico apresentou significativamente menos corrimento vaginal em comparação ao controle (10,3% vs 34,6), além de menor carga fúngica vaginal, determinada por cultura (10,3% vs 38,5). (184)

Contrariamente, Pirotta et al. (185) verificaram que probióticos não foram capazes de prevenir CVV pós-antibioticoterapia. O ensaio clínico randomizado foi

realizado com mulheres não-grávidas, entre 18-50 anos, que necessitaram de antibioticoterapia oral por curto prazo para tratar infecção não-ginecológica. *L. rhamnosus* e *Bifidobacterium longum* foram administrados por via oral e *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus* e *Streptococcus thermophiles* foram aplicados por via vaginal por dez dias. Pó de malto-dextrina foi usado como placebo. Os resultados não suportam o consumo oral ou vaginal de probióticos para prevenir vulvovaginites pós-antibioticoterapia.

Uma razão para esses resultados divergentes entre os estudos pode estar nas diferentes cepas de bactérias probióticas testadas em cada estudo, uma vez que o efeito do probiótico é cepa-específica, tanto do ponto de vista do probiótico, quando do patógeno (26). Outras razões podem envolver diferenças de metodologia, como a forma de apresentação do produto, via de aplicação, número e viabilidade de células dos probióticos e o período de uso dos probióticos. Por exemplo, em um estudo as bactérias foram consumidas por mais de 28 dias (76) e em outro por 10 dias (185). A administração de bactérias probióticas por longos períodos faz-se necessária para observarmos os seus reais benefícios à saúde, uma vez que os micro-organismos probióticos não colonizam permanentemente as superfícies mucosas (156, 186). O consumo contínuo das cepas probióticas é essencial para manter os seus efeitos benéficos.

2.8.3 Trato Gastrointestinal

Candida spp. frequentemente habitam o trato gastrointestinal (GI) do ser humano. O sítio mais comum de infecção é o esófago, mas outros locais como estômago e intestino podem também estarem envolvidos (78). A manutenção do equilíbrio microbiano no trato GI é essencial para evitar o crescimento excessivo de *Candida* spp. e a consequente infecção fúngica, entretanto indivíduos com o sistema imune debilitado, como crianças nascidas prematuramente, são mais susceptíveis a septicemia por *Candida* de origem gastrointestinal (187).

Muitos estudos mostraram que probióticos são efetivos na prevenção da colonização gastrointestinal por *Candida* spp., especialmente em crianças em estado de saúde debilitado. Um ensaio clínico randomizado, duplo-cego e prospectivo avaliou

a eficácia da suplementação oral por *L. casei* subespécie *ramnosus* na prevenção da colonização do GI por *Candida*, em recém-nascidos prematuros com baixo peso. A cepa probiótica foi adicionada ao leite materno e consumida por até seis semanas, sendo que leite materno puro foi usado como controle. Os resultados mostraram que o probiótico reduziu significativamente a incidência e a intensidade da colonização entérica por *Candida* spp (41). Outro estudo também conduzido em recém-nascidos prematuros, testando uma combinação de cepas bacterianas probióticas (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, *B. bifidum* e *B. lactis*) adicionada ao leite materno e consumida diariamente por até seis semanas, apresentou resultados similares. Os probióticos não somente reduziram a colonização enteral fúngica, mas também reduziram a septicemia de *Candida*, a duração da internação hospitalar e aceleraram o estabelecimento de alimentação enteral no bebê (188).

Para avaliar a eficácia de probióticos na prevenção de colonização GI por *Candida* spp. um total de 249 recém-nascidos prematuros foram alocados em três grupos, dois recebendo *L. reuteri* ou *L. rhamnosus* e outro sem suplementação. Ambas as cepas probióticas testadas preveniram a colonização GI por *Candida* spp., além de terem sido efetivas na proteção contra septicemia de início tardio e na redução de problemas neurológicos anormais desenvolvidos nos prematuros (189).

Um ensaio clínico randomizado foi conduzido em crianças de unidades de cuidados intensivos pediátricos, recebendo antibióticos de amplo espectro, objetivando avaliar o efeito de probióticos na prevenção da colonização retal de *Candida*. Os pacientes receberam um produto contendo *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*, *B. bifidum*, *Saccharomyces boulardii*, *S. thermophilus* e frutoligosacarídeos, ou receberam placebo, duas vezes ao dia por sete dias. A suplementação probiótica foi capaz de reduzir a colonização gastrointestinal por *Candida* no trato GI e também na urina dos pacientes (candidúria) (187).

Estudos em modelo animal mostram a ação candidida no trato GI previamente aos testes em humanos. Um deles mostrou que a administração oral de *Saccharomyces boulardii* reduziu a inflamação e a colonização intestinal por *C. albicans* em camundongos BALB/c em modelo de colite (190). Mais tarde, o mesmo probiótico (*S. Boulardii*), em um estudo clínico comparativo, randomizado e prospectivo, demonstrou ser tão eficaz quanto a nistatina na redução de colonização fúngica gastrointestinal e cutânea, e também na redução de infecções invasivas de *Candida* em recém-nascidos prematuros com baixo peso corporal (79). Neste último

estudo, os bebês foram alimentados com leite materno suplementado com *S. boulardii*, uma vez ao dia, ou nistatina a cada oito horas, a partir do terceiro dia de vida. Os resultados deste estudo mostraram que a suplementação com o probiótico foi segura para esses pacientes debilitados, promoveu redução no índice de septicemia clínica e promoveu efeitos favoráveis na intolerância alimentar.

Os benefícios locais da terapia com probióticos também podem ser verificados no estômago. Colonização gástrica por *Candida* provoca o atraso na cicatrização de úlceras gástricas, provavelmente devido à queda na microcirculação da mucosa na área ulcerada (78). Usando testes em ratos, foi demonstrado que a terapia com *Lactobacillus acidophilus* acelerou a cicatrização de úlceras gástricas pré-existentes na presença de infecções por *C. albicans*, sendo observada redução na colonização pelo fungo, melhora na circulação sanguínea gástrica nas margens da úlcera e supressão de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α (78).

Bactérias probiótica mortas por calor também foram capazes de promover efeitos positivos contra candidíases em camundongos, apesar de não serem tão eficientes quanto os probióticos vivos (191). Um estudo em modelo animal testou a capacidade de *L. acidophilus* e *L. casei*, ambos mortos por calor, em proteger camundongos de candidíases sistêmica e orogátrica. Foram usados dois tipos de camundongos: isogênico *bg/bg–nu/nu* que apresenta disfunção nas células fagocíticas, deficiência na atividade de células NK, redução de células T e susceptibilidade à candidíase letal, e o isogênico *bg/bg–nu/+* que apresenta a imunidade mediada por células T normais e resistência à candidíase letal. As duas cepas reduziram a severidade da candidíase orogátrica nos camundongos imunossuprimidos e diminuíram o número de células viáveis de *C. albicans* no trato gastrointestinal e a sua disseminação nos camundongos imunocompetentes. Somente *L. acidophilus* foi capaz de inibir a disseminação de candidíase nos camundongos imunossuprimidos. Entretanto, nenhuma cepa probiótica testada foi capaz de prolongar a vida dos animais *bg/bg–nu/nu* após a infecção por *C. albicans*. Os resultados mostram que bactérias probióticas inativas (mortas) induzem uma limitada proteção contra candidíase em camundongos, no entanto, estas poderiam ser usadas de forma mais segura que bactérias vivas em pacientes imunodeficientes (191).

Estudos em camundongos imunodeficientes também demonstraram o efeito de bactérias probióticas sobre candidíase orogátrica e sistêmica. Os estudos de

Wagner et al. (192, 193) demonstraram que a presença de cepas probióticas, como *Bifidobacterium infantis*, *B. lactis*, *B. animalis*, *L. acidophilus*, *L. reuteri* e *L. casei*, no trato gastrointestinal de camundongos evitou a perda de peso associada à infecções por *C. albicans*, reduziu a severidade da candidíase gástrica e a incidência da infecção sistêmica de origem endógena.

Tabela 2.2 - Estudos clínicos evidenciando o efeito antifúngico de probióticos na cavidade oral, tratos urogenital e gastrointestinal em humano

REFERÊNCIA	SÍTIO DE AÇÃO	PROBIÓTICO(S)	PATÓGENO(S)	MÉTODO	RESULTADOS	COMENTÁRIOS
Hatakka et al. 2007 (18)	Cavidade oral	<i>L. rhamnosus</i> GG (ATCC 53103), <i>L. rhamnosus</i> LC705, <i>Propionibacterium freudenreichii</i> ssp <i>shermanii</i> JS	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> e <i>C. tropicalis</i>	<ul style="list-style-type: none"> - RCT, 276 idosos; - Terapia probiótica: consumo diário de 50 g de queijo probiótico ou controle por 16 semanas; - Índice periodontal de comunidade (IPC) e lesões na mucosa foram registrados. Amostras orais para identificação de fungo foram coletadas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Prevalência de levedura na saliva reduziu no grupo probiótico de 30% para 21% (32% de redução), e aumentou no grupo controle de 28% para 34%; - Intervenção probiótica reduziu o risco de alta contagem de levedura em 75%. 	<ul style="list-style-type: none"> - Probióticos reduziram a prevalência de hipossalivação; - Nenhum efeito adverso foi observado.
Mendonça et al. 2012 (180)	Cavidade oral	<i>L. casei</i> e <i>Bifidobacterium breve</i>	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. lipolytica</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. kefyr</i> e <i>C. parapsilosis</i>	<ul style="list-style-type: none"> - 42 mulheres (≥65 anos); - Terapia probiótica: 3x por semana por 30 dias; - Coleta de amostras de saliva para quantificação de <i>Candida</i> (contagem de UFC) e análise de IgA (ELISA). 	<ul style="list-style-type: none"> - Reduziu a prevalência de <i>Candida</i> de 92,9% para 85,7%; - Aumentou o nível de IgA anti-<i>Candida</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>C. albicans</i> foi a espécie mais frequentemente isolada antes e depois do consumo de probiótico.
Sutula et al. 2012 (181)	Cavidade oral	<i>L. casei</i> Shirota	<i>Candida</i> spp., <i>Streptococcus mutans</i> e espécies anaeróbicas Gram-negativas	<ul style="list-style-type: none"> - 7 indivíduos saudáveis (≥55 anos), usuários de próteses totais; - Terapia probiótica: 1x ao dia, com a prótese em posição, por 28 dias; - Amostras de saliva, biofilme da língua e prótese foram coletadas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Não houve efeito do probiótico na ocorrência e viabilidade da <i>Candida</i>; - Não houve mudança significativa na viabilidade de <i>S. mutans</i> e anaeróbicos Gram-negativos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Apenas uma pequena amostra (n = 7) completou o estudo.
Sutula et al. 2013 (182)	Cavidade oral	<i>L. casei</i> Shirota	<i>Candida</i> spp. e espécies anaeróbicas Gram-negativas	<ul style="list-style-type: none"> - 21 indivíduos saudáveis dentados (18 – 45 anos); - Terapia probiótica: 1x ao dia, por 28 dias; - Amostra de saliva e biofilme da língua foram coletados. Amostra de hálito matinal foi obtido com monitor de sulfureto portátil. 	<ul style="list-style-type: none"> - Nível de <i>Lactobacillus</i> na saliva aumentou durante o consumo de probiótico; - Níveis de <i>Candida</i> e espécies anaeróbicas não foram afetados; - Hálito matinal não foi significativamente afetado. 	<ul style="list-style-type: none"> - Confirmação da colonização temporária de <i>Lactobacillus</i> e da necessidade do seu consumo contínuo.
Li et al. 2014 (178)	Cavidade oral	<i>L. bulgaricus</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> e <i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Candida</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> - RCT, 65 pacientes com estomatite associada à <i>Candida</i>; - Terapia probiótica: antifúngico sozinha (bicarbonato de sódio + nistatina) ou associada ao probiótico. 3x ao dia, por 4 semanas; - Parâmetros de hiperemia, escala análoga visual, amostras de saliva e swab de dorso de língua foram avaliados. 	<ul style="list-style-type: none"> - Taxa de detecção de <i>Candida</i> spp. não foi reduzida no grupo probiótico; - Alívio significativo dos sintomas e sinais clínicos após administração de probiótico. 	<ul style="list-style-type: none"> - Nenhum efeito adverso foi observado.
Ishikawa et al. 2015 (177)	Cavidade oral	<i>L. rhamnosus</i> HS111, <i>L. acidophilus</i> HS101 e <i>Bifidobacterium bifidum</i> .	<i>Candida</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> - RCT, 55 usuárias de prótese total apresentando <i>Candida</i> spp., sem sintomas de candidíase oral; - Terapia probiótica: 1x ao dia, por 5 semanas (probiótico ou placebo); - Swab do palato para quantificação e identificação de <i>Candida</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> - Redução significativa de infecção por <i>Candida</i> após administração de probiótico; - <i>C. albicans</i> foi a espécie mais prevalente antes e depois da terapia probiótica. 	<ul style="list-style-type: none"> - Redução na infecção por <i>Candida</i> foi independente do seu nível inicial, das espécies presentes ou da idade da prótese.

Continua

Continuação

Kraft-Bodi et al. 2015 (179)	Cavidade oral	<i>L. reuteri</i> DSM 17938 e <i>L. reuteri</i> ATCC PTA 5289	<i>Candida</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> - RCT, 215 idosos (60 – 102 anos); - Terapia probiótica: 2x ao dia por 12 semanas (placebo ou probiótico); - Prevalência e quantidade de crescimento de <i>Candida</i> (saliva e placa), higiene oral e inflamação gengival foram avaliados. 	<ul style="list-style-type: none"> - Redução significativa de <i>Candida</i> na saliva e placa após administração de probiótico; - Nenhuma diferença nos níveis de placa supragengival e sangramento a sondagem foi observada. 	- "Gosto forte" dos tablets e irritação gástrica foram queixas reportadas no grupo controle e experimental.
Pirotta et al. 2004 (185)	Trato urogenital	<i>L. rhamnosus</i> e <i>B. longum</i> (produto oral); <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. acidophilus</i> e <i>Streptococcus thermophilus</i> (produto vaginal).	<i>Candida</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> - RCT, 235 mulheres não-grávidas (18-50 anos) usando antibiótico oral por curto período; - Terapia probiótica: oral 2x por dia e vaginal 1x por dia por 6 dias, juntamente com antibiótico e 4 dias após antibiótico terapia; - Swab vaginal para identificação de <i>Candida</i>; - Identificação de CVV sintomática. 	<ul style="list-style-type: none"> - O uso de formas orais e vaginais de probióticos não pode prevenir vulvovaginites pós-antibiótico terapia. 	- 10 dias de terapia probiótica pode não ser suficiente para a ocorrência de efeitos benéficos contra <i>Candida</i> spp. na vagina.
Martínez et al. 2009 (184)	Trato urogenital	<i>L. rhamnosus</i> GR-1 e <i>L. reuteri</i> RC-14	<i>Candida</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> - RCT, 55 mulheres diagnosticadas com CVV; - Terapia probiótica: dose única de fluconazol mais probiótico ou placebo, 1x ao dia, por 4 semanas; - Swab vaginal para identificação de <i>Candida</i>; - Avaliação clínica para detectar sinais e sintomas de CVV. 	<ul style="list-style-type: none"> - Probióticos reduziram significativamente o corrimento vaginal, coceira e/ou ardor vaginal, dispareunia e disúria; - Probióticos reduziram a presença de <i>Candida</i> spp. 	- Efeitos adversos suaves foram reportados, mas não foi possível associá-los definitivamente à administração de probióticos.
Vicariotto et al. 2012 (76)	Trato urogenital	<i>L. fermentum</i> LF10 e <i>L. acidophilus</i> LA02 (prebióticos: arabinogalactano e fructo-oligosacarídeos)	<i>Candida</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> - 30 mulheres (23-64 anos); - Terapia probiótica: 1x ao dia por 7 dias, seguido de 1x a cada 3 dias por 3 semanas, por fim 1x por semana por 1 mês; - Swab vaginal para identificação de <i>Candida</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> - Probióticos reduziram os sintomas causados por <i>Candida</i> em 86,6% dos pacientes após 28 dias; - Após 2 meses, recorrências ocorreram em 11,5% dos pacientes. 	- Probiótico provavelmente estabelece e mantém uma barreira contra <i>Candida</i> vaginal.
Hu et al. 2013 (183)	Cavidade oral e trato urogenital	<i>Bifidobacterium Lactobacillus</i> (DanActive™ ou YoPlus™ iogurte)	<i>Candida</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> - 24 mulheres (17 HIV-positivo e 7 HIV-negativo); - Terapia probiótica: 15 dias de consumo de cada iogurte, com 30 dias de intervalo entre o consumo de cada iogurte; - Swabs oral e vaginal. 	<ul style="list-style-type: none"> - Menor colonização fúngica foi observada após consumo do probiótico; - HIV-positivo tiveram significativamente menor colonização vaginal fúngica após consumo de DanActive™ 	- Colonização oral fúngica reduzida foi observada em HIV-positivos consumindo iogurte com probiótico, mas não foi estatisticamente significante.
Kovachev et al. 2015 (149)	Trato urogenital	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> .	<i>C. albicans</i>	<ul style="list-style-type: none"> - 436 mulheres (17-50 anos) com infecção vaginal por <i>C. albicans</i>; - Tratamento: antifúngicos sozinhos (fluconazol e fenticonazol) ou associados com probiótico; - Testes clínicos e microbiológicos foram realizados. 	<ul style="list-style-type: none"> - Probióticos reduziram as queixas clínicas; - Terapia probiótica melhorou os parâmetros: modificações teciduais vaginais, pH e fluorine vaginal. 	- Aplicações locais de probiótico pode melhorar a eficácia de antifúngicos e prevenir recorrência.
Manzoni et al. 2006 (41)	Trato gastrointestinal	<i>L. casei</i> subespécies <i>rhamnosus</i>	<i>Candida</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> - RCT, 80 recém-nascidos prematuros com baixo peso; - Terapia probiótica: leite materno sozinho ou adicionado a probiótico, por 6 semanas; - Amostras de vários sítios (ex: orofaringe, fezes, reto, estômago) foram coletadas para avaliar a colonização fúngica no trato gastrointestinal. 	<ul style="list-style-type: none"> - Leite materno suplementado com probiótico reduziu significativamente a incidência de colonização entérica de <i>Candida</i>; - Probiótico reduziu o número de isolados fúngicos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Probióticos reduziram a incidência e a intensidade de colonização entérica por <i>Candida</i> spp.; - Nenhum efeito adverso foi observado.
Romeo et al. 2011 (189)	Trato gastrointestinal	<i>L. reuteri</i> (ATCC 55730) e <i>L. rhamnosus</i> (ATCC 53103)	<i>Candida</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> - 249 recém-nascidos prematuros com peso <2500 g e idade gestacional <37 semanas; - Terapia probiótica: leite materno ou formulado sozinhos ou suplementados com probiótico, por até 6 semanas; - Avaliações clínicas. Amostras de fezes, orofaringe, aspirado gástrico foram coletados para detecção de <i>Candida</i>. Culturas de sangue para diagnóstico de candidíase invasiva. 	<ul style="list-style-type: none"> - Probióticos reduziram significativamente a presença de <i>Candida</i> nas fezes; - <i>L. reuteri</i> promoveu maior redução dos sintomas gastrointestinais que <i>L. rhamnosus</i> e grupo controle; - Probióticos reduziram a incidência de consequências neurológicas anormais. 	- Probióticos podem prevenir colonização gastrointestinal por <i>Candida</i> , proteger contra septicemia tardia e reduzir consequências neurológicas anormais em recém-nascidos prematuros.

Continua

Conclusão

Demirel et al. 2013 (79)	Trato gastrointestinal	<i>Saccharomyces boulardii</i>	<i>Candida</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> - 181 recém-nascidos prematuros com idade gestacional ≤ 32 semanas e peso ao nascer $\leq 1,500$ g; - Terapia probiótica: nistatina a cada 8 h, ou leite materno ou formulado suplementado com probiótico 1x ao dia; - Amostras de sangue, urina e fluido cérebro-espinhal foram coletados para identificar infecções invasivas. Pele, fezes e cultura retal foram coletados para detecção de <i>Candida</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> - Colonização por <i>Candida</i> na pele e nas fezes foi similar entre os grupos probiótico e nistatina; - Septicemia clínica e ataques de septicemia foram significativamente menores no grupo probiótico. 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>S. boulardii</i> profilático e nistatina foram igualmente efetivos na redução da colonização por <i>Candida</i> e infecções fúngicas invasivas.
Kumar et al. 2013 (187)	Trato gastrointestinal	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>S. boulardii</i> e <i>Saccharomyces thermophilus</i>	<i>Candida</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> - RCT, 150 crianças (3 meses - 12 anos) usando antibiótico de amplo espectro por no mínimo 48 h; - Terapia probiótica: probiótico ou placebo, 2x ao dia por 7 dias; - Swab retal, amostras de urina e sangue foram coletadas para detecção de <i>Candida</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> - Terapia probiótica evitou um aumento significativo no número de pacientes colonizados por <i>Candida</i> spp.; - Probiótico reduziu significativamente a presença de <i>Candida</i> na urina, mas não no sangue. 	<ul style="list-style-type: none"> - Probióticos podem ser uma estratégia alternativa para a redução de infecções por <i>Candida</i> no trato GI e urina em crianças fazendo uso de antibióticos de amplo espectro.
Roy et al. 2014 (188)	Trato gastrointestinal	<i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>B. longum</i> e <i>B. bifidum</i>	<i>Candida</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> - RCT, 112 recém-nascidos prematuros (idade gestacional < 37 semanas e peso ao nascimento $< 2,500$ g); - Terapia probiótica: leite materno suplementado com probiótico ou placebo, 2x ao dia por até 6 semanas; - Avaliações clínicas. Amostras de fezes e aspirado gástrico foram coletados para detecção de <i>Candida</i>. Culturas de sangue foram feitas para diagnóstico de candidíase invasiva. 	<ul style="list-style-type: none"> - Probióticos reduziram a duração da hospitalização e a presença de fungo nas fezes; - Infecção fúngica foi significativamente menor no grupo probiótico; - O estabelecimento da alimentação normal ocorreu antes no grupo probiótico. 	<ul style="list-style-type: none"> - Probióticos podem reduzir colonização fúngica enteral e reduzir septicemia fúngica em recém-nascidos com baixo peso.

CVV (Candidíase vulvovaginal); ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay); GI (Gastrointestinal); HIV (human immunodeficiency virus); RCT (Randomized controlled trial – ensaio controlado randomizado); UFC (Unidades formadoras de colônia).

2.9 POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DOS PROBIÓTICOS CONTRA *C. ALBICANS*

O equilíbrio entre o estado de saúde e doença envolve o equilíbrio entre a microbiota benéfica e a patológica dentro de um sistema. O maior atributo dos probióticos aparenta ser a restauração do microbioma natural saudável em um habitat no qual ele foi introduzido, transformando uma microbiota disbiótica causadora de doença, em uma simbiótica e equilibrada (194). O equilíbrio promovido pela presença dos probióticos pode ocorrer em diferentes ecossistemas do corpo humano, como o da cavidade oral, vaginal e do trato GI (194). A origem da microbiota balanceada que leva um indivíduo de um estado de doença para saúde baseia-se em vários mecanismos.

Um primeiro mecanismo seria a competição por nutrientes e receptores na superfície das células teciduais, prevenindo assim a adesão de patógenos à mucosa (168, 194, 195). As suas capacidades de auto-agregação, co-agregação com células

de *Candida*, além da formação de biofilme, podem contribuir para a criação de uma barreira protetora que previne a adesão de patógenos ao epitélio e subsequente acesso aos tecidos, tanto na cavidade oral quanto em outros sítios (162, 196, 197).

Outro possível mecanismo da interferência de probióticos na colonização de patógenos na mucosa seria a produção de biosurfactantes. A absorção destes produtos pelo substrato modifica a hidrofobicidade das superfícies celulares, interferindo na adesão microbiana e no processo de dessorção (197). Biosurfactantes não somente previnem a adesão, como também induzem o descolamento das células já aderidas (197).

A produção de exometabólitos é mais um possível mecanismo de ação, uma vez que o tratamento com sobrenadantes celulares de bactérias probióticas inibe o crescimento de *C. albicans* (163). Ácido láctico, ácido acético, ácido cáprico, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e bacteriocinas são exemplos de exometabólitos, com conhecidos efeitos danosos em patógenos, envolvendo morte celular e/ou neutralização de toxinas produzidas pelo patógeno (165, 198-200). No entanto, o papel desses produtos no efeito antimicrobiano no homem é controverso, uma vez que não é possível simular todas as condições encontradas na cavidade oral, vaginal e trato GI em ensaios *in vitro* (162, 201, 202).

Modulação do sistema imune, inato e adaptativo, pelos probióticos pode exercer grande influencia no efeito contra *Candida*, uma vez que ambas as respostas colaboram intrinsicamente para a geração de uma proteção antifúngica efetiva (203). Probióticos podem alterar a produção de citocinas no nosso organismo de forma localizada ou sistêmica (39). Testes *in vitro*, com linfócitos intraepiteliais desafiados com *C. albicans*, mostraram que a bactéria probiótica reduz a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , promovendo uma resposta anti-inflamatória (204). Maior produção de IL-4 e IFN- γ em linfonodos de camundongos foi observada após ingestão de probióticos seguido do desafio por *C. albicans* (39). IL-4 é uma citocina que induz a diferenciação de linfócitos T auxiliares nativos (células T_H0) em linfócitos T auxiliares 2 (células T_H2), que, por sua vez, estimulam a resposta imune adaptativa e inibem a resposta inata, reduzindo a inflamação.

Outro estudo mostrou que probióticos suprimiram a expressão de genes associados à via de sinalização do fator nuclear -kappa β (NF- $\kappa\beta$) e genes que expressam citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-8 em células epiteliais vaginais desafiadas por *C. albicans* (205). Receptores tipo Toll ativam a produção de citocinas

pró-inflamatórias através da via de sinalização NF- κ B, demonstrando o impacto dos probióticos na produção de mediadores inflamatórios. O mesmo estudo também mostrou que os probióticos reduziram a expressão dos receptores para *Candida* TLR2 e TLR6 nas células vaginais, levando a menor capacidade de reconhecimento e resposta inflamatória destas células na presença do fungo.

Uma excessiva inflamação promove uma destruição tecidual que favorece a infiltração das hifas, com isso a contribuição anti-inflamatória dos probióticos pode contribuir na profilaxia e tratamento de candidíase.

Probióticos podem também estarem agindo através da melhora da atividade das células imunes circulantes na corrente sanguínea, por exemplo, células NK, melhorando assim a defesa contra infecções sistêmicas (206).

Outras propriedades imunomodulatórias das bactérias probióticas também foram comprovadas e podem estar associadas com o mecanismo de ação contra *C. albicans*. Aumento da secreção de IgA e outros componentes de imunoglobulinas foi descrito após consumo de probióticos (207, 208). Já o aumento da secreção de óxido nítrico (NO) e IFN- γ na saliva foi associado com a maior redução de infecção por *C. albicans* na cavidade oral (39). Um aumento da atividade fagocítica de macrófagos em camundongos e leucócitos em indivíduos saudáveis também foi verificado após o consumo de produtos suplementados com probióticos (207, 209).

Estudos *in vitro* demonstraram que probióticos podem reduzir a formação de hifas de *Candida* spp., a adesão das células ao substrato e a formação de biofilmes, ou seja, afetam importantes fatores de virulência da *C. albicans* (167, 210). A manutenção do fungo na forma de levedura favorece o seu reconhecimento pelas células fagocíticas do sistema imune inato, como macrófagos (112).

A associação de probióticos aos tratamentos convencionais de candidíase pode potencializar o efeito dos agentes antifúngicos, melhorando a erradicação da infecção (164). O mecanismo por trás deste efeito potencializador seria o aumento da expressão dos genes relacionados ao estresse nas células fúngicas e redução dos genes envolvidos com resistência antifúngica.

A ação dos probióticos mostra-se multifatorial, no entanto, ainda não estão totalmente claros os seus mecanismos de ação, principalmente os seus efeitos sobre a resposta imune do hospedeiro e sobre o biofilme de *C. albicans*.

2.10 SEGURANÇA E RISCOS DA TERAPIA PROBIÓTICA

A segurança no consumo de probióticos é bastante discutida na literatura. Membros do gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são considerados, de forma geral, como pertencentes ao grupo de microrganismos com reconhecida segurança. Muitas espécies de lactobacilos fazem parte de produtos fermentados, como queijo, leite fermentado e iogurte e são consumidos há muito tempo com segurança, sendo habitantes não-patogênicos do trato intestinal humano. Estudos mostram a segurança do consumo de produtos probióticos por pessoas saudáveis (27, 29, 33, 45-47, 49, 50, 211, 212).

A seleção de bactérias probióticas para o consumo humano segue uma série de critérios já abordados anteriormente. Com base no critério de segurança, as cepas bacterianas devem ser de origem humana, normalmente isoladas do trato GI, não promotoras de reações inflamatórias e não portadoras de genes transmissíveis de resistência a antibióticos (28, 29). Com isso, essas exigências na seleção de um probiótico reduzem as chances de efeitos adversos.

Apesar de muitos estudos mostrarem a segurança do consumo de cepas probióticas (33, 36, 49), alguns poucos casos de infecções por bactérias probióticas foram reportados, como septicemia por *Lactobacillus* (213).

Lactobacillus raramente são patogênicos ao homem e aos animais (214). No entanto, há casos de infecções envolvendo pacientes com cateter venoso central (215). *L. casei* (35,7%) e *L. rhamnosus* (22,9%) são as principais espécies suspeitas de causar infecções (50) e um possível fator de risco pode ser o grande consumo diário de produtos contendo probiótico. Entre as infecções associadas com *Lactobacillus*, podemos citar endocardites, bacteremias, infecções locais, peritonites, abscessos, meningite e pneumonias (213). A habilidade de agregar a placas é considerada uma possível característica patogênica na progressão da endocardite infecciosa (213).

Na maioria desses casos de infecção, o *Lactobacillus* causador aparentemente seria originado da própria microbiota do hospedeiro, e não de produtos fermentados ou probióticos consumidos. Além disso, os casos de infecção acometem pacientes com saúde comprometida, como imunocomprometidos, recém-nascidos e portadores de próteses de válvula (27, 29, 49, 50). Além disso, a cárie dental é associada com

maiores proporções de lactobacilos, bactérias acidogênicas e acidúricas que podem fazer parte do biofilme cariogênico, principalmente em sítios de retenção (211).

As evidências sugerem que o risco de infecções por espécies de *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium* usadas como probióticos é similar ao risco das infecções causadas por micro-organismos comensais, e o consumo de produtos contendo essas bactérias apresentam um risco negligenciável aos consumidores, incluindo indivíduos imunocomprometidos (33).

Em estudo avaliando a prevalência de bacteremia por *Lactobacillus* e o consumo de *Lactobacillus rhamnosus* GG como probióticos, foi observado que *Lactobacillus* foram isolados em 0,02% de todas as culturas de sangue avaliadas e não houve indícios que sugerissem um aumento da bacteremia por *Lactobacillus*. A incidência foi de 0,3 casos/100.000 habitantes/ano entre 1995 e 2000. Dentre os 48 casos confirmados de bacteremia por *Lactobacillus*, 26 foram identificados como sendo *L. rhamnosus*, sendo 11 isolados idênticos ao *L. rhamnosus* GG. Os resultados indicam que o aumento do consumo dessas bactérias como probióticos não levou a um aumento de bacteremia por *Lactobacillus* (32).

O principal fator de preocupação no uso desses probióticos é o risco de transmissão de resistência antibiótica para outras bactérias, uma vez que bactérias ácido lácticas podem apresentar resistência intrínseca a vários antibióticos e potencial para servirem como reservatório de genes de resistência, podendo transferi-los para outras bactérias (216). Felizmente, na maioria dos casos, essa resistência não é transmissível a outras bactérias. Além disso, mesmo nos casos de bactérias ácido-láticas associadas a infecções, existe uma ampla e segura variedade de antibióticos para os quais elas são sensíveis (27, 48, 50).

Visando a segurança no consumo, antes de lançar um produto contendo probióticos no mercado, deve-se verificar se a bactéria isolada não contém genes de resistência transmissíveis (50). O sequenciamento do genoma das bactérias probióticas pode gerar informações importantes para a comparação de bactérias a nível molecular. No caso do *L. acidophilus*, análises do genoma da bactéria mostraram a ausência de conhecidos elementos genéticos transferíveis, relacionados com a resistência antibiótica (217).

Danielsen et al. (48), em 2003, realizaram um estudo com o objetivo de estabelecer os níveis de susceptibilidade de *Lactobacillus* spp. a vários tipos agentes antimicrobianos. Isso é um pré-requisito para diferenciar a resistência transmissível

da resistência natural. Foram usados *Lactobacillus* de diferentes espécies e 25 tipos de agentes antimicrobianos. Os resultados mostraram que o nível de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos é dependente da espécie de *Lactobacillus*. Os resultados indicaram que *L. acidophilus* apresenta resistência transferível à vancomicina. *L. rhamnosus* mostrou-se resistente ao ácido fusídico.

Em geral, considerações sobre a segurança devem incluir o conhecimento sobre o histórico de uso com segurança do probiótico, quando administrado em rotas recomendadas; o estado de saúde do consumidor; a frequência de associação de espécies com infecção; a tendência de produção de produtos metabólicos finais potencialmente deletérios; a associação com transferência de resistência aos antibióticos; a sensibilidade à antibioticoterapia e a relação com espécies que produzem fatores de virulência (49). Casos raros de infecções por probióticos devem ser acompanhados e estudados para obter confirmações e caracterizações moleculares (33).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Visando contribuir com o conhecimento sobre os mecanismos associados aos benefícios causados por cepas probióticas, visamos testar as seguintes hipóteses:

- Bactérias probióticas podem ser capazes de alterar a resposta induzida por *Candida albicans* em macrófagos humanos, interferindo na produção de citocinas e na expressão do receptor Dectina-1.
- Probióticos podem ser capazes de interferir na formação de biofilme de *C. albicans*, através de uma interação direta com as células fúngicas e/ou através da produção de produtos antimicrobianos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito de *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei*, individualmente, sobre macrófagos humanos (THP-1) desafiados por *Candida albicans*, avaliando os seguintes aspectos:

- Perfil de citocinas: interleucina 10 (IL-10), interleucina 12 (IL-12), interleucina 1-beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e proteína quimioatrativa de monócito-1 (MCP-1);
- Expressão relativa do gene *Clec7a*, que codifica o receptor dectina-1;

Avaliar quantitativamente e qualitativamente a ação de bactérias probióticas sobre o biofilme de *C. albicans*, durante diferentes fases do seu desenvolvimento, avaliando:

- Efeito de suspensões de *Lactobacillus*, em 6 diferentes concentrações, sobre o biofilme de *C. albicans*, durante a fase de colonização inicial e maturação;
- Efeito do sobrenadante do biofilme bacteriano de lactobacilos sobre o biofilme de *C. albicans* durante a sua fase de adesão, colonização inicial e maturação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EFEITO DE *LACTOBACILLUS* SOBRE MACRÓFAGOS HUMANOS DESAFIADOS POR *C. ALBICANS*

4.1.1 Micro-Organismos e Condições de Cultivo

Foram utilizadas as cepas de bactérias *Lactobacillus rhamnosus* LR-32 (Danisco, Madison, WI, EUA), *Lactobacillus acidophilus* NCFM (Danisco, Madison, WI, USA), *Lactobacillus casei* L324m (cepa isolada clinicamente e fornecida pelo Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Brasil) (38). As bactérias foram cultivadas em 10% de CO₂ (Shel Lab, Cornelius, OR, EUA) a 37°C em meio de Man, Rogosa and Sharpe (MRS - Difco, Sparks, MD, EUA) suplementado com 40mg de NaHCO₃.l⁻¹. Quando utilizado meio sólido, foi acrescido 1,5g de ágar/litro de meio.

A cepa *C. albicans* ATCC SC5314, isolado clínico de humano, com o genoma já sequenciado (218-220) e virulenta (221), foi cultivada em ágar Sabouraud dextrose (SDA - Difco, Detroit, MI, EUA) a 37°C. Todas as amostras foram mantidas em tubos contendo glicerol 20% em freezer a -80°C (mod. ULT2586-3-D35, Revco, Asheville, NC, EUA).

4.1.2 Curva de Crescimento

As curvas de crescimento foram determinadas para definir os parâmetros para preparo dos inóculos de *Lactobacillus* e de *C. albicans* nos ensaios com macrófagos. Alíquotas das bactérias foram inoculadas em placas de ágar MRS, incubadas em estufa em atmosfera de 10% de CO₂ por 24 horas a 37°C. Após este período, uma colônia foi transferida para 8 ml de caldo MRS em triplicata e incubada durante 16 horas (overnight), nas mesmas condições. Após a incubação, a densidade ótica

(DO_{495nm}) das culturas foi ajustada para valor ~ 1.0 Å por mensuração em espectrofotômetro (Jenway 6405UV/Vis Essex, Inglaterra). As culturas foram diluídas 1:10 em caldo MRS, distribuídas em tubos de ensaios 16x160mm, e incubadas estaticamente em atmosfera de microaerofilia (estufa com atmosfera de 10% de CO₂) a 37°C. A cada hora foram realizadas leituras das culturas homogeneizadas, e os valores da DO foram utilizados para construção das curvas de crescimento.

Além das medições da densidade óptica, foi determinado o número de UFC/ml em cada cultura, nos diferentes períodos. Para isso, as suspensões microbianas foram diluídas em série em solução salina fosfato-tamponada (PBS), e 25 µL foram semeados em triplicata em placas de ágar MRS e incubadas a 37°C por 48 horas, 10% CO₂. Após a incubação, foi realizada a contagem das colônias e determinado o número de UFC/mL. Foram realizados 2 ensaios independentes.

Para a construção da curva de crescimento da *Candida albicans* SC 5314, a levedura foi inoculada em SDA com cloranfenicol, seguindo-se incubação a 37°C por 24 h. Em seguida, as colônias foram inoculadas em 8 ml de meio caldo BHI (Brain Heart Infusion, Difco, Sparks, MD, EUA), em triplicata e incubadas a 37°C por 16 h. Após a incubação, a densidade óptica (DO_{495nm}) das culturas foi ajustada para valores ~ 1.0 Å. As culturas foram diluídas 1:10 em caldo BHI, aliquotadas em tubos de ensaios 16x160mm, e incubadas a 37°C. As leituras de absorbância e a determinação de UFC/mL foram feitas como descrito acima.

4.1.3 Preparo das Suspensões de *Candida albicans* e de Bactérias Probióticas

As cepas de bactérias probióticas testadas foram cultivadas em ágar MRS a 37°C, 10% CO₂ por 48 e 24 horas. Em seguida foram inoculadas em caldo MRS por 16 h, a 37°C e 10% de CO₂. Após este período, a cultura foi ajustada em 1 Å (DO_{495nm}). Em seguida foi feita uma diluição 1/10 em caldo MRS. Após atingir o meio da fase de crescimento exponencial (4-5 h dependendo da cepa) (item 4.1.2), as culturas foram centrifugadas (2.000 Xg por 10 min), e as células no precipitado lavadas duas vezes com PBS e resuspendidas em RPMI sem soro fetal bovino e sem antibiótico, obtendo-se uma suspensão com a concentração final de 2×10^8 UFC/mL.

Candida albicans SC 5314 foi cultivada em ágar BHI por 24 h a 37°C. Em seguida, a levedura foi inoculada em caldo BHI e incubada por 16 h a 37°C. Após este período, a suspensão foi ajustada em 1 Å (DO_{495nm}) e diluída 1/10 em caldo BHI. Após atingir o meio da fase de crescimento exponencial (cerca de 4 h), as culturas foram centrifugadas, e as células no precipitado lavadas com PBS por 2 vezes e resuspendidas em meio RPMI sem soro fetal bovino e sem antibiótico, a uma concentração de 6×10^6 UFC/mL.

4.1.4 Linhagem de Celular

A linhagem celular monocítica humana THP-1 foi cultivada em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB - Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), L-glutamina (concentração final: 2 mM); 1% piruvato de sódio (concentração final: 0.1 mM) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e 0,05 mM b-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), 11 mM bicarbonato de sódio, 10 mM Hepes (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e 1% penicilina/streptomicina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). As células foram mantidas em garrafas de cultura (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA), em estufa a 37°C, 5% CO₂, com repiques periódicos para manter a viabilidade celular. Para a realizações das trocas de meio de cultura, o conteúdo de uma garrafa (meio RPMI + THP-1) foi transferido para um tubo falcon de 50 ml e centrifugado a 800 Xg, 10°C por 5 min. Após a centrifugação, o meio de cultura foi removido, e as células no precipitado foram ressuspensas em RPMI e transferidas para outra garrafa.

4.1.5 Ensaio de Co-Cultura *C. albicans* e *Lactobacillus*

A Figura 4.1 descreve a sequência de eventos do ensaio de co-cultura de macrófagos com *C. albicans* e *Lactobacillus*. Células THP-1 foram inoculadas a poços em placas de 6-poços (Corning-Costar, Lowell, MA, EUA) na concentração de 2×10^6 céls/poço. A diferenciação em macrófagos (57, 222) foi obtida através do tratamento

das células com 100 ng/mL (223) de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) por 72 h (224). Após a diferenciação, as células foram lavadas duas vezes com PBS para a remoção das células não aderidas e do PMA residual. O meio de cultura foi substituído por RPMI 1640 sem SFB e antibiótico. As células foram incubadas por mais 24 h (37°C, 10% CO₂) (223).

Após a diferenciação das células THP-1, os macrófagos foram co-cultivados com a bactéria probiótica, LPS e/ou *C. albicans*, de acordo com a sua alocação nos seguintes grupos de estudo: Grupo THP-1 (somente macrófago); Grupo THP-1 + Probiótico (macrófago tratado com probiótico); Grupo THP-1 + LPS (macrófago desafiado com LPS); Grupo THP-1 + Probiótico + LPS (macrófago tratado com probiótico e desafiado com LPS); Grupo THP-1 + *Candida* (macrófago desafiado com *C. albicans*); Grupo THP-1 + Probiótico + *Candida* (macrófago tratado com probiótico e desafiado com *C. albicans*); Grupo THP-1 + (LPS) + *Candida* (macrófagos tratados com LPS e desafiado com *C. albicans*) e Grupo THP-1 + (LPS + Probiótico) + *Candida* (macrófagos tratados com LPS e probiótico, e desafiado com *C. albicans*).

Cada uma das três cepas de bactérias probióticas (*L. rhamnosus* LR32, *L. casei* L324m e *L. acidophilus* NCFM) foram testadas individualmente. Logo após a diferenciação dos monócitos THP-1, os macrófagos foram tratados com 50 µl da suspensão de bactéria probiótica sozinha (1 x 10⁷ UFC/poço), 50 µl de LPS (4 ng/µl) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), sozinho ou a combinação de ambos (50 µl de cada) por 12 h a 37°C, dependendo do grupo de estudo (224). Em seguida, os grupos específicos foram desafiados com 50 µl da suspensão de *C. albicans* (6 x 10⁶ blastosporos/ml) ou 50 µl da suspensão de LPS (4 ng/µl) e incubados por três horas a 37°C. Cada poço apresentou um volume total de 2 ml. Meio de cultura estéril (RPMI 1640 sem SFB e antibiótico) foi usado no lugar das suspensões de *Candida* e LPS nos grupos Grupos THP-1 e THP-1 + Probiótico, os quais não receberam nenhum desafio.

A produção de citocinas, a expressão relativa do gene *Clec7a* e a expressão do receptor Dectina-1 nos macrófagos foram determinadas após as três horas da incubação final. A viabilidade dos macrófagos foi também determinada através de exclusão por azul de tripan (225). Cada teste foi realizado em triplicata em ensaios individuais. Foram realizados pelos menos dois ensaios independentes, para determinar a reprodutibilidade dos ensaios.

Figura 4.1 – Linha do tempo do ensaio de co-cultura

A diferenciação de monócitos em macrófagos foi induzida pela estimulação por PMA durante 72 h. Após um período de descanso das células (24 h), probiótico, LPS ou ambos foram adicionados aos macrófagos. Após 12 h de pré-tratamento, as células foram desafiadas por *C. albicans* ou LPS. Análises para quantificação de citocinas e expressão gênica foram realizadas após 3 h de incubação.

4.1.6 Determinação do Perfil de Citocinas (ELISA)

As concentrações de TNF- α , IL-10, IL-12 (p70), IL-1 β e MCP-1 presentes no sobrenadante das culturas de macrófagos após três horas em co-cultura dos diferentes grupos de estudo foram determinadas por ELISA, seguindo o protocolo do fabricante (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Os níveis de citocina foram determinados após a comparação com uma curva padrão de calibração.

4.1.7 Determinação da Transcrição Relativa do Gene *Clec7a* (RTqPCR)

Os macrófagos nos poços das placas de 6 poços dos diferentes grupos de estudo foram lizados e o RNA total foi obtido usando-se o kit RNeasy (QIAGEN, Valencia, CA, EUA) de acordo com as especificações do fabricante. A transcrição reversa para síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit SuperScript VILO MasterMix (Invitrogen, Waltham, MA, EUA). O PCR em tempo real foi realizado no aparelho Step One Plus System (Applied Biosciences, Foster City, CA, EUA), usando iniciadores e sondas TaqMan complementares a *clec7a* (*Hs01902549_sl*) e ao gene controle *gapdh* (*Hs02758991_gl*). Taqman Gene Expression Master Mix foi usado nas reações de

PCR (Applied Biosciences, Foster City, CA, EUA) e 100 ng de cDNA foram utilizados em cada reação. O programa para a reação foi: 50°C por 2 min e 95°C por 10 min (95°C por 15 s, e 50°C por 1 min) por 40 ciclos. A transcrição relativa de *clec7a* foi determinada após a normalização dos dados pela análise da expressão de *gapdh* utilizando como molde o mesmo cDNA (112, 226).

4.2 EFEITO DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS SOBRE O BIOFILME DE *CANDIDA ALBICANS*

4.2.1 Desenho Experimental

O estudo envolveu duas etapas (Figura 4.2 e 4.3) (227). A primeira avaliou o efeito direto de células de bactérias probióticas sobre o biofilme de *C. albicans* (Figura 4.2). Suspensões de *Lactobacillus* foram adicionadas a *C. albicans* em dois diferentes momentos da formação do biofilme: fases de colonização inicial e maturação. A viabilidade celular após a incubação final foi determinada por determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC).

Na segunda etapa foram determinados os efeitos dos produtos bacterianos liberados no sobrenadante celular sobre a formação do biofilme de *C. albicans* (Figura 4.3). Após três diferentes períodos de incubação com sobrenadantes de bactérias probióticas (1,5 h, 25,5 h e 49,5 h), a viabilidade das células de *C. albicans* foi determinada por ensaio de redução de sal de tetrazólio (XTT).

A morfologia do biofilme de *C. albicans* submetido ao tratamento de probiótico foi determinada por microscopia de varredura por laser confocal (MVLC) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), e esta comparada à morfologia dos biofilmes controle, não tratados com probióticos.

4.2.2 Micro-Organismos e Condições de Cultivo

Candida albicans ATCC SC5314 e um isolado clínico de *C. albicans*, denominado *C. albicans* 75, foram usadas nesta segunda etapa do estudo. As mesmas três cepas de *Lactobacillus* descritas anteriormente (item 4.1.1) foram testadas. As condições de cultura e armazenamento são as mesmas descritas no item 4.1.1.

Previamente ao experimento, *C. albicans* e *Lactobacillus* foram cultivados em ágar SD (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e ágar BHI (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), respectivamente, por 24 h a 37°C, sendo que as cepas probióticas foram cultivadas em condições de anaerobiose estrita. A seguir, *Candida* e *Lactobacillus* foram inoculados em caldos SD e BHI, respectivamente, e incubados a 37°C por 18 h sob agitação, sendo que atmosfera anaeróbica foi utilizada para os *Lactobacillus*. Após a incubação, as suspensões foram centrifugadas (2,000 Xg por 5 min), lavadas duas vezes com PBS e resuspendidas em caldo BHI. As concentrações de ambos os micro-organismos foram ajustadas para 1×10^7 céls/mL através de um espectrofotômetro. As suspensões de *Lactobacillus* foram diluídas em série (1:2), variando de 1×10^7 a $6,25 \times 10^5$ céls/mL.

4.2.3 Formação do Biofilme de *C. albicans*

Placas de poliestireno de 96-poços, com fundo plano, pré-esterilizadas (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA) foram usados para desenvolver o biofilme fúngico. Primeiramente, 100 µl de uma suspensão de *C. albicans* (1×10^7 céls/mL) foram transferidos para cada poço. A placa foi incubada por 1,5 h a 37°C, sob agitação (80 rpm), para promover a adesão celular à superfície dos poços. Após a incubação, o sobrenadante foi removido e cada poço foi lavado duas vezes com PBS para remoção das células não aderidas. Um total de 200 µl de caldo BHI foi adicionado a cada poço e a placa foi incubada novamente por 6 h ou 24 h, dependendo do grupo de estudo (228). A incubação final do biofilme de *C. albicans* com a suspensão ou o sobrenadante de *Lactobacillus* spp. variou em 18 h ou 24 h, totalizando 7,5 h, 25,5h e 49,5h de formação do biofilme de *C. albicans*.

4.2.4 Ensaio de Interação Celular Fungo-Probiótico

Cada uma das três cepas de *Lactobacillus* foi testada sobre biofilmes de *C. albicans* ATCC SC5314 e *C. albicans* 75. O biofilme fúngico foi desenvolvido por 7,5 h e 25,5 h, em placas de 96-poços (Figura 4.2). Em seguida, o sobrenadante do biofilme foi aspirado, e um total de 100 µl de BHI estéril e 100 µl de suspensões de celular de *Lactobacillus* em diferentes concentrações (1×10^7 , 5×10^6 , $2,5 \times 10^6$, $1,25 \times 10^6$ e $6,25 \times 10^5$ UFC/ml) foram adicionados individualmente aos poços (228). As placas com biofilmes de *C. albicans* com 7,5 h e 25,5 h foram incubadas por mais 18 h e 24 h, respectivamente, a 37°C, 80 rpm. Caldo BHI estéril foi usado como controle no lugar da suspensão de probiótico. Após a incubação final, os poços foram lavados duas vezes com PBS e a viabilidade das células de *C. albicans* foi determinada através da determinação do número de UFC em placas de SDA. O pH do sobrenadante das co-culturas (1×10^7 UFC de *Lactobacillus*/ml e *C. albicans* SC5214) foi monitorado durante as fases de colonização inicial (9-18 h de co-cultura) e de maturação (8-24 h de co-cultura).

Figura 4.2 – Linha do tempo do ensaio de co-cultura *Lactobacillus* e *Candida*

Suspensões de *L. rhamnosus*, *L. casei* e *L. acidophilus*, em cinco concentrações diferentes, foram adicionadas ao biofilme de *C. albicans* durante a sua fase de colonização inicial ou no início da fase de maturação. Ao final de cada uma das fases foi feita a quantificação da viabilidade de *C. albicans*.

4.2.5 Ensaio com Sobrenadante de Biofilme Bacteriano

Biofilmes de *L. rhamnosus* foram obtidos através da inoculação de 3 ml/poço de suspensão bacteriana com concentração inicial de 1×10^7 UFC/ml, em placas de 6-poços (Corning Incorporated, Nova York, NY, EUA), e incubação anaeróbica a 37 °C, 80 rpm, por 1,5 h. Após a incubação, o sobrenadante Fase-1 foi coletado. Alternativamente, os sobrenadantes Fase-2 e Fase-3 foram coletados de biofilmes cultivados com suspensões de *L. rhamnosus* com uma concentração inicial de 1×10^6 UFC/ml, após incubação por 24 h e 48 h, respectivamente. Os sobrenadantes livres de células foram obtidos através de centrifugação seguindo-se filtração através de filtros de membrana 0,2 µm (Life Sciences, Ann Arbor, MI, EUA). Todos os sobrenadantes foram preparados no momento da sua utilização e a esterilidade foi confirmada através da quantificação das unidades formadoras de colônia.

Este ensaio foi realizado para avaliar o efeito de sobrenadantes de *L. rhamnosus* sobre as fases de adesão celular (T^1), colonização inicial (T^2) e maturação (T^3) da formação do biofilme de *Candida*. Os sobrenadantes probióticos obtidos na Fase-1, Fase-2 e Fase-2 foram adicionados aos biofilmes de *C. albicans* ATCC SC5314 em placas de 96-poços. No T^1 , células de *C. albicans* foram ressuspensas no sobrenadante probiótico na concentração 1×10^7 UFC/ml, e alíquotas de 100 µl dessas suspensões foram adicionadas nos poços e incubadas por 1,5 h (37 °C, 80 rpm). No T^2 , os sobrenadantes de *L. rhamnosus* (200 µl/poço) foram adicionados aos biofilmes de *Candida* com 1,5 h de idade e incubados por 24 h (37 °C, 80 rpm). No T^3 , os sobrenadantes de *L. rhamnosus* (200 µl/poço) foram adicionados aos biofilmes de *Candida* com 25,5 h e incubados por 24 h (37 °C, 80 rpm). BHI estéril foi usado no lugar do sobrenadante de *L. rhamnosus* como controle.

A análise quantitativa do biofilme foi realizada através de ensaio de redução de XTT para medir a atividade metabólica dos biofilmes (228). O sobrenadante celular foi removido, e os poços foram lavados duas vezes com PBS para remover as células não aderidas. Um total de 79 µL de PBS, 20 µL de solução de XTT (1 mg/mL) e 1 µL de solução de menadione (0,4 mM) foram adicionados a cada poço, seguindo-se incubação no escuro por 3 h a 37 °C. Após a incubação, a solução resultante de cada poço foi transferida para um poço limpo. A leitura foi realizada por espectrometria em leitor de microplacas (Spectra Max 340 tunable microplate reader; Molecular Devices

Ltd, Sunnyvale, CA, EUA) ajustado em comprimento de onda de 492 nm. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

Figura 4.3 – Linha do tempo do ensaio com sobrenadante de *L. rhamnosus*

Sobrenadantes do biofilme de *L. rhamnosus*, coletados em diferentes tempos (1,5 h, 24 h e 48 h), foram adicionados ao biofilme de *C. albicans* no início de cada fase do seu desenvolvimento (adesão, colonização inicial e maturação). Ao final de cada fase, a viabilidade das células de *C. albicans* foi determinada por ensaio de XTT.

4.2.6 Análise Microscópica

4.2.6.1 Microscopia de varredura por laser confocal (MVLC)

O biofilme de *Candida albicans* ATCC SC5314 foi cultivado sobre discos plásticos previamente esterilizados (1 cm de diâmetro; Thermanox plastic cover slips; Nulge Nunc International, Rochester, NY, EUA), dispostos em poços de placas de 24-poços. Neste experimento de análise macroestrutural do biofilme de *Candida*, os sobrenadantes de *L. rhamnosus* (Fase-2 e Fase-3) foram adicionados aos biofilmes de *C. albicans* nas fases de adesão (T¹) e colonização inicial (T²) (Figura 4.4a). Além

disso, a suspensão de *L. rhamnosus* (1×10^7 céls/ml) foi adicionada ao biofilme de *Candida* formado por 7,5 h, como descrito anteriormente (Figura 4.4b). Nos grupos controle, BHI estéril foi usado em vez do sobrenadante de *L. rhamnosus* ou da suspensão bacteriana. Os biofilmes foram corados com SYTO[®] 9 e iodeto de propídeo (Live/Dead BacLight Bacterial Viability kit; Invitrogen, Eugene, OR, EUA)(229), seguindo o protocolo do fabricante. Os biofilmes corados foram então analisados com microscópio de varredura por laser confocal Nikon C2 (Nikon Corp., Tokyo, Japão).

Figura 4.4 - Linha do tempo de ensaios com microscopia

a)

b)

(a) ensaio com sobrenadante de *L. rhamnosus*. (b) ensaio com suspensão de *L. rhamnosus*. Nestes ensaios, os sobrenadantes Fase-2 e Fase-3 foram testados sobre o biofilme de *C. albicans* nas fases de adesão e colonização inicial (a). Somente a suspensão mais concentrada de *L. rhamnosus* foi testada durante a fase de colonização inicial do biofilme de *C. albicans* (b).

4.2.6.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Biofilmes de *C. albicans* (ATCC SC5314) na fase de colonização inicial (7,5 h), com e sem tratamento com suspensões de *L. rhamnosus* (1×10^7 céls/ml) (Figura 4.4b), foram cultivados sobre discos plásticos previamente esterilizados (1 cm de diâmetro; Thermanox plastic cover slips; Nulge Nunc International, Rochester, NY, EUA), fixados em glutaraldeído a 4% por 30 min e secos por congelamento. As amostras foram cobertas com uma camada de ouro e visualizadas um microscópio eletrônico de varredura Sigma VP (Carl Zeiss Inc., Oberkocken, Alemanha), em um modo de alto-vácuo de 10 kV.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

One-way ANOVA com teste de Tukey de Comparação múltipla foi usado para determinar a diferença significativa entre os grupos do ensaio de co-cultura (item 4.1.5) e do ensaio de interação celular fungo-probiótico (item 4.2.4). Teste T foi usado para comparar as médias de valores de XTT entre os grupos controles e testes no ensaio com sobrenadantes de biofilme bacteriano (item 4.2.5). Os dados foram apresentados como média $\pm$ DP, considerando $p < 0,05$ para diferenças estatisticamente significantes (GraphPad Prism® Version 6.0c – GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 CURVAS DE CRESCIMENTO

As curvas de crescimento da amostra de *Candida albicans* SC 5314 (figura 5.1) mostram que o meio da fase de crescimento exponencial ocorre após 4 horas de cultivo. Foi também determinado que a concentração de 1×10^7 células viáveis/mL corresponde à absorbância 0,450-0,500 Å.

Figura 5.1– Valores de Densidade óptica (DO) a 495 nm obtidos de cultura de *Candida albicans* SC5314 em diferentes intervalos de tempo

As curvas de crescimento das amostras de *Lactobacillus* são apresentadas na Figura 5.2. Para todas as bactérias utilizadas, o meio da fase exponencial de crescimento ocorreu após 4 a 5 horas de cultivo. A concentração de 2×10^8 UFC/mL foi obtida na absorbância 0,510 Å para *Lactobacillus rhamnosus* LR32; 0,890 Å para *Lactobacillus casei* L324m e 1,155 Å para *Lactobacillus acidophilus* NCFM.

Figura 5.2 – Valores de Densidade óptica (DO) a 495 nm obtidos de cultura de cepas de *Lactobacillus* em diferentes intervalos de tempo

5.2 VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS DESAFIADOS COM LPS E/OU *C. ALBICANS* APÓS CO-CULTURA COM CEPAS PROBIÓTICAS

Os macrófagos permaneceram viáveis após o contato com as bactérias probióticas, LPS e *C. albicans*, como mostra a Figura 5.3, no ensaio testando *L. rhamnosus* LR32 como cepa probiótica. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) no número de células de macrófagos viáveis entre os grupos THP-1 + LPS; THP-1 + (Probiótico) + LPS; THP-1 + *Candida*; THP-1 + (Probiótico) + *Candida*; THP-1 + (LPS) + *Candida*; THP-1 + (LPS + Probiótico) + *Candida*. Não houve também diferença estatisticamente significativa para as outras duas cepas de *Lactobacillus* testadas.

Figura 5.3 – Número de células THP-1 viáveis determinado por exclusão por azul de trypan

Os dados mostrados são do ensaio utilizando *L. rhamnosus* LR32 como bactéria probiótica. One-way ANOVA com teste de Tukey de Comparação múltipla foi usado para análise. Dados apresentados como média $\pm$ DP ($p < 0,01$).

5.3 PROBIÓTICOS ALTERAM O PERFIL DE CITOCINAS DE MACRÓFAGOS DESAFIADOS COM LPS E/OU *C. ALBICANS*

A análise de produção de citocinas revelou que o desafio por *C. albicans* isoladamente não foi capaz de induzir significativamente ($p > 0,05$) a produção de TNF- α , IL-12 e MCP-1. Os macrófagos desafiados com LPS tiveram aumento significativo ($p < 0,05$) na produção de todas as citocinas estudadas, com exceção de MCP-1. Por

outro lado, o pré-tratamento dos macrófagos com LPS, antes do desafio com *C. albicans*, resultou em um significativo aumento ($p < 0,05$) na produção de todas as cinco citocinas, TNF- α , IL-10, IL-1 β , MCP-1 e IL-12, quando comparado com o controle formado por macrófagos não estimulados ou com o grupo desafiado somente com *C. albicans* (Figura 5.4).

A co-cultura de macrófagos somente com cepas probióticas (grupo THP-1 + Probiótico) provocou um aumento na produção de todas as citocinas, com exceção de IL-12, quando comparado com o grupo somente de macrófagos não estimulados (grupo THP-1). As três cepas de probióticas testadas (*L. rhamnosus*, *L. casei* ou *L. acidophilus*) induziram um aumento significativo na produção de TNF- α e IL-1 β ($p < 0,05$), tendo uma variação na produção dependendo da cepa de *Lactobacillus* testada.

O pré-tratamento com probióticos em macrófagos desafiados com LPS (grupo THP-1 + Probiótico + LPS) provocou aumento na produção IL-10, IL-1 β , MCP-1 e IL-12 em comparação com o grupo somente desafiado com LPS (grupo THP-1 + LPS), sendo que o aumento não foi significativo ($p > 0,05$) para IL-10 no grupo pré-tratado com *L. rhamnosus* e para IL-12 nos grupos com *L. rhamnosus* e *L. casei*. Por outro lado, as bactérias probióticas não foram capazes de alterar a produção de TNF- α após o desafio com LPS (Figura 5.5a).

Por sua vez, o pré-tratamento com probióticos em macrófagos desafiados com *C. albicans* (grupo THP-1 + Probiótico + *C. albicans*) provocou aumento de TNF- α , IL-10, IL-1 β , MCP-1, mas reduziu os níveis de IL-12, quando comparados com o grupo THP-1 + *C. albicans*. As três cepas probióticas aumentaram significativamente ($p < 0,05$) os níveis de TNF- α , IL-1 β e MCP-1 (Figuras 5.5a, 5.5c e 5.5d). A redução de IL-12 foi significativa somente com a adição dos probióticos *L. casei* e *L. acidophilus* (Figura 5.5e).

Quando os macrófagos foram pré-tratados, simultaneamente, com LPS e probióticos, e desafiados com *C. albicans* (grupo THP-1 + (LPS + Probiótico) + *C. albicans*), os níveis de IL-10 no sobrenadante aumentaram enquanto os níveis de IL-12 reduziram significativamente ($p < 0,05$) para todos os três *Lactobacillus* testados, em comparação com o grupo correspondente sem probiótico (grupo THP-1 + (LPS) + *C. albicans*). Além disso, a adição do probiótico a estes macrófagos que receberam LPS e *C. albicans* não alterou os níveis de TNF- α , resultado semelhante ao obtido

com o grupo THP-1 + Probiótico + LPS (Figura 5.5a). *L. rhamnosus* e *L. acidophilus* foram ainda associadas a uma redução significativa ($p < 0,05$) da produção de MCP-1 e aumento de IL-1 β no sobrenadante celular.

Figura 5.4 – Níveis de citocinas TNF- α (a), IL-10 (b), IL-1 β (c), MCP-1 (d) e IL-12 (e) produzidas por macrófagos após desafio por LPS, *C. albicans* ou pré-tratamento com LPS e desafio por *C. albicans*

Valores dados em relação à produção de citocinas por macrófagos sem desafio (controle). Teste ANOVA seguido de teste de Tukey de múltipla comparação foi usado para a análise estatística. Dados são apresentados como média $\pm$ DP de três ensaios independentes. * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$).

Figura 5.5 – Produção de citocinas determinada por ELISA a partir de sobrenadante de macrófagos

a) TNF- α

b) IL-10

c) IL-1 β

Oito diferentes grupos foram realizados para cada cepa bacteriana testada, diferindo na presença ou ausência de bactéria probiótica, LPS e/ou *C. albicans*. Três diferentes cepas de probióticos foram usadas: *Lactobacillus rhamnosus* LR32, *Lactobacillus casei* L324m e *Lactobacillus acidophilus* NCFM. TNF- α (a), IL-10 (b), IL-1 β (c), MCP-1 (d) e IL-12 (e) foram quantificados em cada experimento. Teste ANOVA seguido de teste de Tukey de múltipla comparação foi usado para a análise estatística. Dados são apresentados como média $\pm$ DP de ensaios independentes. * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$).

Continua

Conclusão

Figura 5.5 – Produção de citocinas determinada por ELISA a partir de sobrenadante de macrófagos

d) MCP-1

e) IL-12

5.4 BACTÉRIAS PROBIÓTICAS REDUZEM A TRANSCRIÇÃO RELATIVA DO GENE *CLEC7A* EM MACRÓFAGOS

O nível de transcritos do gene *Clec7a*, o qual codifica o receptor Dectina-1, foi quantificado nos oito grupos de estudo realizados, usando as três cepas de *Lactobacillus* probióticos. A comparação do perfil de expressão gênica em macrófagos pré-tratados ou não com bactérias probióticas revelou que os probióticos reduziram a transcrição relativa do gene *clec7a* (Figura 5.6). Nestes resultados, os grupos THP-1, THP-1 + LPS, THP-1 + *C. albicans* e THP-1 + LPS + *C. albicans* foram normalizados para o valor 1, sendo os outros grupos expressos em relação ao respectivo valor de referência. O contato dos macrófagos com as três bactérias probióticas promoveu uma redução significativa ($p < 0,0001$) na transcrição do gene em relação ao grupo com macrófagos não desafiados (grupo THP-1). A transcrição do gene nos grupos desafiados com LPS também foi reduzida após o pré-tratamento com as cepas de *Lactobacillus*. Por sua vez, nos grupos desafiados por *C. albicans*, o pré-tratamento com as bactérias probióticas reduziu de forma significativa ($p < 0,0001$) a transcrição relativa de *clec7* em macrófagos desafiados somente com *C. albicans* (THP-1 + Probiótico + *C. albicans*) e também naqueles pré-tratados com LPS e desafiados com *C. albicans* (THP-1 + (LPS + probiótico) + *C. albicans*).

Figura 5.6 –Transcrição relativa do gene *clec7a* nos diferentes grupos de estudo: grupo THP-1 (ausência de desafio), grupo THP-1 + LPS (desafio com LPS), grupo THP-1 + *C. albicans* (desafio com *C. albicans*) e grupo THP-1 + LPS + *C. albicans* (pré-tratamento com LPS seguido do desafio com *C. albicans*), após tratamento com *L. rhamnosus* LR32, *L. casei* L324m ou *L. acidophilus* NCFM

O nível de transcritos de *clec7a* foi normalizado em relação aos níveis de transcritos do gene de referência *gapdh*. Os valores obtidos para células THP-1 sem tratamento com probiótico (controle), submetidas ou não ao desafio com LPS e/ou *C. albicans*, foram estabelecidos como um valor de 1. O efeito dos probióticos é relatado como número de vezes em relação a cada condição controle. One-way ANOVA seguido de teste de Tukey de múltipla comparação foi usado para a análise estatística. Dados são apresentados como média $\pm$ DP de ensaios independentes. * ($p < 0,0001$).

5.5 SUSPENSÕES PROBIÓTICAS INTERFEREM NA FORMAÇÃO DO BIOFILME DE *C. ALBICANS*, MAS NÃO ALTERAM SIGNIFICATIVAMENTE O PH DO MEIO

Em uma avaliação quantitativa, as suspensões de *L. rhamnosus* LR32, *L. casei* L324m e *L. acidophilus* NCFM reduziram significativamente ($p < 0,05$) os níveis de UFC de *C. albicans* SC5314 no biofilme, durante os intervalos 24 h e 48 h (Figuras 5.7A, 5.7B, 5.7C). Estes resultados sugerem que a presença de células de *Lactobacillus* pode inibir a colonização inicial de *C. albicans* e suprimir o desenvolvimento de um biofilme maduro. No entanto, não foi encontrada relação entre a concentração das suspensões probióticas e os efeitos inibitórios ($p > 0,05$), sugerindo que a máxima atividade inibitória conseguiu ser obtida mesmo nas concentrações mais baixas de bactérias probióticas.

Por outro lado, as duas menores concentrações de todas as suspensões probióticas testadas ($1,25 \times 10^6$ e $6,25 \times 10^5$ céls/ml) não apresentaram efeitos significantes ($p > 0,05$) sobre o número de células do biofilme de *C. albicans* 75, durante ambos os intervalos 25,5 e 49,5 (Figura 5.7D, 5.7E, 5.7F). Tal fato sugere que este isolado clínico de *Candida* é menos susceptível à atividade inibitória promovida pelo *Lactobacillus*, em comparação com a cepa *C. albicans* SC5314. Além disso, um efeito inibitório significativo ($p < 0,05$) sobre a fase de maturação do biofilme de *C. albicans* 75 foi somente observado com a maior concentração de *L. acidophilus* (1×10^7 céls/ml; Figura 5.7F). Já o efeito inibidor promovido pelo *L. rhamnosus* e *L. casei* foi também observado na concentração 5×10^6 céls/ml, além da concentração mais alta, durante a mesma fase (Figura 5.7D, 5.7E).

A redução nos níveis de células viáveis de *C. albicans* nos biofilmes foi maior com todos os probióticos testados na maior concentração da suspensão (1×10^7 céls/ml) (Tabela 5.1). O efeito do *L. rhamnosus* contra *C. albicans* ATCC SC5314 foi significativamente maior ($p < 0,05$) durante a fase de maturação do biofilme de *Candida* (29,8% maior) em comparação com a fase de colonização inicial. Por outro lado, *L. acidophilus* mostrou um efeito significativamente menor ($p < 0,05$) sobre os biofilmes de 48 h (21,1% menor) quando comparado com os biofilmes de 24 h. Nenhuma diferença ($p > 0,05$) foi observada para *L. casei* entre os dois intervalos avaliados. Contra *C. albicans* 75, as porcentagens de redução do biofilme não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$) entre as fases de colonização inicial e de

maturação para todas as três espécies de *Lactobacillus* testadas. Em geral, todas as três bactérias probióticas demonstraram um melhor efeito anti-biofilme contra *C. albicans* SC5314 em comparação com o isolado clínico. Esses resultados indicam que o efeito probiótico dos *Lactobacillus* é cepa bacteriana-específico e cepa fúngica-específico.

A co-cultura de *C. albicans* com as três cepas de *Lactobacillus* testadas promoveram a redução do pH do sobrenadante das co-culturas, quando comparadas com a cultura controle inoculada somente com *C. albicans*. No entanto, as diferenças no pH entre as co-culturas não foram estatisticamente significantes ($p>0,05$), em todos os tempos de análise (Figura 5.8). Além disso, o valor do pH do sobrenadante aumentou significativamente ($p<0,05$) com o passar do tempo de incubação em todos os grupos de estudo, durante as fases de colonização inicial e de maturação do biofilme de *C. albicans*.

Figura 5.7 – Viabilidade de *C. albicans* durante as fases de colonização inicial (24 h) e de maturação (48 h) da formação do biofilme de *Candida* após tratamento com suspensão de bactérias probióticas, determinada através de quantificação de unidades formadoras de colônia (UFCs)

(A, B, C) Biofilme de *C. albicans* ATCC SC5314. (D, E, F) Biofilme de *C. albicans* 75. One-way ANOVA seguido de teste de Tukey de múltipla comparação foi usado para a análise estatística. Dados são apresentados como média $\pm$ DP de ensaios independentes. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,005$), *** ($p < 0,001$).

Tabela 5.1 – Porcentagem de redução de viabilidade de *C. albicans* nos biofilmes após tratamento com suspensão de bactéria probiótica (1×10^7 céls/ml), durante as fases de colonização inicial (24 h) e maturação (48 h)

Cepas probióticas	Redução de células viáveis no biofilme (%)							
	<i>C. albicans</i> ATCC SC5314				<i>C. albicans</i> 75			
	Colonização Inicial		Maturação		Colonização Inicial		Maturação	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
<i>L. rhamnosus</i> LR32	32,0	6,4	61,8*	8,3	31,8	12,2	39,8	6,2
<i>L. casei</i> L324m	59,0	6,9	54,7	4,6	27,7	5,0	36,6	3,3
<i>L. acidophilus</i> NCFM	56,3	4,2	34,2*	7,0	27,4	5,5	25,5	9,1

* Diferença significativa entre as fases de colonização inicial e maturação ($p < 0,05$).

Figura 5.8 – Variação do pH dos sobrenadantes do biofilme de *C. albicans* SC5314 após incubação com suspensão de *Lactobacillus* (1×10^7 céls/ml)

L. rhamnosus LR32, *L. casei* L324m e *L. acidophilus* NCFM foram testados e o pH determinado em diferentes intervalos de tempo, durante as fases de colonização inicial e de maturação do biofilme de *C. albicans*. Dados apresentados como média $\pm$ DP. * ($p < 0,05$).

5.6 EFEITO DO SOBRENADANTE PROBIÓTICO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO BIOFILME DE *C. ALBICANS*

O sobrenadante coletado do biofilme de *L. rhamnosus* com 1,5 h (Fase-1) não apresentou efeito sobre nenhuma das três fases da formação de biofilme de *C. albicans* ($p > 0,05$) (Figuras 5.9A, 5.9B, 5.9C). Por outro lado, os sobrenadantes coletados do biofilme de *L. rhamnosus* com 24 h (Fase-2) e 48 h (Fase-3) de idade inibiram significativamente ($p < 0,01$) o crescimento do biofilme de *C. albicans* durante o intervalo 0 – 1,5 h (fase de adesão) (Figura 5.9A) e durante 1,5 h - 24 h (fase de colonização inicial) (Figura 5.9B). Esses resultados sugerem que os metabólitos produzidos pelos *Lactobacillus* podem inibir a formação e desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*.

Todos os três tipos de sobrenadantes probióticos não inibiram o crescimento do biofilme de *Candida* ($p > 0,05$) durante a sua fase de maturação (24 h – 48 h) (Figura 5.9C), sugerido que nenhum produto bacteriano solúvel capaz de impactar no biofilme de *C. albicans* maduro foi liberado no meio.

Figura 5.9 – Efeitos do sobrenadante de *L. rhamnosus* LR32 sobre biofilmes de *C. albicans* ATCC SC5314, determinados por ensaio de redução de XTT

(A) Efeitos dos sobrenadantes Fase-1 (1,5 h), Fase-2 (24 h) e Fase-3 (48 h) sobre biofilmes de *C. albicans* T^1 (0 – 1,5 h). (B) Efeitos dos sobrenadantes Fase-1, Fase-2 e Fase-3 sobre biofilmes de *C. albicans* T^2 (1,5 h – 24 h). (C) Efeitos dos sobrenadantes Fase-1, Fase-2 e Fase-3 sobre biofilmes de *C. albicans* T^3 (24 h – 48 h). Valores apresentados como média $\pm$ DP (n=3). * ($p < 0,01$).

5.7 MICROSCOPIA DE VARREDURA POR LASER CONFOCAL

Ao final da fase de adesão (1,5 h), as imagens obtidas por microscopia confocal revelaram uma redução de blastosporos de *C. albicans* ATCC SC5314 após o tratamento com o sobrenadante do biofilme de *L. rhamnosus*, confirmando os resultados do ensaio com redução de XTT (Figuras 5.10b e 5.10c). O biofilme apresentou uma arquitetura pobre e uma redução na formação de hifas, após o tratamento com o sobrenadante probiótico (Figura 5.10c), em comparação com o grupo controle (Figura 5.10a).

No final da fase de colonização inicial (24 h) do biofilme de *C. albicans*, uma significativa redução na transição levedura-hifa foi observada quando o biofilme foi tratado com sobrenadante de *L. rhamnosus*. Blastosporos (fase de levedura) de *C. albicans* predominaram no biofilme cultivado com o sobrenadante probiótico (Figuras 5.10e e 5.10f). Já o biofilme controle de *C. albicans* apresentou basicamente estruturas filamentosas e esparsos brotamentos fúngicos (Figura 5.10d).

Em ambas as fases de desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* avaliadas por microscopia confocal, a inibição da adesão de células fúngicas e da formação de hifas foi mais evidente e potente com a adição do sobrenadante de *Lactobacillus* na Fase-3 (Figura 5.10c e 5.10f), em comparação com o sobrenadante Fase-2 (Figura 5.10b e 5.10d). Este resultado sugere que o sobrenadante coletado de células probióticas mais velhas apresentou uma maior concentração de produtos inibitórios capaz de modificar a arquitetura do biofilme de *C. albicans*.

Por sua vez, a adição de suspensões de *L. rhamnosus* ao biofilme de *C. albicans* durante a sua fase de colonização inicial inibiu a filamentação da levedura. O biofilme tratado com probiótico (Figura 5.10f) apresentou uma predominância de leveduras sobre as hifas. Já o biofilme controle (Figura 5.10e) apresentou uma distribuição mais densa de células filamentosas. Efeitos similares foram observados com os sobrenadantes probióticos (Figura 5.11f).

Figura 5.10 – Imagens de microscopia de varredura por laser confocal (MVLC)

Células vivas foram coradas em verde e as mortas em vermelho. (a – c) Biofilmes de *C. albicans* ATCC SC5314 com 1,5 h de desenvolvimento (40x): (a) grupo controle; (b) tratado com sobrenadante de *L. rhamnosus* Fase-2 (24 h); (c) tratado com sobrenadante de *L. rhamnosus* Fase-3 (48 h). Note uma arquitetura pobre no biofilme dos grupos testes, e a inibição da adesão de células de *C. albicans* e formação de hifas pelo sobrenadante, em comparação com o controle. Quanto maior a concentração do sobrenadante, mais evidente foi a inibição. (d – f) Biofilmes de *C. albicans* ATCC SC5314 com 24 h de desenvolvimento (40x): (d) grupo controle; (e) tratado com sobrenadante de *L. rhamnosus* Fase-2 (48 h); (f) tratado com sobrenadante de *L. rhamnosus* Fase-3 (48 h). Note a forte inibição da transição levedura-hifa pelo sobrenadante de *Lactobacillus*, especialmente o de 48 h, em comparação com o controle.

5.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Após 18 h de incubação com células de *L. rhamnosus* LR32, o biofilme de *C. albicans* (Figuras 5.11c e 5.11d) apresentou menor quantidade de hifas em comparação com o grupo controle (Figuras 5.11a e 5.11b). Uma arquitetura estratificada, com grandes canais de água distribuídos (figura 5.11c), e brotamentos celulares nas superfícies das leveduras (Figura 5.11d) foram observados por todo o biofilme tratado com células probióticas após 18 h. O grupo controle exibiu uma alta densidade de hifas, com canais de água menores em número e tamanho (Figuras 5.11a e 5.11b). Células de *Lactobacillus* foram encontrados em íntimo contato com células de *Candida*, circundando hifas e leveduras (Figuras 5.11c e 5.11d).

Figura 5.11 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (SEM) de biofilmes de *C. albicans* ATCC 5314 durante a fase de colonização inicial (a – d) e imagens de microscopia de varredura por laser confocal (MVLC) de biofilmes de *C. albicans* ATCC SC5314 durante a fase de colonização inicial (e – f)

(a & b) Grupo controle sem tratamento com células probióticas. (c & d) Grupo experimental tratado com suspensão de *L. rhamnosus* por 18 h. Densa formação de hifas pode ser visualizado no grupo controle (b), com canais de água relativamente pequenos dispersos na arquitetura do biofilme (a). No grupo experimental, grandes canais de água e mais levedura estão distribuídos no biofilme de *C. albicans* (c). Células de *L. rhamnosus* (seta preta) estão dispersas por todo o biofilme, e muitos brotamentos estão presentes nas superfícies das leveduras (seta branca) (d). (e) Grupo controle sem tratamento com células probióticas. (f) Grupo tratado com suspensões de *L. rhamnosus*. Note menor formação de hifa após co-cultura com o probiótico.

6 DISCUSSÃO

A eficácia do uso de certas cepas de bactérias probióticas na redução da colonização oral por *C. albicans* já foi demonstrada em modelo animal (38) e em seres humanos (177). Estudos *in vitro* (Tabela 2.1) dão subsídio científico para os testes clínicos de probióticos contra infecções por *Candida*, uma vez que demonstram o efeito candidicida e a capacidade de interferir nos fatores de virulência da *C. albicans* (161, 169).

Diversas hipóteses sobre os mecanismos de ação das bactérias probióticas já foram levantadas, como descrito na introdução, sendo esta atividade muito provavelmente multifatorial. No entanto, estes mecanismos não estão totalmente elucidados. Ainda não está claro se a interferência no desenvolvimento de biofilmes fúngicos é dependente de um contato direto entre as células de *Candida* e as bactérias probióticas e/ou da liberação de exometabólitos pelos probióticos. Outro ponto ainda pouco aprofundado é o efeito dos probióticos sobre o sistema imune do hospedeiro, seja ele inato ou adaptativo. Neste cenário, a nossa pesquisa procurou trazer novos esclarecimentos em relação a esses dois possíveis mecanismos de ação dos probióticos contra infecções por *C. albicans*, especialmente na mucosa oral. O presente estudo *in vitro* foi dividido em duas partes: ensaios em cultura celular e ensaios com biofilmes microbianos.

Os ensaios em cultura celular objetivaram verificar o efeito da interação entre *L. rhamnosus* LR32, *L. casei* L324m e *L. acidophilus* NCFM sobre macrófagos humanos, após desafio por *C. albicans* e LPS bacteriano. Macrófagos são associados à resposta contra infecções fúngicas, inata e adaptativa, pela sua capacidade fagocítica e produção de mediadores inflamatórios (83).

Estudos prévios mostraram que *Lactobacillus* podem suprimir a produção de algumas citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α , IL-6 e MCP-1 (224). Além disso, certas cepas deste gênero são capazes de promover a modulação da resposta imune, pela regulação de genes que codificam TNF- α e MCP-1 em células THP-1 estimuladas por LPS (230). No entanto, a resposta de macrófagos contra *C. albicans* é distinta da induzida por LPS, pois diferentes moléculas são reconhecidas pelos receptores do hospedeiro. Além disso, não se pode esperar que o padrão de citocinas

produzidas pelos macrófagos estimulados apenas por *C. albicans* seja igual ao de macrófagos desafiados apenas com LPS ou a combinação de ambos (57).

Os nossos resultados revelam a maior ativação de vias pró-inflamatórias com o reconhecimento de *C. albicans* na presença de LPS, uma vez que todas as citocinas avaliadas no presente estudo (TNF- α , IL-10, IL-1 β , MCP-1 e IL-12) apresentaram maior nível nesta condição, quando comparadas com o grupo desafiado somente com *C. albicans* ou somente com LPS, exceto para TNF- α e IL-12 no desafio com LPS (Figura 5.4). Estudo prévio relatou que a presença de LPS é capaz de aumentar a expressão do receptor Dectina-1, aumentando assim o reconhecimento de *Candida* (57). Os nossos resultados estão ainda de acordo com relatos de que *C. albicans* regula positivamente a transcrição de genes codificadores de mediadores inflamatórios em células monocíticas THP-1, entre eles TNF- α (225). Assim, estas evidências demonstram o favorecimento de um processo inflamatório na presença de *C. albicans* corroborado pelo biofilme misto contendo LPS. Este quadro inflamatório prolongado na mucosa, do ponto de vista clínico, facilitaria a infiltração das hifas e consequentemente o desenvolvimento da candidíase.

A diferença no reconhecimento de células de *C. albicans* na presença ou ausência de LPS provavelmente deve-se ao fato de que o receptor Dectina-1 é pouco expresso na superfície do macrófago “inativo”, ou seja, que não tiveram contato prévio com LPS ou outras PAMPS (57). Assim, os dados sugerem que *C. albicans* não ativa os macrófagos e quando as células de *C. albicans* são adicionadas ao meio com macrófagos não ativados, estes não reconhecem o fungo e consequentemente não há produção de mediadores inflamatórios.

A capacidade das bactérias probióticas modularem a liberação de mediadores inflamatórios foi demonstrada no presente estudo em diferentes situações. Primeiramente, pode-se verificar que a presença dos probióticos por si só já é capaz de aumentar a produção das citocinas avaliadas, principalmente TNF- α . Um estudo prévio também já havia evidenciado que *Lactobacillus* são capazes interferirem na produção e liberação de citocinas pró- e anti-inflamatórias por macrófagos diferenciados de células THP-1, sendo o aumento ou a redução dependente da cepa bacteriana utilizada (63).

Nos grupos em que os macrófagos entraram em contato com lipopolissacarídeos, seja durante o pré-tratamento (THP-1 + LPS + *C. albicans*) ou no desafio (THP-1 +

LPS), os probióticos não foram capazes de alterar significativamente a produção de TNF- α ou de reduzir IL-1 β , como mostram as figuras 5.5a e 5.5c. Este resultado contraria os resultados de estudos prévios (224, 230-232). Macrófagos estimulados por *L. rhamnosus* BFE5264 e *L. plantarum* NR74, previamente ao desafio por LPS, apresentaram uma redução na produção de TNF- α e IL-1 β em comparação com os grupos sem probiótico (224). Essa diferença de resultados pode ser explicada pela especificidade do efeito dos probióticos de acordo com a cepa bacteriana testada. Por exemplo, no estudo de Drago et al. (63), cepas de *L. salivarius* apresentaram efeitos contrários sobre macrófagos em relação à produção de citocinas. Neste estudo, as cepas de *L. salivarius* LDR0723 e CRL1528 induziram a um aumento na produção de IL-12 e Interferon- γ (IFN- γ), além da redução na liberação de IL-4 e IL-5 (citocinas associadas à resposta imune adaptativa). Por sua vez, as cepas *L. salivarius* BNL1059 e RGS1746 promoveram um efeito inverso. Diferenças metodológicas entre os estudos, como variações no período de contato com o LPS também podem explicar parcialmente essas diferenças de resultados. Com isso, esses dados indicam que múltiplos modelos e estímulos devem ser testados para mimetizar a complexidade das interações que ocorrem em superfícies mucosas no homem.

O contato dos macrófagos com as bactérias probióticas anteriormente ao desafio por *C. albicans*, tanto na presença quanto na ausência de LPS, promoveu uma redução na produção de IL-12, considerada uma citocina pró-inflamatória (233). Em uma infecção, esta citocina é produzida principalmente por células apresentadoras de antígenos (APCs), incluindo monócitos/macrófagos e células dendríticas, em resposta à presença do patógeno (234). A IL-12 induz a produção de IFN- γ , por células matadoras naturais (NK) e linfócitos T, que contribui para a ativação de células fagocíticas e inflamação. IL-12 tem papel fundamental na diferenciação de linfócitos T CD4⁺ nativos em linfócitos T auxiliares tipo 1 (Th1) (235) e diferenciação de linfócitos T citotóxico (CTL) (236), além de exercer papel antagônico ao IL-4, que favorece a resposta por linfócitos T auxiliares tipo 2 (Th2). Como a resposta imune depende de um balanço entre Th1 e Th2, pode-se considerar que o IL-12 representa uma ponte funcional entre a resposta imune inata não-específica inicial e a subsequente imunidade adaptativa antígeno-específica (234).

Comparando-se ainda os grupos THP-1 + (LPS) + *Candida* e THP-1 + (LPS + Probiótico) + *Candida* (Figura 5.5), a presença de *Lactobacillus* em um ambiente com LPS induziu aumento nos níveis de IL-10, além de ter promovido a redução da

produção de IL-12 após o desafio com *C. albicans*, sugerindo a capacidade da bactéria probiótica modular a resposta inflamatória. A IL-10 é considerada uma importante citocina imunossupressora, cuja principal função é limitar a extensão da ativação das células do sistema imune inato e adaptativo, mantendo a homeostase (233). Ou seja, sua atividade regulatória previne inflamações patológicas (231), como em certas doenças inflamatórias intestinais (237), e protege o hospedeiro de imunopatologias associadas a infecções e autoimunidade (233). A produção de IL-10 pelos macrófagos ocorre como uma consequência do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) da *Candida* pelos receptores de reconhecimento padrão (PRRs) expressos na superfície dos macrófagos (233). A modulação da resposta dos macrófagos, por nós observada, está associada à regulação negativa da transcrição do gene que codifica o receptor Dectina-1 promovida pela presença dos probióticos. No entanto, a *C. albicans* continua sendo reconhecida por outros receptores, cuja ativação induz a produção de IL-10.

Por outro lado, o aumento na produção de IL-10 causado pelas bactérias probióticas pode ter induzido a redução nos níveis da citocina pró-inflamatória IL-12, ambos observados nos grupos desafiados com *C. albicans*, uma vez que IL-10 é um dos principais reguladores negativos da produção de IL-12 (238). Os genes *IL12a* e *IL12b* precisam ser expressos coordenadamente nas mesmas células para que haja a produção de IL-12 biologicamente ativa (239). IL-10 parece regular negativamente a transcrição de ambos estes genes (240).

Nossos resultados mostraram claramente que *Lactobacillus* é capaz de interferir na resposta imune mediada por macrófagos, através da indução da produção de citocinas que favorecem a resposta imune Th2, ou seja, a imunidade adaptativa em detrimento da imunidade inata. Isto está de acordo com dados prévios que mostram aumento de IgA em pacientes tratados com probióticos (180). O favorecimento da resposta Th2 foi observado principalmente nos grupos de macrófagos pré-tratados com LPS e desafiados com *C. albicans*. Este duplo desafio procurou simular as situações reais na cavidade oral e na mucosa gastrointestinal, onde comunidades mistas desafiam os macrófagos residentes (241).

Nossos dados indicam que as três cepas de *Lactobacillus* testadas reduziram a transcrição relativa do gene que codifica Dectina-1. A redução na expressão do receptor Dectina-1 pode também estar diretamente ligada à redução da inflamação frente ao patógeno e pode resultar na alteração da microbiota residente, favorecendo

os *Lactobacillus* (242), que por sua vez, segundo nossos dados, promovem ainda mais a redução da expressão deste receptor. Um estudo em modelo animal demonstrou que camundongos deficientes em Dectina-1 apresentaram maior proporção de *Lactobacillus* na microbiota comensal do intestino, devido à redução na produção de peptídeos antimicrobianos induzidos pela sinalização mediada por Dectina-1. O mesmo estudo mostrou que a colonização por *Lactobacillus* induziu aumento de células T regulatórias (Treg) no intestino, as quais promoveram uma redução do processo inflamatório local. Assim, o estudo sugeriu que Dectina-1 regula a imunidade intestinal através do controle da diferenciação de células Treg promovida pela modificação da microbiota (242). Com base nestes dados associados à nossa observação de regulação negativa do gene *clec7a* promovida por *Lactobacillus* em macrófagos desafiados com *C. albicans* e LPS, podemos sugerir que probióticos poderiam modular a resposta na mucosa oral de maneira semelhante à observada no intestino, por interferir na expressão de Dectina-1, alterando o reconhecimento e a consequente sinalização promovida por *C. albicans*.

A capacidade da *C. albicans* diferenciar-se da forma de levedura para a filamentosa é fundamental para a patogenicidade (2). A transição de levedura para a forma filamentosa é induzida por uma ampla variedade de fatores ambientais, tais como a presença de soro, alto pH e temperatura corporal do hospedeiro, ou seja, todas as características de uma condição inflamatória (243). Desta forma, a redução da resposta inflamatória em tecidos colonizados por *C. albicans* altera as condições ambientais. Tal evento, por sua vez, reduz o desenvolvimento de candidíase, através da redução da formação de hifas e da infiltração de *Candida* nas superfícies mucosas, já que tecidos inflamados são mais susceptíveis à penetração de patógenos (112).

Quitina e β -glucanos são componentes básicos da camada interna da parede celular de *C. albicans* (244), além de polissacarídeos, glicoproteínas, enzimas e lipídeos que também são componentes da parede celular (245). Todos estes componentes, principalmente os β -glucanos, são reconhecidos por diversos receptores das células do sistema imune inato, como Dectina-1, receptores de manose e TLRs (223, 245). Hifas e leveduras são reconhecidas de forma diferente por esses receptores, uma vez que cada uma dessas morfologias fúngicas apresentam diferentes características estruturais (112). Os glucanos das hifas apresentam uma estrutura cíclica única, não encontrada no glucano da levedura (113). Os β -glucanos cíclicos das hifas induzem a um padrão de produção de citocinas

diferentes em monócitos humanos, em comparação com os β -glucanos lineares das leveduras, sendo que β -glucanos cíclicos são mais potentes indutores de TNF- α , IL-1 β e IL-6 (113, 245). Por outro lado, as hifas não expõem β -glucanos na superfície celular como ocorre com as leveduras, e portanto são menos reconhecidas por receptores Dectina-1 dos macrófagos (112). Consequentemente, menor ativação das células imunes e menor produção de citocinas pró-inflamatórias são esperadas quando a *C. albicans* está na forma filamentosa (112).

Uma vez que os probióticos reduziram a resposta inflamatória mediada pelos macrófagos em nosso estudo, um predomínio de leveduras em relação a hifas seria esperado na presença de bactérias probióticas. Com isso, seria esperado que o reconhecimento das células de *C. albicans* e de *Lactobacillus* pelos macrófagos levaria à maior produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos. No entanto, os nossos resultados também mostraram que as bactérias probióticas induziram a redução na transcrição do gene *clec7a* nos macrófagos, resultando na menor expressão de Dectina-1 nas superfícies dos macrófagos. Com isso, na prática, menos *C. albicans* mesmo na forma de levedura estaria sendo reconhecida pelos macrófagos pré-tratados com *Lactobacillus*. Isto evitaria uma resposta inflamatória exacerbada, que favoreceria a infiltração de *Candida* e o desenvolvimento de candidíase, promovendo um ambiente favorável à forma comensal.

As bactérias probióticas, ao se ligarem às células fúngicas, podem também estar inibindo a adesão de *C. albicans* ao substrato (162). Essa interação fungo/bactéria no biofilme, mais discutida a seguir, evita o processo de invasão de *C. albicans* às superfícies mucosas e reduz o seu contato com células imunes do hospedeiro.

Assim, os resultados da primeira parte do nosso estudo, ensaios em cultura celular, sugerem que os *Lactobacillus* modulam a secreção de mediadores inflamatórios (induzem aumento da produção de IL-10 e redução de IL-12) pelos macrófagos desafiados por *C. albicans*, reduzindo a resposta inflamatória. Uma vez que a inflamação favorece a transição de levedura para hifa (243) e esta última é necessária para a patogenicidade (112), a presença de probióticos altera o ambiente favorecendo blastosporos, reduzindo as chances de infecção. Além disso, na presença da bactéria probiótica, as leveduras não induzem a uma resposta imune exacerbada mediada por Dectina-1, devido à redução da expressão deste receptor em macrófagos, levando a um menor reconhecimento da *Candida*. Portanto, a

presença da bactéria probiótica provavelmente quebra o círculo vicioso envolvendo a inflamação, a transição levedura-hifa e o desenvolvimento da candidíase.

Na segunda parte do nosso estudo, os mesmos probióticos *L. rhamnosus* LR32, *L. casei* L324m e *L. acidophilus* NCFM, com comprovado efeito candidicida em humanos (18, 177, 180), foram testados. Suspensões celulares planctônicas, assim como o sobrenadante de biofilme de *Lactobacillus* foram incubados com biofilmes de *C. albicans*, objetivando a verificação do efeito direto e indireto dos probióticos sobre o biofilme fúngico.

Como mencionado anteriormente, as bactérias probióticas podem estar interferindo no processo de filamentação das células de *C. albicans* através de mudanças no ambiente (243) e alterando a expressão gênica (228). Além disso, probióticos podem estar agindo sobre a formação de biofilmes, um importante fator de virulência de *Candida* (167, 168). Em nossos estudos, suspensões celulares probióticas e sobrenadantes de biofilmes de *Lactobacillus* foram incubados com biofilmes de *C. albicans*, em diferentes situações, para verificar se a interferência no desenvolvimento do biofilme fúngico é dependente de uma interação direta entre células de *C. albicans* e de bactérias probióticas, ou dependente da secreção de exometabólitos pelos probióticos (ação indireta).

De acordo com os resultados encontrados, cada uma das suspensões celulares de *Lactobacillus* exerceu efeito anti-biofilme durante os estágios de colonização inicial e maturação do biofilme de *C. albicans*. No entanto, estes efeitos foram espécie probiótica-específicos, uma vez que a inibição de *C. albicans* mediada pelos *Lactobacillus* variou entre as cepas probióticas testadas. A produção de ácidos orgânicos pelo metabolismo bacteriano e a consequente redução do pH final no meio de cultura já foram sugeridos como razões para tal inibição de *Candida* (246). Em um estudo prévio, Hasslof et al. (44) notaram que *Lactobacillus* que induziram os menores valores de pH após incubação foram os mais efetivos na inibição do crescimento de *Candida*. No entanto, nossos resultados revelaram que nenhum dos *Lactobacillus* testados induziu uma grande acidificação do meio (pH < 6.0) na co-cultura. Além disso, todas as três cepas probióticas induziram valores de pH semelhantes no sobrenadante do biofilme de *Candida*, em todos os tempos de análise. Tais resultados sugerem que o efeito candidicida espécie-específico promovido pelas bactérias probióticas usadas no presente estudo não está relacionado a acidificação do meio.

Notou-se ainda que o grau de inibição de crescimento exercido pelos probióticos contra *C. albicans* 75 correlacionou-se com a concentração das suspensões celulares de probióticos. Assim, somente as maiores concentrações relativas de *Lactobacillus* reduziram significativamente ($p < 0,05$) o biofilme (UFC) de *C. albicans* 75 (Figura 5.7), indicando que a quantidade total de exometabólitos produzidos pelos probióticos é provavelmente crítica para o efeito antimicrobiano observado. Estudo prévio demonstrou que a supressão do biofilme de *C. albicans* por *Lactobacillus* planctônicos pode ocorrer devido à produção de bacteriocinas pelas bactérias ácido lácticas nas co-culturas (249). O mecanismo de *quorum sensing* poderia estar regulando a produção dos peptídeos antimicrobianos pelos *Lactobacillus*, envolvendo uma regulação autoindutora em culturas líquidas (247). *Lactobacillus*, como outras bactérias Gram-positivas, usam circuitos de comunicação célula-célula para regular a produção e liberação de autoindutores, moléculas sinalizadoras químicas que aumentam em concentração de acordo com a densidade/concentração celular e levam à alteração da expressão de genes, e consequentemente alteração do comportamento de toda a comunidade bacteriana (248). Assim, os nossos dados indicam que o efeito anti-*Candida* de *Lactobacillus* é mediado, pelo menos em parte, pela produção de exometabólitos.

Por outro lado, os sobrenadantes livres de células coletados do biofilme de *Lactobacillus* demonstraram uma capacidade limitada na supressão do desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*, uma vez que foram efetivos contra o biofilme somente nos estágios iniciais do seu desenvolvimento, sendo incapazes de suprimir/eliminar o biofilme maduro, como ocorreu com as suspensões de *Lactobacillus*. Este resultado indica que os efeitos dos sobrenadantes provavelmente são físico-químicos ou, mais especificamente, de natureza interfacial (célula-célula e célula-superfície). Com base nos dados que indicam que o sobrenadante de *Lactobacillus* é capaz de interferir nos estágios iniciais do biofilme, onde predomina a adesão e agregação, sugere-se que componentes dos sobrenadantes, possivelmente exometabólitos de *Lactobacillus*, modificariam a energia de tensão superficial dos blastosporos de *Candida*, e consequentemente preveniriam a agregação celular e a formação de uma estrutura organizada (249). Os exometabólitos em questão, secretados pelas bactérias probióticas, incluem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (54), metabólitos contendo proteicos (250), componentes de baixa massa molecular, como reuterina, ácidos carboxílicos, ácidos graxos, dipeptídeos cíclicos e nucleotídeos (251-

253), e biosurfactantes cuja atividade antimicrobiana contra *C. albicans* já foi demonstrada (163, 197).

A imagens da MVLC (Figura 5.10) mostraram que o sobrenadante de *L. rhamnosus* reduziu a adesão de *C. albicans* à superfície plástica dos discos. Os biosurfactantes, um importante exometabólito de *Lactobacillus*, seria o principal responsável pela propriedade anti-adesiva do sobrenadante, uma vez que apresenta capacidade de modificar a hidrofobicidade das superfícies, interferindo na adesão microbiana e nos processos de desorção (254). Estudos prévios já demonstraram que estes exometabólitos produzidos por bactérias ácido lácticas foram capazes de reduzir a adesão inicial de leveduras ao silicone elastomérico (249) e poliestireno (255). Os biosurfactantes além de prevenir a adesão de células entre si e à superfícies rígidas, também podem induzir o descolamento das células já aderidas (197). Este modelo de ação, no entanto, não seria eficaz no biofilme maduro, como demonstrado no presente estudo, em que as células de *C. albicans* já estão aderidas.

O ensaio com sobrenadante de bactérias probióticas também demonstrou que o sobrenadante coletado durante a fase de adesão do biofilme de *L. rhamnosus* (1,5 h) não inibiu a adesão de *C. albicans* e o desenvolvimento do biofilme. No entanto, o efeito inibitório foi observado quando os sobrenadantes coletados dos biofilmes de 24 h e de 48 h foram testados. Este resultado sugere que a produção de exometabólitos pelo *L. rhamnosus*, capaz de interferir na formação do biofilme de *Candida*, seria associado às fases mais avançadas da cultura do probiótico, possivelmente envolvendo mecanismo *quorum sensing*. Nossas imagens de MVLC corroboram com os achados anteriores, sugerindo que os exometabólitos da fase tardia de *L. rhamnosus*, possivelmente regulados por estímulos ambientais como a densidade celular (256), podem ser mais potentes na supressão no crescimento do biofilme fúngico. Além disso, a redução no número de *C. albicans* viáveis e a alteração da arquitetura do biofilme de *C. albicans* após a exposição ao *Lactobacillus*, tanto no contato direto célula-célula, quanto no contato da *Candida* com os produtos secretados no sobrenadante, podem estar ligadas à regulação negativa da transcrição de genes envolvidos com o desenvolvimento do biofilme, genes associados com replicação de DNA, translação, glicólise e gluconeogênese (164, 256).

O maior do efeito inibitório dos *Lactobacillus* sobre os biofilmes de *C. albicans* observado no ensaio de co-cultura, quando comparado com o ensaio com sobrenadante, pode indicar a necessidade de um contato direto de células bacterianas

e fúngicas para garantir a inibição da maturação do biofilme de *C. albicans*. No entanto, essa observação pode ser causada por outros mecanismos. As condições de crescimento dos *Lactobacillus* podem influenciar a atividade antimicrobiana dessas bactérias ácido lácticas (257). Além disso, a co-cultura de cepas de *Lactobacillus* com outras espécie bacteriana pode induzir ou aumentar a produção de bacteriocinas (258). Portanto, nossos dados podem também indicar que a liberação de componentes com ação inibitória pelos *Lactobacillus* é dependente das condições do ambiente, como o crescimento em biofilme multiespécie, onde os metabólitos de *Candida* ou a competição por substrato nutricional poderiam induzir a produção de fatores inibidores de crescimento pelos *Lactobacillus*.

A formação de hifas é um importante passo para a patogênese de candidíase (259). Nossa análise ultra-estrutural com imagens de MEV demonstrou que o sobrenadante e o contato direto com células de *L. rhamnosus* inibiram significativamente a filamentação fúngica e afetaram a arquitetura do biofilme. Sabe-se que o pH neutro favorece a transição levedura-hifa e também contribui para a adesão de células de *C. albicans* (260). As células de *Candida* na fase estacionária formam brotamentos elipsoidais em baixo pH e hifas alongadas em alto pH (261). Devido ao fato de todas as cepas de *Lactobacillus* testadas não reduzirem significativamente o pH nas variadas co-culturas realizadas, a acidificação do ambiente pelos *Lactobacillus* provavelmente não interfere na inibição da transição levedura-hifa da *C. albicans*. Assim, a modulação da expressão de genes hifa-específicos na *C. albicans* é a provável causa da redução da filamentação de *Candida* promovida pelas bactérias probióticas e seus produtos (228).

A presença de brotamentos nas células do biofilme de *C. albicans* tratado com probióticos é um indicativo que o fungo estava proliferando-se em vez de formar hifas, uma vez que a presença de brotamentos celulares é um sinal de crescimento de blastosporos maduros, não estando presentes em grande número durante a filamentação (261). Por outro lado, um estudo *in vitro* recente (249), o qual testou o efeito de biosurfactantes produzidos por *L. brevis* sobre o biofilme de *C. albicans*, mostrou a ausência de diferenças fenotípicas nos blastoconídios (blatosporos), na morfologia da hifa e na localização dos brotamentos entre os grupos controle e teste. A diferença das cepas de bactérias probióticas usadas no estudo de Ceresa et al. (250) e no presente estudo pode explicar os resultados divergentes.

Quando comparamos as duas cepas de *C. albicans* usadas em nosso estudo, a *C. albicans* 75 demonstrou uma menor susceptibilidade à inibição promovida pelas cepas de *Lactobacillus* em comparação com a *C. albicans* ATCC SC5314, uma vez que os efeitos dos probióticos no biofilme do isolado clínico foram significativamente menores ($p < 0,05$). Este resultado indica que o potencial anti-biofilme dos probióticos testados foi também patógeno-específico. Além dessa variabilidade intraespécie, um estudo prévio observou uma variabilidade interespecie para os efeitos fungicidas e fungistáticos dos *Lactobacillus* contra espécies de *Candida*, sendo as cepas de *Lactobacillus* por eles testadas mais efetivas contra *C. albicans*, em comparação com outras espécies patogênicas de *Candida*, como *L. krusei* e *L. parapsilosis* (262). Por outro lado, um estudo clínico randomizado (177) verificou que a redução *in vivo* da colonização oral por *Candida* promovida por *Lactobacillus* não foi relacionada à espécie que colonizava o paciente, sugerindo que outros mecanismos, como a modulação da resposta imune induzida pelo *Lactobacillus*, poderiam favorecer também a redução das espécies mais resistentes ao efeito direto do probiótico.

Os resultados obtidos validam a hipótese de que os efeitos terapêuticos e profiláticos de *Lactobacillus* contra candidíase seriam atribuído às interferências nas interações célula-célula e célula-superfície (256) e à produção de exometabólitos que desestabilizam a organização e a arquitetura do biofilme. Nossos estudos envolvendo biofilmes revelaram que as espécies de *Lactobacillus* testadas interferiram no desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* através da inibição da colonização inicial, remoção do biofilme maduro e supressão da formação de hifas, possivelmente por exometabólitos produzidos pelos *Lactobacillus*. O contato direto de células bacterianas probióticas com o biofilme fúngico foi essencial para o efeito anti-biofilme durante o estágio de maturação do mesmo.

Apesar das novas informações trazidas pela nossa pesquisa, os mecanismos moleculares da ação dos probióticos contra *C. albicans* ainda não foram esclarecidos e devem ser investigados a fundo. Fazem-se necessários estudos com o isolamento e identificação dos componentes efetivos dos exometabólitos produzidos pelos *Lactobacillus*, usando espectrometria de massa - cromatografia líquida e espectroscopia de ressonância magnética nuclear, por exemplo. Além disso, as frações de exometabólitos isolados precisam ser avaliadas em relação ao seu impacto no desenvolvimento do biofilme de *Candida* e na expressão de genes associados à filamentação fúngica.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo sugeriu que *Lactobacillus* probióticos modulam a resposta inflamatória mediada por macrófagos ativados com LPS e/ou *C. albicans*, por sua capacidade de:

- Alterar o reconhecimento de *C. albicans* por macrófagos pela regulação negativa da transcrição do gene *cle7a*, o qual codifica o receptor Dectina-1;
- Alterar o perfil de citocinas pró-inflamatórias, induzindo o aumento da produção de IL-10 e redução da produção de IL-12.

Os resultados também revelaram que espécies de *Lactobacillus* são capazes de inibir o desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* por:

- Inibir a colonização inicial, tanto pela produção de exometabólitos como pelo contato célula-célula;
- Inibir a maturação dos biofilmes pelo contato célula-célula;
- Reduzir a formação de hifas possivelmente pela produção de exometabólitos.

Como a inflamação favorece a transição levedura-hifa e a forma filamentosa é necessária para a patogenicidade, o efeito dos probióticos sobre a modulação da resposta imune pode estar quebrando o ciclo vicioso envolvendo inflamação, diferenciação levedura-hifa e o desenvolvimento de candidíase. Além disso, a ação anti-*Candida* dos *Lactobacillus* pode envolver mecanismos inibitórios diretos, interferindo diretamente na capacidade da *C. albicans* de formar biofilme e de se diferenciar em hifas.

REFERÊNCIAS¹

1. Escherich T. Die darmbakterien des sauglings und ihre beziehungen zur physiologie der Verdauung. Ferdinand Enke: Stuttgart; 1886.
2. Scully C, el-Kabir M, Samaranayake LP. *Candida* and oral candidosis: a review. Crit Rev Oral Biol Med. 1994;5(2):125-57.Review.
3. Shay K, Truhlar MR, Renner RP. Oropharyngeal candidosis in the older patient. J Am Geriatr Soc. 1997 Jul;45(7):863-70.
4. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 2. Oral diseases caused by *Candida* species. Aust Dent J. 1998 Jun;43(3):160-6. Review.
5. Ellepola AN, Samaranayake LP. Oral candidal infections and antimycotics. Crit Rev Oral Biol Med. 2000;11(2):172-98. Review.
6. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. Aust Dent J. 1998 Feb;43(1):45-50. Review.
7. Lynch DP. Oral candidiasis. History, classification, and clinical presentation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1994 Aug;78(2):189-93. Review.
8. Matsubara VH, Bandara HM, Mayer MP, Samaranayake LP. Probiotics as antifungals in mucosal candidiasis. Clin Infect Dis. 2016 May; 62(9): 1143-53. doi: 10.1093/cid/ciw038. Epub Jan 29.
9. Niimi M, Firth NA, Cannon RD. Antifungal drug resistance of oral fungi. Odontology. 2010 Feb;98(1):15-25. doi:10.1007/si0266-009-0118-3. Epub 2010 Feb 16.
10. Calderone RA, Braun PC. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. Microbiol Rev. 1991 Mar;55(1):1-20.

¹ De acordo com estilo Vancouver.

11. Cutler JE, Brawner DL, Hazen KC, Jutila MA. Characteristics of *Candida albicans* adherence to mouse tissues. *Infect Immun*. 1990 Jun;58(6):1902-8.
12. Kimura LH, Pearsall NN. Relationship between germination of *Candida albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. *Infect Immun*. 1980 May;28(2):464-8.
13. Austin NC, Darlow B. Prophylactic oral antifungal agents to prevent systemic *Candida* infection in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004(1):CD003478.
14. Ericson JE, Benjamin DK, Jr. Fluconazole prophylaxis for prevention of invasive candidiasis in infants. *Curr Opin Pediatr*. 2014 Apr;26(2):151-6. doi: 10.1097/MOP000000000000060.
15. Coogan MM, Fidel PL, Jr., Komesu MC, Maeda N, Samaranayake LP. (B1) *Candida* and mycotic infections. *Adv Dent Res*. 2006 Apr;19(1):130-8.
16. McCullough MJ, Savage NW. Oral candidosis and the therapeutic use of antifungal agents in dentistry. *Aust Dent J*. 2005 Dec;50(4 Suppl 2):S36-9. Review.
17. Meurman JH. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? *Eur J Oral Sci*. 2005 Jun;113(3):188-96.
18. Hatakka K, Ahola AJ, Yli-Knuuttila H, Richardson M, Poussa T, Meurman JH, et al. Probiotics reduce the prevalence of oral *Candida* in the elderly - a randomized controlled trial. *J Dent Res*. 2007 Feb;86(2):125-30.
19. Sanders ME, Klaenhammer TR. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *J Dairy Sci*. 2001 Feb;84(2):319-31.
20. Klaenhammer TR. Probiotic bacteria: today and tomorrow. *J Nutr*. 2000 Feb;130(2S Suppl):415S-6S.
21. Tuohy KM, Probert HM, Smejkal CW, Gibson GR. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discov Today*. 2003 Aug;8(15):692-700. Review.

22. Sanders ME. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clin Infect Dis*. 2008 Feb;46 Suppl 2:S58-61; discussion S144-51. doi: 10.1086/523341.
23. Prakash S, Tomaro-Duchesneau C, Saha S, Cantor A. The gut microbiota and human health with an emphasis on the use of microencapsulated bacterial cells. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:981214. doi: 10.1155/2011/981214. Epub 2011 Jun 2.
24. Dunne C, Murphy L, Flynn S, O'Mahony L, O'Halloran S, Feeney M, et al. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1999 Jul;76(1-4):279-92.
25. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*. 1989 May;66(5):365-78. Review.
26. Collado MC, Meriluoto J, Salminen S. Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Lett Appl Microbiol*. 2007 Oct;45(4):454-60.
27. Salminen S, von Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, de Vos WM, et al. Demonstration of safety of probiotics - a review. *Int J Food Microbiol*. 1998 Oct;44(1-2):93-106.
28. Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Matto J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol*. 2000 Dec;84(3):197-215.
29. Collins JK, Thornton G, Sullivan GO. Selection of probiotic strains for human applications. *Int Dairy J*. 1998 May;8(5-6):487-90. doi: 10.1016/s0958-6946(98)00073-9.
30. Lee YK, Nomoto K, Salminen S, Gorbach SL. *Handbook of probiotics*. New York: John Wiley and Sons. 1999. 211 p.
31. Stanton C, Desmond C, Coakley M, Collins JK, Fitzgerald G, Ross RP, et al. Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. In: Farnworth ER, editor. *Handbook of fermented functional foods*: Boca Raton: CRC Press; 2003. p. 27-58.

32. Salminen MK, Tynkkynen S, Rautelin H, Saxelin M, Vaara M, Ruutu P, et al. *Lactobacillus* bacteremia during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. Clin Infect Dis. 2002 Nov;35(10):1155-60. Epub 2002 Oct 21.
33. Borriello SP, Hammes WP, Holzapfel W, Marteau P, Schrezenmeir J, Vaara M, et al. Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. Clin Infect Dis. 2003 Mar;36(6):775-80. Epub 2003 Mar 5.
34. Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. Int J Dairy Technol. 1998 Dec;51:123-36.
35. Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, et al. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. Am J Clin Nutr. 2001 Feb;73(2 Suppl):386S-92S.
36. Daniel C, Poiret S, Goudercourt D, Dennin V, Leyer G, Pot B. Selecting lactic acid bacteria for their safety and functionality by use of a mouse colitis model. Appl Environ Microbiol. 2006 Sep;72(9):5799-805.
37. Boris S, Suarez JE, Vazquez F, Barbes C. Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. Infect Immun. 1998 May;66(5):1985-9.
38. Matsubara VH, Silva EG, Paula CR, Ishikawa KH, Nakamae AE. Treatment with probiotics in experimental oral colonization by *Candida albicans* in murine model (DBA/2). Oral Dis. 2012 Apr;18(3):260-4. doi:10.1111/j.1601-0825.2011.01868.x.
39. Elahi S, Pang G, Ashman R, Clancy R. Enhanced clearance of *Candida albicans* from the oral cavities of mice following oral administration of *Lactobacillus acidophilus*. Clin Exp Immunol. 2005 Jul;141(1):29-36.
40. Falagas ME, Betsi GI, Tokas T, Athanasiou S. Probiotics for prevention of recurrent urinary tract infections in women: a review of the evidence from microbiological and clinical studies. Drugs. 2006;66(9):1253-61. Review.
41. Manzoni P, Mostert M, Leonessa ML, Priolo C, Farina D, Monetti C, et al. Oral supplementation with *Lactobacillus casei* subspecies *rhamnosus* prevents enteric colonization by *Candida* species in preterm neonates: a randomized study. Clin Infect Dis. 2006 Jun;42(12):1735-42. Epub 2006 May 14.

42. Osset J, Garcia E, Bartolome RM, Andreu A. Role of *Lactobacillus* as protector against vaginal candidiasis. Med Clin (Barc). 2001 Sep;117(8):285-8. Spanish.
43. Pascual LM, Daniele MB, Ruiz F, Giordano W, Pajaro C, Barberis L. *Lactobacillus rhamnosus* L60, a potential probiotic isolated from the human vagina. J Gen Appl Microbiol. 2008 Jun;54(3):141-8.
44. Hasslof P, Hedberg M, Twetman S, Stecksen-Blicks C. Growth inhibition of oral mutans streptococci and candida by commercial probiotic lactobacilli - an in vitro study. BMC Oral Health. 2010 Jul 2;10:18. doi: 10.1186/1472-6831-10-18.
45. Gueimonde M, Ouwehand AC, Salminen S. Safety of probiotics. Scand J Nutrit. 2004;48(1):42-8. doi:10.1080/11026480410027004.
46. Aguirre M, Collins MD. Lactic acid bacteria and human clinical infections. J Appl Bact 1993 Aug;75(2):95-107. Review.
47. Gasser F. Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. Bull Inst Pasteur. 1994;92:45-67.
48. Danielsen M, Wind A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. Int J Food Microbiol. 2003 Jan;82(1):1-11.
49. Sanders ME. Probiotics: considerations for human health. Nutr Rev. 2003 Mar;61(3):91-9.
50. Bernardeau M, Vernoux JP, Henri-Dubernet S, Gueguen M. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. Int J Food Microbiol. 2008 Sep;126(3):278-85. Epub. 2007 Aug 22. Review.
51. Mogensen G, Salminen S, O'Brien J, Ouwehand AC, Holzapfel W, Shortt C, et al. Inventory of microorganisms with a documented history of safe use in food. Bull Int Dairy Fed. 2002;377:10-9.
52. European Food Safety Authority. List of taxonomic units proposed for QPS status [database on the Internet]. Available from: http://www.efsa.europa.eu/EFSA/Scientific_Opinion/sc_op_ej587_qps_en.pdf.
53. Fuller R. Probiotics in human medicine. Gut. 1991 Apr;32(4):439-42.

54. Strus M, Kucharska A, Kukla G, Brzychczy-Wloch M, Maresz K, Heczko PB. The in vitro activity of vaginal *Lactobacillus* with probiotic properties against *Candida*. Infect Dis Obstet Gynecol. 2005 Jun;13(2):69-75.
55. Chakir J, Cote L, Coulombe C, Deslauriers N. Differential pattern of infection and immune response during experimental oral candidiasis in BALB/c and DBA/2 (H-2d) mice. Oral Microbiol Immunol. 1994 Apr;9(2):88-94.
56. Ferwerda B, Ferwerda G, Plantinga TS, Willment JA, van Sriel AB, Venselaar H, et al. Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. N Engl J Med. 2009 Oct;361(18):1760-7. doi:10.1056/NEJMoa0901053.
57. Rogers H, Williams DW, Feng GJ, Lewis MA, Wei XQ. Role of bacterial lipopolysaccharide in enhancing host immune response to *Candida albicans*. Clin Dev Immunol. 2013;2013:320168. doi: 10.1155/2013.320168.
58. Iliev ID, Funari VA, Taylor KD, Nguyen Q, Reyes CN, Strom SP, et al. Interactions between commensal fungi and the C-type lectin receptor Dectin-1 influence colitis. Science. 2012 Jun;336(6086):1314-7. doi: 10.1126/science.1221789.
59. Brown GD, Gordon S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. Nature. 2001 Sep 6;413(6851):36-7.
60. Goodridge HS, Reyes CN, Becker CA, Katsumoto TR, Ma J, Wolf AJ, et al. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'. Nature. 2011;472(7344):471-5. doi: 10.1038/ni.2222.
61. Gringhuis SI, Kaptein TM, Wevers BA, Theelen B, van der Vlist M, Boekhout T, et al. Dectin-1 is an extracellular pathogen sensor for the induction and processing of IL-1beta via a noncanonical caspase-8 inflammasome. Nat Immunol. 2012 Jan;13(3):246-54.
62. LeibundGut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ, Osorio F, Slack EC, Tsoni SV, et al. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. Nat Immunol. 2007 Jun;8(6):630-8. Epub 2006 Oct 6. Review.
63. Drago L, Nicola L, Iemoli E, Banfi G, De Vecchi E. Strain-dependent release of cytokines modulated by *Lactobacillus salivarius* human isolates in an in vitro model. BMC Res Notes. 2010;3:44. doi: 10.1186/1756-0500-3-44.

64. Orsi CF, Sabia C, Ardizzoni A, Colombari B, Neglia RG, Peppoloni S, et al. Inhibitory effects of different lactobacilli on *Candida albicans* hyphal formation and biofilm development. J Biol Regul Homeost Agents. 2014 Oct-Dec;28(4):743-52.
65. Brown GD, Denning DW, Levitz SM. Tackling human fungal infections. Science. 2012 May 11;336(6082):647. doi: 10.1126/science.1.222236.
66. Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. Eukaryot Cell. 2003 Oct;2(5):1053-60.
67. Samaranayake LP, McCourtie J, MacFarlane TW. Factors affecting the in vitro adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. Arch Oral Biol. 1980;25(8-9):611-5.
68. McCourtie J, Douglas LJ. Relationship between cell surface composition of *Candida albicans* and adherence to acrylic after growth on different carbon sources. Infect Immun. 1981 Jun;32(3):1234-41.
69. Nikawa H, Hamada T. Binding of salivary or serum proteins to *Candida albicans* in vitro. Arch Oral Biol. 1990;35(7):571-3.
70. Elguezabal N, Maza JL, Moragues MD, Ponton J. Monoclonal antibody-mediated inhibition of adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to human epithelial cells. Eur J Oral Sci. 2009 Aug;117(4):474-8. doi: 10.1111/j.1600-0722.2009.00642.x.
71. Hazen KC, Lay JG, Hazen BW, Fu RC, Murthy S. Partial biochemical characterization of cell surface hydrophobicity and hydrophilicity of *Candida albicans*. Infect Immun. 1990 Nov;58(11):3469-76.
72. Hazen BW, Hazen KC. Dynamic expression of cell surface hydrophobicity during initial yeast cell growth and before germ tube formation of *Candida albicans*. Infect Immun. 1988 Sep;56(9):2521-5.
73. Hazen KC, Brawner DL, Riesselman MH, Jutila MA, Cutler JE. Differential adherence of hydrophobic and hydrophilic *Candida albicans* yeast cells to mouse tissues. Infect Immun. 1991 Mar;59(3):907-12.

74. Lopez-Ribot JL, Casanova M, Martinez JP, Sentandreu R. Characterization of cell wall proteins of yeast and hydrophobic mycelial cells of *Candida albicans*. Infect Immun. 1991 Jul;59(7):2324-32.
75. Samaranayake LP. Superficial oral fungal infections. Curr Opin Dent. 1991 Aug;1(4):415-22. Review.
76. Vicariotto F, Del Piano M, Mogna L, Mogna G. Effectiveness of the association of 2 probiotic strains formulated in a slow release vaginal product, in women affected by vulvovaginal candidiasis: a pilot study. J Clin Gastroenterol. 2012 Oct;46 Suppl:S73-80. doi: 10.1097/MGC.0b013e3182684d71.
77. Cohen R, Roth FJ, Delgado E, Ahearn DG, Kalser MH. Fungal flora of the normal human small and large intestine. N Engl J Med. 1969 Mar;280(12):638-41.
78. Brzozowski T, Zwolinska-Wcislo M, Konturek PC, Kwiecien S, Drozdowicz D, Konturek SJ, et al. Influence of gastric colonization with *Candida albicans* on ulcer healing in rats: effect of ranitidine, aspirin and probiotic therapy. Scand J Gastroenterol. 2005 Mar;40(3):286-96.
79. Demirel G, Celik IH, Erdevi O, Saygan S, Dilmen U, Canpolat FE. Prophylactic *Saccharomyces boulardii* versus nystatin for the prevention of fungal colonization and invasive fungal infection in premature infants. Eur J Pediatr. 2013 Oct;172(10):1321-6. doi: 10.1007/s00431-013-2041-4.
80. McCarty TP, Pappas PG. Invasive candidiasis. Infect Dis Clin North Am. 2016 Mar;30(1):103-24. doi: 10.1016/j.idc.2015.10.013.
81. Das I, Nightingale P, Patel M, Jumaa P. Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia: experience in a tertiary referral center in the UK. Int J Infect Dis. 2011 Nov;15(11):e759-63. doi: 10.1016/j.ijid.2011.06.006.
82. Gamaletsou MN, Kontoyiannis DP, Sipsas NV, Moriyama B, Alexander E, Roilides E, et al. *Candida* osteomyelitis: analysis of 207 pediatric and adult cases (1970-2011). Clin Infect Dis. 2012 Nov;55(10):1338-51. doi: 10.1093/cid/cis660.
83. Netea MG, Joosten LA, van der Meer JW, Kullberg BJ, van de Veerdonk FL. Immune defence against *Candida* fungal infections. Nat Rev Immunol. 2015;15(10):630-42. doi: 10.1038/nri3897.

84. Ngo LY, Kasahara S, Kumasaka DK, Knoblaugh SE, Jhingran A, Hohl TM. Inflammatory monocytes mediate early and organ-specific innate defense during systemic candidiasis. *J Infect Dis*. 2014 Jan;209(1):109-19. doi: 10.1093/infdis/jit413.
85. Qian Q, Jutila MA, Van Rooijen N, Cutler JE. Elimination of mouse splenic macrophages correlates with increased susceptibility to experimental disseminated candidiasis. *J Immunol*. 1994 May 15;152(10):5000-8.
86. Lionakis MS, Swamydas M, Fischer BG, Plantinga TS, Johnson MD, Jaeger M, et al. CX3CR1-dependent renal macrophage survival promotes *Candida* control and host survival. *J Clin Invest*. 2013 Dec;123(12):5035-51. doi: 10.1172/JCI71307.
87. Xu R, Sun HF, Williams DW, Jones AV, Al-Hussaini A, Song B, et al. IL-34 Suppresses *Candida albicans* induced TNFalpha production in M1 macrophages by downregulating expression of Dectin-1 and TLR2. *J Immunol Res*. 2015;2015:328146. doi: 10.1155/2015/328146.
88. Megias J, Martinez A, Yanez A, Goodridge HS, Gozalbo D, Gil ML. TLR2, TLR4 and Dectin-1 signalling in hematopoietic stem and progenitor cells determines the antifungal phenotype of the macrophages they produce. *Microbes Infect*. 2016 May;18(5):354-63. doi: 10.1016/j.micinf.2016.01.005.
89. Smeekens SP, van de Veerdonk FL, Joosten LA, Jacobs L, Jansen T, Williams DL, et al. The classical CD14(+)(+) CD16(-) monocytes, but not the patrolling CD14(+) CD16(+) monocytes, promote Th17 responses to *Candida albicans*. *Eur J Immunol*. 2011 Oct;41(10):2915-24. doi: 10.1002/eji.201141418.
90. Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis*. 2009 Jun;48(12):1695-703. doi: 10.1086/599039.
91. Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NA. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol*. 2008 Jan;6(1):67-78. Review.
92. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:459-89. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074942.

93. Brown GD. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:1-21. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101229. Review.
94. Quintin J, Voigt J, van der Voort R, Jacobsen ID, Verschueren I, Hube B, et al. Differential role of NK cells against *Candida albicans* infection in immunocompetent or immunocompromised mice. *Eur J Immunol.* 2014 Aug;44(8):2405-14. doi: 10.1002/eji.201343828.
95. Zielinski CE, Mele F, Aschenbrenner D, Jarrossay D, Ronchi F, Gattorno M, et al. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta. *Nature.* 2012 Apr 26;484(7395):514-8. doi: 10.1038/nature10957.
96. Shalaby MR, Aggarwal BB, Rinderknecht E, Svedersky LP, Finkle BS, Palladino MA, Jr. Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon-gamma and tumor necrosis factors. *J Immunol.* 1985 Sep;135(3):2069-73.
97. Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med.* 1983 Sep;158(3):670-89.
98. Eyerich S, Wagener J, Wenzel V, Scarponi C, Pennino D, Albanesi C, et al. IL-22 and TNF-alpha represent a key cytokine combination for epidermal integrity during infection with *Candida albicans*. *Eur J Immunol.* 2011 Jul;41(7):1894-901. doi: 10.1002/eji.201041197.
99. Wang X, van de Veerdonk FL, Netea MG. Basic genetics and immunology of *Candida* infections. *Infect Dis Clin North Am.* 2016 Mar;30(1):85-102. doi: 10.1016/j.idc.2015.10.010.
100. Puel A, Cypowyj S, Bustamante J, Wright JF, Liu L, Lim HK, et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science.* 2011 Apr 1;332(6025):65-8. doi: 10.1126/science.12004339.
101. Gladiator A, Wangler N, Trautwein-Weidner K, LeibundGut-Landmann S. Cutting edge: IL-17-secreting innate lymphoid cells are essential for host defense against fungal infection. *J Immunol.* 2013 Jan 15;190(2):521-5. doi: 10.4049/jimmunol.1202924.

102. Drago L, Bortolin M, Vassena C, Taschieri S, Del Fabbro M. Antimicrobial activity of pure platelet-rich plasma against microorganisms isolated from oral cavity. *BMC Microbiol.* 2013 Feb 25;13:47. doi: 10.1186/1471-2180-13-47.
103. Pereira HA, Hosking CS. The role of complement and antibody in opsonization and intracellular killing of *Candida albicans*. *Clin Exp Immunol.* 1984 aug;57(2):307-14.
104. Cheng SC, Sprong T, Joosten LA, van der Meer JW, Kullberg BJ, Hube B, et al. Complement plays a central role in *Candida albicans*-induced cytokine production by human PBMCs. *Eur J Immunol.* 2012 Apr;42(4):993-1004. doi: 10.1002/eji.201142057.
105. Speth C, Rambach G, Wurzner R, Lass-Flörl C. Complement and fungal pathogens: an update. *Mycoses.* 2008 Oct;51(6):477-96. doi: 10.1128/AAC.00662-08.
106. Elahi S, Pang G, Clancy R, Ashman RB. Cellular and cytokine correlates of mucosal protection in murine model of oral candidiasis. *Infect Immun.* 2000 Oct;68(10):5771-7.
107. Elahi S, Pang G, Ashman RB, Clancy R. Nitric oxide-enhanced resistance to oral candidiasis. *Immunology.* 2001 Oct;104(4):447-54.
108. Challacombe SJ. Immunologic aspects of oral candidiasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994 Aug;78(2):202-10.
109. Epstein JB, Kimura LH, Menard TW, Truelove EL, Pearsall NN. Effects of specific antibodies on the interaction between the fungus *Candida albicans* and human oral mucosa. *Arch Oral Biol.* 1982;27(6):469-74.
110. Strasser D, Neumann K, Bergmann H, Marakalala MJ, Guler R, Rojowska A, et al. Syk kinase-coupled C-type lectin receptors engage protein kinase C-sigma to elicit Card9 adaptor-mediated innate immunity. *Immunity.* 2012 Jan;36(1):32-42. doi: 10.1026/j.immuni.2011.11.015.
111. Taylor PR, Tsoni SV, Willment JA, Dennehy KM, Rosas M, Findon H, et al. Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol.* 2007 Jan;8(1):31-8. Epub 2006 Dec 10.

112. Gantner BN, Simmons RM, Underhill DM. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. EMBO J. 2005 Mar;24(6):1277-86.
113. Lowman DW, Greene RR, Bearden DW, Kruppa MD, Pottier M, Monteiro MA, et al. Novel structural features in *Candida albicans* hyphal glucan provide a basis for differential innate immune recognition of hyphae versus yeast. J Biol Chem. 2014 Feb;289(6):3432-43. doi: 10.1074/jbc.M113.529131.
114. Galan-Diez M, Arana DM, Serrano-Gomez D, Kremer L, Casasnovas JM, Ortega M, et al. *Candida albicans* beta-glucan exposure is controlled by the fungal CEK1-mediated mitogen-activated protein kinase pathway that modulates immune responses triggered through dectin-1. Infect Immun. 2010 Apr;78(4):1426-36. doi: 10.1128/IAI.00989-09.
115. Glocker EO, Hennigs A, Nabavi M, Schaffer AA, Woellner C, Salzer U, et al. A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. N Engl J Med. 2009 Oct;361(18):1727-35. doi:10.1056/NEJMoa0810719.
116. Whitney PG, Bar E, Osorio F, Rogers NC, Schraml BU, Deddouche S, et al. Syk signaling in dendritic cells orchestrates innate resistance to systemic fungal infection. PLoS Pathog. 2014;10(7):e1004276.
117. Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van der Vlist M, Wevers B, Bruijns SC, et al. Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk. Nat Immunol. 2009 Feb;10(2):203-13. doi:10.1038/ni.1692.
118. Ferwerda G, Meyer-Wentrup F, Kullberg BJ, Netea MG, Adema GJ. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. Cell Microbiol. 2008 Oct;10(10):2058-66. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01188.x.
119. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, Wang Q, Gutierrez MG, Brown GD, et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. Nat Immunol. 2014 Nov;15(11):1017-25. doi: 10.1038/ni.2987.
120. Marakalala MJ, Vautier S, Potrykus J, Walker LA, Shepardson KM, Hopke A, et al. Differential adaptation of *Candida albicans* in vivo modulates immune recognition by Dectin-1. PLoS Pathog. 2013;9(4):e1003315.

121. van de Veerdonk FL, Marijnissen RJ, Kullberg BJ, Koenen HJ, Cheng SC, Joosten I, et al. The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to *Candida albicans*. *Cell Host Microbe*. 2009 Apr;5(4):329-40. doi: 10.1016/j.chom.2009.02.006.
122. Saijo S, Ikeda S, Yamabe K, Kakuta S, Ishigame H, Akitsu A, et al. Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. *Immunity*. 2010 May;32(5):681-91. doi: 10.1016/j.immuni.2010.05.001.
123. Zhu LL, Zhao XQ, Jiang C, You Y, Chen XP, Jiang YY, et al. C-type lectin receptors Dectin-3 and Dectin-2 form a heterodimeric pattern-recognition receptor for host defense against fungal infection. *Immunity*. 2013 Aug;39(2):324-34. doi: 10.1016/j.immuni.2013.05.017.
124. Cambi A, Netea MG, Mora-Montes HM, Gow NA, Hato SV, Lowman DW, et al. Dendritic cell interaction with *Candida albicans* critically depends on N-linked mannan. *J Biol Chem*. 2008 Jul;283(29):20590-9. doi: 10.1074/jbc.M709334200.
125. Nahum A, Dadi H, Bates A, Roifman CM. The L412F variant of Toll-like receptor 3 (TLR3) is associated with cutaneous candidiasis, increased susceptibility to cytomegalovirus, and autoimmunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Feb;127(2):528-31. doi: 10.1016/j.jaci.2010.09.031.
126. Wagener J, Malireddi RK, Lenardon MD, Koberle M, Vautier S, MacCallum DM, et al. Fungal chitin dampens inflammation through IL-10 induction mediated by NOD2 and TLR9 activation. *PLoS Pathog*. 2014;10(4):e1004050.
127. Jaeger M, van der Lee R, Cheng SC, Johnson MD, Kumar V, Ng A, et al. The RIG-I-like helicase receptor MDA5 (IFIH1) is involved in the host defense against *Candida* infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015 May;34(5):963-74. doi:10.1007/s10096-014-2309-2.
128. Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol*. 2012 Dec;10(2):112-22. doi: 10.1126/scitranslmed.3004404.
129. Cheng SC, van de Veerdonk FL, Lenardon M, Stoffels M, Plantinga T, Smeeckens S, et al. The dectin-1/inflammasome pathway is responsible for the induction of protective T-helper 17 responses that discriminate between yeasts and

hyphae of *Candida albicans*. J Leukoc Biol. 2011 Aug;90(2):357-66. doi: 10.1189/jib.1210702.

130. Wellington M, Koselny K, Sutterwala FS, Krysan DJ. *Candida albicans* triggers NLRP3-mediated pyroptosis in macrophages. Eukaryot Cell. 2014 Feb;13(2):329-40. doi: 10.1128/EC.0036-13.

131. Tomalka J, Ganesan S, Azodi E, Patel K, Majmudar P, Hall BA, et al. A novel role for the NLRC4 inflammasome in mucosal defenses against the fungal pathogen *Candida albicans*. PLoS Pathog. 2011;7(12):e1002379.

132. Lyu X, Zhao C, Yan ZM, Hua H. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. Drug Des Devel Ther. 2016 Mar;10:1161-71. doi: 10.1111/myc.12495.

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

134. Nett JE. Future directions for anti-biofilm therapeutics targeting *Candida*. Expert Rev Anti Infect Ther. 2014 ;12(3):375-82. doi: 10.1586/14787210.2014.885838.

135. Lewis MA, Samaranayake LP, Lamey PJ. Diagnosis and treatment of oral candidosis. J Oral Maxillofac Surg. 1991 Sep;49(9):996-1002.

136. O'Reilly RA, Goulart DA, Kunze KL, Neal J, Gibaldi M, Eddy AC, et al. Mechanisms of the stereoselective interaction between miconazole and racemic warfarin in human subjects. Clin Pharmacol Ther. 1992 Jun;51(6):656-67.

137. Alcazar-Fuoli L, Mellado E. Current status of antifungal resistance and its impact on clinical practice. Br J Haematol. 2014 Aug;166(4):471-84. doi: 10.1111/bjh.12896.

138. Lewis RE, Kontoyiannis DP, Darouiche RO, Raad, II, Prince RA. Antifungal activity of amphotericin B, fluconazole, and voriconazole in an in vitro model of *Candida* catheter-related bloodstream infection. Antimicrob Agents Chemother. 2002 Nov;46(11):3499-505.

139. Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. J Med Microbiol. 2013 Jan;62(Pt 1):10-24. doi: 10.1099/jmm.0.045054-0.

140. Sherry L, Jose A, Murray C, Williams C, Jones B, Millington O, et al. Carbohydrate Derived Fulvic Acid: An in vitro Investigation of a novel membrane active antiseptic agent against *Candida albicans* biofilms. *Front Microbiol.* 2012 Mar;3:116. doi: 10.3389/fmicb.2012.00116.
141. Coleman JJ, Okoli I, Tegos GP, Holson EB, Wagner FF, Hamblin MR, et al. Characterization of plant-derived saponin natural products against *Candida albicans*. *ACS Chem Biol.* 2010 Mar;5(3):321-32. doi: 10.1021/cb9000243b.
142. Rossignol T, Kelly B, Dobson C, d'Enfert C. Endocytosis-mediated vacuolar accumulation of the human ApoE apolipoprotein-derived ApoEdpL-W antimicrobial peptide contributes to its antifungal activity in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Oct;55(10):4670-81. doi: 10.1128/AAC.00319-11.
143. Mandal SM. A novel hydroxyproline rich glycopeptide from pericarp of *Datura stramonium*: proficiently eradicate the biofilm of antifungals resistant *Candida albicans*. *Biopolymers.* 2012;98(4):332-7.
144. Pires RH, Montanari LB, Martins CH, Zaia JE, Almeida AM, Matsumoto MT, et al. Anticandidal efficacy of cinnamon oil against planktonic and biofilm cultures of *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis*. *Mycopathologia.* 2011;172(6):453-64. doi: 10.1007/s11046-011-9448-0.
145. Evensen NA, Braun PC. The effects of tea polyphenols on *Candida albicans*: inhibition of biofilm formation and proteasome inactivation. *Can J Microbiol.* 2009 Sep;55(9):1033-9. doi: 10.1139/w09-058.
146. Shuford JA, Steckelberg JM, Patel R. Effects of fresh garlic extract on *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Jan;49(1):473.
147. Cruciani M, de Lalla F, Mengoli C. Prophylaxis of *Candida* infections in adult trauma and surgical intensive care patients: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med.* 2005 Nov;31(11):1479-87.
148. Tortorano AM, Biraghi E, Astolfi A, Ossi C, Tejada M, Farina C, et al. European Confederation of Medical Mycology (ECMM) prospective survey of candidaemia: report from one Italian region. *J Hosp Infect.* 2002 Aug;51(4):297-304.
149. Kovachev SM, Vatcheva-Dobrevska RS. Local probiotic therapy for vaginal *Candida albicans* infections. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2015 Mar;7(1):38-44. doi: 10.1007/s12602-014-9176-0.

150. Khalesi S, Sun J, Buys N, Jayasinghe R. Effect of probiotics on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *Hypertension*. 2014 Oct;64(4):897-903. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03469.

151. Jones ML, Tomaro-Duchesneau C, Martoni CJ, Prakash S. Cholesterol lowering with bile salt hydrolase-active probiotic bacteria, mechanism of action, clinical evidence, and future direction for heart health applications. *Expert Opin Biol Ther*. 2013 May;13(5):631-42. doi: 10.1517/14712598.2013.758706.

152. Akalin AS, Gonc S, Duzel S. Influence of yogurt and acidophilus yogurt on serum cholesterol levels in mice. *J Dairy Sci*. 1997 Nov;80(11):2721-5.

153. Wollowski I, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr*. 2001 Feb;73(2 Suppl):451S-5S.

154. Burns AJ, Rowland IR. Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Curr Issues Intest Microbiol*. 2000 Mar;1(1):13-24. Review.

155. Shida K, Nomoto K. Probiotics as efficient immunopotentiators: translational role in cancer prevention. *Indian J Med Res*. 2013 Nov;138(5):808-14.

156. Klaenhammer TR, Kullen MJ. Selection and design of probiotics. *Int J Food Microbiol*. 1999 Sep;50(1-2):45-57. Review.

157. Collado M, Meriluoto J, Salminen S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *Eur Food Res Technol*. 2008 Mar;226:1065–73. doi: 10.1007/s00217-007-0632-x.

158. Buck BL, Altermann E, Svingerud T, Klaenhammer TR. Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(12):8344-51.

159. Reid G. In vitro testing of *Lactobacillus acidophilus* NCFM as a possible probiotic for the urogenital tract. *Int Dairy J*. 2000;10(5-6):415-9. doi: 10.1016/S0958-6994(0)00059-5.

160. Perdigon G, de Macias ME, Alvarez S, Oliver G, de Ruiz Holgado AA. Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. *Infect Immun*. 1986 Aug;53(2):404-10.

161. Coman MM, Verdenelli MC, Cecchini C, Silvi S, Orpianesi C, Boyko N, et al. In vitro evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501® , *Lactobacillus paracasei* IMC 502® and SYN BIO® against pathogens. J Appl Microbiol. 2014 Aug;117(2):518-27. doi: 10.1111/jam.12544.

162. Ishijima SA, Hayama K, Burton JP, Reid G, Okada M, Matsushita Y, et al. Effect of *Streptococcus salivarius* K12 on the in vitro growth of *Candida albicans* and its protective effect in an oral candidiasis model. Appl Environ Microbiol. 2012 Apr;78(7):2190-9. doi: 10.1128/EAM.07055-11.

163. Kheradmand E, Rafii F, Yazdi MH, Sepahi AA, Shahverdi AR, Oveisi MR. The antimicrobial effects of selenium nanoparticle-enriched probiotics and their fermented broth against *Candida albicans*. Daru. 2014 Jun;22:48. doi: 10.1186/2008-2231-22-48.

164. Kohler 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.

165. Murzyn A, Krasowska A, Stefanowicz P, Dziadkowiec D, Lukaszewicz M. Capric acid secreted by *S. boulardii* inhibits *C. albicans* filamentous growth, adhesion and biofilm formation. PLoS One. 2010;5(8):e12050.

166. Sookkhee S, Chulasiri M, Prachyabrued W. Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens. J Appl Microbiol. 2001 Feb;90(2):172-9.

167. 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.

168. Ujaoney S, Chandra J, Faddoul F, Chane M, Wang J, Taifour L, et al. In vitro effect of over-the-counter probiotics on the ability of *Candida albicans* to form biofilm on denture strips. J Dent Hyg. 2014 Jun;88(3):183-9.

169. Verdenelli MC, Coman MM, Cecchini C, Silvi S, Orpianesi C, Cresci A. Evaluation of antipathogenic activity and adherence properties of human *Lactobacillus* strains for vaginal formulations. J Appl Microbiol. 2014 May;116(5):1297-307. doi: 10.1111/jam.12459.

170. 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.
171. Vestman NR, Timby N, Holgerson PL, Kressirer CA, Claesson R, Domellof M, et al. Characterization and in vitro properties of oral lactobacilli in breastfed infants. *BMC Microbiol*. 2013 Aug;13:193. doi: 10.1186/1471-2180-13-193.
172. Navarro-Alarcon M, Lopez-Martinez MC. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *Sci Total Environ*. 2000 Apr;249(1-3):347-71.
173. Yang J, Huang K, Qin S, Wu X, Zhao Z, Chen F. Antibacterial action of selenium-enriched probiotics against pathogenic *Escherichia coli*. *Dig Dis Sci*. 2009 Feb;54(2):246-54. doi: 10.1007/s10620-008-0361-4.
174. Ryan LA, Zannini E, Dal Bello F, Pawlowska A, Koehler P, Arendt EK. *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 as a novel food-grade antifungal agent for bakery products. *Int J Food Microbiol*. 2011 Apr;146(3):276-83. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.036.
175. Varsha KK, Priya S, Devendra L, Nampoothiri KM. Control of spoilage fungi by protective lactic acid bacteria displaying probiotic properties. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014 Apr;172(7):3402-13. doi: 10.1007/s1210-014-0779-4.
176. Chew SY, Cheah YK, Seow HF, Sandai D, Than LT. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 exhibit strong antifungal effects against vulvovaginal candidiasis-causing *Candida glabrata* isolates. *J Appl Microbiol*. 2015 May;118(5):1180-90. doi: 10.1111/jan.12772.
177. Ishikawa KH, Mayer MP, Miyazima TY, Matsubara VH, Silva EG, Paula CR, et al. A Multispecies probiotic reduces oral *Candida* colonization in denture wearers. *J Prosthodont*. 2015 Apr;24(3):194-9. doi:10.1111/jopr.12198.
178. Li D, Li Q, Liu C, Lin M, Li X, Xiao X, et al. Efficacy and safety of probiotics in the treatment of *Candida*-associated stomatitis. *Mycoses*. 2014 Mar;57(3):141-6. doi: 10.1111/myc.12116.

179. Kraft-Bodi E, Jorgensen MR, Keller MK, Kragelund C, Twetman S. Effect of probiotic bacteria on oral *Candida* in frail elderly. J Dent Res. 2015 Sep;94(9):181S-6S. doi: 10.1177/00220345155950.

180. Mendonça FH, Santos SS, Faria Ida S, Goncalves e Silva CR, Jorge AO, Leao MV. Effects of probiotic bacteria on *Candida* presence and IgA anti-*Candida* in the oral cavity of elderly. Braz Dent J. 2012;23(5):534-8.

181. Sutula J, Coulthwaite L, Thomas L, Verran J. The effect of a commercial probiotic drink on oral microbiota in healthy complete denture wearers. Microb Ecol Health Dis. 2012 Oct;23. doi: 10.3402/mehd.v23i0.184.04.

182. Sutula J, Coulthwaite LA, Thomas LV, Verran J. The effect of a commercial probiotic drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on oral health in healthy dentate people. Microb Ecol Health Dis. 2013 Oct;24. doi: 10.3402/mehd.v24i0.21003.

183. Hu H, Merenstein DJ, Wang C, Hamilton PR, Blackmon ML, Chen H, et al. Impact of eating probiotic yogurt on colonization by *Candida* species of the oral and vaginal mucosa in HIV-infected and HIV-uninfected women. Mycopathologia. 2013 Oct;176(3-4):175-81. doi: 10.1007/s11046-013-9678-4.

184. Martinez RC, Franceschini SA, Patta MC, Quintana SM, Candido RC, Ferreira JC, et al. Improved treatment of vulvovaginal candidiasis with fluconazole plus probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14. Lett Appl Microbiol. 2009 Mar;48(3):269-74. doi: 10.1111/j.1472-765x.2008.02477.x.

185. Pirotta M, Gunn J, Chondros P, Grover S, O'Malley P, Hurley S, et al. Effect of lactobacillus in preventing post-antibiotic vulvovaginal candidiasis: a randomised controlled trial. BMJ. 2004 Sep;329(7465):548.

186. Taipale T, Pienihakkinen K, Salminen S, Jokela J, Soderling E. Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12 administration in early childhood: a randomized clinical trial of effects on oral colonization by mutans streptococci and the probiotic. Caries Res. 2012;46(1):69-77. doi: 10.1159/00033567.

187. Kumar S, Bansal A, Chakrabarti A, Singhi S. Evaluation of efficacy of probiotics in prevention of candida colonization in a PICU-a randomized controlled trial. Crit Care Med. 2013 Feb;41(2):565-72. doi: 10.1097/CCM.0b013e31826a409c.

188. Roy A, Chaudhuri J, Sarkar D, Ghosh P, Chakraborty S. Role of enteric supplementation of probiotics on late-onset sepsis by *Candida* species in preterm low birth weight neonates: a randomized, double blind, placebo-controlled Trial. *N Am J Med Sci*. 2014 Jan;6(1):50-7. doi: 10.4103/1947.2714.125870.
189. Romeo MG, Romeo DM, Trovato L, Oliveri S, Palermo F, Cota F, et al. Role of probiotics in the prevention of the enteric colonization by *Candida* in preterm newborns: incidence of late-onset sepsis and neurological outcome. *J Perinatol*. 2011 Jan;31(1):63-9. doi: 10.1038/jp.2010.57.
190. Jawhara S, Poulain D. *Saccharomyces boulardii* decreases inflammation and intestinal colonization by *Candida albicans* in a mouse model of chemically-induced colitis. *Med Mycol*. 2007 Dec;45(8):691-700.
191. Wagner RD, Pierson C, Warner T, Dohnalek M, Hilty M, Balish E. Probiotic effects of feeding heat-killed *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* to *Candida albicans*-colonized immunodeficient mice. *J Food Prot*. 2000 May;63(5):638-44.
192. Wagner RD, Pierson C, Warner T, Dohnalek M, Farmer J, Roberts L, et al. Biotherapeutic effects of probiotic bacteria on candidiasis in immunodeficient mice. *Infect Immun*. 1997 Oct;65(10):4165-72.
193. Wagner RD, Warner T, Pierson C, Roberts L, Farmer J, Dohnalek M, et al. Biotherapeutic effects of *Bifidobacterium* spp. on orogastric and systemic candidiasis in immunodeficient mice. *Rev Iberoam Micol*. 1998 Dec;15(4):265-70.
194. Chermesh I, Eliakim R. Probiotics and the gastrointestinal tract: where are we in 2005? *World J Gastroenterol*. 2006 Feb;12(6):853-7.
195. Servin AL, Coconnier MH. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2003 Oct;17(5):741-54. Review.
196. Flichy-Fernandez AJ, Alegre-Domingo T, Penarrocha-Oltra D, Penarrocha-Diago M. Probiotic treatment in the oral cavity: an update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010 Sep;15(5):e677-80.
197. Zakaria Gomaa E. Antimicrobial and anti-adhesive properties of biosurfactant produced by lactobacilli isolates, biofilm formation and aggregation ability. *J Gen Appl Microbiol*. 2013;59(6):425-36.

198. Makras L, Triantafyllou V, Fayol-Messaoudi D, Adriany T, Zoumpopoulou G, Tsakalidou E, et al. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Res Microbiol.* 2006 Apr;157(3):241-7.

199. Ocana VS, Elena Nader-Macias M. Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria II: screening bacteriocin-producing strains with probiotic purposes and characterization of a *Lactobacillus* bacteriocin. *Methods Mol Biol.* 2004 Mar;268:347-53.

200. Borges S, Silva J, Teixeira P. The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. *Arch Gynecol Obstet.* 2014;289(3):479-89. doi: 10.1007/s00404-013-3064-9.

201. Muench DF, Kuch DJ, Wu H, Begum AA, Veit SJ, Pelletier ME, et al. Hydrogen peroxide-producing lactobacilli inhibit gonococci in vitro but not during experimental genital tract infection. *J Infect Dis.* 2009 May;199(9):1369-78. doi: 10.1086/597390.

202. O'Hanlon DE, Lanier BR, Moench TR, Cone RA. Cervicovaginal fluid and semen block the microbicidal activity of hydrogen peroxide produced by vaginal lactobacilli. *BMC Infect Dis.* 2010 May;10:120. doi: 10.1186/1471-2334-10-120.

203. Hamad M. Innate and adaptive antifungal immune responses: partners on an equal footing. *Mycoses.* 2012 May;55(3):205-17. doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.2078.x.

204. Fidan I, Kalkanci A, Yesilyurt E, Yalcin B, Erdal B, Kustimur S, et al. Effects of *Saccharomyces boulardii* on cytokine secretion from intraepithelial lymphocytes infected by *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Mycoses.* 2009 Jan;52(1):29-34. doi: 10.1111/j.1439-0507.2008.01545.x.

205. Wagner RD, Johnson SJ. Probiotic lactobacillus and estrogen effects on vaginal epithelial gene expression responses to *Candida albicans*. *J Biomed Sci.* 2012 Jun;19:58. doi: 10.1186/1423-0127-19-58.

206. Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML. Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly: an investigation of age-related immunological changes. *J Clin Immunol.* 2001 Jun;21(4):264-71.

207. Medici M, Vinderola CG, Perdigon G. Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresh cheese. *Int Dairy J.* 2004 Jun;14(7):611-8. doi: 10.1016/j.idairyij.2003.10.011.
208. Buts JP, Bernasconi P, Vaerman JP, Dive C. Stimulation of secretory IgA and secretory component of immunoglobulins in small intestine of rats treated with *Saccharomyces boulardii*. *Dig Dis Sci.* 1990 Feb;35(2):251-6.
209. Schiffrin EJ, Rochat F, Link-Amster H, Aeschlimann JM, Donnet-Hughes A. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J Dairy Sci.* 1995 Mar;78(3):491-7.
210. Krasowska A, Murzyn A, Dyjankiewicz A, Lukaszewicz M, Dziadkowiec D. The antagonistic effect of *Saccharomyces boulardii* on *Candida albicans* filamentation, adhesion and biofilm formation. *FEMS Yeast Res.* 2009 Dec;9(8):1312-21. doi: 10.1111/j.1567-1364.2009.0059.x.
211. Harty DW, Oakey HJ, Patrikakis M, Hume EB, Knox KW. Pathogenic potential of lactobacilli. *Int J Food Microbiol.* 1994 Dec;24(1-2):179-89.
212. Elmer GW, Surawicz CM, McFarland LV. Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. *JAMA.* 1996 Mar;275(11):870-6. Review.
213. Cannon JP, Lee TA, Bolanos JT, Danziger LH. Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005 Jan;24(1):31-40. Review.
214. Wagner RD, Warner T, Roberts L, Farmer J, Balish E. Colonization of congenitally immunodeficient mice with probiotic bacteria. *Infect Immun.* 1997 Aug;65(8):3345-51.
215. Land MH, Rouster-Stevens K, Woods CR, Cannon ML, Cnota J, Shetty AK. *Lactobacillus* sepsis associated with probiotic therapy. *Pediatrics.* 2005 Jan;115(1):178-81.
216. Mathur S, Singh R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - a review. *Int J Food Microbiol.* 2005 Dec;105(3):281-95.

217. Altermann E, Russell WM, Azcarate-Peril MA, Barrangou R, Buck BL, McAuliffe O, et al. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar;102(11):3906-12.
218. Butler G, Rasmussen MD, Lin MF, Santos MA, Sakthikumar S, Munro CA, et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*. 2009 Jun 4;459(7247):657-62. doi: 10.1038/nature08064.
219. Jones T, Federspiel NA, Chibana H, Dungan J, Kalman S, Magee BB, et al. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 May;101(19):7329-34.
220. Braun BR, van Het Hoog M, d'Enfert C, Martchenko M, Dungan J, Kuo A, et al. A human-curated annotation of the *Candida albicans* genome. *PLoS Genet*. 2005 Jul;1(1):36-57.
221. O'Day DM, Head WS, Csank C, Shetlar DJ, Robinson RD, McCollum GW, et al. Differences in virulence between two *Candida albicans* strains in experimental keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000 Apr;41(5):1116-21.
222. Jouault T, Bernigaud A, Lepage G, Trinel PA, Poulain D. The *Candida albicans* phospholipomannan induces in vitro production of tumour necrosis factor-alpha from human and murine macrophages. *Immunology*. 1994 Oct;83(2):268-73.
223. Chanput W, Reitsma M, Kleinjans L, Mes JJ, Savelkoul HF, Wichers HJ. beta-Glucans are involved in immune-modulation of THP-1 macrophages. *Mol Nutr Food Res*. 2012 May;56(5):822-33. doi: 10.1002/mnfr.201100715.
224. Yoon HS, Ju JH, Lee JE, Park HJ, Lee JM, Shin HK, et al. The probiotic *Lactobacillus rhamnosus* BFE5264 and *Lactobacillus plantarum* NR74 promote cholesterol efflux and suppress inflammation in THP-1 cells. *J Sci Food Agric*. 2013 Mar;93(4):781-7. doi: 10.1002/jsfa.5797.
225. Barker KS, Liu T, Rogers PD. Coculture of THP-1 human mononuclear cells with *Candida albicans* results in pronounced changes in host gene expression. *J Infect Dis*. 2005 Sep;192(5):901-12.
226. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May;29(9):e45.

227. 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 Apr 18. [Epub ahead of print]
228. Bandara HM, Cheung BP, Watt RM, Jin LJ, Samaranayake LP. Secretory products of *Escherichia coli* biofilm modulate *Candida* biofilm formation and hyphal development. J Investig Clin Dent. 2013 Aug;4(3):186-99. doi: 10.1111/jicd.12048.
229. Jin Y, Zhang T, Samaranayake YH, Fang HH, Yip HK, Samaranayake LP. The use of new probes and stains for improved assessment of cell viability and extracellular polymeric substances in *Candida albicans* biofilms. Mycopathologia. 2005;159(3):353-60.
230. Aporana Sudhakaran V, Panwar H, Chauhan R, Duary R, Rathore R, Batish V, et al. Modulation of anti-inflammatory response in lipopolysaccharide stimulated human THP-1 cell line and mouse model at gene expression level with indigenous putative probiotic lactobacilli. Genes Nutr. 2013 Nov;8(6):637-48. doi: 10.1007/s12263-013-0347-5.
231. Duary RK, Bhausahab MA, Batish VK, Grover S. Anti-inflammatory and immunomodulatory efficacy of indigenous probiotic *Lactobacillus plantarum* Lp91 in colitis mouse model. Mol Biol Rep. 2012 Apr;39(4):4765-75. doi: 10.1007/s11033-011-1269-1.
232. van Baarlen P, Troost F, van der Meer C, Hooiveld G, Boekschoten M, Brummer RJ, et al. Human mucosal in vivo transcriptome responses to three lactobacilli indicate how probiotics may modulate human cellular pathways. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Mar;108 Suppl 1:4562-9. doi: 10.1073/pnas.1000079107.
233. Ma X, Yan W, Zheng H, Du Q, Zhang L, Ban Y, et al. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. F1000Res. 2015;4:1465. doi: 10.12688/f1000research.7010.1
234. Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. Annu Rev Immunol. 1995 Jan;13:251-76.
235. Trinchieri G. Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells. Immunol Today. 1993 Jun;14(7):335-8. Review.

236. Gately MK, Wolitzky AG, Quinn PM, Chizzonite R. Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. *Cell Immunol.* 1992;143(1):127-42.
237. Schreiber S, Heinig T, Thiele HG, Raedler A. Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 1995 May;108(5):1434-44.
238. D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med.* 1993 Sep;178(3):1041-8.
239. Wolf SF, Temple PA, Kobayashi M, Young D, Dicig M, Lowe L, et al. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J Immunol.* 1991 May;146(9):3074-81.
240. Aste-Amezaga M, Ma X, Sartori A, Trinchieri G. Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *J Immunol.* 1998 Jun;160(12):5936-44. Erratum in: *J Immunol* 2000 May 15;164(10):5330.
241. He J, Li Y, Cao Y, Xue J, Zhou X. The oral microbiome diversity and its relation to human diseases. *Folia Microbiol (Praha).* 2015 Jan;60(1):69-80. doi:10.1007/s12223-014-0342-2.
242. Tang C, Kamiya T, Liu Y, Kadoki M, Kakuta S, Oshima K, et al. Inhibition of Dectin-1 signaling ameliorates colitis by inducing *Lactobacillus*-mediated regulatory T cell expansion in the intestine. *Cell Host Microbe.* 2015 Aug;18(2):183-97. doi: 10.1016/j.chom.2015.07-03
243. Wartenberg A, Linde J, Martin R, Schreiner M, Horn F, Jacobsen ID, et al. Microevolution of *Candida albicans* in macrophages restores filamentation in a nonfilamentous mutant. *PLoS Genet.* 2014 Dec;10(12):e1004824. doi: 10.1371/journal.pgen.1004824.
244. Masuoka J. Surface glycans of *Candida albicans* and other pathogenic fungi: physiological roles, clinical uses, and experimental challenges. *Clin Microbiol Rev.* 2004 Apr;17(2):281-310. Review.
245. Barreto-Bergter E, Figueiredo RT. Fungal glycans and the innate immune recognition. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014 Oct;4:145. doi: 10.3389/fcimb.2014.00145.

246. 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;54(6):602-7.
247. Rizzello CG, Filannino P, Di Cagno R, Calasso M, Gobbetti M. Quorum-sensing regulation of constitutive plantaricin by *Lactobacillus plantarum* strains under a model system for vegetables and fruits. *Appl Environ Microbiol*. 2014 Jan;80(2):777-87. doi: 10.1128/AEM.03224-13.
248. Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2001;55:165-99.
249. Maldonado-Barragan A, Caballero-Guerrero B, Lucena-Padros H, Ruiz-Barba JL. Induction of bacteriocin production by coculture is widespread among plantaricin-producing *Lactobacillus plantarum* strains with different regulatory operons. *Food Microbiol*. 2013 Feb;33(1):40-7. doi: 10.1016/j.fm.2012.08.009.
250. 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/jan.12760.
251. Atanassova M, Choiset Y, Dalgalarondo M, Chobert JM, Dousset X, Ivanova I, et al. Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. *Int J Food Microbiol*. 2003 Oct;87(1-2):63-73.
252. Li H, Liu L, Zhang S, Cui W, Lv J. Identification of antifungal compounds produced by *Lactobacillus casei* AST18. *Curr Microbiol*. 2012 Aug;65(2):156-61. doi: 10.1007/s00284-012-5955-1.
253. Wang H, Yan Y, Wang J, Zhang H, Qi W. Production and characterization of antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. *PLoS One*. 2012;7(1):e29452. doi: 10.1371/journal.pone.0029452.
254. Ryu EH, Yang EJ, Woo ER, Chang HC. Purification and characterization of antifungal compounds from *Lactobacillus plantarum* HD1 isolated from kimchi. *Food Microbiol*. 2014 Aug;41:19-26. doi: 10.1016/j.fm.2014.01.011.
255. Rodrigues L, Banat IM, Teixeira J, Oliveira R. Biosurfactants: potential applications in medicine. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Apr;57(4):609-18. Epub 2006 Feb 6. Review.

256. 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;49(1):79-86. Epub 2006 Apr 17.
257. 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.
258. Maldonado-Barragan A, Ruiz-Barba JL, Jimenez-Diaz R. Knockout of three-component regulatory systems reveals that the apparently constitutive plantaricin-production phenotype shown by *Lactobacillus plantarum* on solid medium is regulated via quorum sensing. *Int J Food Microbiol*. 2009 Mar;130(1):35-42. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.033
259. Polke M, Hube B, Jacobsen ID. *Candida* survival strategies. *Adv Appl Microbiol*. 2015;91:139-235. doi: 10.1016/bs.aambs.2014.12.002.
260. Kucharikova S, Tournu H, Lagrou K, Van Dijck P, Bujdakova H. Detailed comparison of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin. *J Med Microbiol*. 2011 Sep;60(9):1261-9. doi: 10.1099/jmm.0.032037-0.
261. Anderson JM, Soll DR. Differences in actin localization during bud and hypha formation in the yeast *Candida albicans*. *J Gen Microbiol*. 1986 Jul;132(7):2035-47.
262. Parolin C, Marangoni A, Laghi L, Foschi C, Nahui Palomino RA, Calonghi N, et al. Isolation of vaginal lactobacilli and characterization of anti-*iuiiii* activity. *PLoS One*. 2015;10(6):e0131220.