VICTOR HARUO MATSUBARA

Colonização oral experimental por *Candida albicans* em camundongos
imunossuprimidos e tratados com *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus*
ramnosus

São Paulo

2011

VICTOR HARUO MATSUBARA

**Colonização oral experimental por *Candida albicans* em camundongos
imunossuprimidos e tratados com *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus
rhamnosus***

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências Odontológicas

Área de Concentração: Prótese Dentária

Orientador: Prof. Dr. Atlas Edson Moleros
Nakamae

São Paulo

2011

Matsubara VH. Colonização oral experimental por *Candida albicans* em camundongos imunossuprimidos e tratados com *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus rhamnosus*. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2011

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Ao meu pai, Paulo, sempre presente e disposto a ajudar,
pelos ensinamentos de vida, apoio em todas as horas e pela grande pessoa que é.
À minha mãe, Mieko, grande incentivadora, pelos seus ensinamentos profissionais,
pelo seu amor e dedicação

Ao meu irmão, Igor, companheiro e amigo

Ao meu avô, "Odi", grande responsável pela pessoa que eu sou hoje, por estar
sempre ao meu lado, fazendo muito mais que o papel de avô, sendo amigo e
companheiro

À minha avó, pelo incentivo, apoio e amor

Às minhas tias, por tudo o que fizeram e fazem por mim tanto na vida profissional,
quanto na vida pessoal

Aos meus tios e primos, sempre presentes

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

A vocês eu dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, na pessoa de seu diretor Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha e da chefe do Departamento de Prótese Profa. Dra. Tomie Nakakuki de Campos.

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da USP, presidida pela Profa. Dra. Maria Helena Cury Gallottini de Magalhães e à Coordenadora do Programa Profa. Dra. Dalva Cruz Laganá.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Atlas Edson Moleros Nakamae, não somente pela orientação em meu mestrado, mas também por toda ajuda acadêmica, profissional e pessoal que me proporcionou e continua proporcionando. Espero poder contar sempre com sua amizade, conquistada durante todo o período em que fui monitor, estagiário e pós-graduando da disciplina de Prótese Total da FOUUSP. Seus conselhos serão sempre muito bem recebido e terá sempre a minha eterna gratidão.

Ao pós-doutorando do Departamento de Microbiologia do ICB-USP, Eriques Gonçalves da Silva, pela co-orientação e essencial colaboração em minha pesquisa, disponibilizando o seu tempo e atenção para discutir os pontos importantes do projeto e por me passar parte do seu conhecimento no trabalho com leveduras e em modelo animal.

À doutoranda do departamento de prótese da Faculdade de Odontologia da USP, Karin Hitomi Ishikawa, por ter auxiliado no desenvolvimento e execução da pesquisa, e com a qual pude contar durante todo o mestrado.

À Prof. Dr. Claudete Rodrigues Paula por disponibilizar todas as instalações do Laboratório de Leveduras Patogênicas, do Departamento de Microbiologia do ICB-USP

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

Ao técnico do biotério do ICB-USP, Carlos, por ajudar nos cuidados com os camundongos usados na pesquisa.

Aos Professores da Disciplina de Prótese Total da Faculdade de Odontologia da USP, Prof. Dra. Maria Cecília Miluzzi Yamada, Prof. Dr. 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, Danilo, Flávio, Carol, Roger, Juliana, Tatinha, Sanmy, Jun e Wallace.

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

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

RESUMO

Matsubara VH. Colonização oral experimental por *Candida albicans* em camundongos imunossuprimidos e tratados com *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus rhamnosus* [dissertação] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011.

Bactérias probióticas, como *Lactobacillus sp*, são conhecidas como inibidoras do crescimento de microrganismos patogênicos, têm a capacidade de modificar o equilíbrio microbiológico do hospedeiro e reduzir o crescimento de patógenos, como o microorganismo *Candida albicans*. Para avaliar a colonização oral experimental e o seu tratamento com probióticos, 152 camundongos DBA/2 imunossuprimidos foram inoculados oralmente com uma suspensão (10^8 células viáveis) de *C. albicans*. Os animais foram divididos em 4 grupos: controle positivo (sem tratamento), tratados oralmente com nistatina, com *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus rhamnosus*. No grupo que recebeu nistatina, o tratamento foi iniciado um dia após a inoculação por *Candida*, já nos grupos que receberam as bactérias probióticas, os tratamentos foram iniciados 14 dias antes da inoculação. Tratamentos com nistatina e probióticos foram diários e duraram 13 dias. As avaliações foram realizadas 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13 dias após a inoculação inicial e feitas através de análises microbiológicas da mucosa oral dos animais. A colonização por *C. albicans* iniciou-se um dia após a inoculação, sendo o aumento das unidades formadoras de colônia progressivo e significativo até o sétimo dia. Após este período, observou-se uma redução significativa no isolamento de leveduras. Todos os tratamentos probióticos reduziram significativamente a colonização de *C. albicans* na mucosa oral dos animais, comparada com a do grupo de animais não tratados. No grupo tratado com *L. rhamnosus*, a redução da colonização de levedura foi significativamente maior comparado ao grupo nistatina. Concluiu-se que o modelo animal DBA/2 imunossuprimidos é um bom modelo experimental para o estudo da colonização oral e o tratamento com probióticos, no presente modelo, pode ser uma alternativa eficaz para a redução da *Candida* na cavidade oral.

Palavras-Chave: *Candida albicans*, imunossupressão, probióticos, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, camundongos, candidíase bucal.

ABSTRACT

Matsubara VH. Experimental oral colonization by *Candida albicans* in immunosuppressed mice treated with *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus* [dissertation] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011.

To evaluate experimental oral candidiasis and the treatment using probiotics, 152 DBA/2 mice after being immunosuppressed were orally inoculated with a suspension of *C. albicans* containing 10^8 viable cells of yeast. The animals were divided into four groups: positive control (untreated), treated orally with nystatin, with *Lactobacillus acidophilus* and with *Lactobacillus rhamnosus*. In the group that received nystatin, the treatment was initiated one day after *Candida* inoculation, and in the groups that received the probiotic bacteria, the treatment began fourteen days before inoculation. Treatments with nystatin and probiotics were daily and lasted 13 days. Evaluations were performed at 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 13 days (after the initial inoculation) and made by microbiological analysis of the oral mucosa of these animals. The colonization of *C. albicans* in the oral mucosa animals began one day after the initial challenge and it was progressive and significant until the seventh day, when there was a significant reduction in the isolation of yeast. All treatments with probiotic bacteria significantly reduced the colonization of *C. albicans* in oral mucosa of the animals, compared to the untreated animal group. In group treated with *L. rhamnosus* the reduction of colonization of yeast was significantly higher compared to the group receiving nystatin. Based on the findings of this study we suggest that animal model DBA/2 immunosuppressed is a good model for experimental oral candidiasis and the treatment with probiotics in this model may be an effective alternative to the treatment of oral candidiasis.

Keywords: *Candida albicans*, immunosuppression, probiotics, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, mice, oral candidiasis

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Tubo contendo amostra de <i>Candida albicans</i> ATCC 90028	53
Figura 4.2 - Camundongo DBA/2	55
Figura 4.3 - Ciclofosfamida.....	56
Figura 4.4 - Injeção intraperitoneal de solução aquosa de contendo Ciclofosfamida....	57
Figura 4.5 - Meio YPD.....	58
Figura 4.6 - <i>C. albicans</i> foi cultivada em meio YPD	58
Figura 4.7 - Levedura em PBS estéril.....	59
Figura 4.8 - Suspensão de <i>C. albicans</i> na concentração $1,0 \times 10^8$ células viáveis/mL .	59
Figura 4.9 - Swab estéril sendo embebido na suspensão de blastosporos contendo $1,0 \times 10^8$ células viáveis/mL	60
Figura 4.10 - Camundongo sendo inoculado com <i>C. albicans</i> , com auxílio de um swab estéril	61
Figura 4.11 - Camara de CO ₂	62
Figura 4.12 - Coleta de amostra através de swab.....	63
Figura 4.13 - Tubo Eppendorf contendo 1 mL de PBS estéril e swab (solução Inicial) .	64
Figura 4.14 - Agitação em vortex.....	65
Figura 4.15 - Esquema das diluições seriada.....	65

Figura 4.16 - Amostra sendo semeada na superfície do meio agar Sabouraud Dextrose	66
Figura 4.17 - Colônias de <i>C. albicans</i> na superfície do meio agar Sabouraud Dextrose	66
Figura 4.18 - Suspensão de <i>Lactobacillus</i>	67
Figura 4.19 - Seringa de 1 mL e agulha de gavagem com ponta romba.....	68
Figura 4.20 - Aplicação do probiótico	68
Figura 4.21 - Pipeta com ponteira descartável coletando nistatina	69
Figura 4.22 - Aplicação da nistatina na cavidade oral do camundongo	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Grupos, subgrupos, total de animais infectados e total de animais por grupo (incluindo controle negativo)	55
Tabela 5.1- Isolamento de <i>C. albicans</i> da mucosa oral de camundongos DBA/2 imunossuprimidos, não tratados e tratados com <i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> e nistatina.	74

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
B	Bifidobacterium
C	<i>Candida</i>
CD4	Grupamento de diferenciação 4 (Linfócito T)
CD8	Grupamento de diferenciação 8 (Linfócito T)
CEH	Células epiteliais humanas
CO ₂	Dióxido de carbono
CVV	Candidíase vulvovaginal
EI	Endocardite infecciosa
G	Gramas
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IFN	Interferon
IgA	Imunoglobulina A
IL	Interleucinas
i.p.	Intraperitoneal
Kg	Quilograma
KOH	Hidróxido de potássio
L	<i>Lactobacillus</i>
LAB	Bactérias ácido lácticas
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
MMLA	N ^G -monometil-L-arginina
NK	Natural Killers
NO	Óxido nítrico
OR	Odds ratio
PAS	Ácido periódico-Schiff
PBS	Solução tampão de fosfato
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
pH	Potencial hidrogênico

rRNA	RNA ribossômico
RNAm	RNA mensageiro
UFC	Unidade formadora de colônia
UI	Unidade internacional
v.o.	Via oral
YPD	Yeast Extract Peptone Dextrose Agar

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
3 PROPOSIÇÃO	52
4 MATERIAL E MÉTODOS	53
5 RESULTADOS.....	72
6 DISCUSSÃO	75
7 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS.....	85
ANEXOS	97

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento científico sobre a importância da microbiota intestinal para a saúde humana iniciou-se após o famoso cientista Louis Pasteur afirmar em 1877 que "os microrganismos são necessários para a vida humana normal".

Logo após Pasteur, outro conhecido cientista, Escherich, afirmou 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".

Os idosos são os indivíduos mais vulneráveis à maioria das infecções por patógenos, entre eles o gênero *Candida*. Isso se deve às doenças crônicas, medicação, higiene oral precária, diminuição do fluxo salivar e deficiência do sistema imunológico (1). Em 1999, Narhi et. al. (2), mostraram que 75% das pessoas idosas na Finlândia apresentavam fungo na cavidade oral, sendo o gênero *Candida* o mais prevalente. A colonização por esta levedura pode ser assintomática, porém o seu denso crescimento pode gerar vários tipos de lesões na mucosa e tornar-se sintomática (1).

A candidíase ou candidose é uma infecção primária ou secundária envolvendo as espécies do gênero *Candida*. Podem-se considerar patogênicas para o homem cerca de sete espécies: *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida viswanathii* e *Candida glabrata* (3).

O microrganismo *Candida albicans* é uma levedura endógena, isto é, encontrada normalmente na microbiota humana e depende de fatores predisponentes do hospedeiro para que manifeste a patogenicidade (4).

As manifestações clínicas da doença 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 generalizadas, como na septicemia, endocardite e meningite. Os processos patológicos também são variados, indo desde irritação e inflamação, até uma resposta granulomatosa e supurativa (3, 5-8).

Nos pacientes com sistema imunológico debilitados, desnutridos, idosos e recém-nascidos, a ocorrência de candidíase é alta, em suas variadas formas clínicas (9).

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

No exame direto a fresco, as leveduras apresentam-se sob a forma de células arredondadas ou ovaladas que se reproduzem por brotamento simples, e em determinadas condições podem apresentar filamentação (4). O exame direto pode ser: a fresco com KOH a 20%; esfregaços corados pelo Gram ou Giemsa (além de poder visualizar os elementos fúngicos, permite avaliar a quantidade de microrganismos); cortes histológicos: PAS ou Gomori & Grocott (elementos leveduriformes com brotamentos e filamentos abundantes) (13).

Com o isolamento em cultivo, após 24-48 horas formam-se colônias cremosas, esbranquiçadas e brilhantes. Ao exame microscópico visualizam-se apenas os elementos leveduriformes comuns a todas as espécies de *Candida*. A cultura deve ser feita em meio ágar malte ou ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (13).

Para o tratamento da candidíase oral, provocada por *C. albicans*, é muito utilizado a nistatina como fármaco tópico. Administra-se 2 ou 3 ml de uma solução contendo 100.000 unidades/ml de nistatina, colocados em cada lado da boca, fazendo-se bochechos e mantendo-se a solução durante pelo menos cinco minutos antes de sua deglutição, a cada 6 horas, durante pelo menos 10 dias ou 48 horas após a remissão dos sintomas. Em usuários de próteses totais, pode-se recomendar a aplicação tópica da pomada de nistatina (100.000 unidades/ml) a cada 6 horas à superfície da base que fica em contato com a mucosa. Este fármaco apesar de ser bem tolerado, pode causar distúrbios gastrointestinais leves e transitórios, como náuseas, vômito e diarreia, após ingestão oral (9).

Uma alternativa de tratamento, principalmente para os indivíduos intolerantes aos tradicionais fármacos usados no combate a infecções por fungos, seria a utilização de probióticos (14).

Os probióticos são microrganismos vivos, que administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (15-17).

Bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e, em menor escala, *Enterococcus faecium*, são mais freqüentemente empregadas como suplementos probióticos em alimentos, uma vez que elas têm sido isoladas de todas

as porções do trato gastrointestinal do humano saudável (18). Dentre as bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*, destacam-se *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. animalis*, *B. longum* e *B. thermophilum*. Dentre as bactérias lácticas pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, destacam-se *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* (19-21).

Os efeitos benéficos dos probióticos envolvem a redução de fatores de risco para determinadas doenças e melhora em determinadas funções naturais do corpo, ajudando com isso, a manter a saúde gastrointestinal e modulação benéfica do sistema imune.

Estudos mostram que as bactérias probióticas são capazes de combater infecção por *Candida*, tanto na cavidade oral, como também no trato gastrointestinal e vagina (14, 22-33).

Na microbiota intestinal humana, os probióticos são muito estudados e a sua influência benéfica, inclui fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando em um aumento da resistência contra patógenos. Assim, a utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento da proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (34, 35). O espectro de atividade dos probióticos pode ser dividido em efeitos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos (36).

Os benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos à ingestão de culturas probióticas que mais se destacam são: controle da microbiota intestinal; estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promoção da resistência gastrointestinal à colonização por patógenos; diminuição da população de patógenos através da produção de ácidos acético e láctico, de bacteriocinas e de outros compostos antimicrobianos; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose; estimulação do sistema imune; alívio da constipação; aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas (25-28, 31, 32, 37-42). Embora ainda não comprovados, outros efeitos atribuídos a essas culturas envolvem a diminuição do risco de câncer de cólon e de doença cardiovascular (17, 37, 43, 44). São sugeridos, também, a diminuição das concentrações plasmáticas de colesterol, efeitos anti-hipertensivos, redução da atividade ulcerativa de *Helicobacter pylori*, controle da colite induzida por rotavírus e por *Clostridium difficile*, prevenção

de infecções urogenitais, além de efeitos inibitórios sobre a mutagenicidade (37, 45-49). Estudos também mostram atividades antifúngicas, especificamente contra *Candida albicans*, na vagina (22-24, 33).

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, a competição por nutrientes e a 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 (23, 37, 40, 50, 51).

As bactérias probióticas têm a capacidade de modificar o equilíbrio microbiológico do hospedeiro e reduzir o crescimento de patógenos, como o gênero *Candida* (52). Na cavidade oral de ratos, os *Lactobacillus* reduzem o número de células de *Candida*, possivelmente pela indução da produção de interleucina 4 (IL-4) e interferon- γ (IFN- γ) nos nódulos linfáticos, e óxido nítrico (NO) na saliva (29). Os *Lactobacillus* também podem aderir-se ao epitélio da mucosa, competindo deste modo pelos sítios de adesão (23). In vitro, produzem diferentes metabolitos, como peróxido de hidrogênio (23), e peptídeos cíclicos antifúngicos (53), os quais inibem o crescimento de *Candida*. Testes em idosos, utilizando probióticos (*Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LC705, *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *sermanii* JS) indicaram a redução do crescimento por *Candida* oral, concluindo que essas bactérias reduzem a sua prevalência (14).

A seleção de bactérias probióticas tem como base os seguintes critérios preferenciais: o gênero ao qual pertence a bactéria deve ser de origem humana, estabilidade frente ao meio ácido e aos sais de bile, capacidade de aderir à mucosa intestinal e vaginal e de colonizar, ao menos temporariamente, o trato gastrointestinal humano e a vagina, capacidade de produzir compostos antimicrobianos e ser metabolicamente ativo no intestino. Outros critérios fundamentais são: segurança para uso humano, histórico de não patogenicidade e não estarem associadas a outras doenças, tais como endocardite, além da ausência de genes determinantes da resistência aos antibióticos (18-20, 32, 33, 40, 47, 54-58).

Bactérias ácido lácticas têm sido consideradas seguras e convenientes para o consumo humano. Poucos casos de infecções foram associados a essas bactérias,

enquanto vários estudos publicados mostraram a sua segurança para o consumo (15, 54, 56, 57, 59-63). Especificamente, os *Lactobacillus acidophilus* e os *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 (64) e na lista de Presunção Qualificada de Segurança feita pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (65).

Entretanto, é importante que seja salientado que os probióticos devem, necessariamente, resultar em efeitos benéficos mensuráveis sobre a saúde, substanciados por estudos conduzidos no hospedeiro ao qual ele destina-se. Em outras palavras, probióticos destinados para o uso em humanos requerem comprovação da eficácia através de ensaios em humanos (15, 16).

Assim, devido à existência de efeitos colaterais conseqüentes do uso de antifúngicos, ou pela própria intolerância ao medicamento em determinados indivíduos, os tratamentos alternativos, como o uso de probióticos no combate à candidíase oral, tornam-se necessários e importantes para melhorar a qualidade de vida desses pacientes. Para a utilização de probióticos em seres humanos são necessários estudos em modelo animal que comprovem a ação benéfica dessas bactérias para o hospedeiro, no combate ao patógeno. Os testes que verificam os efeitos de determinadas substâncias ou microrganismos em animais representam o segundo passo para a realização de testes em seres humanos, sendo os testes *in vitro* considerados o primeiro passo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CANDIDA NA CAVIDADE ORAL

Candida é o fungo patogênico mais comumente isolado da cavidade oral. Sua existência na cavidade oral pode ser comensal ou oportunista, apresentando vários atributos que contribuem para sua patogenicidade (5). O aumento da incidência de infecções virais que trazem a imunodeficiência humana e a AIDS resultou na ressurgência de infecções orais por *Candida* (5). Oito espécies de *Candida* são conhecidas como patogênicas, especialmente em pessoas imunossuprimidas: *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida viswanathii* e *Candida glabrata* (3).

Macroscopicamente, as espécies de *Candida* formam colônias de coloração creme, com odor característico quando crescem em condições aeróbicas, pH variando de 2.5 - 7.5 e temperatura entre 20° e 38°C. Todas as espécies são Gram-positivas, o formato dos blastosporos pode variar de ovóide a alongado ou espiral. Microscopicamente, *C. albicans* exibe um dimorfismo, no qual há uma transição dos blastosporos com brotamento ovóide para hifas distribuídas paralelamente. As observações dos tubos germinativos e clamidoconídios são úteis na identificação do microrganismo *C. albicans*. Todas as espécies de *Candida* patogênicas assimilam e fermentam glicose como uma fonte de carbono, nenhuma assimila nitrato como fonte de nitrogênio, mas variam na capacidade de utilizar outras fontes de carbono e nitrogênio (4).

Sendo a espécie *C. albicans* comumente encontrada na cavidade oral de indivíduos saudáveis (presente em cerca de 40 % da população humana), várias rotas de inoculação por *C. albicans* em humanos são estudadas. A transmissão da vagina da mãe para a boca de recém-nascidos durante o parto é um método de contaminação bem aceito (3). A fonte oral primária de *C. albicans* é o dorso da língua, já outros sítios orais como a mucosa e a placa que recobre a superfície dos dentes são colonizados secundariamente (5, 6).

Um dos fatores que afetam a distribuição da levedura *Candida* na cavidade oral é a saliva. Alguns estudos mostraram que a saliva reduz a adesão de *C.*

albicans ao acrílico (66, 67), no entanto, outro estudo mostrou que proteínas salivares ou mucina agem como receptores de manoproteínas da superfície do fungo (68).

Um estudo que mostra a importância da saliva na prevenção da candidíase oral foi o de Elguezabal et al. (69), 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 contra componentes da parede celular das leveduras, na adesão dessas duas espécies de *Candida* às CEH. Foram usadas cepas de *C. albicans* sorotipo A NCPF 3153, *C. albicans* sorotipo B ATCC 90028 e *C. dubliniensis* NCPF 3949. Verificou-se que *C. albicans* NCPF 3153 e *C. albicans* ATCC 90028 apresentaram maior adesão às CEH comparado com *C. dubliniensis* NCPF 3949. Verificou-se que IgA salivar inibiu a adesão de *C. albicans* às CEH. Esse efeito inibidor pode ser imitado pelos anticorpos monoclonais contra antígenos expressados na superfície da parede celular dos fungos.

Outro fator que influencia a distribuição por *Candida* na cavidade oral é o pH do meio, 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 da levedura *Candida* (6). Outro fator é a adesão do fungo, o qual envolve a interação entre ligantes celulares do microrganismo *Candida* e receptores celulares do hospedeiro. A hidrofobicidade da superfície celular está envolvida na adesão dos blastosporos às células epiteliais humanas. As mudanças nas proteínas da parede externa celular são responsáveis pelas mudanças na hidrofobicidade e hidrofiliabilidade. A hidrofobicidade celular da espécie *C. albicans* promove uma ligação difusa e plena aos tecidos do hospedeiro, já a hidrofilia celular promove uma ligação a sítios específicos. Estudos mostram que a espécie *C. albicans* na forma de hifa está associada com invasividade, já que se acredita que proteinases produzidas durante a formação de hifa ajudem a destruir a integridade da mucosa oral. Enzimas como fosfolipases e proteinases mostraram uma influência na adesão e invasão por *Candida* ao epitélio oral (4).

Os fatores predisponentes podem ser classificados em: fatores naturais, como infecções, diabetes, deficiência imune (HIV), estados hipoadócrinos, como hipotireoidismo, alterações psicológicas, gravidez, selinidade, malignidade, alterações fagocíticas, redução do fluxo salivar; fatores relacionados à dieta, como dietas ricas em carboidratos e deficiência de vitamina B12 e ferro; fatores

mecânicos, como o uso de dentaduras; e fatores iatrogênicos, como administração de contraceptivos, antibióticos, corticóides e outros agentes imunossupressivos e o fumo (5).

No caso de usuários de próteses totais, uma boa higiene oral e da prótese pode ser o suficiente para prevenir a candidíase oral. Em 2000, Budtz-Jorgensen et al. (70), realizaram um estudo com residentes de uma clínica geriátrica. Dentre os indivíduos avaliados, muitos faziam uso de próteses totais, outros usavam próteses totais e também apresentavam dentes naturais e uma minoria não apresentava dentes e nem próteses. Metade dos residentes, incluídos no grupo experimental, recebeu um programa de higiene oral preventivo, o qual incluía orientação de escovação, recebimento de escovas e dentifrícios fluoretados, orientação de cuidados com as próteses e conselhos de dietas. Enfermeiras receberam as informações e ficaram responsáveis pelos cuidados de higiene oral dos residentes do grupo experimental. Já no grupo controle, nenhum programa sistemático de cuidado com a saúde foi introduzido. Foi observado que através do programa de saúde bucal, a prevalência de estomatite causada por prótese reduziu em 24% no grupo experimental, já no grupo controle houve um pequeno aumento. Além disso, a prevalência de fungos na mucosa, indicando candidíase oral, reduziu em 50% a 23% no grupo experimental. Para o autor, a instituição de medidas de higiene oral meticulosas e a manutenção da prótese seca durante a noite são os meios mais importantes para controlar a candidíase oral em idosos. Concluiu-se que o programa preventivo foi eficiente na redução da colonização da mucosa oral e de próteses totais por *Candida* e com isso, podendo melhorar a saúde da mucosa oral.

A apresentação clínica da doença pode ser dividida em três categorias: agudo, crônico e mucocutâneo. A forma aguda é subdividida em pseudomembranosa, que aparece clinicamente como placas branca-creme, não queratótica, que podem ser removidas expondo uma mucosa eritematosa, acometendo a mucosa da língua, palato mole, bochecha, gengiva e faringe, podendo ser pequena ou cobrir uma grande área; e em forma aguda atrófica, que pode ocorrer após o uso prolongado de esteróides ou antibióticos de amplo espectro, não apresenta as placas superficiais, há somente o eritema, dor, sensação de queimação. Quando a língua é envolvida, o dorso apresenta áreas despapiladas, com coloração avermelhada e dolorida (3-5, 7, 8).

A candidíase crônica inclui as formas atrófica e hiperplásica, já a mucocutânea pode ser localizada, familiar ou relacionada à síndrome. A forma crônica atrófica está relacionada com o uso de dentaduras, sendo as lesões assintomáticas, mucosites eritematosas, limitada na área da prótese. No entanto quando é sintomática, pode apresentar-se com sangramento na mucosa, inchaço, queimação, dor, halitose, gosto desagradável e boca seca. Existem três tipos dessa candidíase, classificadas 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 (3, 4).

A causa da estomatite protética pode ser considerada multifatorial, envolvendo trauma causado por próteses mal adaptadas; uso contínuo da prótese, que neutraliza o efeito de limpeza gerado pela língua, saliva e anticorpos salivares; higiene da prótese; dieta; infecções por *Candida* e condições sistêmicas predisponentes (4).

A queilite angular é outra forma que geralmente está associada à candidíase atrófica crônica, os seus fatores predisponentes envolvem a deficiência de ferro, vitamina B12, dimensão vertical inadequada devido a oclusão inadequada da prótese e rugosidade na pele no canto da boca. Ela é caracterizada por eritema e fissura na comissura bucal (4, 6).

A forma crônica hiperplásica ou leucoplásica está geralmente associada com usuários de tabaco e nela, a hifa invade o epitélio e não somente coloniza a superfície. Apresentam-se como placas brancas crônicas na mucosa oral, firmes, resistentes à remoção e normalmente aparecem como lesões únicas próximo da comissura ou da língua. A espécie *C. albicans* pode ainda causar a chamada glossite rombóide mediana, mas não se sabe com certeza se ela é causadora dessa lesão ou simplesmente é um organismo oportunista que invade o tecido que está alterado por outro mecanismo (3-5, 7, 8).

O diagnóstico pode ser feito através de cultura de saliva, biópsia e exame direto do esfregaço colhido através de raspagem (71).

O hospedeiro apresenta defesas contra a infecção por *Candida* que incluem as interações microbianas; fatores salivares não-imunológicos (ferro, lisozina,

peptídios salivares, lactoferrina, lactoperoxidase, glicoproteínas salivares) e fatores imunológicos do hospedeiro (granulócitos, células mediadoras da imunidade, anticorpos, proteínas) (5).

A imunidade contra infecções por *Candida* em seres humanos é complexa, pois há diferentes tipos de candidíases, diferentes formas de *Candida* e de inter-relações entre a mucosa e o sistema imune sistêmico. As infecções em mucosas são os tipos mais comuns, mas infecções sistêmicas também podem ocorrer. A imunidade humoral é representada pelos anticorpos salivares do sistema imune da mucosa e pelos anticorpos séricos presentes na mucosa. Anticorpos salivares (IgA) mostraram-se capazes de inibir a aderência de *Candida* à células epiteliais bucais. A imunidade celular é primariamente importante na resistência do hospedeiro. Estudos in vitro mostraram que macrófagos e leucócitos polimorfonucleares podem destruir *Candidas* na forma de levedura e inibir na forma de hifa. A saliva mostrou-se importante para a integridade da mucosa oral, uma vez que pacientes com redução do fluxo salivar apresentam um aumento na susceptibilidade às infecções por *Candida*. Quando a flora normal é suprimida, por exemplo, durante o tratamento com antibióticos de largo espectro, a colonização da cavidade oral pelos fungos pode aumentar. Isso mostra que a inibição normal ao crescimento de fungos ocorre como resultado da competição entre bactérias e *Candida* por nutrientes essenciais ou pelo bloqueio de receptores na superfície de células epiteliais. A proliferação de linfócitos in vitro leva a produção de interferon (IFN) e interleucina-2, estas por sua vez, ativam células “Natural Killers” (NK) que combatem o gênero *Candida*. No entanto, esse fato ainda não foi demonstrado em infecções em mucosa. Apesar das investigações, os mecanismos de imunidade do hospedeiro contra infecções por *Candida* ainda são pouco compreendidos (72).

Estudos em animais foram desenvolvidos para observar a resposta do hospedeiro frente a uma infecção oral por *Candida*. No estudo de Lacasse et al. (73), em 1993, realizaram uma pesquisa com o objetivo de estudar os mecanismos de defesa do hospedeiro contra o primeiro contato com blastosporos de *Candida albicans*. Para o estudo foram usados camundongos CD-1, os quais foram contaminados por *C. albicans* através de aplicação tópica da levedura. Os animais foram sacrificados e analisados microbiologicamente e histologicamente. Foi observado um pico no nível de crescimento da levedura no quinto dia de infecção. Após o sétimo dia, a população estabilizou-se em cerca de 300 unidades formadoras

de colônia (UFC) por tecido mucoso excisionado. A infecção primária desencadeou uma resposta inflamatória que foi controlada no oitavo dia. Nesse ponto, o padrão histológico da mucosa atingiu um novo equilíbrio entre as células mononucleares recrutadas e as residentes. A infecção primária rapidamente estimulou também a imunidade celular. Após a segunda aplicação de *Candida*, 30 dias depois da primeira, a infecção foi detectada e a uma típica reação de hipersensibilidade local e tardia ocorreu entre 24-72 horas. Propuseram que a resistência adquirida, em conjunto com persistência de *Candida* em baixos níveis no modelo proposto, mimetiza o estado do portador em humanos.

Por sua vez, Chakir et al. (74) investigaram o impacto da introdução de *Candida albicans* em um sistema livre de *Candida*. O experimento foi realizado com camundongos BALB/c e DBA/2. *C. albicans* foi inoculada na cavidade oral dos animais através da aplicação tópica. Os animais foram sacrificados em datas pré-determinadas para avaliar a quantidade de levedura na cavidade oral, a mucosa oral dos camundongos infectados foi dissecada para avaliação histológica e imunohistoquímica. O sangue dos animais também foi coletado para verificar a porcentagem de neutrófilos polimorfonucleares. Foi observado que nas reações da mucosa durante a infecção dos dois tipos de camundongos, 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 do microrganismo *Candida* na mucosa, que ocorreu no dia 3 para os BALB/c e no dia 6 para os DBA/2. Nos camundongos DBA/2, células mediadoras da imunidade foram acionadas, já no BALB/c, tal fato não ocorreu.

Elahi et al. (75) realizaram, em 2000, uma pesquisa com camundongos DBA/2 e BALB/c, com o objetivo de avaliar a resposta imune desses animais frente a uma infecção oral por *Candida albicans*, analisando a resposta celular, a produção de anticorpos e as citocinas de células no linfonodo regional. Foram verificados níveis maiores de imunoglobulinas G (IgG) e anticorpos salivares IgA nos camundongos BALB/c, comparado aos DBA/2, após a infecção. Nos camundongos BALB/c, houve um aumento precoce nos níveis de IL-4, IFN- γ e IL-12, correlacionado com a rápida eliminação da levedura *C. albicans*. Nos DBA/2, nos quais a resolução da infecção foi mais demorada, os níveis de IL-4 foram menores. A neutralização de IL-4, através da injeção de anticorpos anti-IL-4, nos BALB/c, resultou em um atraso no controle dos fungos. Os dados sugeriram que a resposta das células T à infecção

por *C. albicans*, nos linfonodos regionais, foi uma resposta equilibrada de citocaina Th θ , envolvendo uma secreção precoce de IFN- γ e IL-4.

Em 2001, Elahi et al. (76), a fim de verificar o envolvimento de óxido nítrico (NO) na resistência às infecções por *Candida albicans*, os autores 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 na produção de NO detectado na saliva. Amostras de saliva pós-infecção inibiram o crescimento do fungo in vitro. Foi realizado, ao mesmo tempo, um tratamento com N^G-monometil-L-arginina (MMLA), um inibidor da síntese de NO, o que causou uma redução na produção de NO. Isto, por sua vez, causou um aumento no crescimento de *C. albicans*. A redução da produção de NO, após o tratamento com MMLA, correlacionou com uma redução na produção de interleucina-4 (IL-4), mas não de interferon- γ (INF- γ). Foi verificada uma relação funcional entre IL-4 e a produção de NO, em camundongos tratados com anticorpos monoclonais anti-IL-4, pois mostraram uma inibição na produção de NO na saliva e em culturas de células do linfonodo cervical estimuladas por antígenos de *C. albicans*. Os resultados deram suporte às conclusões anteriores em 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*.

Para o tratamento da candidíase oral existem diversos tipos de medicação. Os agentes antifúngicos disponíveis dividem-se em três categorias principais: polienos; azóis e análogos de DNA. Dentro do grupo dos polienos, pode-se destacar Anfotericina B e Nistatina. No grupo dos azóis, ressalta-se o Clotrimidazol, Miconazol, Cetoconazol, Fluconazol, Itraconazol. Nos análogos de DNA inclui-se a 5-fluorocitosina. Existem casos de infecções resistentes ao tratamento com fluconazol, que persistem mesmo após o tratamento com a droga. O biofilme de *Candida* e a resistência antifúngica ainda não estão bem esclarecidos. Em geral, microrganismos organizados em biofilmes são mais resistentes aos antifúngicos do que quando isolados (77). Existe uma vasta gama de novos antifúngicos como Amorolfina, Natifina, Terbinafina, Rilopirox e Benanomicina A. No entanto, há uma limitação sobre os conhecimentos sobre a farmacodinâmica oral desses agentes. A clorexidina, um agente bastante conhecido e usado na odontologia, é considerada um antifúngico oral, pois apresenta atividade fungicida e é capaz de reduzir a

adesão de *Candida* a substratos orgânicos e inorgânicos. Há ainda a possibilidade do uso de agentes antifúngicos incorporados a materiais dentários (71).

A profilaxia de candidíase oral em pacientes HIV positivos, realizando quimioterapia, radioterapia ou terapia imunossupressiva no combate de neoplasias, ou ainda terapia antibiótica prolongada pode ser considerada de extrema importância para a saúde bucal e geral destes indivíduos (7).

2.2 PROBIÓTICOS

Probióticos podem ser definidos como microrganismos vivos, quando ingeridos em quantidades adequadas, exercem benefícios à saúde, além da nutrição básica inerente (17, 21, 37, 78).

Durante as duas ultimas décadas, probióticos foram adicionados cada vez mais em vários tipos de produtos alimentares (iogurte, leite, queijo), suplementos alimentares (pílulas, cápsulas) e drogas (medicamentos), que devem estar de acordo com a regulamentação alimentar do país (15, 40).

Os benefícios trazidos ao homem pelo consumo de probióticos são a interferência, exclusão e antagonismo de patógenos, imunoestimulação e imunomodulação, as atividades anticarcinogênicas e antimutagênicas em modelos animal. Ajudam na saúde do trato vaginal/urinário, na redução da pressão sanguínea em hipertensos e do colesterol, na redução da incidência e duração de diarreia, na prevenção de vaginites e manutenção da integridade da mucosa, ajudam no alívio dos sintomas da má digestão da lactose, cujos sintomas incluem dores abdominais, náusea e flatulência. Dois mecanismos podem explicar essa última ação dos probióticos, uma delas é que as bactérias probióticas contêm altos níveis de lactase, estas agem sobre a lactose ingerida. O outro mecanismo seria que o iogurte, por passar lentamente pelo intestino, garante uma digestão lenta da lactose, reduzindo os sintomas. Os probióticos ajudam a combater a diarreia causada pela infecção por rotavírus, a diarreia causada pelo uso de antibióticos e a que acomete viajantes, através da fortificação da integridade da mucosa e/ou estimulação da resposta imune. Eles ainda ajudam no tratamento de desordens de etiologia desconhecida que se caracterizam pela inflamação crônica ou recorrente da mucosa. Essa ação

pode ser explicada, pois os probióticos estariam interagindo com as células T reguladoras da mucosa e regulando os fatores de transcrição da citocaina na mucosa, em resposta à invasão bacteriana. Estudos relataram que probióticos ajudam na resposta imune, por exemplo, *L. rhamnosus* GG reduzem a resposta imunoinflamatória em indivíduos com hipersensibilidade ao leite, enquanto agem como imunoestimulador em indivíduos saudáveis. Probióticos também ajudam no combate de distúrbios intestinais como a síndrome do intestino irritado, assim como, combatem e previnem colite pseudomembranosa, pois o probiótico ocuparia o sítio que o patógeno normalmente ocupa. A ação dos probióticos mostra-se multifatorial, no entanto, ainda não estão claros os mecanismos usados pelos probióticos para melhorar a saúde humana. (15, 17, 37-39, 50, 79).

Há indícios que mostram a habilidade dos probióticos de benéficamente modular biomarcadores de câncer colorretal. Algumas atividades enzimáticas expressas por bactérias intestinais implicam na conversão de constituintes da dieta em componentes tóxicos e carcinogênicos. Muitos probióticos mostram que reduzem o nível de atividade dessas enzimas. Em ratos, probióticos reduziram a incidência de tumores no cólon. (37).

Pascual et al. (80), em 2008, testou *Lactobacillus*, como probióticos, na manutenção da saúde do trato urogenital e também na prevenção e terapia de infecções urogenitais. A amostra isolada da vagina de mulheres saudáveis, não grávidas e na pré-menopausa foi identificada como *L. rhamnosus* L60. Esta bactéria foi avaliada em sua atividade antimicrobiana, na resistência antibiótica in vitro, na auto-agregação, na hidrofobicidade de superfície, na co-agregação com outras espécies de bactérias, na produção de peróxido de hidrogênio e na aderência bacteriana. A capacidade inibitória do *L. rhamnosus* não foi alterada pelo calor, manteve-se em atividade inibitória em pH variando de 4.0 a 7.0. A atividade antimicrobiana foi mais estável em pHs ácido e neutro, tornando progressivamente inativo em pH alcalino. Tripsina eliminou completamente a atividade. A bactéria mostrou alta hidrofobicidade, que é um importante mecanismo para a adesão bacteriana. L60 mostrou auto-agregação, co-agregação com *C. albicans*. Esta co-agregação pode ser um importante fator na manutenção da saúde vaginal, pois é produzida uma área ao redor do patógeno onde a concentração de substâncias antimicrobianas, produzidas pelos *Lactobacillus*, é maior. L60 mostrou ainda uma capacidade de adesão que pode promover uma colonização do epitélio vaginal,

havendo assim a formação de um filme bacteriano que tende a excluir patógenos da mucosa. De acordo com as características, o *L. rhamnosus* L60 pode ser considerado um probiótico potencial.

Akalin et al. (81), em 1997, realizaram um experimento para verificar o efeito do consumo de iogurte, contendo *Lactobacillus acidophilus*, sobre a taxa de colesterol, triglicerídeos e níveis de lipoproteína em camundongos. Os animais foram divididos em três grupos, nos quais recebiam uma dieta contendo leite, iogurte ou iogurte com *L. acidophilus*. Verificou-se que os camundongos que receberam iogurte e iogurte com *L. acidophilus* apresentaram um ganho de peso maior do que aqueles que receberam leite. Os valores médios da concentração de colesterol sanguíneo e de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL) foram significativamente reduzidos quando alimentados com iogurte com *L. acidophilus*. Por outro lado, a densidade de lipoproteína e triglicerídeos não foram afetadas pelo tipo de dieta.

Por sua vez, Meurman (51) publicou uma revisão bibliográfica sobre bacterioterapia probiótica sob a perspectiva da saúde oral. Estudos recentes mostram que *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* podem exercer efeitos benéficos na cavidade oral, através da inibição de *Streptococos* cariogênicos e *Candida* sp. Probióticos têm sido usados com sucesso no controle de doenças gastrointestinais, além de aparentemente aliviarem os sintomas de alergias e doenças com patologia imunológica. Os mecanismos de ação dos probióticos aparentemente estão ligados com a resistência a colonização e modulação imune. Bactérias ácido lácticas podem produzir diferentes componentes antimicrobianos, como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, peróxido de carbono, diacetil, substâncias antimicrobianas de baixo peso molecular, bacteriocinas e inibidores de adesão, que também afetam a microflora oral. No entanto, são poucas as informações sobre a ação dos probióticos na cavidade oral. Mais informações são necessárias sobre a colonização de probióticos na cavidade oral e seus possíveis efeitos sobre o biofilme oral. Há razões para acreditar que os mecanismos de ação dos probióticos na cavidade oral são os mesmos que em outras partes do trato gastrointestinal. Devido o aumento da resistência das drogas antimicrobianas, o conceito de terapia probiótica é interessante e pertinente.

Já em 2008, Köll et al. (41) realizaram uma pesquisa com o objetivo de caracterizar *Lactobacillus* orais em relação às propriedades probióticas potenciais, de acordo com o guia internacional de avaliação de probióticos, e para selecionar os

probióticos com potencial para serem usados a favor da saúde oral. Para o estudo foram coletados *Lactobacillus* da saliva e da região subgengival de indivíduos saudáveis. Todas as bactérias foram identificadas, testadas em relação à atividade antimicrobiana contra patógenos orais. Foi testada também, a tolerância ao baixo pH, à bile, à lisozina e a susceptibilidade aos antibióticos. Dentre as bactérias identificadas estavam o *L. rhamnosus* e o *L. acidophilus*. A maioria dos *Lactobacillus* identificados suprimiu o crescimento dos patógenos periodontais: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermédia* e o cariogênico *S. mutans*. No entanto, nenhum inibiu o crescimento de *C. albicans*. O menor pH tolerado durante 4 horas de incubação foi de pH 2.5, mas nenhuma amostra cresceu neste pH. Todos os tipos de bactérias analisadas toleraram altas concentrações de bile humana e altas concentrações de lisozina (50 vezes a concentração fisiológica). Esta é uma enzima que é encontrada na saliva e que é eficiente em matar uma série de tipos de bactérias gram-positivas através do rompimento da parede celular e subsequente lise da célula. Apesar da maioria das bactérias analisadas serem sensíveis a grande número de antibióticos, houve alto nível de resistência à cefoxitina, vancomicina, ciprofloxacina e metronidazol. *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. salivarius* e *L. rhamnosus* mostraram alta atividade antimicrobiana e alta tolerância a estresse do ambiente. Tais resultados confirmam o potencial de *Lactobacillus* orais serem usados como probióticos para a saúde bucal.

Os efeitos benéficos trazidos pelos probióticos dependem da permanência dessas bactérias no trato gastrointestinal. Estudos mostram que os probióticos, entre eles os *L. rhamnosus* e *L. acidophilus*, não permanecem muito tempo no trato gastrointestinal, ou seja, não colonizam permanentemente essa região, necessitando doses regulares das bactérias probióticas para que esses organismos colonizem a microflora intestinal permanentemente, já que os efeitos benéficos dos probióticos terminam quando o número desses microrganismos diminui (39, 50).

Uma bactéria é considerada probiótica, viável de ser incorporada em alimentos do dia a dia, quando apresenta determinados critérios. Estes podem ser divididos em quatro categorias: apropriação, adequação tecnológica, competitividade e performance e funcionalidade. Na apropriação inclui-se a origem humana dos probióticos; ausência de toxicidade e patogenicidade. Na adequação tecnológica inclui-se a possibilidade de produção em massa e estocagem; viabilidade em altas populações; estabilidade das características desejadas durante a preparação da

cultura, estocagem e entrega; prover qualidades desejadas quando incluído em alimentos e processos de fermentação, apresentar estabilidade genética, manter a viabilidade e as propriedades médico-científicas dos microrganismos até o seu consumo; ser tolerante a baixo pH e bacteriófagos em produtos alimentares manufaturados; ser tolerante à conservantes e outros microrganismos presentes nos alimentos. Na categoria competitividade, inclui-se a capacidade de sobrevivência, proliferação e atividade metabólica em um sítio alvo in vivo; tolerância ao trânsito pelo ambiente gástrico e pelo ambiente do intestino delgado; tolerância aos sais de bile; capacidade de crescer no lúmen do trato gastrointestinal; capacidade de competir com a microflora normal, incluindo a mesma ou parecidas espécies; potencialmente resistente à bacteriocinas e outros antimicrobianos produzidos pela microflora residente; aderência e colonização preferencial; ter adesão epitelial e adesão às mucinas e mucosas; permanência e crescimento após a adesão; produção de exopolímeros, cujas funções incluem a promoção da adesão, estabilização e persistência da adesão e promoção de resistência à imunidade não-específica e específica do hospedeiro; habilidade de co-agregação que ajuda na eliminação e/ou destruição de patógenos no trato gastrointestinal. Nas categorias performance e funcionalidade incluem-se a capacidade de exercer um ou mais benefícios clínicos à saúde; promoção de resistência gastrointestinal à colonização de patógenos; amenização da má-digestão da 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, pois os probióticos reduzem a absorção gastrointestinal de colesterol exógeno e endógeno e/ou inibem a produção de colesterol no fígado, reduzindo assim a taxa de colesterol no sangue; antagonismo à bactérias patogênicas; produção de substâncias antimicrobianas; imunoestimulação; antimutagenicidade; anticarcinogênico e produção de compostos bioativos. Assim, a escolha de qual microrganismo será adicionado aos alimentos envolve um conhecimento das propriedades individuais dos probióticos (18, 19, 39, 40, 47, 58).

A capacidade de autoagregação (união de microrganismos da mesma espécie) é um importante pré-requisito para a colonização e infecção de patógenos no trato gastrointestinal. Já a capacidade de agregar e coagregar (união de microrganismos de espécies diferentes) dos probióticos usados em alimentos pode impedir que patógenos colonizem a superfície epitelial. Collado et al. (82) realizou

um estudo para avaliar a capacidade de probióticos de aderir e agregar a determinados patógenos. Todos os probióticos testados apresentaram capacidade de coagregação aos patógenos testados. Os resultados mostraram que o conhecimento da capacidade de um determinado probiótico de autoagregação e a capacidade de coagregação a patógenos é importante para determinar se a bactéria será potencialmente benéfica para o ser humano.

Os microrganismos mais comuns usados como probióticos são os *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Saccharomyces*, *Enterococcus*. Eles são os mais usados, pois estão presentes na microflora intestinal, são usados tradicionalmente na produção de produtos fermentados e são geralmente amostras seguras (18, 19).

Sabemos que *Lactobacillus* fazem parte da microflora normal do trato gastrointestinal e que a habilidade de interagir com células epiteliais do trato intestinal é uma importante propriedade desses organismos. No entanto, os mecanismos através dos quais eles ligam-se às células intestinais ainda são desconhecidos. Com isso, Buck et al. (83) em 2005, realizaram uma pesquisa com o objetivo de investigar proteínas da superfície celular de *Lactobacillus acidophilus* NCFM que promoveriam essa ligação. Usando dados da sequência genômica, identificaram-se quatro proteínas potencialmente envolvidas na adesão celular (proteína ligadora de mucina, ligadora de fibronectina, proteína da camada superficial e homólogos R28 estreptocócica). Foram feitas mutações nos genes que codificam essas proteínas e as habilidades dos mutantes de aderir às células do epitélio intestinal foram avaliadas in vitro. Este estudo demonstrou que todas as proteínas avaliadas podem contribuir individualmente para a capacidade do organismo de ligar-se às células intestinais in vitro.

Reid (84), em 2000, analisou o *Lactobacillus acidophilus* NCFM, in vitro, e verificou que suas características indicavam que poderia ser usado como um probiótico para aplicação no trato urogenital. As suas características foram comparadas com *L. rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14, ambos conhecidos por colonizar a vagina. Verificou-se que o *L. acidophilus* NCFM também adere às células do trato urogenital e produzem biossurfactantes que significativamente inibem a adesão de uropatógenos. Além disso, a capacidade de aderir e competir pelos sítios de ligação diminui a união de uropatógenos.

Em 1997, Wagner et al. (85) avaliaram a capacidade de quatro bactérias probióticas, entre elas o *Lactobacillus acidophilus*, de colonizar, infectar, estimular a resposta imune e de afetar o crescimento e sobrevivência de camundongos imunodeficientes congênitos. Verificou-se que a bactéria colonizou e persistiu no trato gastrointestinal por todo o período do estudo (12 semanas). As bactérias probióticas manifestaram diferentes capacidades de adesão às superfícies epiteliais, sendo a bactéria *L. acidophilus* uma das que apresentaram maior adesão. Houve ainda diferenças na capacidade de disseminação aos órgãos internos, de afetar o peso do camundongo adulto e de estimular a resposta imune. Observou-se um aumento na produção de anticorpos no sangue, mas não se detectou aumento na proliferação de linfócitos, em resposta a um antígeno específico do probiótico in vitro. Durante todo o experimento, não houve morbidade ou mortalidade dos camundongos adultos, colonizados com os probióticos, mostrando que as bactérias probióticas tendem a ser seguras em imunocompetentes e adultos imunodeficientes.

Os mecanismos de ação dos probióticos envolvem a produção de substâncias antimicrobianas que reduzem o número de células viáveis e que afetam o metabolismo ou a produção de toxinas do patógeno; a competição pelos receptores de adesão, já que alguns probióticos têm a capacidade de se aderir à parede epitelial e competir com os patógenos pelos receptores; a competição por nutrientes e a estimulação da imunidade, por exemplo, através do aumento dos níveis de anticorpos e a estimulação da atividade de macrófagos contra diferentes tipos de patógenos, gerada pela administração de *Lactobacillus* (50, 86).

Barefoot et al. (87), em 1983, realizaram um estudo no qual foi verificado a atividade de uma bacteriocina produzida por *Lactobacillus acidophilus*, denominada Lactacin B. Um total de 52 amostras de *L. acidophilus* foram examinadas para verificar a produção de bacteriocinas. A maioria dessas bacteriocinas demonstrou uma atividade inibitória contra grupos de *Lactobacillus leichmannii*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus lactis*. Foi observada também a inibição de *Streptococcus faecalis* e *Lactobacillus fermentum*, o que sugere um segundo sistema de antagonismo. O agente produzido pelo *L. acidophilus* N2 e responsável pela inibição de *L. leichmannii*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus* e *L. lactis* foi investigado. O agente foi sensível à enzimas proteolíticas e manteve atividade completa após 60 minutos, a 100 °C (pH 5). A atividade contra células sensíveis foi

bactericida, mas não bacteriostática. Essas características identificaram o agente inibidor como sendo uma bacteriocina, denominada Lactacin B.

Em 1986, Perdigon et al. (35) avaliaram, em camundongos, o efeito de *Lactobacillus casei* e *L. bulgaricus*, administrados via oral (v.o.), sobre a ativação de macrófagos. Os lactobacilos foram administrados durante 8 dias. A atividade dos macrófagos foi medida através de critérios bioquímicos e funcionais. Os dados foram comparados de acordo com o tipo de administração, via oral e inoculação intraperitoneal (i.p.), utilizando as mesmas espécies de lactobacilos, em doses iguais e também em camundongos. A atividade fagocítica foi significativamente maior nos camundongos tratados intraperitonealmente. Para a administração via oral, houve um aumento somente com *L. casei*. Em relação à função fagocítica do sistema reticuloendotelial, foi verificado que os dois tipos de lactobacilos aceleraram a função fagocítica tanto na v.o., quanto i.p. Com essas observações, concluiu-se que *L. casei* e *L. bulgaricus* administrados via oral, são capazes de ativar macrófagos em camundongos. Isto sugere que quando essas bactérias passam pelo trato gastrointestinal, podem ser responsáveis pela melhora na resposta imune do hospedeiro.

Com o objetivo de mostrar convincentemente as propriedades imunomodulatórias de bactérias ácido lácticas em humanos, Schiffrin et al. (88), em 1995, realizaram um estudo com voluntários saudáveis, os quais foram divididos em dois grupos. Um grupo consumiu leite fermentado suplementado com *Lactobacillus acidophilus* e o outro grupo suplementado com *Bifidobacterium bifidum*, ambos durante 3 semanas. Amostras de sangue foram coletadas para verificar mudanças nos linfócitos ou na atividade fagocítica dos leucócitos, após o consumo dos produtos fermentados. Não foram observadas modificações nas subpopulações de linfócitos. A fagocitose de *Escherichia coli* sp., in vitro, foi aumentada após a administração dos produtos. Esse aumento da fagocitose foi coincidente com a colonização fecal pelas bactérias ácido lácticas e persistiu por 6 semanas após a ingestão dos produtos. Após esse período, a taxa fecal das bactérias retornou para as concentrações anteriores ao consumo. Com isso, verificou-se que esses microrganismos podem ser usados como suplementos nutricionais para melhorar a função imune de grupos com idades particulares, como recém-nascidos ou idosos, nos quais essa função está diminuída.

Em 2007, Collado et al. (89) realizaram um estudo para analisar, *in vitro*, a capacidade de bactérias probióticas derivadas de produtos a base de leite fermentado, de inibir, competir e diminuir a adesão de patógenos ao muco intestinal humano. 12 probióticos foram testados, incluindo o *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Todos eles foram capazes de inibir e deslocar a adesão de *Bacteroides*, *Clostridium*, *Staphylococcus* e *Enterobacter*. Verificou-se que essas habilidades dependem simultaneamente do probiótico e do patógeno testado, necessitando estudos caso a caso para selecionar o melhor probiótico para a inibição de determinado patógeno.

Em 2008, Paineau et al. (90) realizaram um estudo piloto para investigar as propriedades imunomodulatórias de sete espécies de probióticos, entre eles o *L. acidophilus* NCFM. Voluntários consumiram 2×10^{10} UFC de bactéria ou placebo durante 3 semanas. Os indivíduos receberam uma vacina oral de colera no dia 7 e 14, sendo amostras de sangue e de saliva coletadas nos dias 0, 21 e 28. As amostras de soro foram analisadas especificamente para IgA, IgG e IgM. A saliva foi analisada somente para IgA, através de ELISA. Com o trabalho, concluiu-se que alguns probióticos, incluindo *L. acidophilus* NCFM, promoveram uma resposta imune mais rápida, medida através dos indicadores de imunoglobulina do soro, especialmente IgG. Com isso, mostrou-se que espécies específicas de probióticos podem agir como adjuvante da resposta imune humoral.

Os idosos apresentam um risco mais elevado de adquirirem doenças infecciosas e não infecciosas devido a uma queda na atividade celular linfóide, relacionada com a idade. Estudos anteriores sugeriram que a suplementação na dieta pode representar um meio efetivo para melhorar a atividade das células “natural killers” (NK), circulantes na corrente sanguínea do idoso. Com isso, em 2001, Gill et al. (91) realizaram uma pesquisa com o objetivo de determinar o impacto da suplementação alimentar com bactérias probióticas ácido lácticas sobre a atividade das células NK, presentes na corrente sanguínea periférica de idosos. *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium lactis* foram ingeridos associados ao leite durante três semanas. A dieta somente com leite não afetou significativamente as células NK. Em contrapartida, a proporção de linfócitos CD56-positivo na circulação periférica foi maior após o consumo do leite suplementado com probióticos. A atividade tumoricida das células sanguíneas mononucleares periféricas contra células K562 também aumentou. Os indivíduos com mais de 70 anos de idade apresentaram um aumento médio na função das células NK, devido o consumo das

bactérias ácido lácticas, muito maior que nos indivíduos com menos de 70 anos. Tal fato mostrou uma relação significativa entre idade e aumento da atividade das células NK devido o consumo dos probióticos. A atividade aumentada persistiu somente durante o período em que foi consumido o probiótico, sugerindo que o consumo das bactérias probióticas deve ser mantido para haver melhora no sistema imune do indivíduo.

Lactobacillus acidophilus NCFM é uma das principais bactérias probióticas. Sanders et al. (21) escreveram uma revisão de literatura sobre as bases científicas da função desta bactéria como probióticos. Segundo a revisão, o *Lactobacillus acidophilus* NCFM está presente em alimentos convencionais (leite, iogurte) e em suplementos alimentares. Apresenta uma boa estabilidade para ser comercializado, já que mantém um bom número de células viáveis após congelamento para estocagem. Apresenta uma atividade antimicrobiana, excluindo ou inibindo atividades prejudiciais de microrganismos patogênicos. Estudos in vitro (21) mostraram que *Lactobacillus* frequentemente produzem bacteriocinas, as quais apresentam atividade bactericida ou bacteriostática contra outras espécies. Esse *Lactobacillus* mostrou-se capaz de aderir-se às células humanas, como as células intestinais. A redução do total de colesterol ou de lipoproteínas de baixa densidade encontrados no plasma humano tende a reduzir o risco de doenças coronárias no coração. Probióticos, incluindo *Lactobacillus acidophilus*, mostraram-se capazes de reduzir esses lipídeos sanguíneos. O consumo de lactose por certas pessoas pode resultar em um desconforto intestinal devido à fermentação da lactose, que passa sem ser digerida pelo intestino. Estudos (18, 19, 39, 40, 47, 58) mostraram que *Lactobacillus*, probióticos, melhoraram a digestão de lactose ou aliviaram os sintomas em indivíduos lactase-deficientes. Esses probióticos apresentaram atividade anticarcinogênica, principalmente no câncer de colo, aumentando o período de latência do câncer e ainda demonstraram capacidade de melhorar a resposta imune do hospedeiro no combate da *Candida albicans*, por exemplo. O uso de bactérias probióticas através da ingestão ou da aplicação intravaginal tem sido explorado no controle de infecções no sistema urogenital. Foi verificada também a sua capacidade de reduzir a incidência de diarreia em crianças e a sua segurança para ser utilizado.

A segurança no consumo de probióticos é bastante discutida na literatura. Membros do gênero *Bifidobacteria* e *Lactobacillus* são considerados, de forma geral,

como pertencentes ao grupo de microrganismos com a segurança reconhecida generalizada. Muitas espécies de lactobacilos fazem parte de produtos fermentados, como o queijo, leite fermentado e iogurte e são consumidos há bastante tempo com segurança, sendo habitantes não-patogênicos do trato intestinal humano. Artigos mostram a segurança do consumo de probióticos por pessoas saudáveis (15, 19, 54, 57, 59-61, 63, 79, 92).

Os *Lactobacillus* raramente são patogênicos ao homem e aos animais (85). No entanto, há casos de infecções envolvendo pacientes com cateter venoso central, sendo o *L. casei* e o *L. rhamnosus* os principais suspeitos de causar a infecção. Um possível fator de risco pode ser o grande consumo diário de produtos contendo *L. rhamnosus* GG. Existem casos de infecções associadas com *Lactobacillus*, como endocardites, bacteremia, infecções locais, peritonites, abscessos, meningite e pneumonia. A habilidade de agregar em placas é considerada uma possível característica patogênica na progressão da endocardite infecciosa. Na maioria desses casos de infecção, o *Lactobacillus* causador, aparentemente seria originado da própria microflora do hospedeiro, e não de produtos fermentados ou probióticos consumidos. Além disso, os casos de infecção acometem pacientes com a saúde comprometida, com função imune reduzida (15, 19, 54, 63). Uma doença específica da cavidade oral associados ao consumo de lactobacilos é a cárie dental (92).

As evidências sugerem que o risco de infecções por *Lactobacillus* ou *Bifidobacteria* usadas como probióticos é similar ao risco das infecções causadas por microrganismos comensais, e o consumo de produtos contendo essas bactérias apresentam um risco negligenciável aos consumidores, incluindo indivíduos imunocomprometidos (57).

Salminen et al. (56), em 2002, realizaram um estudo procurando correlacionar o possível aumento da bacteremia por *Lactobacillus* devido ao elevado consumo de *Lactobacillus rhamnosus* GG como probióticos, na Finlândia. *Lactobacillus* supostamente apresentam baixa patogenicidade e são raramente detectados em cultura de sangue. *L. rhamnosus* GG, originado do intestino humano, tornou-se disponível para uso como probiótico em 1990 na Finlândia. *Lactobacillus* foram isolados em 0.02% de todas as culturas de sangue avaliadas e não houve indícios que sugeriam 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 uso de dessas bactérias como probióticos não levou a um aumento na bacteremia por *Lactobacillus*.

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 apresentam resistência intrínseca a vários antibióticos e potencial para servirem como reservas de genes antibiótico-resistentes, podendo transferi-los para outras bactérias. Entretanto, na maioria dos casos essa resistência não é transmissível a outras bactérias. Mesmo nos casos de bactérias ácido lácticas associadas a infecções, existem uma ampla e segura variedade de antibióticos para os quais elas são sensíveis. As infecções oportunistas podem ser complicadas pela resistência antibiótica de determinados *Lactobacillus* (54, 62, 63). Com isso, antes de lançar um produto contendo probióticos no mercado, deve-se verificar se a bactéria isolada não contém genes de resistência transmissíveis. Novas bactérias usadas como probióticos devem ser escolhidas a partir da flora comensal de seres humanos reduzindo o risco de raras infecções por probiótico. Um dos procedimentos que pode ajudar na avaliação dos probióticos é seqüenciamento do genoma de várias bactérias, que pode gerar informações importantes para a comparação entre as 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 (93). Casos raros de infecções por probióticos devem ser acompanhados e estudados para obter confirmações e caracterizações moleculares. (57).

Danielsen et al. (62), em 2003, realizaram um estudo com o objetivo de estabelecer os níveis de susceptibilidade de *Lactobacillus* spp. à 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. Baseados nos resultados, mínimas concentrações de inibições para cada espécie de *Lactobacillus* são possíveis de serem sugeridas, as quais podem ser usadas como

marcadores microbiológicos na identificação das bactérias com genes de resistência transferíveis.

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 antibiótico terapia e a relação com espécies que produzem fatores de virulência (15).

Avanços na microbiologia e biologia molecular proporcionaram ferramentas moleculares para identificar adequadamente as espécies de probióticos. O sequenciamento direto de determinadas regiões do rRNA é o método preferido para a identificação de novas culturas de probióticos. Considera-se de extrema importância a determinação da sequência do genoma das bactérias probióticas, já que uma vez determinada, será possível entender as capacidades dos *Lactobacillus* no trato gastrointestinal, promover novas aplicações a eles, melhorar a sua funcionalidade, aprimorar a habilidade de selecionar e combinar espécies através da projeção genética dos probióticos. A ciência probiótica será beneficiada por ferramentas moleculares, que podem ser usadas para investigar as interações microbianas complexas que ocorrem entre as culturas fornecidas e a microbiota residente (15, 39).

2.3 CANDIDÍASE NO TRATO GASTROINTESTINAL E PROBIÓTICOS

Bactérias probióticas apresentam um potencial bioterapêutico na profilaxia e terapia contra doenças causadas por fungos, protegendo o hospedeiro através de uma variedade de mecanismos imunológicos e não imunológicos. Os probióticos modulam a resposta imune, influenciando anticorpos e células mediadoras do sistema imune, reduzindo o número de infecções orogástricas, por exemplo. O estudo de Wagner et al. (28), em 1997, comprovou tais afirmações. Realizaram a pesquisa avaliando os efeitos bioterapêuticos de quatro espécies de bactérias probióticas (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei* GG e

Bifidobacterium animalis) sobre a candidíase em camundongos imunodeficientes. *Candida albicans* e cada espécie de bactéria foram colonizadas no trato gastrointestinal de camundongos saudáveis e imunodeficientes. Foi observado que a presença de bactérias no trato prolongou a sobrevivência dos camundongos imunodeficientes adultos e recém-nascidos, a incidência de candidíase sistêmica foi reduzida nesses camundongos, além de reduzir o número de *C. albicans* no trato gastrointestinal. Entretanto, nenhuma bactéria probiótica preveniu completamente a candidíase na mucosa.

No ano seguinte, Wagner et al. (27) deram continuidade com seus estudos sobre a ação protetora dos probióticos no trato gastrointestinal. Compararam duas espécies de *Bidobacterium* spp. (*B. infantis* e *B. lactis*) em relação às suas capacidades de proteger camundongos imunodeficientes de candidíase orogástrica e letal. Para a pesquisa foram usados camundongos imunodeficientes bg/bg-nu/nu e bg/bg-nu/+. Os animais foram contaminados com *C. albicans* através de swab e com um dos tipos de *Bidobacterium*, foram coletadas amostras de fezes e os animais foram acompanhados, sacrificados e analisados. Através do experimento, foi verificado que as duas espécies de *Bidobacterium* spp. prolongam a sobrevivência dos camundongos imunodeficientes recém-nascidos e adultos, contaminados por *C. albicans*. Observou-se que as bifidobactérias afetam a produção de anticorpos contra *C. albicans*, inibem a disseminação da candidíase, suprimem a perda de peso associada com infecção pelo fungo analisado, inibem o crescimento de *C. albicans* no trato alimentar, inibem a candidíase sistêmica de origem endógena e reduzem a severidade do acometimento gástrico em ambos os tipos de camundongos. Foi verificado que a *B. infantis* inibem candidíase sistêmica de origem endógena melhor que *B. lactis*. No entanto, *B. lactis* foi mais eficiente inibindo a colonização por *Candida* no trato alimentar, suprimindo a candidíase gástrica e protegendo os camundongos imunodeficientes de candidíase letal, comparado a *B. infantis*. Com o estudo, concluiu-se que *Bidobacterium* spp. podem proteger camundongos imunodeficientes contra candidíase, mas diferentes espécies manifestam diferenças quantitativas e qualitativas em seus efeitos probióticos e bioterapêuticos.

Probióticos podem proteger camundongos imunodeficientes contra a candidíase orogástrica, mas podem causar patologias por si só, principalmente em pacientes imunodeficientes. Pensando nisso, Wagner et al. (26), em 2000, realizaram uma pesquisa objetivando avaliar o potencial de bactérias probióticas não

viáveis na proteção de camundongos imunodeficientes, contra infecções por *Candida albicans*. Camundongos imunodeficientes e imunocompetentes foram alimentados com *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei*, ambos mortos através de calor, e contaminados oralmente com *C. albicans*. Um grupo controle não foi alimentado com lactobacilos, mas foi contaminado com *C. albicans*. Os resultados obtidos demonstraram que os lactobacilos não viáveis não conseguiram proteger os camundongos imunodeficientes contra a candidíase letal, ou seja, não prolongaram a vida desses animais. No entanto, o tratamento com esses lactobacilos diminuiu a incidência da disseminação da candidíase nos camundongos imunocompetentes até a quarta semanas de colonização por *C. albicans* e somente o *L. acidophilus* não viável diminuiu a incidência de disseminação da mesma nos animais imunodeficientes até a segunda semana de colonização. A alimentação com lactobacilos não viáveis atenuou a severidade da candidíase na mucosa dos camundongos imunodeficientes, mas não protegeu os imunocompetentes da candidíase gástrica. A alimentação com esses lactobacilos reduziu significativamente o número de *C. albicans* viáveis no estômago e intestinos dos animais imunocompetentes e imunodeficientes, sendo que somente a alimentação com *L. acidophilus* não viáveis reduziu a perda de peso induzida pela infecção por *C. albicans* nos animais imunodeficientes. A alimentação com os lactobacilos também aumentou a resposta proliferativa dos esplenócitos aos antígenos do micorganismo *C. albicans*, nos camundongos imunocompetentes, fato que não ocorreu nos animais do grupo controle. Assim, os resultados demonstram que lactobacilos não viáveis podem trazer alguns efeitos probióticos contra candidíase em camundongos, sendo mais seguros que as bactérias vivas, para serem usados em certos produtos destinados a pacientes imunodeficientes, já que nestes, a bactéria viva pode causar patologias.

A forma como os probióticos podem ser introduzidos ao organismo, para agirem no trato gastrointestinal, pode ser bastante variada, havendo uma série de alimentos aos quais as bactérias podem ser adicionadas. Queijo fresco contendo probióticos (QFP) é um adequado veículo para a administração oral de bactérias, como o *Lactobacillus acidophilus*. QFP garante adequada viabilidade da bactéria (cerca de 60 dias após a manufatura) e protege contra acidez in vitro. Assim, em 2004, Medici et al. (42) realizaram uma pesquisa com o objetivo avaliar o efeito do QFP sobre a resposta imune da mucosa in vivo. Um grupo de camundongos BALB/c

foram alimentados com QFP, outro grupo com queijo fresco sem a adição de probióticos (QFC) e o grupo controle foi alimentado com uma dieta convencional balanceada. A resposta imune (atividade fagocítica de macrófagos peritoneais, número de células produtoras de IgA⁺ no intestino delgado e grosso e a relação entre linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ no intestino delgado) foi avaliada no final de cada período de alimentação. Um significativo aumento na atividade fagocítica dos macrófagos peritoneais, no número de células produtoras de IgA⁺ e na relação CD4⁺/CD8⁺ foi observado no intestino delgado após 5 dias de tratamento com QFP, enquanto no intestino grosso não foi observado diferenças significativas. Esses valores retornaram aos valores do grupo controle após 8 dias do término da alimentação com QFP. Com isso, mostrou-se que o queijo fresco contendo probióticos, como *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus* e *L. paracasei*, quando consumidos diariamente, podem exercer importantes efeitos imunomoduladores na mucosa intestinal.

Lactobacillus rhamnosus GG é um dos probióticos mais estudados, apresentando vantagens no tratamento de distúrbios gastrointestinais bem documentados. Assim, em 1999, Alander et al. (30) realizaram um estudo para demonstrar, através de biópsias, a adesão de *L. rhamnosus* à mucosa intestinal humana e a persistência dessa adesão após o término da administração do probiótico. Voluntários ingeriram um produto fermentado contendo *L. rhamnosus* GG durante 12 dias, amostras de fezes foram coletadas antes, durante e depois do consumo. Amostras de GG foram detectadas tanto nas fezes como nas biópsias, através das características morfológicas da colônia, de teste de fermentação de lactose e PCR. O estudo mostrou que o probiótico testado foi capaz de aderir-se à mucosa do cólon. Apesar de ser uma adesão temporária, ela permaneceu mais de uma semana após a descontinuidade da administração de GG.

Daniel et al. (32), em 2006, tiveram como objetivo investigar a influência de três tipos de *Lactobacillus* (*L. salivarius*, *L. plantarum* e *L. acidophilus*) sobre a inflamação intestinal e avaliar a translocação bacteriana para órgãos extra-intestinais. Foi comparada a capacidade desses *Lactobacillus* de sobreviverem, in vitro, nas condições presentes no trato gastrointestinal e de persistirem no local após a sua administração via oral. Os testes foram feitos em camundongos saudáveis e doentes (com colite aguda induzida). No estudo verificou-se que a alimentação de ambos os tipos de camundongos com altas doses de lactobacilos não induziu

translocação das bactérias para órgãos extra-intestinais. A administração oral de *L. salivarius* teve um significativo efeito preventivo da colite em camundongo, enquanto que *L. plantarum* e *L. acidophilus* não apresentaram nenhum efeito. *L. acidophilus* apresentou resistência à pepsina, pancreatina e aos sais biliares. Apresentou ainda, adesão às células Caco-2 presentes no trato gastrointestinal. Os autores puderam concluir que nem todos os lactobacilos apresentam efeitos semelhantes sobre a inflamação intestinal e adesão in vitro às células Caco-2 e a persistência in vivo no trato gastrointestinal não estão diretamente correlacionados com efeitos anti-inflamatórios dos probióticos.

A presença de *Candida* no trato gastrointestinal pode trazer prejuízos para o bom funcionamento do organismo. Em 2005, Brzozowski et al. (31) pesquisaram os efeitos da espécie *Candida albicans* na secreção gástrica e na cicatrização de úlceras gástricas, induzidas por ácido acético em ratos e tratados com ranitidina e aspirina. Observaram ainda, o efeito do uso de *Lactobacillus acidophilus* concomitante ao tratamento. Verificaram que a infecção por *Candida*, juntamente com o uso da ranitidina ou da aspirina, atrasou a cicatrização das úlceras, além de provocar uma queda na microcirculação da área ulcerada. A ação deletéria por *Candida albicans* pode ser atribuída à habilidade da hifa em crescer no interior do epitélio oral, esofágico e na mucosa gastrointestinal, liberando seus fatores de virulência, incluindo enzimas hidrolíticas, como as proteinases. A terapia com probióticos mostrou-se benéfica à mucosa gástrica, por mostrar que o atraso da cicatrização das úlceras induzidas por *C. albicans* pode ser reduzido através do uso de probióticos. Esse efeito é acompanhado pela redução da colonização por *Candida*, fato que explica o efeito benéfico dos probióticos na cicatrização das úlceras gástrica pré-existent.

Já em 2006, Manzoni et al. (25) realizaram um estudo objetivando avaliar a efetividade de uma suplementação oral com probióticos (*Lactobacillus rhamnosus*) na prevenção da colonização gastrointestinal por espécies de *Candida* em recém-nascidos prematuros, com baixo peso (ex: <1500 g), durante a permanência na unidade de cuidados intensivos neonatais. A pesquisa foi realizada com 80 recém-nascidos. As crianças foram divididas aleatoriamente em dois grupos. O grupo A recebeu uma alimentação a base de leite humano associado com probiótico oral. O grupo B recebeu apenas leite humano. Essa alimentação foi realizada durante 6 semanas ou até a saída da unidade de cuidados intensivos neonatais, caso a

criança saísse antes das 6 semanas. Amostras foram coletadas de todos os pacientes e obtidas de vários sítios (ex: orofaringe, reto, estômago). Foram feitas culturas com as amostras coletadas, permitindo a verificação da ocorrência e da intensidade da colonização por fungos no trato gastrointestinal. Com a pesquisa, foi observado que a incidência de colonização por fungos foi significativamente menor no grupo A, comparado ao grupo B. O número de fungos isolados obtidos de cada recém-nascido e de cada paciente colonizado foi menor no grupo que recebeu o probiótico. O *L. rhamnosus* foi mais efetivo nos subgrupos de crianças com peso entre 1001 – 1500 g, não sendo observado nenhum potencial efeito adverso associado ao probiótico. Verificou-se, assim, que a administração oral de *L. rhamnosus* reduz significativamente a incidência e a intensidade da colonização entérica por espécies de *Candida* entre recém-nascidos com baixo peso corporal.

2.4 CANDIDÍASE VAGINAL E PROBIÓTICOS

A união de organismos a materiais fibrosos e consequente formação de biofilmes são considerados importantes fatores para a indução de diversas doenças. Com isso, Reid et al. (24), em 1995, realizaram um estudo para verificar se microrganismos conseguiriam aderir a fibras disponíveis no mercado, além de verificar se *Lactobacillus* conseguiriam interferir nessa ligação. No estudo in vitro, uma amostra hidrofóbica de *Staphylococcus aureus* e uma hidrofílica de *Candida albicans* foram altamente aderidas a fibras de fraldas comerciais. Houve evidências de que a adesão dos patógenos foi inibida quando um dos cinco *Lactobacillus* estava presente. Superfícies pré-recobertas por lactobacilos inibiram em 26-97% a adesão de *Sataphylococcus* e em 0-67% a de *Candida albicans*. Quando o lactobacilo foi usado para competir com a adesão de patógenos, houve 99% de desalojamento de *S. aureus* e mais de 91% de desalojamento de *C. albicans*. Os *L. acidophilus* 76 e T-13 foram os mais efetivos entre os cinco *Lactobacillus* isolados testados na interferência por pré-recobrimento. O *L. rhamnosus* GR-1 foi o mais efetivo no desalojamento da levedura. Experimentos com células uroepiteliais também mostraram que *Lactobacillus* podem significativamente interferir na adesão de ambos os patógenos às células. Os resultados demonstraram a rapidez com que

os dois patógenos aderem-se às fibras e células epiteliais, além de aumentar a possibilidade de que membros da flora urogenital feminina normal podem interferir nas infecções causadas por esses organismos.

Lactobacillus, microrganismos predominantes na vagina de mulheres saudáveis na pré-menopausa, controlam outros membros da microflora vaginal e protegem a vagina contra bactérias e fungos, inclusive a levedura *Candida* e ainda evitam infecções no trato urinário. Pouco se conhece sobre os mecanismos de ação dos *Lactobacillus* contra o gênero *Candida*, com isso, em 2005, Strus et al. (23) realizaram um estudo com o objetivo de testar *Lactobacillus*, com conhecidas capacidades antibacterianas, em relação às suas propriedades celulares superficiais, à adesão às células vaginais in vitro e às atividades antagonistas contra fungos, com atenção especial à produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Foi observado com o experimento que uma pequena proporção dos *Lactobacillus* testados aderiu fortemente às células epiteliais vaginais e inibiu o crescimento de *Candida albicans*. A atividade dos *Lactobacillus* contra *Candida* não pode ser explicada exclusivamente pela produção de H_2O_2 , mas sim em associação a outros mecanismos de ação, como a colonização do epitélio vaginal, formando um biofilme que inibe o crescimento de outros microrganismos. Além disso, estes probióticos produzem outras substâncias antifúngicas, como dipeptídeos cíclicos. Pode-se concluir que existem diversos mecanismos agindo no combate à *Candida albicans* pelos *Lactobacillus*.

Ainda com o objetivo de avaliar os mecanismos de ação dos probióticos no combate a patógenos, Boris et al. (33), em 1998, realizaram um estudo no qual foi avaliado a aderência de *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri* e *L. jensenii*, todos isolados da vagina de mulheres saudáveis, às células epiteliais da vagina. Todos os *Lactobacillus* testados apresentaram auto-agregação e adesão às células epiteliais vaginais, in vitro, reduzindo a adesão de microrganismos patogênicos, como *Candida albicans* e *G. vaginalis*, além de inibir o crescimento de *E. coli* e *Streptococcus agalactiae*. Os componentes superficiais aparentemente envolvidos com a auto-agregação são proteínas para *L. gasseri* e lipoproteínas para *L. acidophilus* e *L. jensenii*. Já os fatores aparentemente responsáveis pela adesão às células epiteliais da vagina são glicoproteínas (*L. acidophilus* e *L. gasseri*) e carboidratos (*L. jensenii*). Os receptores das células epiteliais vaginais são glicolípidos, os quais provavelmente são os alvos da competição observada entre

lactobacilos e microrganismos patogênicos. Os três *Lactobacillus* avaliados apresentaram co-agregação com *E. coli*, *C. albicans* e *G. vaginalis*. Esta co-agregação pode impedir o acesso de patógenos aos receptores dos tecidos, fato que pode também explica a redução de aderência de *C. albicans* e *G. vaginalis* ao epitélio vaginal na presença de lactobacilos. Com o estudo, pode-se concluir que a proteção do epitélio vaginal ocorre através de mecanismos de barreira (auto-agregação e adesão) e de interferência (interferência na união do patógeno ao receptor e co-agregação aos patogênicos potenciais).

2.5 CANDIDÍASE ORAL E PROBIÓTICOS

Sookkhee et al. (94), em 2001, realizaram um estudo com o objetivo de identificar e caracterizar a bactéria ácido láctica isolada da cavidade oral sadia de voluntários, assim como caracterizar suas substâncias inibidoras. As amostras coletadas apresentaram atividade antibacteriana e ação contra *Candida*. Elas mostraram-se anaeróbicas facultativas, Gram-positivas, não formadora de esporo, não formadora de cápsula e bacilo catalase-negativo. Seus potenciais antimicrobianos aparentemente são afetados pelo pH, catalase, enzimas proteolíticas e temperatura. A atividade foi parcialmente inativada após tratamento com catalase e após tratamento com tripsina e pepsina. Houve uma redução na atividade após o aquecimento a uma temperatura maior ou igual a 100°C. No entanto, a atividade antimicrobiana dessas amostras isoladas mostraram-se resistentes ao calor. Quando as amostras isoladas foram testadas em relação às suas sensibilidades antimicrobianas, elas mostraram-se sensíveis a um número significativo de agentes antimicrobianos. Estas amostras isoladas foram identificadas como sendo *Lactobacillus paracasei* e *L. rhamnosus*.

O crescimento excessivo de fungos na cavidade oral é um problema comum entre idosos. Probióticos são conhecidos por inibir o crescimento de patógenos. Com isso, Hatakka et al. (14), em 2007 realizaram uma pesquisa com objetivo de testar a hipótese de que queijo contendo bactérias probióticas poderia reduzir a prevalência de *Candida* oral. Para realizar o estudo, 276 idosos consumiram diariamente 50 gramas de queijo com probióticos ou queijo controle. Foi observada

redução na porcentagem de indivíduos do grupo que consumiu queijo com probiótico, que apresentava alta contagem de cepas, de 30% para 21% (32% de redução), e um aumento no grupo controle, de 28% para 34%. A intervenção com probióticos reduziu o risco de alta contagem de cepas em torno de 75%, e o risco de hipossalivação em torno de 56%. Assim, concluiu-se que probióticos podem ser eficientes no controle da *Candida* oral e da hipossalivação em idosos.

Uma das formas de consumir probióticos é adicionado ao queijo. Muitos estudos utilizam esse veículo para levar a bactéria à cavidade oral e ao trato gastrointestinal. Em 2002, Ahola et al. (95) tiveram como objetivo verificar como o consumo, a curto prazo, de queijo contendo *Lactobacillus rhamnosus* GG e *Lactobacillus rhamnosus* LC 705 afetaria microbiota cariogênica presente na boca, em jovens adulto. Para isso, durante três semanas, os indivíduos escolhidos para a pesquisa consumiram 15 gramas de queijo, cinco vezes por dia. Exames orais foram feitos antes e depois do estudo. A secreção estimulada de saliva, a capacidade tampão e a contagem salivar de *Streptococcus mutans*, fungos e *Lactobacillus* foram avaliados antes e depois da intervenção e após 3 semanas do período de tratamento. Com o estudo não foi verificada diferença estatística significativa entre o grupo que recebeu queijo com probióticos e o que recebeu placebo, queijo sem *Lactobacillus*, na contagem de *Streptococcus mutans* logo após a intervenção. Entretanto, durante o período de pós-tratamento, houve uma redução significativa dessa contagem no grupo que recebeu queijo com *Lactobacillus*. A contagem de *S. mutans* diminuiu em 20% e de fungo em 27% em todos os indivíduos, independentemente do grupo de intervenção. Resultados baseados na regressão logística mostraram uma tendência da intervenção com probióticos em reduzir o risco de altos níveis de *Streptococcus mutans* e fungos salivares e em geral o consumo de queijo parece diminuir o risco de cárie.

Em 2005, Elahi et al. (29) realizaram um estudo com o objetivo de examinar o mecanismo de proteção induzido pela administração oral de espécies de *Lactobacillus* vivos usando um modelo em que a relação hospedeiro-parasita já foi estudada extensivamente. Para o estudo foram usados camundongos DBA/2. Eles foram alimentados com *Lactobacillus* (1×10^9 células em 0.2 ml de PBS) durante 14 dias, em seguida suas cavidades bucais foram contaminadas com *C. albicans* através de aplicação tópica. A alimentação continuou por mais 14 dias. Em datas pré-determinadas, os animais foram sacrificados para quantificar o nível colonização

por *C. albicans*. Foi analisada também a saliva dos animais, a expressão do gene citocaina através de transcrição reversa – reação cadeia de polimerase, foram feitos o teste ELISA e a determinação de óxido nítrico na saliva. Esse estudo demonstrou que a alimentação com *L. acidophilus* reduziu a duração da colonização da cavidade oral por *C. albicans*. Esse fato está relacionado com o aparecimento prematuro de RNAm de IL-4 e IFN- γ , dos produtos secretados pela estimulação dos nódulos linfáticos cervicais e com o aparecimento de INF- γ e NO na saliva.

2.6 NISTATINA

Os principais fármacos utilizados para o tratamento da candidíase oral são os polienos, como nistatina e anfotericina B e os azólicos, incluindo o miconazol, fluconazol, itraconazol, de uso tópico (96).

Candidas isoladas da cavidade oral, sendo a mais prevalente a espécie *C. albicans*, apresentam alta sensibilidade a maioria dos tipos de antifúngicos existentes no mercado, fluconazol, itraconazol, voriconazol, cetoconazol, miconazol, anfotericina B e nistatina (97).

Resistência de fungos aos polienos é raro, mas algumas espécies de *Candida*, tais como *Candida glabrata* e *C. krusei*, são naturalmente menos suscetíveis aos azólicos. Além disso, a espécie *C. albicans* pode adquirir resistência aos azólicos. O principal mecanismo de resistência dos fungos aos azóis, medida in vitro, é o de efluxo de droga energia-dependente. A maioria dos fungos na cavidade oral está presente em biofilme, composto por múltiplas espécies de microrganismos, que, normalmente, demonstram um fenótipo de resistência aos antifúngicos. Esta resistência é o resultado de múltiplos fatores, incluindo a presença de bombas de efluxo na membrana da célula fúngica, a permeabilidade da matriz do biofilme e a uma resposta ao estresse na célula fúngica. A remoção de biofilme dental, ou tratamentos para prevenir o desenvolvimento de biofilme em combinação com drogas antifúngicas, poderá permitir um melhor tratamento e prevenção da doença fúngica oral (8).

Cada classe de antifúngico apresenta um determinado mecanismo de ação. Os polienos, como a nistatina e a anfotericina B, desenvolvidos na década de

cinquenta, são moléculas heterocíclicas anfipáticas que se inserem nas bicamadas lipídicas das células fúngicas, ligadas a ergosterol e agregados em anéis para formar poros. Estes poros perturbam a integridade da membrana plasmática fúngica e permitem o efluxo de cátions, como o potássio, o que resulta em morte celular. Com isso, essas drogas são consideradas fungicidas. Acredita-se ainda que os polienos também possam causar danos oxidativos (98-100).

A nistatina não é absorvida no trato gastrointestinal, por essa razão ela é utilizada em aplicações tópicas intra-orais. Pelo fato dela ter um gosto desagradável, as preparações para uso oral contêm agentes aromatizantes. A nistatina é comercializada em uma série de formas, incluindo creme, pomada, comprimidos, suspensão, gel e pastilha (101).

No estudo de Flattery et al. (102) foi avaliado a ação de agentes antifúngicos, entre eles a nistatina, no combate a colonização orofaríngea e gastrointestinal por *Candida albicans*, em camundongos DBA/2 deficientes em células-T CD4. Amostras da cavidade oral, coletadas através do método de swab, e amostras de fezes foram analisadas para quantificar o número de células viáveis de *C. albicans*. Verificou-se que a nistatina foi moderadamente efetiva na redução da colonização oral e fecal pelo fungo, no modelo estudado, quando comparado com os outros agentes antifúngicos.

2.7 IMUNOSSUPRESSÃO DE CAMUNDONGOS

Guentzel e Herrera, em 1982 (103), desenvolveram um modelo animal útil para o estudo das interrelações patógeno-hospedeiro para candidose. Realizaram inoculação oral intragástrica de *C. albicans* em camundongos lactantes, levando tanto a letalidade ou a infecção persistente de longa duração. Esta infecção persistente foi possível através da administração de antibiótico de amplo espectro (cloranfenicol), de acetato de cortisona, de irradiação X ou de alta dose única de ciclofosfamida. Através do modelo, observaram que animais mais jovens são mais suscetíveis aos efeitos letais das doses de *C. albicans*, já os camundongos mais velhos abrigam infecções persistentes do trato gastrointestinal. Os dados indicaram

que os animais com infecções persistentes fornecem um modelo realista para o estudo de tratamentos para candidíase humana.

Balish et al., em 1993 (104), realizaram um estudo em modelo animal no qual observaram que camundongos SCID, imunodeficientes, foram suscetíveis à colonização intestinal por *Candida albicans*. A manifestação de candidíase crônica superficial foi verificada em superfícies epiteliais queratinizadas, língua e estômago. Apesar da presença contínua de uma grande população de *C. albicans* no trato intestinal, foi observado somente candidíase superficial na mucosa, sem disseminação progressiva da mesma. O tratamento com ciclofosfamida (100 mg/kg/t, via intraperitoneal) aumentou a suscetibilidade dos camundongos SCID à candidíase na língua e estômago, sendo os camundongos imunocompetentes mais resistentes a infecção. Os autores observaram que a colonização do trato gastrointestinal por bactérias, aparentemente, aumenta a resistência dos animais à disseminação da candidíase. Demonstraram ainda que mecanismos de defesa imune inatos (fagócitos e/ou células NK), na ausência de células T e B funcionais, representam uma importante rota de resistência dos camundongos para a candidíase na mucosa e a sua disseminação.

Kamai et al., em 2001 (105), estabeleceram um modelo de candidíase orofaríngea simples em camundongos. Para causar a infecção, os animais foram imunossuprimidos administrando, por via subcutânea, doses de 4 mg de acetato de cortisona, aplicadas 1 dia antes e 3 dias depois da inoculação por *C. albicans*. Para evitar infecções secundárias, um dia antes da infecção, os animais passaram a receber cloridrato de tetraciclina misturado na água do bebedouro (0.5 mg/ml). Para a infecção, os camundongos foram anestesiados e em seguida inoculados, colocando-se bolas de algodão saturadas com *Candida albicans* na região sublingual, por 2 horas. A infecção induzida foi prolongada e reprodutível. Segundo os autores, este modelo pode ser útil para a seleção de antifúngicos ou estudos de patogenicidade.

Em 2002, Kamai et al. (106) realizaram um estudo utilizando o mesmo modelo animal já descrito por eles anteriormente, com o objetivo de investigar a contribuição do gene ALS1 da *Candida albicans* para a patogenicidade de uma candidíase orofaríngea. Este gene codifica uma adesina que media a união da levedura à células endoteliais. Os resultados indicaram que o produto do gene ALS1 é importante para a aderência da levedura à mucosa oral durante a fase inicial da

infecção e que métodos que bloqueiam essa aderência parecem ser eficazes na prevenção e/ou tratamento dessa infecção.

Majithiya et al., em 2009 (107), avaliaram em modelo animal a resposta do hospedeiro às doses de isavuconazol, voriconazol e fluconazol, no combate a infecções por *Candida tropicalis* e *Candida krusei*. Para causar e manter a infecção, os animais foram imunossuprimidos com ciclofosfamida (200 mg/kg, i.v.), usando uma dose, a qual levava a uma neutropenia temporária ou múltiplas doses, gerando uma neutropenia persistente, aplicadas a cada 5 dias e iniciada 3 dias antes da infecção. O modelo mostrou-se eficiente para o estudo do tratamento da candidíase sistêmica.

Em 2010, Warn et al. (108) compararam a eficácia de uma série de antifúngicos, no combate ao *Aspergillus fumigatus*. Foi utilizada uma forma de imunossupressão dos animais parecida com a do modelo utilizado no estudo de Majithiya et al., em 2009, (107) necessária para manter a infecção fúngica em níveis consideráveis e assim poder avaliar a eficácia dos tratamentos. A única diferença foi que para causar a neutropenia persistente, o intervalo de aplicação das doses de ciclofosfamida (200 mg/kg, i.v.) foi de 3 dias, e não 5 dias, como no estudo anterior. O estudo mostrou que a neutropenia temporária manteve-se profunda somente até dois dias após a infecção.

De Repentigny (109) publicou uma revisão bibliográfica abordando os modelos animais existentes na literatura para a análise de interações entre hospedeiro e *Candida*. Ele mostrou cada modelo, abordando as formas clínicas da candidíase passíveis de serem estudadas, os fatores predisponentes, o tipo de animal usado, a rota de infecção e a forma de imunossupressão. Segundo o autor, os modelos animais apresentam uma grande relevância clínica, sendo assim, uma poderosa ferramenta para analisar as interações específicas do microrganismo *Candida* e o hospedeiro, como um agente comensal ou patogênico, trazendo novos conhecimentos sobre a patogênese molecular e celular de candidíase.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho é avaliar a eficácia de duas espécies de bactérias probióticas, como medida terapêutica e profilática, na redução da colonização oral por *Candida albicans* em um modelo animal que permita esse tipo de estudo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA DE *CANDIDA ALBICANS*

Todos os ensaios foram realizados utilizando a cepa padrão de *Candida albicans* ATCC (American Type Culture Collection) 90028 (Figura 4.1), cepa esta que já foi usada em trabalhos anteriores envolvendo candidíase oral (69, 110, 111).

Figura 4.1 –Tubo contendo amostra de *Candida albicans* ATCC 90028

4.2 ORIGEM DA AMOSTRA

A amostra empregada neste estudo provém da Micoteca do Laboratório de Leveduras Patogênicas, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), em tubos contendo ágar Sabouraud dextrose (Figura 4.1) (Difco, Detroit, MI, USA) e em glicerol a -20°C.

4.3 MODELO ANIMAL

Foram empregados no presente trabalho 152 camundongos DBA/2 machos (Figura 4.2) (29, 75, 76, 102), de 6-8 semanas de vida, com peso aproximado de 25 a 27g, obtidos do biotério de criação de animais isogênicos do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, Brasil. A escolha dessa linhagem de camundongo para o estudo ocorreu, pois os camundongos DBA/2, tanto no estudo de Chakir (74), quanto nos estudos pilotos por nós realizados, mostraram-se mais susceptíveis à colonização da cavidade oral por *Candida albicans*, mantendo-se em níveis elevados de infecção por mais tempo, quando comparados com camundongos BALB/c e SCID.

Os animais foram divididos em 4 grupos: controle positivo (infecção), tratado com *Lactobacillus rhamnosus* Lr-32 (Danisco, Madison, WI, USA), tratado com *Lactobacillus acidophilus* NCFM (Danisco, Madison, WI, USA) e tratado com nistatina, conforme a Tabela 4.1. No grupo controle positivo não foi utilizado nenhum medicamento, os animais foram apenas imunossuprimidos, infectados por *Candida albicans* e avaliados. Em cada grupo haviam 38 animais, distribuídos em gaiolas microisoladoras de polipropileno (cinco animais em cada gaiola) e receberam ração e água estéreis. Os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas, ICB/USP, com ambiente controlado. Foram observados também os princípios éticos do Colégio

Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), seguindo o protocolo para uso de animais em experimentação (Anexo A) e foi obtida a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da USP (Anexo B).

Figura 4.2 – Camundongo DBA/2

Tabela 4.1 - Grupos, subgrupos, total de animais infectados e total de animais por grupo (incluindo controle negativo)

GRUPOS		TOTAL DE ANIMAIS INFECTADOS	TOTAL DE ANIMAIS POR GRUPO
Controle Tratados	Positivo	28	38
	<i>L. rhamnosus</i>	28	38
	<i>L. acidophilus</i>	28	38
	Nistatina	28	38

4.4 IMUNOSSUPRESSÃO DOS ANIMAIS

Todos os animais foram imunossuprimidos através da administração de Ciclofosfamida (Figura 4.3) (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). Foram administradas injeções intraperitoneais de 0,2 mL de solução aquosa contendo Ciclofosfamida (100 mg/kg de peso corporal do animal) (Figura 4.4). Elas foram aplicadas previamente à infecção por *Candida albicans* (4 e 1 dias antes da inoculação) e após à infecção (a cada 4 dias) (103-109, 112). A imunossupressão deu-se necessária, pois os resultados de estudos pilotos mostraram que a colonização oral por *Candida albicans* tende a reduzir e ser controlada logo nos primeiros dias após a infecção, em camundongos imunocompetentes (BALB/c) e imunodeficientes (SKID). Outros estudos também mostraram a necessidade da imunossupressão (113, 114). Para um estudo que testa a eficácia de um produto no combate a um patógeno, a colonização prolongada no hospedeiro torna-se necessária.

Figura 4.3 - Ciclofosfamida

Figura 4.4 – Injeção intraperitoneal de solução aquosa contendo Ciclofosfamida

4.5. SUSPENSÃO DE *C. ALBICANS*

A amostra de *C. albicans* foi cultivada em meio YPD (1% extrato de levedura, 1% Bacto Peptone [Difco, Detroit, MI, USA], e 2% dextrose [Sigma, St Louis, MO, USA]) (Figura 4.5 e 4.6), a 30°C durante 18 horas. Após esse período, foi feita uma suspensão da levedura em 5 mL de solução tampão fosfato (PBS) estéril (Figura 4.7) . Os blastosporos da levedura foram coletados através de centrifugação a 2500Xg por 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante. Este procedimento foi repetido por duas vezes. A suspensão foi preparada na concentração de 1.0×10^8 células viáveis/mL (Figura 4.8). A contagem do número de células viáveis da suspensão foi feita em câmara de Neubauer, após prévia coloração com azul de metileno a 0,05% (115).

Figura 4.5 – Meio YPD

Figura 4.6 - *C. albicans* foi cultivada em meio YPD

Figura 4.7 - levedura em PBS estéril

Figura 4.8 - Suspensão de *C. albicans* na concentração de 1.0×10^8 células viáveis/mL

4.6 MÉTODO DE ANESTESIA DOS ANIMAIS

Os animais foram anestesiados com ketamina 10% (dose 0,35 mL/kg) e xilasina 2% (dose 0,30 mL/10kg), intraperitonealmente (i.p.).

4.7 COLONIZAÇÃO EXPERIMENTAL

Para provocar a colonização por *C. albicans*, os 38 camundongos de cada grupo foram anestesiados. Destes, 28 animais de cada grupo (1 controle positivo e 3 tratados) foram inoculados com uma suspensão de blastosporos (contendo 1.0×10^8 células viáveis/mL), através de uma aplicação tópica, com o auxílio de um swab estéril (Cral Artigos para laboratório Ltda., Cotia, SP) (29, 75, 76) (Figuras 4.9 e 4.10). 10 animais de cada grupo foram inoculados com PBS, sendo usados como controle negativo.

Figura 4.9 – Swab estéril sendo embebido na suspensão de blastosporos contendo 1.0×10^8 células viáveis/mL

Figura 4.10 – Camundongo sendo inoculado com *C. albicans*, com auxílio de um swab esteril

4.8 AVALIAÇÃO

Os animais de todos os grupos (controle e tratados) foram avaliados ao final dos seguintes intervalos: 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13 dias após a infecção por *C. albicans* (29). Em cada intervalo foram sacrificados 4 animais por grupo (com exceção dos animais *controle negativo*), através de uma câmara de CO₂ (Figura 4.11). Os animais sacrificados foram avaliados através de análises microbiológicas (UFC/mL) de *C. albicans*, isoladas da mucosa da cavidade oral (bochecha, língua, palato), a fim de se quantificar o nível de colonização pela levedura. A avaliação iniciou-se vinte e quatro horas após a infecção, ocorrendo simultaneamente ao tratamento.

Figura 4.11 – Câmara de CO₂

4.9 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

As amostras foram coletadas através de swab (Figura 4.12), girando o mesmo na cavidade oral dos animais (bochecha, língua, palato) durante 120 segundos e em seguida foram colocados em tubos Eppendorf contendo 1 mL de PBS (Phosphate buffered saline = tampão fosfato-salino) estéril (solução inicial) (Figura 4.13). As células da levedura foram homogeneizadas através de agitação em vortex (Figura 4.14) e foram realizadas dez diluições seriadas (Figura 4.15). Para realizar as diluições, retirou-se 0,1 mL da solução inicial, com o auxílio de uma pipeta com ponteiros descartáveis, e transferiu-se para um Eppendorf contendo 0,9 mL de PBS estéril, o qual foi homogeneizado com agitação em vortex. Desta primeira diluição,

retirou-se novamente 0,1 mL e transferiu-se para um terceiro Eppendorf com 0,9 mL de PBS estéril. Esta sequência foi repetida até se obter dez diluições. A quantidade de 0,1 mL da solução inicial e das diluições foi semeada em triplicata na superfície do meio ágar Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, MI, USA) com cloranfenicol (Figura 4.16), com auxílio de uma alça de Drigalski descartável e a incubação foi feita a 35°C por um período de 24 a 48 horas. Após esse período, o número de colônias (UFC/mL) (Figura 4.17) foi determinado manualmente e confirmado através de espectrofotometria. Os dados obtidos foram transformados logaritmicamente (Log10) e analisados através do teste de Mann-Whitney, através do programa estatístico computadorizado GraphPad Prisma.

Figura 4.12 – Coleta de amostra através de swab

Figura 4.13 - Tubo Eppendorf contendo 1 mL de PBS estéril e swab (solução Inicial)

Figura 4.14 – Agitação em vortex

Figura 4.15 – Esquema das diluições seriadas

Figura 4.16 – Amostra sendo semeada na superfície do meio agar Sabouraud Dextrose

Figura 4.17 – Colônias de *C. albicans* na superfície do meio agar Sabouraud Dextrose

4.10 APLICAÇÃO DO PROBIÓTICO

Foi realizada colocando-se 0,2 mL da suspensão de *Lactobacillus* (Figura 4.18), contendo $1,0 \times 10^9$ células viáveis/mL (16, 29), na cavidade oral dos animais, com o auxílio de uma seringa de 1 mL e agulha de gavagem com ponta romba (Figuras 4.19 e 4.20).

Figura 4.18 – Suspensão de *Lactobacillus*

Figura 4.19 – Seringa de 1 mL e agulha de gavagem com ponta romba

Figura 4.20 – Aplicação do probiótico

4.11 APLICAÇÃO DA NISTATINA

Foi realizada colocando-se a solução de nistatina comercializada no mercado (40.000 ui/kg/dia) (101) na cavidade oral dos animais, com o auxílio de uma pipeta e ponteiros descartáveis (Figuras 4.21 e 4.22).

Figura 4.21 – Pipeta com ponteira descartável coletando nistatina

Figura 4.22 – Aplicação da nistatina na cavidade oral do camundongo

4.12 TRATAMENTOS

A aplicação dos probióticos, conforme o item 4.10. iniciou-se duas semanas antes da infecção por *Candida albicans*, conforme o item 4.7., e continuou por mais treze dias após a infecção. As aplicações foram diárias durante os 27 dias de duração do tratamento.

O tratamento foi realizado aplicando os *Lactobacillus* conforme explica o item 4.10. Um grupo recebeu o *Lactobacillus acidophilus* e outro o *Lactobacillus rhamnosus*.

O tratamento com nistatina iniciou-se vinte e quatro horas após a infecção, conforme o item 4.11. As aplicações também foram diárias e ocorreram durante 13 dias.

Os controles negativos dos grupos de tratamentos foram apenas inoculados com PBS, não recebendo nenhum tipo de medicamento.

4.13 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos em relação às UFCs foram submetidos à transformação logarítmica para atingir uma aproximação da distribuição normal, antes da análise estatística utilizando o teste de Mann-Whitney. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o software Graph-Pad Prisma 5 (PRISMTM GraphPad, versão 5.0 e GraphPad Software Incorporated). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 COLONIZAÇÃO EXPERIMENTAL POR *CANDIDA ALBICANS*

Logo após 24 horas da inoculação inicial já foi possível isolar *C. albicans* da mucosa oral dos animais inoculados. Houve um aumento significativo ($p < 0,05$) na quantidade de levedura na mucosa oral destes animais 3, 5, 7 dias após a inoculação inicial, quando comparado com o 1º dia (Gráfico 5.1). A partir do 9º dia de infecção houve uma redução significativa na carga fúngica da mucosa destes animais comparado ao isolamento no 7º dia (Gráfico 5.1). Essa redução pode ser observada até o ultimo dia de análise.

Gráfico 5.1 - Isolamento de *C. albicans* da mucosa oral em modelo murino imunossuprimido (DBA/2), inoculado oralmente com 10^8 células viáveis de cepa ATCC 90028 (*C. albicans*). Estatística realizada através do teste Mann-Whitney. Diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$.
 ap<0,05 versus Dia 1;
 bp<0,05 versus Dia 9;
 cp<0,05 versus Dia 11;
 dp<0,05 versus Dia 13.

5.2 TRATAMENTOS

5.2.1 Tratados com probióticos

Os dados referentes à recuperação de *C. albicans* (UFCs) na mucosa oral dos animais, tratados e não tratados estão demonstrados na Tabela 5.1.

Os resultados mostraram que nos grupos que receberam *Lactobacillus* previamente à infecção por *C. albicans*, os níveis de colonização inicial (24 horas após a infecção) foram menores que nos grupos controle positivo e tratado com nistatina.

Os resultados mostraram ainda que houve uma redução significativa ($p < 0,05$) na carga da levedura na mucosa oral dos animais nos grupos tratados com os probióticos *L. acidophilus* e *L. rhamnosus*, em comparação com o grupo controle positivo (infectado e não tratado). Quando comparado com o grupo tratado com nistatina, somente o *L. rhamnosus* apresentou uma redução estatisticamente significativa na carga fungica (Gráfico 5.2). Verificou-se ainda que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) no isolamento da levedura na mucosa oral entre os grupos tratados com *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus rhamnosus* (Gráfico 5.2).

5.2.2 Tratados com nistatina

O grupo tratado com nistatina não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) no isolamento de *C. albicans* na mucosa oral dos animais, quando comparado ao grupo controle positivo (não tratado) (Gráfico 5.2).

Tabela 5.1 - Isolamento de *C. albicans* da mucosa oral de camundongos DBA/2 imunossuprimidos, não tratados e tratados com *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e nistatina.

Períodos	Log UFC/mL da mucosa oral (Média $\pm$ SD)			
	Controle Positivo	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	Nistatina
Dia 1	4,72 $\pm$ 0,1	3,91 $\pm$ 0,5	2,30 $\pm$ 0,2	4,82 $\pm$ 0,04
Dia 3	5,87 $\pm$ 0,2	4,56 $\pm$ 0,7	3,64 $\pm$ 0,1	4,82 $\pm$ 0,01
Dia 5	5,70 $\pm$ 0,2	3,66 $\pm$ 0,4	2,46 $\pm$ 0,3	4,84 $\pm$ 0,06
Dia 7	5,73 $\pm$ 0,1	3,96 $\pm$ 0,2	3,36 $\pm$ 0,2	4,10 $\pm$ 0,2
Dia 9	4,88 $\pm$ 0,1	3,71 $\pm$ 0,3	2,96 $\pm$ 0,05	4,20 $\pm$ 0,07
Dia 11	4,68 $\pm$ 0,8	2,37 $\pm$ 0,4	2,49 $\pm$ 0,2	2,62 $\pm$ 0,1
Dia 13	4,34 $\pm$ 0,2	1,95 $\pm$ 0	2,91 $\pm$ 0,05	3,87 $\pm$ 0,2

Gráfico 5.2 - Análise comparativa do isolamento de *Candida albicans* da mucosa oral em modelo murino imunossuprimidos (DBA/2), inoculado oralmente com 10^8 células viáveis da cepa ATCC 90028 (*C. albicans*) e tratados por via oral com nistatina (40.000 ui/kg/dia) e suspensões contendo 10^9 de células viáveis de *L. acidophilus* e *L. rhamnosus*. Estatística realizada através do teste de Mann-Whitney. Diferenças foram significantes para quando $p < 0,05$.

ap < 0,05 versus controle;

bp < 0,05 versus nistatina.

6 DISCUSSÃO

Estudos em modelo animal são muito importantes para comprovar a ação benéfica para o hospedeiro de determinada substância ou microrganismo, no combate a um patógeno. Os testes em animais representam o segundo passo prévio para a realização de testes em seres humanos, sendo os testes *in vitro* considerados o primeiro passo. Assim, o uso de qualquer substância em seres humanos necessita do prévio teste *in vitro* e em modelo animal.

Oito espécies de *Candida* são conhecidas como patogênicas: *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida viswanathii* e *Candida glabrata* (3). Sendo a espécie *C. albicans* a mais comumente encontrada na cavidade oral de indivíduos saudáveis (presente em cerca de 40 % da população humana), ela é a principal causadora da candidíase oral. Por essa razão foi escolhida especificamente a levedura *Candida albicans* ATCC 90028 para ser utilizada nesse experimento, além do fato de outros estudos terem utilizados esta cepa por apresentar alta adesão às células epiteliais humana e estar associada a infecções orais (69, 110, 111).

Neste estudo, em modelo animal, foram utilizados camundongos DBA/2. A escolha desta linhagem de camundongo baseou-se em artigos que também utilizaram esse camundongo para avaliar colonizações orais por *Candida* (29, 74-76). Os camundongos DBA/2, tanto no estudo de Chakir (74), quanto nos nossos estudos pilotos realizados, mostraram-se mais susceptíveis à colonização da cavidade oral por *Candida albicans*, mantendo-se em níveis elevados de infecção por mais tempo, quando comparados com camundongos BALB/c e SCID. No estudo de Chakir et al., de 1994, (74) foi usado um modelo animal para avaliar a infecção e a resposta imune em camundongos DBA/2 e BALB/c frente a uma infecção oral por *C. albicans*. Coletas de amostras da cavidade oral dos animais foram feitas, através da técnica de swab, diariamente, durante os primeiros 8 dias após a infecção e semanalmente até o vigésimo quinto dia. Análises histológicas e de imunohistoquímica também foram feitas. Os resultados mostraram que a infecção nos camundongos BALB/c teve duração mais curta que nos DBA/2, além de ser menor em todos os períodos avaliados.

Candida não é um microrganismo residente da microbiota oral e do trato gastrointestinal de camundongos (116). Isso dificulta o estabelecimento deste fungo e das doenças causadas por eles nestes animais, principalmente por longos períodos. Após uma infecção da cavidade oral pela levedura, há uma tendência de uma rápida redução na colonização da cavidade oral por esse patógeno em animais imunocompetentes, independente da sua linhagem. Por sua vez, a manutenção da colonização da cavidade oral por *C. albicans* por longos períodos faz-se necessária para testar e avaliar qualquer tipo de tratamento.

Assim, o estabelecimento da colonização de *C. albicans* na mucosa oral por longos períodos, geralmente, requer a intervenção de drogas imunossupressoras (113, 114). Para manter por mais tempo a levedura na cavidade oral dos animais, neste estudo provocou-se a imunossupressão dos mesmos, quatro dias antes da inoculação com periodicidade de quatro em quatro dias durante todo o experimento. A retirada da droga imunossupressora faz com que a colonização de *C. albicans* reduza rapidamente na mucosa oral, sem o auxílio de nenhum fármaco (117), o que é indesejado para uma pesquisa que testa a eficácia de um produto no combate a um patógeno.

Em estudo anterior, a levedura *C. albicans* foi isolada da cavidade oral em modelo animal imunossuprimido entre o terceiro e o sétimo dia após a inoculação inicial (118). No presente estudo, foi verificado que 24 horas após a inoculação inicial já havia uma quantidade significativa de *C. albicans* na cavidade oral dos animais inoculados. O aumento no número de UFCs neste estudo foi constante e significativo até o 7º dia após a inoculação inicial, a partir de então houve uma redução natural e significativa na colonização da mucosa oral dos animais estudados. Essa redução pode ser observada até o último dia de análise, sugerindo que há uma tendência natural de redução da carga da levedura na mucosa oral dos animais, mesmo estando imunossuprimidos. Os resultados de estudos pilotos por nós realizados mostraram que para o estabelecimento de um tempo maior de colonização por *C. albicans* na mucosa oral em modelo animal é necessário que seja provocada a imunossupressão dos animais e que a mesma seja mantida durante todo o experimento, uma vez que a infecção em camundongos imunocompetentes tende a ser controlada e reduzida rapidamente, logo nos primeiros 4 dias pós-infecção. Essa constatação está de acordo com vários estudos que envolvem a colonização por *Candida* da orofaringe e do trato gastrointestinal,

em modelo animal (103-109). No estudo de Kamai, de 2001 (105) foi testado um modelo de candidíase orofaríngea em camundongos, no qual os animais foram imunossuprimidos com 4 mg de acetato de cortisona, administrado subcutaneamente, um dia antes e 1 e 3 dias depois da inoculação do microrganismo *Candida*. Foi dado ainda hidrocloreto de tetraciclina na água do bebedouro dos animais, para evitar infecções secundárias. No modelo de Kamai foi observado uma colonização elevada por pelo menos nove dias, sendo que a colonização atingiu um nível considerado mais elevado a partir do terceiro dia pós-inoculação, resultados que vão de acordo com os obtidos no presente estudo. Através dele foi possível desenvolver o estudo de Kamai de 2002, (106) no qual investigou a contribuição do gene ALS1 da levedura *Candida albicans*, que codifica uma adesina importante para a aderência do patógeno na mucosa oral. O pequeno número de estudos envolvendo especificamente candidíase oral em modelo animal, existentes na literatura, mostra a dificuldade de se trabalhar com colonizações orais por leveduras e mostra a importância do desenvolvimento de metodologias em modelo animal que possam ser reproduzidas para utilização em novos estudos.

Apesar da comprovada necessidade de imunossupressão dos animais para uma adequada colonização da cavidade oral, existem estudos que observaram a colonização oral por *Candida*, por períodos de até quinze dias após a infecção, em animais imunocompetentes (29, 74-76). O estudo de Chakir de 1994, (74) que comparou a infecção oral por *C. albicans* em camundongos imunocompetentes DBA/2 e BALB/c e que já foi comentado anteriormente, mostrou que a colonização por *Candida* é estabelecida após a inoculação inicial da levedura em todos os camundongos. No entanto, a cinética da infecção é diferente entre as duas linhagens de camundongos estudadas. No BALB/c, a infecção teve uma menor duração, tendo um pico de proliferação no segundo dia após a inoculação e reduzindo para valores próximos de zero a partir do quarto dia. Já no DBA/2, a infecção sustentou-se por mais tempo, havendo um segundo pico de proliferação no quinto dia pós-inoculação, além do primeiro pico ocorrido no segundo dia. Após esse segundo aumento na contagem da levedura, observou-se uma queda acentuada, chegando próximo do zero a partir do oitavo dia. Em ambas as linhagens de camundongos, um número mínimo de *Candida* manteve-se por no mínimo 25 dias.

A diferença na cinética da infecção entre camundongos imunocompetentes de linhagens diferentes não aparenta estar ligada a baixa disponibilidade de neutrófilos

no sangue de cada animal, nem mesmo ligada ao seu recrutamento no foco infeccioso epitelial (74). No entanto, é possível que a função fagocítica ou o potencial de proteção em determinadas linhagens de camundongos sejam diferentes devido aos fatores da microbiota, incluindo o estado fisiológico da levedura *Candida* (119, 120), o que poderia permitir que a levedura resistisse a resposta imune do hospedeiro e mantivesse a infecção por mais tempo.

Uma reação inflamatória ocorre logo após o contato com a *levedura*, independente da linhagem do camundongo. Na fase inicial, tempo menor que 48 horas, há o recrutamento massivo de neutrófilos, que vão da corrente sanguínea para as camadas mais superficiais do epitélio (74). No entanto, essa ofensiva não aparenta ser imediatamente efetiva, já que se observa uma proliferação da levedura durante as primeiras 72 horas pós-inoculação, tanto em nosso estudo, quanto nos outros já citados (29, 73-76, 103, 105). Devido à semelhança observada durante a pós-infecção, acredita-se que os Linfócitos T e B participaram do combate à levedura, mas há a necessidade de se investigar essa reação do sistema imune no presente estudo.

Camundongos imunocomprometidos são utilizados para avaliação da candidíase (104, 109), conhecidos como SCID (imunodeficiência combinada severa), estes animais apresentam deficiência congênita na função das células T e B, devido à ausência de genes necessários para formar receptores das células T e B. Estes animais mostram-se mais susceptíveis que os camundongos imunocompetentes, por exemplo BALB/c, às infecções por *Candida*. No entanto, estudos mostram que os mecanismos de defesa inatos, como a função celular fagocítica e/ou as células Natural Killers (NK cells), são mais importantes que a imunidade mediada por células T e B na resistência à infecção por *Candida*, tanto na mucosa, como também na disseminação da candidíase de origem endógena (104, 121). As células fagocíticas são capazes de compensar a deficiência na função das células T e B, deixando o animal resistente à infecção por *Candida*, assim como os camundongos imunocompetentes, os quais apresentam todos os seus sistemas de defesa em perfeito funcionamento. No presente estudo, através dos estudos pilotos realizados, constatou-se que nos camundongos SCID, assim como nos BALB/c, a colonização da cavidade oral dos animais pela *C. albicans* ocorre, mas não se mantém elevada por muito tempo.

A utilização de camundongos imunossuprimidos, nos quais há uma neutropenia, prejuízo no mecanismo de imunidade inata, com ausência da atividade celular fagocítica (104), mostra-se mais adequada para conseguir uma colonização oral elevada por *Candida*, além de mantê-la elevada por um período prolongado, por pelo menos 15 dias, necessário para avaliar a ação do fármaco (103-108).

No presente estudo, utilizando animais imunossuprimidos com Ciclofosfamida, testou-se a ação de dois tipos de *Lactobacillus*, o *L. acidophilus* NCFM e o *L. rhamnosus* Lr-32. Ambas são bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos, que atendem a todos os requisitos necessários para serem utilizadas como probióticos (21, 82, 83, 89, 93, 122-124). As bactérias para serem consideradas probióticos precisam ser de origem humana, ou seja, estarem presentes no trato gastrointestinal; devem apresentar ausência de toxicidade e patogenicidade; possibilidade de produção em massa e estocagem; viabilidade em altas populações; estabilidade das características desejadas durante a preparação da cultura, assim como para estocagem e entrega, ou seja, devem apresentar estabilidade genética, manterem-se viáveis com suas propriedades médico-científicas até o seu consumo; serem tolerante ao baixo pH, à conservantes e outros microrganismos presentes nos alimentos e bacteriófagos em produtos alimentares manufaturados. Devem ainda apresentar a capacidade de sobrevivência, proliferação e atividade metabólica em um sítio alvo in vivo; tolerância ao trânsito pelo ambiente gástrico e pelo ambiente do intestino delgado; tolerância aos sais de bile; serem capazes de crescer no lúmen do trato gastrointestinal; capazes de competir com a microflora normal, incluindo a mesma ou parecidas espécies; serem potencialmente resistente à bacteriocinas e outros antimicrobianos produzidos pela microflora residente; apresentarem aderência e colonização preferencial; adesão epitelial e às mucinas e mucosas; permanecerem e crescerem após a adesão; devem produzir exopolímeros, cujas funções incluem a promoção da adesão, estabilização e persistência da adesão e promoção de resistência à imunidade não-específica e específica do hospedeiro; ter habilidade de co-agregação que ajuda na eliminação e/ou destruição de patógenos no trato gastrointestinal (18, 19, 39, 40, 47, 58).

Com relação à performance e funcionalidade, as bactérias probióticas devem ter a capacidade de exercer um ou mais benefícios clínicos à saúde; promoção de resistência gastrointestinal à colonização de patógenos; amenização da má-digestão

da 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, pois os probióticos reduzem a absorção gastrointestinal de colesterol exógeno e endógeno e/ou inibem a produção de colesterol no fígado, reduzindo assim a taxa de colesterol no sangue; antagonismo à bactérias patogênicas; imunoestimulação; antimutagenicidade; anticarcinogênico e produção de compostos bioativos e substâncias antimicrobianas (18, 19, 39, 40, 47, 58).

Segundo a definição de probióticos, eles são microrganismos vivos, quando ingeridos em quantidades adequadas, exercem benefícios à saúde além da nutrição básica inerente (15, 17, 37, 78). Com isso, a ausência de efeitos prejudiciais ao hospedeiro é essencial para que uma bactéria seja usada para o consumo humano. Tanto o *Lactobacillus acidophilus*, quanto o *Lactobacillus rhamnosus* estão incluídos na lista dos microrganismos com uma história documentada de utilização segura em alimentos (64), além de artigos mostrarem a segurança do uso dessas bactéria como probióticos (15, 19, 28, 54, 56, 57, 59-61, 63, 79, 92).

A principal preocupação no uso desses probióticos é o risco de transmissão de resistência antibiótica para outras bactérias, uma vez que bactérias ácido lácticas (LAB) apresentam resistência intrínseca a vários antibióticos e potencial para servirem como reservas de genes antibiótico-resistentes, podendo transferi-los para outras bactérias. No entanto, análises da sequência genômica do *L. acidophilus* NCFM confirmaram a ausência de conhecidos elementos genéticos transferíveis, relacionados com a resistência antibiótica (93).

No presente estudo, o grupo controle positivo serviu como parâmetro de comparação para se avaliar as unidades formadoras de colônias (UFCs) de *Candida albicans* em cada grupo de tratamento. Foi feito o teste de Mann-Whitney para se conhecer a ação de cada probiótico frente à quantidade de UFCs encontradas, ou seja, verificar se o probiótico atua impedindo a infecção (ação profilática) e/ou reduzindo a infecção, agindo como método terapêutico, uma vez instalada a infecção. Os testes foram realizados para determinar se há independência ou associação entre o uso dos probióticos e a redução do número de UFCs de *Candida albicans*. Além disso, serviu para verificar qual dos probióticos estudados (*L. rhamnosus* ou *L. acidophilus*) teve o melhor resultado, estatisticamente significativo, na ação profilática e qual terapia foi mais eficiente no combate à infecção.

Os resultados deste estudo inferem que a utilização dos probióticos testados previamente à inoculação por *C. albicans* foram capazes de reduzir o nível de colonização oral inicial, medido 24 horas após a inoculação da levedura, fato que indica uma boa ação profilática na colonização fúngica. Além disso, a aplicação do *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* após a infecção por *Candida albicans* reduziram significativamente a carga da levedura na mucosa oral dos animais, em comparação com o grupo controle positivo (infectado e não tratado) e com o grupo tratado com nistatina.

Há uma tendência natural de redução da colonização oral por *C. albicans*, tanto nos animais imunocompetentes (29, 73, 74), quanto nos imunossuprimidos (103-106, 109), sem a aplicação de nenhum fármaco. Os resultados do controle positivo reforçam essa constatação. No entanto, os dados dos grupos tratamento mostram que há uma tendência da colonização oral pela levedura durar menos tempo quando há a aplicação do probiótico, ou seja, a redução da colonização ocorre de forma mais acelerada e antecipada. No grupo controle positivo a redução iniciou-se a partir do sétimo dia pós-inoculação da levedura, já nos grupos tratados com probióticos iniciou-se a partir do terceiro dia.

A aplicação dos probióticos ocorreu diariamente e durante todo o período de avaliação dos animais, pois se sabe que as ações benéficas à saúde persistem somente durante o período em que eles permanecem presentes no sítio de ação (39, 50, 91). Como a colonização da bactéria não é definitiva, ou seja, liga-se temporariamente às células epiteliais (30), o consumo das bactérias probióticas deve ser mantido para que a melhora no sistema imune do indivíduo também seja continuada.

O estudo de Elahi, de 2005, (29) assim como este estudo, procurou observar a colonização por *Candida albicans* da cavidade oral de camundongos, após a administração de espécies de *Lactobacillus*. No primeiro, foram testados os *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 e *Lactobacillus fermentum*, ambos administrados diariamente e por intubação gástrica, em uma concentração de 1×10^9 células viáveis em 0,2 ml de PBS, durante duas semanas. O grupo controle recebeu apenas o PBS. Um dia após a última aplicação do probiótico, os camundongos foram oralmente contaminados com 1×10^8 células viáveis de *C. albicans*, através de aplicação tópica. A administração de *Lactobacillus* continuou por mais duas semanas e os animais foram avaliados em períodos predeterminados

durante 15 dias, através de exames microbiológicos e imunológicos. Os resultados do estudo de Elahi, assim como os do presente estudo, demonstraram que a administração de *L. acidophilus* em camundongos DBA/2 reduziram a duração da colonização da cavidade oral por *C. albicans*. O *L. acidophilus* mostrou-se mais eficiente que o *L. fermentum* em termos de proteção contra infecção da levedura. Os resultados, tanto do estudo de Elahi, como também deste, deram suporte para o conceito de que as bactérias probióticas apresentam a importante capacidade de aumentar a proteção de sítios de mucosa distantes dos locais onde o probiótico foi aplicado (86, 125), uma vez que no estudo de Elahi, as bactérias foram administradas no estômago e acabaram refletindo a sua ação na cavidade oral. No presente estudo pôde-se testar tanto a ação local dos probióticos, como também a ação à distância, já que os probióticos foram aplicados diretamente na cavidade oral dos animais e estes acabaram ingerindo boa parte da solução contendo as bactérias, fato que indica que os probióticos também agiram à distância, a partir do trato gastrointestinal.

Os mecanismos de ação dos probióticos ainda não estão totalmente esclarecidos. Acredita-se que as bactérias probióticas ajam no combate à patógenos produzindo substâncias antimicrobianas que reduzem o número de células viáveis da levedura e que afetam o metabolismo ou a produção de toxinas do patógeno; competindo pelos receptores de adesão, já que alguns probióticos têm a capacidade de se aderir à parede epitelial e competir com os patógenos pelos receptores; competindo também por nutrientes e estimulando a imunidade, através do aumento dos níveis de anticorpos e da estimulação da atividade de macrófagos contra diferentes tipos patógenos (50, 86).

No tratamento com nistatina também não se observou uma redução significativa no isolamento da levedura presente na cavidade oral dos animais, quando comparado com o grupo controle positivo. O tratamento com probiótico, no modelo utilizado neste estudo, mostrou-se mais eficaz no combate à colonização oral por *C. albicans*, em comparação com o tratamento com nistatina. Esse resultado pode talvez ser explicado pelo fato da nistatina ter ação somente local, não sendo absorvida no trato gastrointestinal e conseqüentemente, não proporcionando uma ação sistêmica no combate à infecção (101). Por ter ação somente local, a sua eficácia está sujeita a sofrer a influência de vários fatores, principalmente em um

modelo animal, em que não conseguimos controlar, por exemplo, o tempo de permanência do fármaco na cavidade oral dos animais.

Estudos posteriores devem ser realizados para se verificar qual o período de tratamento necessário com essas bactérias probióticas, para a redução de *C. albicans* na mucosa oral destes animais, além de estudos que avaliem a ação dos probióticos sobre a infecção por *Candida*, em modelo animal, do ponto de vista imunológico.

7 CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos neste estudo, tanto nos grupos de tratamento, como no grupo controle, pode-se concluir de forma estatisticamente significativa que:

- O tratamento com *Lactobacillus* pode ser uma alternativa eficaz na redução de *C. albicans* na mucosa oral em modelo murino DBA/2.
- *Lactobacillus* foram capazes de gerar uma ação profilática na colonização oral por *Candida albicans*.
- O tratamento com a nistatina não se mostrou eficaz na redução da levedura no modelo estudado.
- O tratamento com *L. rhamnosus*, no presente estudo, mostrou ser mais eficaz que o tratamento com a nistatina.
- O modelo murino DBA/2 imunossuprimido mostrou-se ser um bom modelo no estudo da colonização por *Candida* na cavidade oral.

REFERÊNCIAS¹

1. Shay K, Truhlar MR, Renner RP. Oropharyngeal candidosis in the older patient. *J Am Geriatr Soc.* 1997 Jul;45(7):863-70.
2. Narhi TO, Kurki N, Ainamo A. Saliva, salivary micro-organisms, and oral health in the home-dwelling old elderly--a five-year longitudinal study. *J Dent Res.* 1999 Oct;78(10):1640-6.
3. Lynch DP. Oral candidiasis. History, classification, and clinical presentation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994 Aug;78(2):189-93.
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.
5. Scully C, el-Kabir M, Samaranayake LP. Candida and oral candidosis: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1994;5(2):125-57.
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.
7. Ellepola AN, Samaranayake LP. Oral candidal infections and antimycotics. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(2):172-98.
8. Niimi M, Firth NA, Cannon RD. Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology.* 2010 Feb;98(1):15-25.
9. Regezi JA. Patologia bucal: correlações clinicopatológicas. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
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. Jorge AOC, Shimizu MT, Unterkircher CS, Fatinato V. *Microbiologia oral*. São Paulo: Ed. Santos; 1995.
14. 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.
15. Sanders ME. Probiotics: considerations for human health. *Nutr Rev*. 2003 Mar;61(3):91-9.
16. Nations FaAOotU. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. In: World Health Organization, editor. Córdoba; [publisher unknown]; 2001.
17. Klaenhammer TR. Probiotic bacteria: today and tomorrow. *J Nutr*. 2000 Feb;130(2S Suppl):415S-6S.
18. 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-Nov;76(1-4):279-92.
19. Collins JK, Thornton G, Sullivan GO. Selection of probiotic strains for human applications. *Int Dairy J*. 1998;8:487-90.
20. Lee YK, Nomoto K, Salminen S, Gorbach SL. *Handbook of probiotics*. New York: [publisher unknown]; 1999.
21. 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.

22. 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.
23. 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.
24. Reid G, Tieszer C, Lam D. Influence of lactobacilli on the adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* to fibers and epithelial cells. *J Ind Microbiol*. 1995 Sep;15(3):248-53.
25. Manzoni P, Mostert M, Leonessa ML, Priolo C, Farina D, Monetti C, et al. Oral supplementation with *Lactobacillus casei* subspecies *rhannosus* prevents enteric colonization by *Candida* species in preterm neonates: a randomized study. *Clin Infect Dis*. 2006 Jun 15;42(12):1735-42.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. Alander M, Satokari R, Korpela R, Saxelin M, Vilpponen-Salmela T, Mattila-Sandholm T, et al. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Appl Environ Microbiol*. 1999 Jan;65(1):351-4.
31. 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.

32. 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.

33. 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.

34. Puupponen-Pimiä RAMA, Oksman-Caldentey KM, Myllärinen P, Saarela M, Mattila-Sandholm T, et al. Development of functional ingredients for gut health. *Trends Food Sci Technol*. 2002;13:3-11.

35. 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.

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

37. Tuohy KM, Probert HM, Smejkal CW, Gibson GR. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discov Today*. 2003 Aug 1;8(15):692-700.

38. Gilliland SE. Acidophilus milk products: a review of potential benefits to consumers. *J Dairy Sci*. 1989 Oct;72(10):2483-94.

39. Klaenhammer TR, Kullen MJ. Selection and design of probiotics. *Int J Food Microbiol*. 1999 Sep 15;50(1-2):45-57.

40. Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Matto J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol*. 2000 Dec 28;84(3):197-215.

41. Koll P, Mandar R, Marcotte H, Leibur E, Mikelsaar M, Hammarstrom L. Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Apr;23(2):139-47.

42. Medici M, Vinderola CG, Perdigon G. Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresh cheese. *Int Dairy J.* 2004;14:611-8.
43. Pool-Zobel B, van Loo J, Rowland I, Roberfroid MB. Experimental evidences on the potential of prebiotic fructans to reduce the risk of colon cancer. *Br J Nutr.* 2002 May;87 Suppl 2:S273-81.
44. Pereira DI, Gibson GR. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Appl Environ Microbiol.* 2002 Sep;68(9):4689-93.
45. Jelen P, Lutz S. Functional milk and dairy products. In: Mazza G, editor *Functional foods: biochemical and processing aspects.* Lancaster: Technomic Publishing; 1998. 357-281.
46. Shah N, Lankaputhra WEV. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in yogurt. *Int Dairy J.* 1997;7:349-56.
47. Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. *Int J Dairy Technol.* 1998;51:123-36.
48. Kaur N, Gupta AK. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J Biosci.* 2002 Dec;27(7):703-14.
49. Klaenhammer TR. Probiotics and prebiotics. In: Doyle MP, Beuchat LR, Monteville TJ, editors. *Food microbiology: fundamentals and frontiers.* 2. ed: Washington: ASM; 2001. p. 797-811.
50. Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut.* 1991 Apr;32(4):439-42.
51. Meurman JH. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? *Eur J Oral Sci.* 2005 Jun;113(3):188-96.
52. Payne S, Gibson G, Wynne A, Hudspith B, Brostoff J, Tuohy K. In vitro studies on colonization resistance of the human gut microbiota to *Candida albicans* and the effects of tetracycline and *Lactobacillus plantarum* LPK. *Curr Issues Intest Microbiol.* 2003 Mar;4(1):1-8.

53. Strom K, Sjogren J, Broberg A, Schnurer J. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Sep;68(9):4322-7.
54. 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 20;44(1-2):93-106.
55. 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.
56. 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 15;35(10):1155-60.
57. 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 15;36(6):775-80.
58. 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.
59. Gueimonde M, Ouwehand AC, Salminen S. Safety of probiotics. *Scand J of Nutr*. 2004;48:42-8.
60. Aguirre M, Collins MD. Lactic acid bacteria and human clinical infections. *J Appl Bact* 1993;75:95-107.
61. Gasser F. Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. . *Bull Inst Pasteur*. 1994;92:45-67.
62. Danielsen M, Wind A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int J Food Microbiol*. 2003 Jan 26;82(1):1-11.

63. Bernardeau M, Vernoux JP, Henri-Dubernet S, Gueguen M. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *Int J Food Microbiol.* 2008 Sep 1;126(3):278-85.
64. 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.
65. List of taxonomic units proposed for QPS status [database on the Internet]. [cited. Available from: http://www.efsa.europa.eu/EFSA/Scientific_Opinion/sc_op_ej587_qps_en.pdf.
66. 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.
67. 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.
68. Nikawa H, Hamada T. Binding of salivary or serum proteins to *Candida albicans* in vitro. *Arch Oral Biol.* 1990;35(7):571-3.
69. 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.
70. Budtz-Jorgensen E, Mojon P, Rentsch A, Deslauriers N. Effects of an oral health program on the occurrence of oral candidosis in a long-term care facility. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2000 Apr;28(2):141-9.
71. 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.
72. Challacombe SJ. Immunologic aspects of oral candidiasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994 Aug;78(2):202-10.
73. Lacasse M, Fortier C, Chakir J, Cote L, Deslauriers N. Acquired resistance and persistence of *Candida albicans* following oral candidiasis in the mouse: a model of the carrier state in humans. *Oral Microbiol Immunol.* 1993 Oct;8(5):313-8.

74. 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.
75. 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.
76. Elahi S, Pang G, Ashman RB, Clancy R. Nitric oxide-enhanced resistance to oral candidiasis. *Immunology*. 2001 Dec;104(4):447-54.
77. Coogan MM, Fidel PL, Jr., Komesu MC, Maeda N, Samaranayake LP. (B1) *Candida* and mycotic infections. *Adv Dent Res*. 2006;19(1):130-8.
78. Sanders ME. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clin Infect Dis*. 2008 Feb 1;46 Suppl 2:S58-61; discussion S144-51.
79. 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 20;275(11):870-6.
80. 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.
81. 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.
82. Collado M, Meriluoto J, Salminen S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *Eur Food Res Technol*. 2008;226:1065–73
83. Buck BL, Altermann E, Svingerud T, Klaenhammer TR. Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiol*. 2005 Dec;71(12):8344-51.
84. Reid G. In vitro testing of *Lactobacillus acidophilus* NCFM as a possible probiotic for the urogenital tract. *Int Dairy J*. 2000;10:415-9.

85. 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.
86. Clancy R. Immunobiotics and the probiotic evolution. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003 Aug 18;38(1):9-12.
87. Barefoot SF, Klaenhammer TR. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol*. 1983 Jun;45(6):1808-15.
88. 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.
89. 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.
90. Paineau D, Carcano D, Leyer G, Darquy S, Alyanakian MA, Simoneau G, et al. Effects of seven potential probiotic strains on specific immune responses in healthy adults: a double-blind, randomized, controlled trial. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008 Jun;53(1):107-13.
91. Gill HS, Rutherfurd 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 Jul;21(4):264-71.
92. 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.
93. 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 USA*. 2005 Mar 15;102(11):3906-12.
94. 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.

95. Ahola AJ, Yli-Knuuttila H, Suomalainen T, Poussa T, Ahlstrom A, Meurman JH, et al. Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. *Arch Oral Biol.* 2002 Nov;47(11):799-804.
96. Martinez-Beneyto Y, Lopez-Jornet P, Velandrino-Nicolas A, Jornet-Garcia V. Use of antifungal agents for oral candidiasis: results of a national survey. *Int J Dent Hyg.* 2010 Feb;8(1):47-52.
97. Kuriyama T, Williams DW, Bagg J, Coulter WA, Ready D, Lewis MA. In vitro susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. *Oral Microbiol Immunol.* 2005 Dec;20(6):349-53.
98. Kontoyiannis DP, Lewis RE. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet.* 2002 Mar 30;359(9312):1135-44.
99. Loeffler J, Stevens DA. Antifungal drug resistance. *Clin Infect Dis.* 2003 Jan 15;36(Suppl 1):S31-41.
100. Sanglard D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Curr Opin Microbiol.* 2002 Aug;5(4):379-85.
101. Baker H, Sidorowicz A, Sehgal SN, Vezina C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. III. In vitro and in vivo evaluation. *J Antibiot (Tokyo).* 1978 Jun;31(6):539-45.
102. Flattery AM, Abruzzo GK, Gill CJ, Smith JG, Bartizal K. New model of oropharyngeal and gastrointestinal colonization by *Candida albicans* in CD4+ T-cell-deficient mice for evaluation of antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996 Jul;40(7):1604-9.
103. Guentzel MN, Herrera C. Effects of compromising agents on candidosis in mice with persistent infections initiated in infancy. *Infect Immun.* 1982 Jan;35(1):222-8.
104. Balish E, Jensen J, Warner T, Brekke J, Leonard B. Mucosal and disseminated candidiasis in gnotobiotic SCID mice. *J Med Vet Mycol.* 1993;31(2):143-54.

105. Kamai Y, Kubota M, Hosokawa T, Fukuoka T, Filler SG. New model of oropharyngeal candidiasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Nov;45(11):3195-7.
106. Kamai Y, Kubota M, Hosokawa T, Fukuoka T, Filler SG. Contribution of *Candida albicans* ALS1 to the pathogenesis of experimental oropharyngeal candidiasis. *Infect Immun*. 2002 Sep;70(9):5256-8.
107. Majithiya J, Sharp A, Parmar A, Denning DW, Warn PA. Efficacy of isavuconazole, voriconazole and fluconazole in temporarily neutropenic murine models of disseminated *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Jan;63(1):161-6.
108. Warn PA, Sharp A, Morrissey G, Denning DW. Activity of aminocandin (IP960; HMR3270) compared with amphotericin B, itraconazole, caspofungin and micafungin in neutropenic murine models of disseminated infection caused by itraconazole-susceptible and -resistant strains of *Aspergillus fumigatus*. *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Feb;35(2):146-51.
109. de Repentigny L. Animal models in the analysis of *Candida* host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol*. 2004 Aug;7(4):324-9.
110. Fang M, Chen JH, Xu XL, Yang PH, Hildebrand HF. Antibacterial activities of inorganic agents on six bacteria associated with oral infections by two susceptibility tests. *Int J Antimicrob Agents*. 2006 Jun;27(6):513-7.
111. Flisfisch S, Meyer J, Meurman JH, Waltimo T. Effects of fluorides on *Candida albicans*. *Oral Dis*. 2008 May;14(4):296-301.
112. Matheus MT, Hetem S, Guimaraes Neto OM, da Sliveira ZV. [Effect of cyclophosphamide on the development of incisor tooth germs in mice]. *Rev Odontol UNESP*. 1990;19(1):41-9.
113. Naglik J, Fidel PJ, Odds F. Animal models of mucosal *Candida* infection. *FEMS Microbiol Lett*. 2008 Jun;283(2):129-39.
114. Samaranayake Y, Samaranayake L. Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Apr;14(2):398-429.
115. Reed MF, Scragg MA, Williams DM, Soames JV. In vivo effects of *Candida albicans* products on rat oral epithelium. *J Oral Pathol Med*. 1990 Aug;19(7):326-9.

116. Lacasse M, Fortier C, Trudel L, Collet A, Deslauriers N. Experimental oral candidosis in the mouse: microbiologic and histologic aspects. *J Oral Pathol Med*. 1990 Mar;19(3):136-41.
117. Deslauriers N, Coulombe C, Carré B, Goulet J. Topical application of a corticosteroid destabilizes the host-parasite relationship in an experimental model of the oral carrier state of *Candida albicans*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1995 Mar;11(1):45-55.
118. Takakura N, Sato Y, Ishibashi H, Oshima H, Uchida K, Yamaguchi H, et al. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. *Microbiol Immunol*. 2003;47(5):321-6.
119. Diamond RD, Oppenheim F, Nakagawa Y, Krzesicki R, Haudenschild CC. Properties of a product of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae that inhibits contact between the fungi and human neutrophils in vitro. *J Immunol*. 1980 Dec;125(6):2797-804.
120. Smail EH, Melnick DA, Ruggeri R, Diamond RD. A novel natural inhibitor from *Candida albicans* hyphae causing dissociation of the neutrophil respiratory burst response to chemotactic peptides from other post-activation events. *J Immunol*. 1988 Jun 1;140(11):3893-9.
121. Rogers TJ, Balish E. Immunity to *Candida albicans*. *Microbiol Rev*. 1980 Dec;44(4):660-82.
122. Greene JD, Klaenhammer TR. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol*. 1994 Dec;60(12):4487-94.
123. Kleeman EG, Klaenhammer TR. Adherence of *Lactobacillus* species to human fetal intestinal cells. *J Dairy Sci*. 1982 Nov;65(11):2063-9.
124. Haukioja A, Yli-Knuuttila H, Loimaranta V, Kari K, Ouwehand AC, Meurman JH, et al. Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteria in vitro. *Oral Microbiol Immunol*. 2006 Oct;21(5):326-32.
125. Cross ML. Immune-signalling by orally-delivered probiotic bacteria: effects on common mucosal immunoresponses and protection at distal mucosal sites. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2004 May-Aug;17(2):127-34.

ANEXO A – Protocolo para uso de animais

SUBCOMISSÃO DE BIOÉTICA DE ANIMAIS DA FOU SP

PROTOCOLO Nº _____

PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS

1) FINALIDADE: ENSINO () PESQUISA ()
2) DURAÇÃO DA EXPERIMENTAÇÃO: INÍCIO: TÉRMINO:
3) NOME DO RESPONSÁVEL PELO PROJETO: RAMAL:
4) DEPARTAMENTO:
5) COLABORADORES:
6) TÍTULO DO PROJETO EM PORTUGUÊS: 6.1) TÍTULO DO PROJETO EM INGLÊS:
7) IDENTIFICAR O TIPO DE PROJETO: ☐ Iniciação Científica ☐ Tese (mestrado/doutorado) ☐ Auxílio Pesquisa É integrado com outra Instituição? Qual? Local de realização do experimento:

8) INFORMAÇÕES SOBRE O MODELO ANIMAL: Nome Científico: Nome Comum: Raça/Linhagem: Idade: Peso: Número total: Procedência: Animais selvagens (anexar autorização do IBAMA)
9) JUSTIFICATIVA DO NÚMERO DE ANIMAIS UTILIZADOS: Existe método alternativo para evitar o uso de animais? Caso exista justifique porque não foi adotado:

10) CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO E ALIMENTAÇÃO:

Descrição do Alojamento:

Climatização: Sim () Não () – Qual?

Ventilação:

Temperatura ambiente:

Ciclo claro/escuro:

Alimentação:

Lotação - número animais/área:

Fonte de água:

Exaustão de ar: Sim () Não ()

11) PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS:

Envolve a promoção de estresse intencional? Sim () Não () Justifique:

Envolve a promoção de dor intencional? Sim () Não () Justifique:

Envolve a restrição prolongada de água? Sim () Não () Justifique:

Envolve jejum prolongado? Sim () Não () Justifique:

Envolve o uso de ingredientes nutritivos ou não com efeitos desconhecidos?

Sim () Não () Justifique:

Envolve a administração de algum agente? Sim () Não ()**Caso sim, descreva o agente, dose, frequência e via de administração:****Envolve cirurgias? Não () Única () Múltiplas ()****Justifique:****Envolve a colheita de material biológico? Sim () Não ():**

Natureza:

Método de colheita:

Quantidade da amostra:

Frequência:

Envolve eutanásia? Sim () Não ()

Qual o método empregado: Deslocamento Cervical ()

Decapitação () Perfusão sob Anestesia ()

Pistola Pneumática (grandes animais) () CO₂ ()

Dose excessiva de Anestésico () Dessangramento com anestesia ()

Outros.....

especificar

Após o término do experimento o animal poderá ser usado para outro fim?

Sim () Não () Qual?

12) ANEXAR CÓPIA DO PROJETO OU METODOLOGIA DA AULA**13) TERMO DE RESPONSABILIDADE:**

Li os princípios éticos elaborados pelo Colégio Brasileiro em Experimentação Animal - (COBEA) e

concordo com suas exigências durante a duração deste experimento.

Declaro que as informações prestadas neste protocolo são verídicas e caso haja qualquer alteração no mesmo farei comunicação, por escrito, à da Subcomissão de Bioética de Animais da FOU SP.

Declaro, também, que a equipe que participa deste projeto está devidamente treinada, sendo competente para executar os procedimentos descritos neste protocolo.

Nome e assinatura do responsável pelo Projeto: Victor Haruo Matsubara

De acordo.

Nome do Docente/Orientador do Projeto: Atlas Edson Moleros Nakamae

Assinatura: _____

Data:...../...../.....

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 15/2009

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa-Subcomissão de Bioética de Animais da FOUSP, **APROVOU** o protocolo de pesquisa: "**Avaliação do uso de probióticos no controle de prevalência de candidíase oral em camundongos – uso terapêutico e profilático**", de responsabilidade do Pesquisador: **Victor Haruo Matsubara**, sob orientação do Professor Doutor **Atlas Edson Moleros Nakamae**

Cabe ao responsável enviar relatórios referentes ao andamento da pesquisa após 06 (seis) meses e 01 (um) ano desta data, bem como cópia do trabalho em "cd" ou "disquete" ao finalizá-lo, conforme legislação vigente.

São Paulo, 12 de maio de 2009.

Prof. Dr. **CELSON LUIZ CALDEIRA**
PRESIDENTE DA SUB-COMISSÃO DE BIOÉTICA DE ANIMAIS DA FOUSP