

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

CAROLINA LIMA SILVA

PERFIL ANTIFÚNGICO E ANTIBIOFILME DE *Lactobacillus casei*
SOBRE *Candida* spp.

ALFENAS/MG

2022

CAROLINA LIMA SILVA

PERFIL ANTIFÚNGICO E ANTIBIOFILME DE *Lactobacillus casei*
SOBRE *Candida* spp.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção de título de Mestre em Ciências Biológicas, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Interação Patógeno-hospedeiro.

Orientadora: Profa. Dra. Amanda LATERCIA Tranches Dias

Co-Orientadora: Profa. Dra. Naiara Chaves Silva.

ALFENAS/MG

2022

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Biblioteca Central

Silva, Carolina Lima .

Perfil antifúngico e antibiofilme de *Lactobacillus casei* sobre *Candida* spp. / Carolina Lima Silva. - Alfenas, MG, 2022.

76 f. : il. -

Orientador(a): Amanda Latercia Tranches Dias.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.

Bibliografia.

1. *Candida* spp..
 2. *Lactobacillus casei*.
 3. Microbioma humano.
 4. Biofilmes fúngicos.
 5. Infecções fúngicas.
- I. Dias, Amanda Latércia Tranches , orient. II. Título. Perfil antifúngico e antibiofilme de *Lactobacillus casei* sobre *Candida* spp.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

PERFIL ANTIFÚNGICO E ANTIBIOFILME DE *Lactobacillus casei* SOBRE *Candida spp.*

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação/Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro.

Aprovada em: 25 de fevereiro de 2022.

Profa. Dra. Amanda Latércia Tranches Dias
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Profa. Dra. Luciana da Silva Ruiz Menezes
Instituição: Instituto Adolfo Lutz - Bauru

Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Amanda Latércia Tranches Dias, Professor do Magistério Superior**, em 25/02/2022, às 19:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **PEDRO LUIZ ROSALEN, Usuário Externo**, em 25/02/2022, às 19:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana da Silva Ruiz Menezes, Usuário Externo**, em 25/02/2022, às 20:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0683001** e o código CRC **D813C617**.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, que nunca deixou de me guiar e me iluminar, e me trouxe onde estou hoje.

Gostaria de agradecer a minha orientadora, que me recebeu de braços abertos na Unifal, foi paciente comigo durante todo o processo do mestrado, sempre aberta a novas ideias, me ensinando com muita paciência, e principalmente compreensiva com todas minhas situações durante o mestrado.

À meus pais, Nilce e Clecio, que primeiramente me deram a vida, me ensinaram muito do que sei e me fizeram ser quem sou hoje, mas principalmente nunca saíram do meu lado, e sempre me apoiaram em todas minhas loucuras, dentre elas iniciar o mestrado. Além disso, agradecimento especial a minha mãe, por se doar e fazer sempre meus lanchinhos, me ajudar no dinheiro para caronas e todos os tipos de compreensão possíveis que uma mãe pode ser capaz e além de capaz de realizar.

Por fim, um agradecimento àquela pessoa que hoje é a que mais me apoia, me suporta, me fez e faz-me ser mais agradecida todos os dias por tê-la em minha vida, meu eterno namorado e futuro marido Erik. Nada disso seria possível sem você e todo seu apoio e confiança em mim.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Contos de fadas não podem se tornar realidade, você tem que fazê-los acontecer, tudo depende de você, trabalhei bastante até aqui e estou quase lá.”

(NEWMAN R., 2009).

RESUMO

Espécies do gênero *Candida* apresentam diversos fatores associados à virulência, dentre estes, destacam-se a capacidade de formação de biofilmes fúngicos monoespécie e multiespécie, além de biofilmes inter-reinos tais como os biofilmes formados por *Candida* spp. e bactérias. *Lactobacillus* spp. são espécies bacterianas que fazem parte do microbioma humano e há espécies que apresentam ação probiótica. Espécies de *Lactobacillus* já foram identificadas como agentes promissores para tratamento e/ou prevenção de infecções por *Candida* spp. Neste sentido, objetivamos em nossa pesquisa, a identificação da interferência, positiva ou negativa, de *L. casei* sobre o desenvolvimento de células planctônicas e biofilmes de *Candida* spp.. Biofilmes inter-reinos foram formados e a sensibilidade antifúngica, atividade metabólica e biomassa foram verificadas. Observou-se aumento no teor de biomassa dos biofilmes inter-reinos quando em comparação com o biofilme monoespécie de *Candida* spp.. *L. casei*, em estado planctônico, a partir da concentração de 5×10^6 células mL^{-1} foi capaz de reduzir em 61% a atividade metabólica de células planctônicas de *C. albicans* quando adicionados no momento de incubação e durante a fase exponencial de *C. albicans*. *L. casei*, em estado planctônico, foi capaz de diminuir em 36% a atividade metabólica de células planctônicas de *C. krusei* a partir da concentração de 5×10^5 células mL^{-1} . Adição de células planctônicas de *L. casei* ao biofilme de *C. albicans* na fase de maturação e ao biofilme de *C. krusei* no momento de adesão, a partir da concentração de 5×10^7 células mL^{-1} reduziu a atividade metabólica de *Candida* spp.. Biofilme pré-formado de *L. casei* foi capaz de diminuir a atividade metabólica de biofilme de *C. albicans* e *C. krusei* em 16% e 21% respectivamente. Ademais biofilme de *L. casei* reduziu em 24% a atividade metabólica de biofilme de *C. albicans*. Por fim, o antifúngico fluconazol, apresentou maior potencial antibiofilme sobre *Candida* spp. quando em interação destas com *L. casei*. Esses resultados demonstram as possibilidades de interações entre espécies fúngica e bacteriana, simulando muitas vezes, as interações que ocorrem no contexto do microbioma humano. Esses resultados mostram-se altamente promissores principalmente no que se refere à profilaxia e tratamento de infecções associadas à *Candida* spp.

Palavras-chave: *Candida* spp.; *Lactobacillus casei*; microbioma humano; biofilmes fúngicos; infecções fúngicas.

ABSTRACT

Species of the genus *Candida* have shown several factors associated with virulence, among these, the ability to form monospecies and multispecies fungal biofilms, as well as inter-kingdom biofilms such as the biofilms formed by *Candida* spp. and bacteria. *Lactobacillus* spp. are bacterial species that are part of the human microbiome and there are species that have probiotic function. *Lactobacillus* species have already been identified as promising agents for the treatment and/or prevention of *Candida* spp. In this sense, we aimed in our research, the identification of interference, positive or negative, of *L. casei* on the development of planktonic cells and *Candida* spp. biofilms. Mixed inter-kingdom biofilms were formed and fungal sensitivity, metabolic activity and biomass have been verified. An increase in the biomass content was observed in the presence of mixed biofilms when compared to the monospecies biofilm of *Candida* spp.. *L. casei*, in planktonic state, from the concentration of 5×10^6 cells mL^{-1} was able to reduce by 61% the metabolic activity of *C. albicans* planktonic cells when added at the time of incubation and during the exponential phase of *C. albicans*. *L. casei*, in planktonic state, was able to decrease by 36% the metabolic activity of planktonic cells of *C. krusei* from the concentration of 5×10^5 cells mL^{-1} . Addition of *L. casei* planktonic cells to the *C. albicans* biofilm in the maturation phase and to the *C. krusei* biofilm at the time of adhesion, from the concentration of 5×10^7 cells mL^{-1} , reduced the metabolic activity of *Candida* spp. Preformed biofilm of *L. casei* was able to decrease the metabolic activity of *C. albicans* and *C. krusei* biofilm by 16% and 21% respectively. Furthermore, *L. casei* biofilm reduced by 24% the metabolic activity of *C. albicans* biofilm. Finally, the antifungal fluconazole showed greater antibiofilm potential against *Candida* spp. when in interaction with *L. casei*. These results demonstrate the possibilities of interactions between fungal and bacterial species, often simulating the interactions that occur in the context of the human microbiome. These results are highly promising, especially with regard to the prophylaxis and treatment of infections associated with *Candida* spp.

Keywords: *Candida* spp.; *Lactobacillus casei*; human microbiome; fungal biofilms; fungal infections.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Células leveduriforme de <i>C. albicans</i>	18
Figura 2- Hifa de <i>C. albicans</i>	19
Figura 3- Pseudo-hifas de <i>C. albicans</i>	20
Figura 4- Biofilme de <i>C. albicans</i>	22
Figura 5- Biofilmes de <i>C. krusei</i>	22
Figura 6- Esquema representativo de formação de biofilme.....	23
Figura 7- <i>Candida krusei</i>	40
Figura 8- Representação esquemática da metodologia deste trabalho.	49
Figura 9- Representação dos expostos de <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> ao <i>L. casei</i> em diferentes concentrações e em três tempos distintos, e seus respectivos controles de crescimento.	54
Figura 10- Representação dos expostos de biofilme de <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> ao <i>L. casei</i> em estado planctônico em diferentes concentrações e em três tempos distintos, e seus respectivos controles de crescimento.	56
Figura 11- Microscopia óptica em câmara de Neubauer utilizando-se teste de viabilidade celular com corante Azul de Trypan.....	62
Figura 12- Teste de viabilidade celular com corante azul de <i>Trypan</i> da interação de <i>Candida</i> spp. com <i>L. casei</i>	64
Figura 13- Fotografia de microscopia óptica em câmara de Neubauer com corante azul de Trypan apresenta hifas de <i>C. krusei</i>	65
Figura 14- Microscopia Óptica, em aumento 1000x, de células <i>Candida</i> spp. e <i>L. casei</i> coradas através da coloração diferencial de Gram.....	66
Figura 15- Anexo 1.....	97

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Médias dos valores de atividade metabólica da interação de *C. albicans* em estado planctônico ao *L. casei*, em diferentes tempos e concentrações.. 68
- Tabela 2-** Médias dos valores de atividade metabólica da interação de *L. casei* a *C. krusei* em Estado Planctônico em diferentes tempos e concentrações.. 69
- Tabela 3-** Médias dos valores de atividade metabólica e biomassa realizados na interação de biofilme *C. albicans* ao *L. casei* previamente cultivado em estado planctônico. 70
- Tabela 4-** Médias dos valores de atividade metabólica e biomassa** obtidos na interação de biofilme de *C. krusei* aos isolados de *L. casei* em diferentes tempos e concentrações. 72
- Tabela 5-** Médias dos valores de Atividade Metabólica e Biomassa** obtidos na Interação de Biofilme de *C. albicans* com Biofilme Pré-Formado de *L. casei*. 74
- Tabela 6-** Médias dos valores de Atividade Metabólica e Biomassa** obtidos na Interação de Biofilme de *C. krusei* com Biofilme Pré-Formado de *L. casei* 76
- Tabela 7-** Médias dos valores de Atividade Metabólica e Biomassa** realizados na Interação de Biofilme de *C. albicans* ao Biofilme de *L. casei*. 77
- Tabela 8-** Valores de Concentração Inibitória Mínima (em $\mu\text{g mL}^{-1}$) de Fluconazol e *L. casei* sobre biofilmes de *C. albicans* e *C. krusei* 80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CRL	Control Chr Hansen
EV	Vesícula Extracelular
mL	Mililitro
MRS	Man Rogosa Sharpe
PBS	tampão fosfato-salina
Spp	Espécies
TYE	Tryptone Yeast Extract
µg	Micrograma
XTT	[2,3-(2- methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl) -5- [(phenylamino) carbonyl]- 2H-tetrazolium hydroxide)]

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	<i>Candida</i> spp.	17
2.1.1	Taxonomia e Morfologia	17
2.1.2	Relações Entre <i>Candida</i> spp. e o Hospedeiro	23
2.2	<i>Candida albicans</i>	27
2.2.1	Interação Patógeno-Hospedeiro	30
2.2.2	Mecanismos de Resistência	32
2.2.3	Resistência a Agentes Antifúngicos	35
2.3	ESPÉCIES NÃO-ALBICANS DE <i>Candida</i> spp. (NAC)	37
2.4	MICROBIOMA	40
2.5	PROBIÓTICOS	42
2.6	INTERAÇÃO <i>Lactobacillus</i> spp. E <i>Candida</i> spp.	44
2.6.1	Interação <i>Lactobacillus</i> spp. e <i>Candida albicans</i>	44
2.6.2	Interação <i>Lactobacillus</i> spp. e <i>Candida krusei</i>	45
3	OBJETIVOS	47
3.1	OBJETIVO GERAL	47
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4	MATERIAL E MÉTODOS	48

4.1	DESENHO EXPERIMENTAL	48
4.2	CEPA MICROBIANA E CULTURA	50
4.3	CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS.....	50
4.4	VIABILIDADE CELULAR	51
4.4.1	Viabilidade Celular de <i>L. casei</i>	51
4.4.2	Viabilidade Celular de <i>L. casei</i> em interação com <i>Candida</i> spp.	52
4.5	INTERAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>Candida</i> spp. AO <i>L. casei</i> EM ESTADO PLANCTÔNICO	53
4.6	FORMAÇÃO DE BIOFILME DE <i>Candida</i> spp.	55
4.7	BIOFILME DE <i>Candida</i> spp. EXPOSTAS AO <i>L. casei</i>	55
4.8	FORMAÇÃO DE BIOFILME DE <i>L. casei</i>	57
4.9	BIOFILMES DE <i>Candida</i> spp. EXPOSTOS ÀS CÉLULAS SÉSSEIS DE <i>L. casei</i>	57
4.10	BIOFILMES DE <i>C. albicans</i> EXPOSTOS AO BIOFILME DE <i>L. casei</i>	58
4.11	ENSAIO DE ATIVIDADE METABÓLICA POR REDUÇÃO DE SAL DE TRETAZÓLIO XTT	59
4.12	ENSAIO DE BIOMASSA COM CRISTAL VIOLETA	60
4.13	AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE BIOFILME DE <i>Candida</i> spp. EXPOSTOS ÀS CÉLULAS PLANCTÔNICAS DE <i>L. casei</i>	61
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1	VIABILIDADE CELULAR DE <i>L. casei</i> E INTERAÇÃO COM <i>Candida</i> spp.....	62
5.2	INTERAÇÃO DE <i>L. casei</i> A <i>C. albicans</i> EM ESTADO PLANCTÔNICO	67
5.3	INTERAÇÃO DE <i>L. casei</i> A <i>C. krusei</i> EM ESTADO PLANCTÔNICO	68
5.4	INTERAÇÃO DE BIOFILME DE <i>C. albicans</i> AO <i>L. casei</i> PREVIAMENTE CULTIVADO EM ESTADO PLANCTÔNICO	70

5.5	INTERAÇÃO DE BIOFILME DE <i>C. krusei</i> AO <i>L. casei</i> PREVIAMENTE CULTIVADO EM ESTADO PLANCTÔNICO	71
5.6	INTERAÇÃO DE BIOFILME DE <i>C. albicans</i> COM BIOFILME PRÉ-FORMADO DE <i>L. casei</i>	74
5.7	INTERAÇÃO DE BIOFILME DE <i>C. krusei</i> COM BIOFILME PRÉ-FORMADO DE <i>L. casei</i>	75
5.8	INTERAÇÃO DE BIOFILME DE <i>C. albicans</i> COM BIOFILME <i>L. casei</i>	77
5.9	SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE BIOFILME DE <i>Candida spp.</i> EM INTERAÇÃO AO <i>L. casei</i>	79
6	CONCLUSÕES	83
	REFERÊNCIAS	86
	APÊNDICES	Erro! Indicador não definido.
	Apêndice A	94
	Apêndice B	95
	ANEXO	Erro! Indicador não definido. 96
	A- Anexo A.....	96

1 INTRODUÇÃO

Microbioma refere-se aos microrganismos que habitam os tecidos e fluidos do organismo humano, além de seus materiais genéticos e interações intra e inter-reinos. A composição das comunidades microbianas é complexa e depende das condições do hospedeiro e dos fatores externos. A diversidade do microbioma encontrada no organismo pode ser influenciada pela dieta, ambiente, genética do hospedeiro e exposição microbiana precoce. Entretanto o microbioma essencial (*core*) está presente em todos os indivíduos, e representam grande parte dos microrganismos encontrados no microbioma (HUTTENHOWER *et al.*, 2012).

A variedade do microbioma humano é extensa e pode ser definida como a distribuição abundante de tipos distintos de organismos presentes e podem estar associados a doenças humanas severas. A microbiota está presente em diferentes locais do organismo humano e está relacionada com a saúde de cada indivíduo (HUTTENHOWER *et al.*, 2012).

O termo microbioma tem sido utilizado para se referir a microrganismos comensais e patogênicos que habitam e interagem com o genoma humano. Desempenham funções importantes na resistência a patógenos, agem no fortalecimento do sistema imunológico e na absorção nutricional. Bacterioma se designa ao grupo de bactérias que residem na microbiota, viroma ao grupo de vírus e micobioma aos microrganismos fúngicos que também fazem parte da composição do microbioma (HUTTENHOWER *et al.*, 2012; UNDERHILL; ILIEV, 2014).

Dentre os fungos que fazem parte do microbioma humano, destacam-se as espécies pertencentes ao gênero *Candida* spp. . Tais espécies são encontradas principalmente na cavidade oral, vias aéreas superiores, intestino, trato urinário e região vulvovaginal. Em meio ao gênero *Candida* spp., espécie *C. albicans* é a mais prevalente, porém espécies não-*albicans* de *Candida* spp., como *C. krusei* também têm sido encontradas no microbioma humano (BANDARA; PANDUWAWALA; SAMARANAYAKE, 2019).

Candida spp. são considerados microrganismos comensais, embora possam estar associados à ampla gama de doenças em pacientes imunocomprometidos, indivíduos suscetíveis, tais como pacientes que fizeram uso de antibióticos, pacientes com disbiose,

entre outros fatores, como alimentação e exposição ao ambiente (MATSUBARA *et al.*, 2016; ROSSI *et al.*, 2011) Expressa fatores de virulência como adesividade, alterações fenotípicas e morfológicas, tais fatores estão relacionados com o início do processo de infecção ao hospedeiro e resultam no sucesso do processo infeccioso (ROSSI *et al.*, 2011).

Na ocasião em que fatores predisponentes, fisiológicos, patológicos e mecânicos modificam o relacionamento que ocorre entre o hospedeiro e a microbiota natural (ROSSI *et al.*, 2011), essas leveduras podem causar problemas superficiais e/ou sistêmicos denominados candidíase (MATSUBARA *et al.*, 2016). Muitas destas infecções apresentam-se refratárias ao tratamento antifúngico e as falhas terapêuticas devem-se, principalmente, a questões de resistência aos fármacos antifúngicos ou a outros fatores associados à virulência de *Candida* spp. tal como a capacidade de formação de biofilmes seja única ou monoespécie, ou mistos tanto intra quanto inter-reinos. Os biofilmes podem ser compostos por uma população de uma única espécie ou de uma comunidade derivada de várias espécies (SARDI *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2017). Células de *Candida* spp. em biofilmes exibem maior resistência aos antifúngicos disponíveis e às defesas do hospedeiro em comparação com células planctônicas (SILVA *et al.*, 2017). Resistência a antifúngicos é um problema significativo para clínicos que estão encarregados de cuidar de pacientes com alto risco de infecção (WIEDERHOLD *et al.*, 2017). Pesquisas são feitas para encontrar novos compostos antimicrobianos e métodos capazes de serem incluídos na medicina tradicional (ROSSI *et al.*, 2011).

Candida não-albicans têm se mostrado resistente a antifúngicos atuais, como antifúngicos da classe dos azóis, *C. krusei* apresenta resistência intrínseca ao fluconazol, assim como *C. albicans*, em estado de biofilme. Além disso, *C. krusei* demonstra sensibilidade reduzida à anfotericina B (RICARDO *et al.*, 2020; WIEDERHOLD *et al.*, 2017).

No contexto das bactérias que integram o bacterioma humano, ou seja, as bactérias que residem no microbioma e interagem entre si e com outros microrganismos, destacam-se as espécies pertencentes ao gênero. *Lactobacillus* spp. Tais espécies habitam diversas regiões do organismo, como região vulvovaginal, intestino, trato urinário, pele e cavidade oral. Essas bactérias desempenham importante papel na manutenção da microbiota, criando um equilíbrio funcional. Esse equilíbrio

fornece uma barreira para nova colonização por microrganismos patogênicos e crescimento excessivo de microrganismos comensais (ROSSI *et al.* 2011). Esses organismos têm sido estudados como alternativas profiláticas e terapêuticas nos tratamentos contra infecções humanas causadas principalmente pelo gênero *Candida* spp. devido a sua ampla capacidade de interações no microbioma (HUTTENHOWER *et al.*, 2012). Destacam-se as espécies *L. gasseri*, *L. casei* e *L. rhamnosus* (WANG *et al.*, 2017), e algumas delas, já foram elucidadas como potenciais probióticos, como *L. acidophilus*, *L. pentosus*, *L. vaginalis*, *L. plantarum*, *L. gasseri* (MATSUBARA *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2019; ZANGL *et al.*, 2020).

Devido diminuição da sensibilidade antifúngica e à refratariedade ao tratamento antifúngico demonstrada por *Candida* spp. e, e devido à sua capacidade de formar biofilmes mono e ou multiespécie, objetivou-se a compreensão sobre a interferência de *L. casei* no desenvolvimento planctônico e biofilme de *Candida* spp. e na resposta à terapia antifúngica adotada.

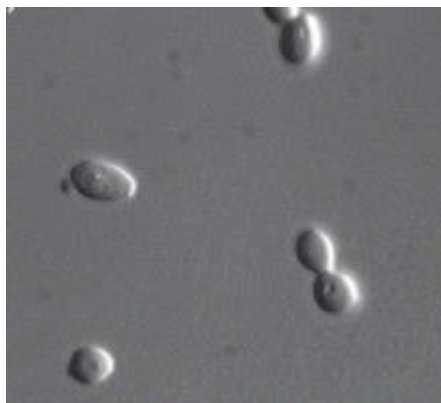
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Candida* spp.

2.1.1 Taxonomia e Morfologia

Candida spp. pertencem ao reino Fungi, ao filo Ascomicota, a classe dos Blastomicetos e a família dos Criptococales. Considerado uma levedura, ou seja, um fungo unicelular microscópico de forma simples de crescimento (HAGEE *et al*, 2020).

O gênero *Candida* spp. é composto por um grupo heterogêneo de organismos e diferentes espécies de *Candida* spp. são conhecidas. O gênero compreende espécies dimórficas, que apresentam forma de levedura e hifas verdadeiras, e algumas espécies polimórficas, como *C. albicans*, que exibem forma de leveduras, pseudo-hifas e hifas verdadeiras. Leveduras, retratadas na figura 1, apresentam formas arredondadas e podem ser encontradas em variados ecossistemas como solo, alimentos, água além de habitarem a microbiota do ser humano e de animais. Esses microrganismos degradam proteínas e carboidratos para obterem carbono e nitrogênio, elementos essenciais para seu desenvolvimento. Devido a sua capacidade adaptativa, as leveduras podem desenvolver tanto na presença de oxigênio quanto em anaerobiose (HAGEE *et al*, 2020; SUDBERY; GOW; BERMAN, 2004).

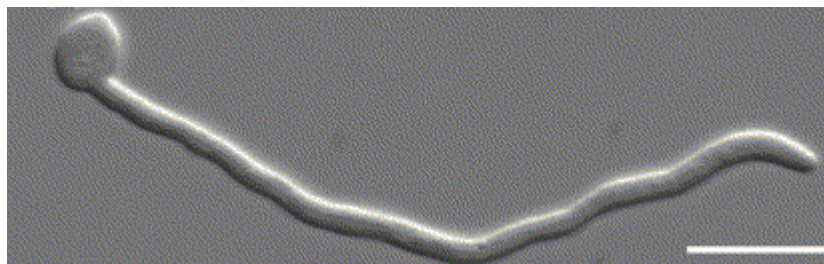
Figura 1- Células leveduriforme

Fonte: SUDBERY; GOW; BERMAN, 2004.

Legenda: As células de levedura brotando possuem ampla capacidade adaptativa a diferentes condições do ambiente. Estão presentes no microbioma humano, em regiões do estômago, intestino, trato urinário e cavidade oral. Imagem de microscópio eletrônico de varredura.

A forma de hifas, conforme apresentada na figura 2, de *Candida* spp. é um fator associado à virulência desse microrganismo. A transição entre leveduras e hifas eleva a capacidade de aderência aos tecidos do hospedeiro, devido ao aumento da superfície de contato do mesmo, consequentemente facilitando a invasão tecidual e levando à disseminação a órgãos internos do corpo humano. Formas de hifas estão relacionadas com as formas mais virulentas e possivelmente ocorrem devido à resposta de *Candida* spp. ao estresse ambiental (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). A forma de hifas e pseudo-hifas podem promover penetração no tecido durante os estágios iniciais da infecção, enquanto a forma de levedura pode ser mais adequada para disseminação na corrente sanguínea. As formas filamentosas (hifas e pseudo-hifas) também podem ser importantes para a colonização de órgãos, como o rim, levando à infecção sistêmica por *Candida* spp., ou infecção invasiva (SUDBERY; GOW; BERMAN, 2004).

Figura 2- Hifa de *C. albicans*

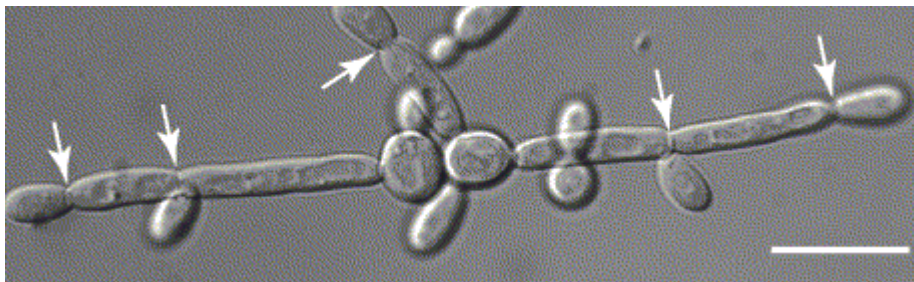


Fonte: SUDBERY; GOW; BERMAN, 2004.

Legenda: *Candida* spp. é capaz de formar hifas verdadeiras, sua forma de hifa é altamente expressa em situações onde as condições de sobrevivência são extremas, como níveis escassos de nutrientes e/ou ambientes de pHs baixos. É considerado um fator de virulência desse microrganismo devido ao fato de, em sua forma de hifa, *Candida* spp. aumenta sua capacidade de adesão e disseminação na corrente sanguínea, além de, facilitar na absorção de nutrientes, em virtude a sua forma alongada que, conseqüentemente, amplifica sua superfície de contato. Imagem de microscópio eletrônico de varredura.

Pseudo-hifa, apresentado na figura 3, é outra estrutura morfológica observada em *C. albicans*, produzida durante sua reprodução por brotamento, na qual os brotos não se destacam da célula mãe, ocorrendo, então, um encadeamento de células, cuja forma lembra uma hifa. O tubo germinativo é um prolongamento contínuo da célula-mãe leveduriforme produzido no início do processo de filamentação (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). Em sua forma pseudo-hifa a célula mãe se alonga e, após a formação do septo, a célula filha permanece ligada à célula-mãe. Como resultado, filamentos compostos de células alongadas com constrições nos septos são formados. O alongamento dos botões nas pseudo-hifas pode ser tão extremo que esses filamentos podem parecer superficialmente com hifas (SUDBERY; GOW; BERMAN, 2004).

Figura 3- Pseudo-hifas de *C. albicans*



Fonte: SUDBERY; GOW; BERMAN, 2004.

Legenda: Setas apontam para os septos identificados. Pseudo-hifas é uma forma morfológica já identificada em espécies de *C. albicans*; devido a isso, *C. albicans* é considerado um microrganismo polimórfico, visto que apresenta as três formas morfológicas identificadas em *Candida* spp., levedura, hifas verdadeiras e pseudo-hifas. Imagem de microscópio eletrônico de varredura.

O termo hifa refere-se a todos os filamentos ramificados e não ramificados que têm um ou mais septos e nenhuma constrição no colo da célula-mãe ou nas junções septais. Em pseudo-hifas o primeiro septo está no início da célula mãe assim como o anel de septina, e seus filamentos são altamente ramificados com sincronia do ciclo celular, enquanto as hifas apresentam seu primeiro septo e a sua divisão celular dentro do tubo germinativo também seus filamentos são menos ramificados. Apesar das diferenças aparentes entre hifas e pseudo-hifas, é impressionante que condições ambientais semelhantes induzam ambas as morfologias, com o equilíbrio sendo inclinado para hifas à medida que as condições se tornam mais extremas (temperatura e pH mais altos) (SUDBERY; GOW; BERMAN, 2004).

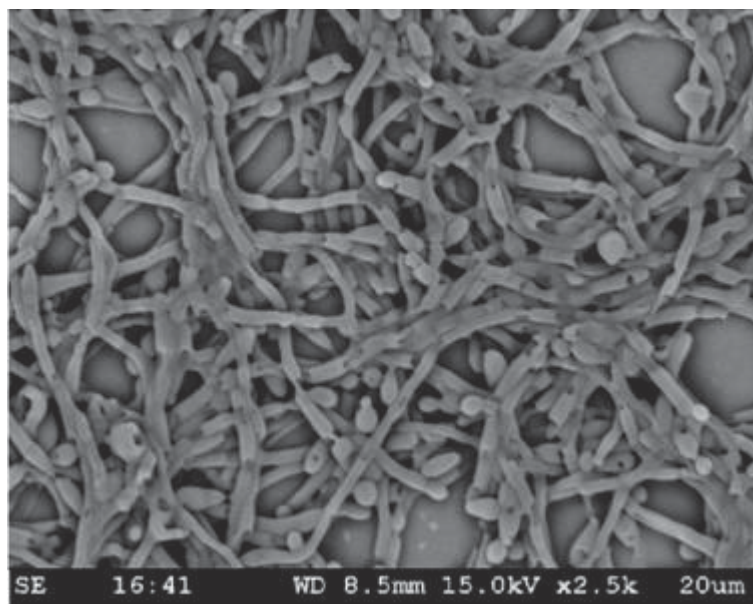
Candida albicans é a espécie mais frequente causadora de candidíases, entretanto outras espécies de *Candida* como *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. auris* também são relevantes do ponto de vista clínico e têm se apresentado em quadros infecciosos em hospedeiros tanto em comunidade quanto em condições hospitalares. *C. albicans* pode ser diferenciada de outros membros deste gênero pela presença de clamidósporos e pseudomicélios. Os clamidósporos são grandes formações nas extremidades das hifas, na maioria das vezes de forma redonda com uma parede espessa. Estruturas semelhantes à clamidoconídios, mas com paredes mais finas, são encontradas em *C. tropicalis*. Os blastoconídios, que são as próprias células de levedura, são estruturas para reprodução assexuada em todos os fungos semelhantes a leveduras. Eles ocorrem durante o brotamento e têm a forma de pequenas células redondas, que se alongam para formar pseudo-hifas. *C. glabrata* é um

organismo haplóide e não é capaz de formar estruturas miceliais (SACHIVKINA; PODOPRIGORA; BOKOV, 2021). Enquanto *C. krusei* produz células de levedura cilíndricas que podem ter até 25 µm de comprimento. Como *C. albicans*, *C. krusei* mostra pleomorfismo, produzindo hifas quando cresce a 37°C e blastoconídios e pseudo-hifas quando incubados em temperaturas mais baixas (GÓMEZ-GAVIRIA; MORA-MONTES, 2020).

As bactérias e leveduras podem exibir dois modos de crescimento, o modo planctônico de vida livre ou o modo sésil aderido a superfícies bióticas ou abióticas, dentro de biofilmes, que são comunidades estruturadas encerradas em uma matriz polimérica autoproduzida (RUMBAUGH; SAUER, 2020). Planctônico refere-se à vida orgânica flutuante ou à deriva encontrada em várias profundidades do oceano ou de água doce. No nível microbiológico, um *habitat* planctônico se caracteriza por água ao redor, saliva na boca, flocos ao redor de partículas do solo, fluidos no lúmen intestinal, soro nos vasos sanguíneos e urina na bexiga. Sésil, por outro lado, significa imediatamente preso a uma superfície, ou aderido. Células sésseis são células que vivem em biofilmes de forma diferente das células planctônicas fisiologicamente, fenotipicamente e metabolicamente, sendo inclusive mais resistentes a fatores externos (MARSHALL, 2006).

Biofilmes, conforme pode ser visto nas figuras 4 e 5, são formados a partir de organismos planctônicos (vida livre), e iniciam-se pela formação de agregados de células aderidos a uma superfície. Em estágios finais de seus desenvolvimentos, células escapam da estrutura do biofilme em um processo conhecido como dispersão para retornar ao modo de crescimento planctônico de uma única célula. Como consequência, as células do biofilme apresentam características e comportamento distintos daqueles de suas contrapartes planctônicas, com as características marcantes, incluindo resistência inata às defesas imunológicas do hospedeiro e sua maior tolerância a estresses.

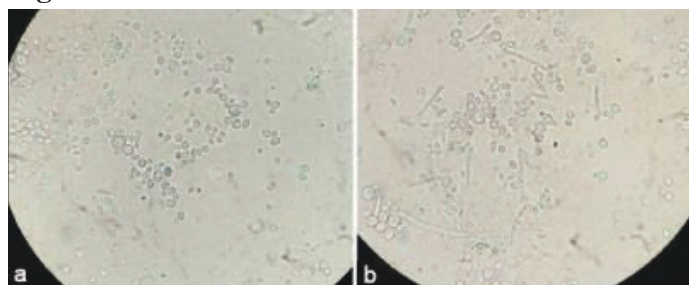
Figura 4- Biofilme de *C. albicans*



Fonte: RAUT *et al*, 2017.

Legenda: *C. albicans* é capaz de formar biofilme em superfícies bióticas e abióticas. Infecções associadas a biofilme de *C. albicans* incluem sapinhos, estomatite dentária, vaginite, endocardite, infecções por queimaduras e infecções de feridas. Biofilmes de *Candida* são intrinsicamente resistentes aos medicamentos antifúngicos existentes. Micrografia eletrônica de varredura

Figura 5- Biofilmes de *C. krusei*



Fonte: SACHIVKINA; PODOPRIGORA; BOKOV, 2021.

Legenda: Assim como *C. albicans*, *C. krusei* são produtores de biofilmes e intrinsicamente resistentes aos antifúngicos. (ampliação $\times 2.500$).

Durante a etapa inicial do desenvolvimento do biofilme, as células se fixam ao substrato com auxílio das proteínas de adesão que são secretadas (RUMBAUGH; SAUER, 2020). As células formam grupos em todo o substrato e inicia-se a produção da matriz extracelular do biofilme, que se constitui em uma rede polimérica que irá

auxiliar na absorção de nutrientes e na proteção contra o sistema imunológico (RAUT *et al.*, 2017). Os aglomerados de células irão amadurecer e a partir disso as células irão se dispersar e formar novos aglomerados (RUMBAUGH; SAUER, 2020). A figura 6 apresenta um esquema representativo das etapas de formação de biofilme.

Figura 6- Esquema representativo de formação de biofilme.



Fonte: SANDAI *et al.*, 2016.

Legenda: A: Aderência Inicial, na primeira etapa de formação de biofilmes, as células aderem-se a uma superfície biótica ou abiótica devido à secreção de proteínas de adesão; a secreção dessas é um fator de resistência apresentado por células de *Candida* spp.; B: Desenvolvimento intermediário, as células iniciam o desenvolvimento intermediário, para atingir a maturidade, os biofilmes passam por três fases de desenvolvimento (precoce, intermediária e madura) envolvendo processos de crescimento complexos e sucessivos marcados por aumento da atividade metabólica celular; C: Maturação e Dispersão, Biofilmes maduros consistem em redes densas de células unidas por uma rede polimérica, matriz extracelular. Os canais de água entre as células facilitam a difusão de nutrientes do meio ambiente para as camadas inferiores da biomassa e permitem que os resíduos sejam eliminados com eficiência

2.1.2 Relações Entre *Candida* spp. e o Hospedeiro

Candida spp. compreende espécies comensais ao organismo humano e presentes em pessoas saudáveis. Durante alguns dias depois do parto, colonizam a mucosa do trato gastrointestinal e vias respiratórias superiores, bem como a boca, faringe e laringe. Normalmente, a espécie prevalente é *C. albicans*, a qual habita diversos sítios do hospedeiro, tais como as dobras e fendas internas do trato gastrointestinal e do trato vaginal (BASMACIYAN *et al.*, 2019). Espécies de *Candida* não-*albicans* como *C. krusei* também reside em inúmeras zonas do corpo, como a cavidade oral e trato urinário (GÓMEZ-GAVIRIA; MORA-MONTES, 2020). No decorrer da gravidez, há um aumento da colonização corporal por espécies de *Candida* spp., relacionado à resposta imune, microbioma, variações positivas no glicogênio e níveis de pH do organismo materno; no entanto, principalmente durante o ciclo de vida normal, outros fatores podem afetar a colonização por *Candida* spp., como higiene e uso de medicamentos tais como antibióticos e imunossupressores (MARTINS *et al.*, 2014).

Em situações normais, *Candida* spp., está presente no organismo humano, como comensal, em forma de levedura, e em diferentes regiões do corpo como estômago, intestino, cavidade oral, região vulvovaginal e trato urinário. Quando ocorrem situações de desequilíbrio no sistema imunológico, essas leveduras podem passar de oportunistas a patógenos e assim estarem associadas a processos infecciosos (BASMACIYAN *et al.*, 2019; ROSSI *et al.*, 2011). Em condições de homeostase e equilíbrio do sistema imunológico, este fungo está presente nos humanos como um organismo comensal sem que isso implique em quaisquer efeitos prejudiciais à sua saúde (BASMACIYAN *et al.*, 2019). Quando fatores predisponentes, fisiológicos, patológicos e mecânicos modificam o relacionamento que ocorre entre o hospedeiro e a microbiota natural, essas leveduras podem causar infecções denominadas candidíase. Dentre estes fatores destacam-se, por exemplo, diminuição de secreção digestiva, fatores dietéticos, deficiência de nutrientes, sistema imunológico em desequilíbrio e/ou estados de doença subjacentes, função hepática prejudicada, uso de fármacos tais como antibióticos e alteração da microbiota (BASMACIYAN *et al.*, 2019; ROSSI *et al.*, 2011; SALVATORI *et al.*, 2016). Aqui decorremos algumas dessas condições propensas.

Pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) representam um grupo de pessoas altamente suscetíveis a infecções por *Candida* spp., como a candidíase orofaríngea, que ocorre com mais frequência em indivíduos cujo sistema imunológico está comprometido pelo uso de drogas imunossupressoras, quimioterapia ou portadores de HIV (SALVATORI *et al.*, 2016). Baixas contagens de CD4 + e altos níveis de HIV são considerados fatores associados à esofagite por *Candida* spp., e a imunossupressão avançada é associada ao desenvolvimento de gravidade da infecção (NISHIMURA *et al.*, 2013).

Perturbações no estado imunológico do hospedeiro permitem que *C. albicans* progrida do comensalismo para a virulência. Além de perturbações no sistema imunológico no hospedeiro, como uso de imunossupressores, quimioterapia e hospedeiros portadores de HIV serem fatores predisponentes que permitem que *Candida* spp. avance do comensalismo para provocar infecções, a antibioticoterapia também é um fator que predispõe um hospedeiro imunocompetente à candidíase. Dado que, verifica-se o papel antagonico de algumas bactérias comensais na proliferação de *Candida* spp. (SALVATORI *et al.*, 2016). Sendo que, há evidências de bactérias que induzem a imunidade, por exemplo, na mucosa intestinal, onde, bactérias fortalecem a

barreira epitelial e previnem a invasão do tecido por *C. albicans* em murinos (OEVER; NETEA, 2014).

Outro fator predisponente identificado na relação entre *Candida* spp. e candidíase, são a ausência das barreiras moduladas pelo sistema imunológico do hospedeiro, como a hipofunção de glândulas salivares. A saliva detém de proteínas ricas em prolinas, estaterinas e mucinas, que promovem a aderência aos tecidos orais, permitindo a inibição do crescimento de *Candida* spp. por exclusão imunológica. Além disso, a saliva possui células do sistema imunológico inato do hospedeiro, também de bactérias capazes de prevenir a proliferação por *Candida* spp.. A deficiência salivar leva a infecções fúngicas orais (LEUNG *et al.*, 2008). A imunoglobulina A (IgA) salivar é um anticorpo abundante produzido pelas glândulas salivares e secretado na saliva e tem papéis multifacetados na imunidade da mucosa, pois inibe a adesão de *C. albicans* por meio da ligação de manoproteínas da parede celular de fungos e reduz a aderência de *C. albicans* às células epiteliais *in vitro* (SALVATORI *et al.*, 2016). Como a IgA salivar, as mucinas também podem se ligar e agregar *C. albicans* para eliminá-la da cavidade oral. As mucinas podem afetar negativamente o crescimento de *C. albicans*, suprimindo a expressão de seus genes de virulência (KAVANAUGH *et al.*, 2014). Algumas doenças orais em hospedeiros imunocompetentes, em que *C. albicans* é um microrganismo etiológico, são a estomatite por dentadura, cárie na primeira infância, doença periodontal e lesões endodônticas (SALVATORI *et al.*, 2016). A mucina Muc5AC, que é expressa no estômago e nos pulmões, pode induzir a regulação negativa de vários traços de virulência em *C. albicans*. Isso inclui a supressão de crescimento filamentosos e a adesão de células para formação de biofilmes (KAVANAUGH *et al.*, 2014).

Um organismo equilibrado precisa de todos os macros e micronutrientes em proporções corretas e, portanto, qualquer dieta desequilibrada afeta o bem-estar do corpo e potencializa o crescimento e a colonização de invasores. Assim, os fatores dietéticos devem ser monitorados de acordo com as necessidades de cada indivíduo (MARTINS *et al.*, 2014). Existem estudos que indicam o ferro como importante na promoção e colonização por microrganismos, incluindo *Candida* spp. (MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

O acúmulo de toxinas no corpo, como resultado de danos ao fígado, associado a mudanças nos mecanismos de desintoxicação, também estimula o supercrescimento de *C. albicans* (MARTINS *et al.*, 2014).

Devido a sua grande adaptabilidade a diferentes nichos corporais do hospedeiro, essas leveduras podem causar perturbações, como a candidíase vulvovaginal, uma infecção frequente principalmente em mulheres e associada à inflamação, coceira intensa e corrimento espesso na vagina; também pode estar associada à candidíase oral, muito comum em bebês recém-nascidos e pessoas com deficiência imunológica. Nessas situações, desequilíbrios ocorridos no microbioma podem ocasionar o crescimento de uma superpopulação de *C. albicans*, na região da língua ou na parte interna das bochechas, causando lesões (BASMACIYAN *et al.*, 2019). A patogenicidade de *Candida* spp. é atribuída aos seus fatores associados à virulência tais como a capacidade de evitar as defesas do hospedeiro (BROWN *et al.*, 2012), adesão (ROSSI *et al.*, 2011), produção de enzimas hidrolíticas que danificam os tecidos como proteases, fosfolipases e hemolisina (SARDI *et al.*, 2013) e formação de biofilmes (WALL *et al.*, 2019).

Indivíduos saudáveis podem apresentar *Candida* spp., entretanto mais de 90% das infecções invasivas são causadas por *C. albicans* (SARDI *et al.* 2013). O gênero é composto por um grupo heterogêneo e há algum tempo têm sido relatadas infecções por outras espécies de *Candida* como *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata* (ROSSI *et al.*, 2011).

As infecções sistêmicas causadas por espécies de *Candida* representam uma ameaça significativa à saúde pública. Infecções clínicas e hospitalares causadas por *Candida* spp. estão associadas ao uso de dispositivos invasivos, como cateteres, articulações artificiais e válvulas. A toxicidade associada às terapias antifúngicas atuais e o surgimento de cepas resistentes representam grandes desafios terapêuticos (KUNYEIT *et al.*, 2019; MARTINS *et al.*, 2014).

2.1.2.1 Mecanismos de escape do sistema imunológico

A imunidade protetora contra fungos patogênicos inclui respostas imunes inata e adaptativa que envolvem várias moléculas e células nas quais os fagócitos se destacam. As células responsáveis pela resposta imune em fungos patogênicos incluem componentes da resposta inata e podem ser neutrófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas, que podem eliminar *Candida* spp. durante um processo infeccioso. As

células fagocíticas têm papel fundamental na interligação das respostas inatas e adaptativas a uma variedade de fungos patogênicos. Algumas delas, como as células dendríticas, podem capturar e processar antígenos e outras também podem expressar moléculas coestimulatórias de linfócitos, migrar para órgãos linfóides e secretar citocinas para iniciar a resposta adaptativa e recrutar outras células efetoras da imunidade inata (OLIVER *et al.*, 2019).

A parede celular de *Candida spp.* tem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS) incluindo mananas, manoproteínas, quitina e β -glucanos. O PAMPS pode ser reconhecido por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), incluindo receptores de quitina, receptores toll-like (TLR-4 / TLR-2) e receptores de lectina do tipo C, como Dectina-1 e receptores de manose. Esses PRRs estão ligados na superfície celular de fagócitos, como monócitos, neutrófilos, células dendríticas e macrófagos (OLIVER *et al.*, 2019).

A patogenicidade de *Candida spp.* é facilitado por vários fatores de virulência, como adesão nas superfícies do hospedeiro ou de dispositivos médicos, secreção de enzima hidrolítica que danifica os tecidos do hospedeiro (por exemplo, proteases, fosfolipases e hemolisinas), polimorfismo e formação de biofilmes (SHARMA; CHUMBER; KAUR, 2017).

2.2 *Candida albicans*

Candida albicans é um organismo inofensivo da microbiota humana, no entanto, em pacientes imunocomprometidos e ou clinicamente comprometidos pode causar uma variedade de infecções oportunistas, que vão desde infecções superficiais dérmicas e mucosas até candidíase sistêmica com risco de morte (HAGEE *et al.*, 2020). *C. albicans* é um dos principais agentes etiológicos da candidíase, infecção fúngica invasiva, além disso, é uma das infecções mais frequentes em hospitais de todo o mundo (WALL *et al.*, 2019). Também é um fungo polimórfico que exhibe formas de levedura, hifas e pseudo-hifas; a capacidade de transição entre estas formas é considerada uma característica associada à virulência deste fungo. Além disso, *C. albicans* exhibe flexibilidade metabólica relacionada a condições nutricionais, de temperatura e pH, o que contribui amplamente para sua adaptabilidade e virulência (BASMACIYAN *et al.*, 2019).

Para iniciar o processo de infecção ao hospedeiro, *C. albicans* manifesta fatores que estão associados à sua virulência tais como: adesividade, alterações fenotípicas e

morfológicas, dentre outros, e que podem resultar no estabelecimento do processo infeccioso (BASMACIYAN *et al.*, 2019). A transição de formas ocorre na diferenciação da forma unicelular leveduriforme para a forma multicelular filamentosa e, essa alteração representa uma condição adaptativa do fungo para sobreviver em ambientes com condições biológicas diversificadas. Essas condições são importantes no processo de invasão do fungo, tornando-o mais virulento (BROWN *et al.*, 2012; MOHAJERI *et al.*, 2018; ROSSI *et al.*, 2011).

A candidíase pode manifestar-se em locais diferentes do corpo, podem colonizar a cavidade oral, trato gastrointestinal, respiratório e urinário, além da circulação sanguínea, podem manifestar-se em órgãos como rins, fígado, baço e cérebro. A relação de comensalismo é dependente da integridade do tecido do hospedeiro, da microbiota normal assim como do sistema imune. Neste caso, a candidíase pode ser localizada, determinando sintomatologia restrita a essa área ou sistêmica (BASMACIYAN *et al.*, 2019).

Candida albicans é uma levedura capaz de interagir com o trato gastrointestinal do hospedeiro, como um organismo comensal, patógeno ou colonizador. O ambiente do trato digestivo, como a mucosa intestinal, a genética do hospedeiro e o estado de saúde, estão diretamente relacionados com a transição do comensalismo para a patogenicidade de *C. albicans*, que também incluem disbiose na microbiota. Por conta disso, *C. albicans* é considerado um patógeno oportunista, ou seja, interage dinamicamente com seu hospedeiro, colonizando mucosas como um comensal, e devido a modificações no ambiente do hospedeiro torna-se capaz de causar infecções (BASMACIYAN *et al.*, 2019).

Quando *C. albicans* entra na corrente sanguínea, sobrevive e escapa das células do sistema imunológico, causa a chamada candidíase invasiva ou candidíase sistêmica. A candidíase invasiva também pode ser de origem endógena com o trato gastrointestinal (GI) sendo a principal portal de entrada na corrente sanguínea (BASMACIYAN *et al.*, 2019). O ambiente intestinal é um nicho específico caracterizado por uma série de fatores ambientais, incluindo pH, temperatura, hipóxia e a presença de soro ou fontes de carbono. Há também uma grande variedade de metabólitos microbianos e nutrientes (MOHAJERI *et al.*, 2018).

A disbiose da microbiota bacteriana ocasiona alterações na função da barreira intestinal além de diminuição na função de neutrófilos e ocasionalmente agrava os

riscos para a candidíase sistêmica. A passagem de *C. albicans* pela barreira da mucosa intestinal é um processo complexo que depende de características do hospedeiro extrínsecas e intrínsecas, associando a características fenotípicas que promovem o comensalismo ou patogenicidade de *C. albicans* (BASMACIYAN *et al.*, 2019).

As interações microbianas entre fungos e bactérias, podem criar relações de sinergismos, como por exemplo, *C. albicans* e *Streptococcus* spp. (FERNANDES *et al.*, 2016) relações de antagonismo, como a relação entre *C. albicans* e algumas espécies de *Lactobacillus* (MATSUDA *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2017) A produção de metabólitos bacterianos limita a proliferação e virulência dos fungos na microbiota do trato intestinal. Por exemplo, *Lactobacillus* spp. limita o crescimento e a virulência de *C. albicans*, afetando a formação do tubo germinativo no trato GI (TGI) por meio da produção de H₂O₂, ácidos orgânicos e ácidos graxos de cadeia curta (WANG *et al.*, 2017). Os metabólitos bacterianos inibem o crescimento de hifas de *C. albicans* ao reprimir a transição de leveduras para hifas, consequentemente inibem a invasão de enterócitos humanos bem como a indutibilidade de transcritos específicos de hifas (BASMACIYAN *et al.*, 2019).

Fatores estão relacionados à colonização por *C. albicans* no TGI, incluindo terapias imunossupressoras e antimicrobianas. Em estudo realizado por Fan e *et al.* (2015), a terapia direcionada a bactérias anaeróbias, Bacteroidetes e Firmicutes, favoreceu a colonização por *C. albicans* no intestino de camundongos, isso foi observado devido à capacidade de *Bacteroides tetraiotamicron* de inibir a colonização por *C. albicans* no TGI correspondente à ativação do Fator de Indução de Hipóxia (HIF)-1 α . Este fator de transcrição é um regulador essencial de defesa inata de mamíferos, que, uma vez ativada, induz a produção da catelicidina-AMPs LL37, um efector imune crítico para limitar a colonização de *C. albicans* (FAN *et al.*, 2015).

A supercolonização por *C. albicans* no TGI pode causar muitas doenças metabólicas, incluindo distúrbios gastrointestinais, úlcera e doença inibitória intestinal, além disso, o crescimento excessivo de *C. albicans* nas superfícies da mucosa do TGI contribui para a candidíase disseminada, especialmente em hospedeiros enfraquecidos por terapias antimicrobianas, imunossupressoras e quimioterapias. Distúrbios metabólicos causados por *C. albicans*, podem estar associados a uma gama de fatores que abrangem a intercomunicação entre *C. albicans* e bactérias no intestino, a formação de biofilmes mistos e seu papel na homeostase intestinal, influência da super ou

subcolonização de *C. albicans* no metabolismo do hospedeiro e na resposta imune local ou sistêmica e características biológicas de *C. albicans* (BASMACIYAN *et al.*, 2019).

2.2.1 Interação Patógeno-Hospedeiro

Candida albicans expressa inúmeras adesinas capazes de aderir às células epiteliais como Als3p, Ssa1p, Hwp1p, Hwp2p, Int1p, Sapp. Após o primeiro contato, a maioria das células de *C. albicans* aderentes mudam para a forma de hifas, devido ao contato físico com a superfície epitelial. Em sua forma filamentosa, *C. albicans*, aumenta a expressão de adesinas e favorece a expressão de invasinas (WIESNER *et al.*, 2002).

De fato, as formas de levedura de *C. albicans* apresentam menor aderência a enterócitos diferenciados *in vitro* em comparação com células epiteliais orais, sugerindo que as células orais podem expressar moléculas específicas que aumentam a adesão de *C. albicans* ou a camada que reveste os enterócitos podem exibir características únicas que limitam a capacidade do fungo em aderir (BASMACIYAN *et al.*, 2019).

Proteínas específicas estão relacionadas ao mecanismo de endocitose às células epiteliais por *C. albicans*, como Als3p e Ssa1p. Als3p é um fator de virulência chave para *C. albicans*, devido a sua função como invasina às células epiteliais humanas orais e endoteliais. A penetração ativa explora a transição de levedura para hifas de *C. albicans*, que germinam e produzem hifas que se alongam e penetram progressivamente nas células epiteliais (BASMACIYAN *et al.*, 2019). Esse mecanismo de invasão permite à *C. albicans* obter entrada para enterócitos com junções intercelulares intactas (DALLE *et al.*, 2010).

Também, há rota paracelular envolvendo a clivagem proteolítica da proteína E-caderina da junção intercelular aderente (AJ) em ambas as células epiteliais orais e enterócitos é sugerida (DALLE *et al.*, 2010). As junções intercelulares aderentes estão localizadas imediatamente abaixo das proteínas de junção rígidas (TJ) e são compostas principalmente de proteínas da família da caderina incluindo a caderina-E. Os AJs, juntamente com os TJs, formam um cinturão de junção que garante a coesão arquitetônica do epitélio intestinal (ROLLENHAGEN *et al.*, 2009).

Após a invasão de *C. albicans* às células epiteliais ocorre os danos à mucosa intestinal, oral e vaginal. Os estágios tardios da infecção de células intestinais são caracterizados por perda de integridade da barreira que desencadeia vias de sinalização

da célula hospedeira e promovem inflamação, ativação de inflamassomas e eventos apoptóticos, levando à necrose dos enterócitos (DALLE *et al.*, 2010). Além disso, o alongamento mecânico das hifas pode levar a danos às células epiteliais infectadas (BÖHRINGER *et al.*, 2016).

Mudanças morfológicas ocorrem em uma variedade de patógenos fúngicos humanos após a interação com o hospedeiro. Em resposta a diferentes sinais do hospedeiro, *C. albicans* muda da forma de levedura para sua forma filamentosa, forma celular característica de fungos filamentosos e que desempenha um importante papel em resposta aos sinais do hospedeiro. O crescimento de hifas está associado a forças mecânicas durante a interação de *C. albicans* com tais células hospedeiras. As forças mecânicas parecem ser suficientes para penetrar nas células epiteliais mesmo na ausência de fatores secretados, como a toxina candidalisina, codificada por *ECE1* e, portanto, secretada apenas por hifas (ARKOWITZ; BASSILANA, 2019).

A defesa do hospedeiro também inclui a barreira física epitelial e as células imunes do hospedeiro, como macrófagos. A capacidade de sofrer morfogênese levedura-hifas e a composição da parede celular também são determinantes na interação macrófago-*C. albicans*. As células de *C. albicans* induzem a morte celular de macrófagos por meio de piroptose, uma morte celular programada dependente da caspase-1 (ARKOWITZ; BASSILANA, 2019).

A maioria das manifestações de candidíase está associada à formação de biofilme em superfícies bióticas e ou abióticas. 80% das infecções por *C. albicans*, nos Estados Unidos, estão associadas a uma etiologia de biofilme. A formação de biofilmes por *C. albicans* acarreta notável repercussão clínica, contribuindo para maiores taxas de mortalidade, o que representa uma das principais características de virulência associadas à patogênese da candidíase (TSUI; KONG; JABRA-RIZK, 2016; WALL *et al.*, 2019).

Células em biofilme exibem proteção da fagocitose por neutrófilos, macrófagos e monócitos, que normalmente desempenham papéis importantes na resposta imune à candidíase disseminada (WALL *et al.*, 2019). Em comparação com organismos planctônicos, os biofilmes de *C. albicans* inibem a liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) e prejudicam a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos neutrófilos (KERNIEN; JOHNSON; NETT, 2017). A formação de biofilme de *C. albicans* também amortece a migração de macrófagos, que é provavelmente independente da matriz e relacionada à sua estrutura física (ALONSO *et*

al., 2017). Os monócitos não conseguem fagocitar *C. albicans* em estado de biofilme, levando também a um perfil de citocinas alterado, particularmente a regulação negativa do TNF- α , citocina que facilita a ativação dos fagócitos e que desempenha um papel fundamental na proteção contra a candidíase (KERNIEN; JOHNSON; NETT, 2017). Os biofilmes fornecem um refúgio seguro para as células fúngicas e podem atuar como reservatórios para fontes persistentes de infecções. Do ponto de vista clínico, as duas principais consequências da formação de biofilme com impacto negativo no manejo de pacientes com essas infecções são o aumento da resistência das células dentro dos biofilmes contra a terapia antifúngica e sua proteção contra as defesas do hospedeiro (WALL *et al.*, 2019).

2.2.2 Mecanismos de Resistência

Durante a infecção, as células de *C. albicans* expressam propriedades de sobrevivência em ambientes extremos. Estas células são capazes de se desenvolverem em nichos do hospedeiro com diferentes disponibilidades de nutrientes, isso implica em sua virulência, devido ao fato de exibirem diferentes graus de resistência ao estresse, o que acarreta em sua relação às defesas imunológicas inatas e também à sua suscetibilidade à terapia antifúngica (BROWN *et al.*, 2014). A glicose é a principal fonte de energia para os fungos e é utilizada pelas enzimas glicolíticas. A glicólise é um mecanismo essencial para a morfogênese e virulência. No entanto, para sobreviver em condições estressantes, às células fúngicas tendem a utilizar fontes de carbono não fermentáveis. O consumo dessas fontes é tentado por meio de reações bioquímicas catabólicas e anabólicas altamente conservadas que liberam energia e moléculas de *quorum sensing* difusíveis (QSMs), o consumo dessas fontes alternativas mostra-se um fator de virulência adaptativa em *C. albicans* (BROWN *et al.*, 2014; SANDAI *et al.*, 2016). Além da adaptação a fonte de carbono observada em células de *C. albicans*, outros fatores estão associados à adaptação a nichos extremos do hospedeiro, como a formação de hifas e biofilmes, aqui descreveremos alguns fatores que estão relacionados à virulência e são expressos durante a formação de hifas e biofilmes de *C. albicans*.

A produção de hifas por *C. albicans* é um fator associado à virulência. Na candidíase oral, por exemplo, a filamentação de *C. albicans* pode ser essencial para a disseminação interepitelial. A formação de hifas por *C. albicans* pode desencadear invasão ativa (penetração física) ou passiva (endocitose induzida) e disseminação.

Também, hifas de *C. albicans* possuem a capacidade de escapar de células fagocíticas do sistema imunológico. Além do modelo de perfuração mecânica de macrófagos por hifas de *C. albicans*, há piroptose por hifas como importante mecanismo de mediação da morte celular de macrófagos após infecção por *C. albicans* (OLIVER *et al.*, 2019).

Uma toxina peptídica secretada por hifas de *C. albicans* durante a invasão às células do hospedeiro, conhecida como Candidalisina (CL), consiste em um peptídeo de 31 aminoácidos gerado a partir da expressão da proteína Ece 1p codificada pelo gene *ECE1* que exibe uma estrutura em hélice α que permite intercalar e permeabilizar as membranas da célula hospedeira e subsequente lise celular quando secretado em quantidade suficiente (BASMACIYAN *et al.*, 2019; RICHARDSON *et al.*, 2018). CL exibe duas funções, imune estimuladora e papel de lise contra células epiteliais vaginais, assim como é observado em células epiteliais orais (RICHARDSON *et al.*, 2018). CL possui atividades líticas e imunoestimulantes (incluindo sinalização MAPK) nas células epiteliais orais além de ser necessária para imunopatogênese vaginal *in vivo* (BASMACIYAN *et al.*, 2019; RICHARDSON *et al.*, 2018). Basmaciyan e *et al.*, (2019) identificaram que CL é requerida para a expressão de citocinas pró-inflamatórias nas células epiteliais da vagina de murinos e responsável por induzir dano celular vaginal e respostas pró-inflamatórias durante a infecção por *C. albicans* *in vitro* e *in vivo*. Em células epiteliais orais, CL desencadeia uma via de sinalização de resposta ao perigo e ativa a imunidade epitelial (BASMACIYAN *et al.*, 2019).

Biofilmes são comunidades de células estruturadas envoltas em uma matriz polimérica autoproduzida. A capacidade de formar biofilmes é uma característica presente em vários microrganismos, incluindo bactérias e leveduras (RUMBAUGH; SAUER, 2020). Biofilmes fúngicos têm sido implicados na patogênese de um grande número de doenças infecciosas disseminadas invasivas devido ao fato de células em estado de biofilme se diferenciarem daquelas em estado planctônico pela capacidade de sobreviverem aos antimicrobianos existentes, incluindo azóis e equinocandinas (SANDAI *et al.*, 2016). Além disso, células em biofilme escapam com mais facilidade do sistema imunológico e a capacidade de sobrevivência em ambientes extremos aumenta (RUMBAUGH; SAUER, 2020). *Candida* spp., assim como outras leveduras, são capazes de produzirem biofilmes que são resistentes aos agentes antimicrobianos de amplo especto. Biofilmes de *C. albicans* compreende leveduras fortemente aderidas à superfície, na camada inferior, enquanto a camada superior é geralmente composta de

hifas. No entanto, a arquitetura final dos biofilmes tem mostrado variar de acordo com o substrato utilizado e as condições de crescimento (SANDAI *et al.*, 2016).

Células de todos os reinos produzem vesículas extracelulares (EVs). Estas são responsáveis pela comunicação célula-célula e também pelo transporte extracelular. Os fungos podem apresentar EVs, as quais possuem RNA e proteínas e são protegidas por uma bicamada lipídica. Para muitas bactérias patogênicas, toxinas liberadas pelas EVs promovem dano ou lise na célula do hospedeiro. O propósito da secreção de EVs é devido ao ambiente e a biologia de cada organismo (BROWN *et al.*, 2015).

Assim como muitos microrganismos, *C. albicans* produz EVs únicas quando em biofilme. Essas EVs referem-se a uma vesícula rodeada por uma bicamada lipídica. (ZARNOWSKI *et al.*, 2018). Zarnowski e *et al.* (2018) identificaram que EVs produzidas por biofilmes são distintas das produzidas por células planctônicas, além disso, EVs produzidas por biofilmes têm o maior pico de formação após 48 horas de formação de biofilme e 45% das proteínas na matriz do biofilme são transportadas por estas EVs, e também manano e glucano, dois dos principais componentes da matriz extracelular (BROWN *et al.*, 2015) ambos estão relacionados à resistência a fármacos em biofilme (BROWN *et al.*, 2015; ZARNOWSKI *et al.*, 2018).

EVs têm um papel direto na biogênese da matriz e carregam cargas específicas para conferir resistência aos fármacos (ZARNOWSKI *et al.*, 2018). EVs de biofilme podem depositar cargas que contribuem diretamente para a estrutura da matriz e também podem fornecer atividades catalíticas que se envolvem na síntese de polissacarídeos da matriz (BROWN *et al.*, 2015; ZARNOWSKI *et al.*, 2018). Cargas únicas de proteínas, lipídeos e carboidratos fornecem componentes da matriz extracelular de biofilme (ZARNOWSKI *et al.*, 2018).

Quorum-sensing (QS) são moléculas de sinalização capazes de suprimir ou ativar a expressão gênica (SEBAA, BOUCHERIT-OTAMI, COURTOIS, 2019). Os mecanismos de detecção de *quorum* permitem que os microrganismos se adaptem a diferentes funções biológicas do ambiente, de acordo com sua densidade populacional (CHO *et al.*, 2010). QS foram descritos em bactérias e leveduras, como a *C. albicans* e estão relacionados à indução de adaptações fenotípicas que incluem alterações morfológicas, secreção de fatores de virulência e formação de biofilme (CHO *et al.*, 2010; DEVEAU; HOGAN, 2011). Farnesol e tirosol as são duas moléculas QS

secretadas por *C. albicans* e estão entre as mais estudadas até a atualidade (SEBAA, BOUCHERIT-OTAMI, COURTOIS, 2019).

Tirosol [2- (4-hydroxyphenyl) ethanol], derivado da tirosina ($C_9H_{11}NO_3$), estimula a formação de tubos germinativos (CHEN *et al.*, 2004). Farnesol ($C_{15}H_{26}O$), metabólito da via de síntese de mevalonato/esterol em *C. albicans*, é uma molécula extracelular com função QSM, exibe capacidade em reduzir a formação do tubo germinativo (HORNBY *et al.*, 2001) e bloquear a transição levedura-hifa de *C. albicans* quando a cultura alcança altas densidades (SEBAA, BOUCHERIT-OTAMI, COURTOIS, 2019). O controle da formação do tubo germinativo por farnesol e tirosol reflete uma estrutura complexa de regulação metabólica em resposta às pistas ambientais que estimulam a síntese destas moléculas reguladoras (CHEN *et al.*, 2004).

Sebaa, Boucherit-Otami, Courtois (2019) compararam os efeitos de ambos os QS (farnesol e tirosol) individualmente no biofilme de *C. albicans* e notavelmente identificaram uma redução significativa na produção de biofilme. Possivelmente devido a uma perturbação nos mecanismos de QSM ou de uma limitação da adesão da levedura ao suporte (SEBAA, BOUCHERIT-OTAMI, COURTOIS, 2019).

Candida albicans tem uma interação única com macrófagos em que a fagocitose induz uma mudança da forma de levedura para a forma filamentosa, permitindo que ela escape pela ruptura da célula imune (VYLKOVA; LORENZ, 2014). Células de *C. albicans* neutralizam o fagossoma macrófago e o pH neutro é um indutor chave da germinação em células fagocitadas. Isso ocorre devido ao fator de transcrição STP2, que regula a expressão de múltiplas permeases de aminoácidos (VYLKOVA; LORENZ, 2014). *C. albicans* utiliza aminoácidos para promover a neutralização do pH fagossomal, morfogênese das hifas e escape de macrófagos (VYLKOVA; LORENZ, 2014)

2.2.3 Resistência a Agentes Antifúngicos

Existem três classes principais de antifúngicos usados para tratar a candidíase: azóis, polienos e equinocandinas (WALL *et al.*, 2019). Os azóis pertencem à classe dos inibidores da biossíntese de esteróis e têm como alvo específico uma lanosterol 14 α -desmetilase em fungos. Esta classe de agente antifúngico contém um amplo espectro de derivados. Os principais azóis utilizados para tratamento em doenças humanas incluem fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol. Fluconazol, por sua

versatilidade de formulações e baixo preço, torna-se uma opção importante para o tratamento de doenças por *C. albicans* (SANGLARD, 2017). Outras classes de antifúngicos incluem polienos e equinocandinas. Polienos se ligam ao ergosterol na membrana celular do fungo e atuam como uma esponja do esterol ao privar rapidamente o ergosterol da membrana, isso leva à perda da integridade da membrana e, em última instância, morte celular. Equinocandinas pertencem a uma classe de compostos semissintéticos que têm como alvo a biogênese da parede celular e, mais especificamente, síntese de β -1,3 glucano em *C. albicans* e outros patógenos fúngicos (SANGLARD, 2017).

Três mecanismos básicos de resistência aos antifúngicos são mais conhecidos, (1) diminuição da concentração efetiva do fármaco com mecanismos específicos, incluindo aumento do efluxo do fármaco, aumento do número de alvos, sequestro de fármacos de origens extracelulares e intracelulares e conversão pró-fármaco; (2) alterações no alvo do fármaco (3) desvios metabólicos (SANGLARD, 2017).

A avaliação da susceptibilidade a antifúngicos é normatizada por comitês internacionais tais como *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI); *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (SANGLARD, 2017).

Células de *C. albicans* dentro de um biofilme podem apresentar altos níveis de resistência a diversos antifúngicos; com biofilmes formados em condições de fluxo exibem resistência ainda maior (PIERCE *et al.*, 2013). Os biofilmes são intrinsecamente resistentes ao fluconazol e a outros derivados azólicos. (WALL *et al.*, 2019). Entre outros contribuintes para a resistência estão o aumento da densidade celular, bombas de efluxo de superexpressão ligadas à resistência aos medicamentos, mudanças na composição de esterol da membrana celular e presença de uma subpopulação de células persistentes que podem tolerar altas concentrações de antifúngicos (PIERCE *et al.*, 2017). A matriz extracelular do biofilme é o principal contribuinte para a resistência, sequestrando moléculas antifúngicas e evitando sua penetração nas profundezas do biofilme. O transporte de macromoléculas à matriz extracelular de *C. albicans* foram identificados por Zarnowski e *et al.* (2018) por meio de ESCRT, mutantes defeituosos em ortólogos de complexos de classificação endossômica necessários para o transporte (JUAN; FÜRTHAUER, 2018).

Muitos isolados clínicos de *C. albicans* superexpressam *ERG11*, o gene que codifica o alvo dos azólicos. Em muitos casos, o nível de superexpressão é mínimo ou

então observado em combinação com outras mutações de resistência, tornando difícil avaliar o impacto direto de tal superexpressão no fenótipo resistente. Estudos têm mostrado que essa superexpressão frequentemente envolve Upc2p, um fator de transcrição do agrupamento de zinco que é induzido após a depleção de ergosterol (BERKOW; LOCKHART, 2017). Upc2p, regulam a expressão de genes envolvidos na síntese de ergosterol. Essa proteína é codificada pelo gene *UPC2*, e está relacionado à resistência aos antifúngicos cetoconazol e fluconazol em *C. albicans* (MACPHERSON *et al.*, 2005)

2.3 ESPÉCIES NÃO-ALBICANS DE *Candida* spp. (NAC)

Candida albicans é o agente etiológico mais frequente da candidíase, entretanto NACestão associadas e são relevantes no cenário clínico devido ao fato de causarem cerca de 35% a 65% dos casos. Dentre estas espécies destacam-se *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *C. glabrata* (GÓMEZ-GAVIRIA; MORA-MONTES, 2019).

As infecções por NAC têm surgido como importante fator de risco em pacientes hospitalizados e imunocomprometidos. Além disso, complicações associadas a antifúngicos ocorrem com mais frequência com essas espécies quando em comparação a *C. albicans*. Dentre estas espécies, destaca-se *C. krusei*, associada a infecções fúngicas com taxas de mortalidade consideradas elevadas, em torno de 40 a 58% e sensibilidade diminuída às terapias antifúngicas convencionais (GÓMEZ-GAVIRIA; KUNYEIT *et al.*, 2019; MORA-MONTES, 2019).

O aumento na prevalência de NAC., como *C. glabrata* e *C. krusei* tem sido reconhecido em hospitais (KAUR *et al.*, 2020). *C. krusei* (figura 7), afeta, principalmente, pacientes pediátricos neonatos do sexo masculino, porém, adultos também são afetados (KAUR *et al.*, 2020). Devido a isso, *C. krusei* tem sido motivo de grande preocupação em função do seu surgimento em ambientes hospitalares e clínicos (HAUTALA *et al.*, 2007; KAUR *et al.*, 2020).

Assim como *C. albicans*, *C. krusei* é capaz de secretar enzimas hidrolíticas (RICETO *et al.*, 2015) e utiliza exclusivamente glicose como fonte de carbono (GÓMEZ-GAVIRIA; MORA-MONTES, 2020). Além disso, *C. krusei* pertence aos membros do gênero capazes de formar hifas verdadeiras, assim como *C. albicans* (GÓMEZ-GAVIRIA; MORA-MONTES, 2020). Todos esses fatores estão diretamente

relacionados à capacidade de *C. krusei* em poder degradar macromoléculas do hospedeiro, contribuindo para a aquisição de nutrientes, e, conseqüentemente, podendo estar associada à mortalidade em hospedeiros imunossuprimidos (GÓMEZ-GAVIRIA; MORA-MONTES, 2020; RICETO *et al.*, 2015).

Candida krusei é capaz de produzir aspartil proteinases, fosfolipases, hemolisinas e desenvolver biofilmes e assim sendo, pode estabelecer infecção persistente (ORTEGA-RIVEROS *et al.*, 2017). Esta infecção persistente depende do estado imunológico do hospedeiro. Em hospedeiros imunocomprometidos, esta infecção persistente pode ser letal, enquanto que em hospedeiros imunocompetentes essa espécie não é considerada letal. *C. krusei* é resistente ao fluconazol, independente de estar na forma de biofilme ou em estado planctônico (SALARI; SEDDIGHI; ALMANI, 2018).

Alguns fatores de risco são observados em casos de candidemia por *C. krusei* tais como doença gastrointestinal, uso prévio de antibióticos, especialmente os carbapenêmicos. *C. krusei* pode colonizar pacientes imunocomprometidos, e algumas evidências apontam para a transmissão nosocomial entre pacientes (HAUTALA *et al.*, 2007; KAUR *et al.*, 2020; RICETO *et al.*, 2015)

Candida krusei está presente no trato urinário, na cavidade oral, trato gastrointestinal, e tem a capacidade de aderir-se a células epiteliais e endoteliais (GÓMEZ-GAVIRIA; MORA-MONTES, 2020; KAUFFMAN, 2014).

Candidúria pode ser definido pela presença de *Candida* spp. no trato urinário. É assintomática e não requer sistematicamente terapia antifúngica. No entanto, pode desencadear o desenvolvimento de candidíase sistêmica em pacientes predisponentes (KAUFFMAN, 2014; RICARDO *et al.*, 2020). *C. krusei* pode causar morte em pacientes com candidemia sistêmica, e é mais comum em pacientes neutropênicos com malignidade hematológica (SCHUSTER *et al.*, 2013).

Fluconazol é a primeira escolha para tratamentos antifúngicos, como a candidúria; isso porque é excretado inalterado na urina pelos rins; além disso, atinge altas concentrações na urina. Assim como outros azóis, como o voriconazol e o posaconazol (KAUFFMAN, 2014). Entretanto, *C. krusei* pode apresentar resistência a voriconazol (RICARDO *et al.*, 2020) e é resistente ao fluconazol (BERKOW; LOCKHART, 2017; GONG *et al.*, 2018; KHALIFA *et al.*, 2021; SCHUSTER *et al.*, 2013). Devido a isso, *C. krusei* tem se tornado umas das NAC de principal importância médica e preocupação na rede de saúde. Mecanismos de resistência de *C. krusei* e sua

genotipagem são cruciais para orientar a terapia específica e para explorar a fonte potencial de infecção (KHALIFA *et al.*, 2021).

Em estudo realizado por Gong e *et al.* (2018) observou-se que de oito agentes antifúngicos testados contra 48 isolados de tipo selvagem de *C. krusei*, todos foram sensíveis ao voriconazol, itraconazol, posaconazol, anidulafungina, micafungina, 5-flucitosina e anfotericina B. Apenas dois dos 48 isolados (4,2%) foram interpretados como intermediários à caspofungina, enquanto o restante 95,8% (46/48) dos isolados permaneceram sensíveis à caspofungina. Esses mesmos autores notaram que a diversidade genética observada em *C. krusei*, apresenta uma capacidade adaptativa para seleção e susceptibilidade aos antifúngicos (GONG *et al.*, 2018).

A resistência a antifúngicos da classe dos azóis observada em *C. krusei* está associada, em sua maioria, a presença de proteínas de bomba de efluxo Abc1p e Abc2p, codificadas pelos genes ABC1 e ABC2 (KHALIFA *et al.*, 2021), e a superexpressão do gene ERG11 que codifica a proteína Egr11p (BERKOW; LOCKHART, 2017; KAUFFMAN, 2014). Essa última tem sido tema de estudos que abordam a resistência, encontrada em *C. krusei*, aos antifúngicos azólicos (BERKOW; LOCKHART, 2017; KAUFFMAN, 2014; KHALIFA *et al.*, 2021; RICARDO *et al.*, 2020). A superexpressão do gene ABC1 é um dos principais mecanismos responsáveis pela resistência aos azóis (KHALIFA *et al.*, 2021).

Os azóis atuam inibindo a enzima lanosterol desmetilase do citocromo P450 (14 α -desmetilase), codificada por *ERG11*, na via de biossíntese do ergosterol. Mais especificamente, o átomo de nitrogênio livre do anel azol se liga a um átomo de ferro dentro do grupo da enzima. Isso impede a ativação do oxigênio e, por sua vez, a desmetilação do lanosterol, que inibe o processo de biossíntese do ergosterol. Como o ergosterol é um componente essencial das membranas celulares dos fungos, essa inibição é tóxica; os esteróis metilados acumulam-se na membrana celular do fungo e o crescimento celular é interrompido (BERKOW; LOCKHART, 2017). Tavakolli e *et al.* (2010) identificaram a produção aumentada de *ERG11* em isolados de *C. krusei*. Berkow e Lockhart (2017) observaram que o aumento da produção da proteína Egr11p está relacionada com a superexpressão do gene *EGR11*, esses mesmos autores identificaram esta superexpressão do gene *EGR11* como um dos principais mecanismos de resistência encontrados em *C. krusei* (BERKOW; LOCKHART, 2017; TAVAKOLLI *et al.*, 2010).

Figura 7- *Candida krusei*



Fonte: ORTEGA-RIVEROS *et al.*, 2017.

Legenda: Fotografia de microscopia óptica. A. Hifas de *C. krusei* em caldo Yeast Peptone Dextrose (YPD). Assim como *C. albicans*, *C. krusei* possui a capacidade de formar hifas verdadeiras, sendo isso uma capacidade virulenta da levedura. *C. krusei* desenvolve hifas quando em ambientes extremos que exigem alta adaptabilidade de sobrevivência. B. Colônia de *C. krusei* em ágar YPD. Assim como outros gêneros de leveduras, *Candida* spp. apresenta colônias arredondadas e esbranquiçadas, também suas colônias são gelatinosas e com aspecto cremoso e úmido.

A adesão celular e tecidual fazem parte do estágio inicial da interação *Candida*-hospedeiro e leva ao estabelecimento do comensalismo e da patogenicidade. Adesão é fundamental para estabelecer a colonização e invasão tecidual do epitélio. Em células epiteliais bucais humanas, *C. krusei* se adere, mas não de modo tão eficiente quanto *C. albicans* e *C. tropicalis*. Semelhante às células epiteliais, as células endoteliais também se constituem em uma superfície na qual *C. krusei* pode aderir, mas não tão eficientemente quanto *C. albicans* (GÓMEZ-GAVIRIA; MORA-MONTES, 2020).

2.4 MICROBIOMA

As comunidades microbianas que habitam o corpo humano são complexas e altamente dependentes das condições ambientais do hospedeiro. Em locais distintos do corpo, o microbioma humano é heterogêneo, por exemplo, o microbioma da pele, intestino, trato urinário, se distinguem entre si, inclusive no mesmo indivíduo. Também, o microbioma humano, evolui ao longo da vida (HUTTENHOWER *et al.*, 2012). Cada cepa bacteriana tem um genoma contendo milhares de genes, oferecendo

substancialmente mais diversidade genética e, portanto, mais flexibilidade do que o genoma humano. Esse genoma interage diretamente com o genoma humano, essa relação de interação entre o genoma humano e o genoma dos microrganismos que compõem a microbiota, designa-se microbioma (GILBERT *et al.*, 2018).

O *National Institutes of Health Human Microbiome Project* (Projeto do Instituto Nacional de Saúde do Microbioma Humano) foi uma das primeiras iniciativas em grande escala a abordar um subconjunto de questões ligadas ao microbioma. A primeira fase do programa buscou determinar se havia elementos comuns a microbiomas saudáveis, na ausência de doença evidente, e doze trabalhos foram publicados nessa temática (GILBERT *et al.*, 2018).

Algumas doenças estão relacionadas com o microbioma como desordens de ordem metabólica, como obesidade, neurológica tais como autismo, alzheimer, doenças alérgicas e imunológicas. Até o momento, pelo menos 105 doenças e distúrbios, substancialmente diferentes em natureza e etiologia, foram associados a alterações na microbiota gastrointestinal, respiratória, oral, cutânea e urinária / vaginal, conforme revelado principalmente pelas quantidades dos genes 16S rDNA gerados a partir de DNA (GILBERT *et al.*, 2018).

Microrganismo *core*, ou microrganismo central, são aqueles que os membros da população compartilham, ou seja, há microrganismos encontrados no microbioma da saliva de um indivíduo, por exemplo, que também são encontrados nas salivas de todos os outros indivíduos de uma dada população. Entretanto, esses organismos possuem alterações fenotípicas e adaptações distintas um dos outros, de acordo com a região, sexo, hábitos de higiene do hospedeiro (HUTTENHOWER *et al.*, 2012).

O microbioma atua em um importante controle na resistência de patógenos, fortalecimento do sistema imunológico e absorção de nutrientes (ZANGL *et al.*, 2020). Os fungos são habitantes normais das comunidades microbianas e estão presentes na pele e nas superfícies mucosas (HUTTENHOWER *et al.*, 2012). Populações complexas de fungos são associadas com o microbioma e gêneros como *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Malassezia* spp., *Saccharomyces* spp. habitam o microbioma humano. As populações de fungos que são encontrados nas mucosas tendem a ser mais diversificadas do que aquelas da pele. *Candida* spp. habita a microbiota oral, intestinal, vaginal além de estar presente na pele entre os dedos do pé e no calcanhar (UNDERHILL; ILIEV, 2014; ZANGL *et al.*, 2020).

Espécies de *Candida* spp. como *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* e *C. lusitaniae* são as espécies prevalentes no ser humano e deste modo são de extrema relevância, pois estão associadas a doenças como a candidíase vulvovaginal (CVV) (UNDERHILL; ILIEV, 2014; ZANGL *et al.*, 2020). *C. albicans* está presente na microbiota vaginal de mulheres saudáveis. Em mulheres com CVV, geralmente a prevalência é de *C. albicans* (50%) e *C. glabrata* (50%) (SANTOS *et al.*, 2019). *C. krusei* reside no trato urinário e é responsável por infecções severas e agravamento da candidúria em pacientes imunossuprimidos, podendo levar a casos de mortalidade entre os pacientes (KAUFFMAN, 2014).

Lactobacillus spp. residem na microbiota gastrointestinal, vaginal, saliva humana e no trato urinário, as espécies encontradas diferem entre estes. A composição do trato vaginal das mulheres varia de acordo com as diferentes regiões do planeta, raças e etnias (SANTOS *et al.*, 2019).

Dentre as espécies que compõem a microbiota vaginal de mulheres saudáveis temos *L. crispatus*, *L. vaginalis*, *L. gasseri*, *L. jensenii* (PAROLIN *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2017). Alguns autores apontam que a espécie prevalente seja *L. crispatus* (WANG *et al.*, 2017), enquanto outros autores discutem ser *L. gasseri* (SANTOS *et al.*, 2019). Na saliva humana existem cerca de 30 espécies de *Lactobacillus*, que incluem *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e *L. fermentum* (WANG *et al.*, 2017).

Desequilíbrio na microbiota permite que microrganismos comensais como, *Candida* spp. avancem do comensalismo para a virulência. Isso ocorre devido a perturbações no sistema imunológico no hospedeiro, antibioticoterapia, dieta do hospedeiro, fatores genéticos (SALVATORI *et al.*, 2016), como discutido no item 2.1.2. Devido a isso, estima-se a importância do equilíbrio da microbiota, onde, existem microrganismos como os probióticos, que regulam a proliferação de microrganismos comensais, evitando a ação de virulência desses (SANTOS *et al.*, 2019).

2.5 PROBIÓTICOS

Os probióticos são microrganismos que desempenham importante papel na manutenção da microbiota, trazendo benefícios para a saúde humana. Estes microrganismos, quando em equilíbrio, ajudam a manter a microbiota saudável, impedindo a colonização por microrganismos patogênicos e colaboram para o bom

funcionamento do corpo. Diferentes sistemas, como digestivo e imunológico, são beneficiados com o equilíbrio da colonização dos microrganismos na microbiota. Além disso, esse equilíbrio impede o crescimento excessivo de microrganismos comensais, que são capazes de causar danos à saúde (MATSUBARA *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2019).

O efeito antifúngico dos probióticos está relacionado a variados fatores, e estes fatores são relativos à espécie probiótica e sua relação com o organismo comensal e especialmente o ambiente em que residem (MATSUBARA *et al.*, 2016; ZANGL *et al.*, 2020). A microbiota vaginal de mulheres assintomáticas tende a ser dominada por espécies individuais de *Lactobacillus* spp. e diversos taxa anaeróbicos adicionais. Acredita-se que os lactobacilos beneficiam o hospedeiro ao diminuir o pH vaginal por meio dos produtos finais da fermentação, reduzindo assim a probabilidade de colonização microbiana de patógenos (HUTTENHOWER *et al.*, 2012).

Vários artigos discutem a interação entre bactérias probióticas e *C. albicans* em detalhes e sua importância no equilíbrio da microbiota (UNDERHILL; ILIEV, 2014; ZANGL *et al.*, 2020). Entre os fatores antifúngico dos probióticos, e relacionados à manutenção da microbiota contra *C. albicans*, temos: a produção de metabólitos secundários, a competição por nutrientes, a estimulação do sistema imunológico, a elisão na formação de biofilme, interferência genética e o impedimento de formação de hifas (MATSUBARA *et al.*, 2016; ZANGL *et al.*, 2020). Tais efeitos probióticos, sobretudo na presença de *Lactobacillus* spp. (MATSUBARA *et al.*, 2016), também podem implicar interferência genética tal como a indução da regulação negativa de genes associados à formação de biofilme de *Candida* spp., como *PHR1* e *ALS12* (BORGES; SILVA; TEIXEIRA, 2014; KOHLER *et al.* 2012). Os mecanismos pelos quais os lactobacilos estabilizam a microbiota vaginal são a produção de compostos exometabólitos e a capacidade de aderir e competir por locais de adesão (BORGES; SILVA; TEIXEIRA, 2014).

Lactobacillus spp. compreendem um gênero de bactérias Gram-positivas pertencente ao filo Firmicutes. São um gênero de bactérias anaeróbias facultativas. Algumas espécies de *Lactobacillus* spp., residentes na microbioma humano, foram identificadas com alto potencial probiótico, e , e possuem a habilidade de manter o equilíbrio na proliferação de microrganismos comensais, além de impedir a colonização de microrganismos patogênicos. Algumas das espécies identificadas com alto potencial

probiótico e mais estudadas são: *L. acidophilus*, *L. pentosus*, *L. vaginalis*, *L. plantarum*, *L. gasseri* (MATSUBARA *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2019; ZANGL *et al.*, 2020).

Lactobacillus spp. apresentam-se como agentes promissores para tratar ou prevenir infecções por *Candida* spp. nas mucosas ou para permutar as opções tradicionais de tratamento (SANTOS *et al.*, 2019). Aplicação de *Lactobacillus* spp. para tratar infecções fúngicas baseia-se na premissa de que certas espécies de *Lactobacillus* spp. exercem um efeito protetor *in vivo*, reduzindo a adesão do fungo à mucosa vaginal, produção de ácidos orgânicos e metabólitos favoráveis, além de melhorar os mecanismos de defesa imunológica das células epiteliais vaginais (ZANGL *et al.*, 2020).

2.6 INTERAÇÃO *Lactobacillus* spp. E *Candida* spp.

2.6.1 Interação *Lactobacillus* spp. e *Candida albicans*

Candida albicans forma biofilmes polimicrobianos com muitas bactérias incluindo espécies de *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Staphylococcus*. Essas bactérias podem ter influências sinérgicas ou antagônicas sobre *C. albicans* por vários mecanismos, como a promoção da coadesão para aumentar a biomassa do biofilme, a liberação de moléculas de *quorum sensing* e metabólitos para reduzir o crescimento fúngico, afetando a expressão gênica relacionada à virulência e modulando as respostas inflamatórias imunológicas da mucosa (SALVATORI *et al.*, 2016).

Diversos estudos apresentam a interação entre *Lactobacillus* spp. e *C. albicans*. Nesses estudos são descritas atividades probióticas de diversas espécies de *Lactobacillus* como: *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. salivarius*, *L. pentosus*, *L. helveticus*, *L. iners*, *L. debrueckii*. Essa atividade também pode estar relacionada a diversos fatores de inibição de crescimento de *C. albicans*: como liberação de metabólitos secundários e alteração gênica (ZANGL *et al.*, 2020).

Autores sugerem que são os metabólitos, liberados por *Lactobacillus* spp., os responsáveis por sua atividade probiótica (ALLONSIUS *et al.*, 2019; MAILÄNDER-SÁNCHEZ *et al.*, 2017; NYANZI *et al.*, 2013; PAROLIN *et al.*, 2015; ROSSONI *et al.*, 2018b; TORTELLI *et al.*, 2019).

Nyanzi e *et al.* (2013) descreveram a produção de ácido láctico por *Lactobacillus* spp. e um ácido graxo (6-*O*-(α -D-glucopyranosyl)-1,6-di-*O*-pentadecanoyl- α -D-

glucopyranose) derivada de glicosídeo dentro das células como sendo o responsável pela ação probiótica de *Lactobacillus* spp.

Os lactobacilos vaginais inibem o crescimento de *C. albicans* pela produção de H₂O₂, bem como pela redução do pH e produção de ácidos graxos de cadeia curta para prevenir a transição de levedura para hifas (SALVATORI *et al.*, 2016).

Lactobacillus iners está presente no microbioma vaginal e são dominantes quando há um potencial patogênico. O ácido lático produzido por *L. iners* inibe o crescimento de *C. albicans*, assim como ácido lático produzido por cepas de *L. crispatus*. Uma alternativa, embora não seja uma explicação mutuamente exclusiva, é que a colonização vaginal por *C. albicans* mude o microbioma para favorecer *L. iners* (TORTELLI *et al.*, 2019). *L. casei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. jensenii* e *L. crispatus* são capazes de produzir ácido lático a partir de glicose. *L. casei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. rhamnosus* e *L. crispatus* são capazes de produzir ácido D-lático e L-lático. O ácido lático de *L. rhamnosus* é capaz de reduzir em 50% a formação de hifas por *C. albicans* (ALLONSIUS *et al.*, 2019).

Parolin *et al.* (2015) sugerem que os metabólitos butirato, orotato, piroglutamato e isoleucina podem estar relacionados com as funções fungistáticas e fungicidas dos lactobacilos. No entanto, nenhum efeito sinérgico foi observado entre esses compostos contra *C. albicans*.

A capacidade de inibição de *C. albicans* por *L. crispatus* pode ser devido a suas produções de alguns compostos liberados, como H₂O₂ e ácidos orgânicos (WANG *et al.*, 2017).

Panariello e *et al.* (2021) realizaram estudo com cepa de *L. casei* ATCC 4646 e *C. albicans* resistente ao fluconazol ATCC 96901. Esses autores identificaram potencial anti-*Candida* em *L. casei* a partir da redução de componentes da matriz extracelular de biofilmes de *C. albicans*. Também, esses autores propuseram a investigação de diferentes cepas de *Lactobacillus* que poderiam potencialmente reduzir biofilmes de *C. albicans*.

2.6.2 Interação *Lactobacillus* spp. e *Candida krusei*

Interações entre bactérias probióticas e leveduras do gênero *Candida* são muito comuns no microbioma humano, principalmente no trato gastrointestinal, na boca e

região vulvovaginal (SANTOS *et al.*, 2019). Muitos estudos revelam a capacidade de colonização de bactérias do gênero *Lactobacillus* spp. em diferentes regiões do microbioma, além disso, pesquisas demonstram a capacidade inibidora destas bactérias contra fungos do gênero *Candida* spp. (HALM *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2019). *Candida krusei* reside em diferentes sítios do microbioma humano, e a sua interação com bactérias do gênero *Lactobacillus* spp. é de extrema importância para compreender a complexidade desse agrupamento (KUNYEIT *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2019).

Santos e *et al.* (2019) propuseram interação entre *L. paracasei*, *L. fermentum* e *L. rhamnosus*, bactérias ácidas usadas como probióticos e *C. krusei*, e identificaram um efeito profilático contra *C. krusei*, onde essa interação desencadeou uma diminuição na proliferação de *C. krusei*.

Em estudo realizado por Kunyeit e *et al.* (2019), foi observado que probióticos, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Issatchenkia occidentalis*, são capazes de inibir a adesão, filamentação e formação de biofilme de várias espécies NAC, incluindo *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, bem como a espécie recentemente identificada *C. auris* multirresistente. Além disso, esses autores mostraram que as espécies probióticas atenuaram infecções e diminuíram a colonização por espécies NAC em um animal vivo (KUNYEIT *et al.*, 2019).

Lactobacillus rhamnosus é capaz de aumentar a sobrevivência de larvas *Caenorhabditis elegans* infectadas com *C. albicans* (POUPET *et al.*, 2019). Espécies de bactérias do gênero *Lactobacillus* spp. que possuem capacidade probiótica contra *C. krusei* impedem a adesão de *C. krusei* às células epiteliais do hospedeiro (SANTOS *et al.*, 2019). Essas bactérias também são capazes de produzir ácido lático e devido a isso, promovem mudanças de curto prazo no pH extracelular e interferem diretamente no processo de fermentação, isso pode acometer a sobrevivência de *C. krusei* no meio extracelular (HALM *et al.*, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a interferência de células planctônicas e biofilme de *Lactobacillus casei* no desenvolvimento de células planctônicas e biofilme de *Candida* spp..

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

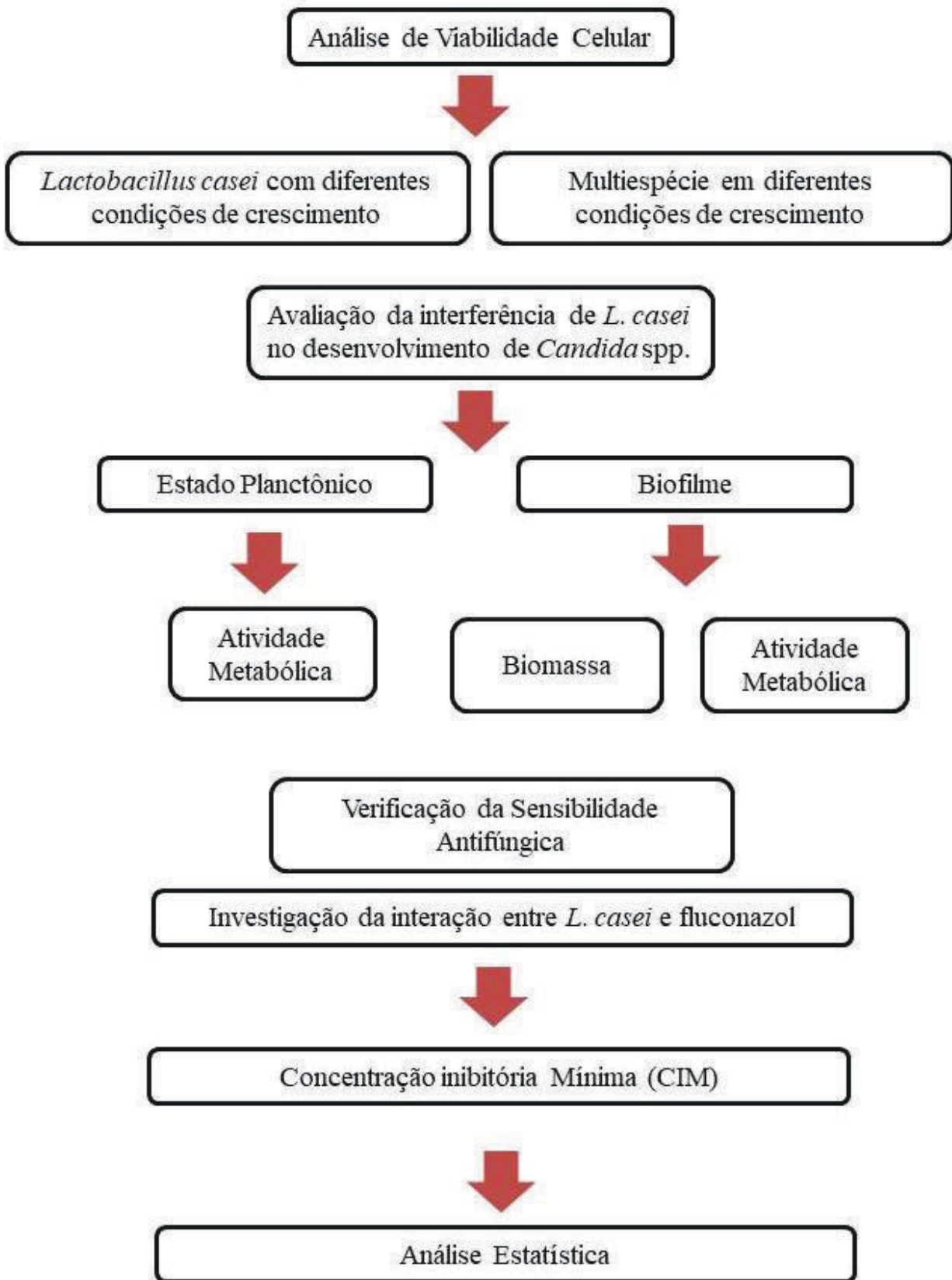
- a) Identificar um método eficaz no desenvolvimento de biofilmes mistos de *Candida* spp. e *Lactobacillus casei*;
- b) Analisar se *L. casei* interfere no crescimento planctônico de *Candida* spp.;
- c) Avaliar se células planctônicas de *L. casei* interfere no desenvolvimento de biofilme de *Candida* spp.;
- d) Investigar se biofilme de *L. casei* interfere no desenvolvimento de biofilme de *Candida* spp.;
- e) Observar o comportamento metabólico e a biomassa em todos os modelos de interação propostos;
- f) Determinar sensibilidade antifúngica de biofilmes de *Candida* spp. após contato com *L. casei*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Encontra-se a seguir representação esquemática das etapas da metodologia realizada no desenvolvimento desta pesquisa (Figura 8).

Figura 8- Representação esquemática da metodologia deste trabalho.



4.2 CEPA MICROBIANA E CULTURA

O trabalho foi realizado na Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Básicas. As culturas de *Candida* spp. utilizadas estão mantidas, a -80°C , na coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Básicas da UNIFAL-MG. Foram utilizadas neste estudo duas amostras padrões do gênero *Candida* spp.: *C. albicans* ATCC 10231 e *C. krusei* ATCC 6258. Foi utilizada a cepa de *L. casei* CRL 431. A cepa de *L. casei* CRL 431 faz parte do repositório de cepas probióticas da CHR HANSEN e foi isolada inicialmente da amostra fecal de um bebê saudável (HANSEN, 1995). Esta cepa já foi utilizada em mais de 90 trabalhos científicos (NUNEZ *et al.*, 2015). *C. krusei* ATCC 6258 foi isolada de escarro de paciente com broncomicose no Sri Lanka e depositada por A Castellani e *C. albicans*. ATCC 10231 foi isolada de homem com broncomicose e depositada por CW Emmons (ATCC, 2015).

4.3 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS

Para o crescimento de *C. albicans* e *C. krusei*, inicialmente as cepas foram retiradas da coleção de microrganismos, especificada acima, e cultivadas em ágar Sabouraud Dextrose, foram mantidas a 37°C durante $24\text{h} \pm 2\text{h}$, conforme condição de crescimento descrito e adaptado por Melo e *et al.* (2011). Em seguida, as colônias foram subcultivadas em meio caldo de Extrato de Triptona e Levedura (TYE), preparado conforme especificações de Himedia (2020) (Apêndice 1 e Anexo 1) e este foi incubado em estufa de agitação orbital a 37°C durante $24\text{h} \pm 2\text{h}$ conforme descrito por Oliveira (2018). O caldo extrato de levedura de triptona é formulado de acordo com o *International Streptomyces Project*, e fornece compostos nitrogenados, carbono, enxofre, complexo de vitamina B e oligoelementos, necessários para crescimento de bactérias e leveduras (HIMEDIA, 2020). Para a realização dos testes, as células foram colhidas e lavadas com tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,2 e ajustadas a uma densidade óptica de 0,4 a 530nm, equivalente a 5×10^7 células mL^{-1} em caldo TYE segundo Oliveira (2018) com modificações.

As células de *L. casei* CLR 431 foram adquiridas liofilizadas e a seguir foram ressuspensas em 0,5 mL de meio caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e mantidas durante $24\text{h} \pm 2\text{h}$ a uma temperatura de 37°C (GOMES; PEREIRA, 2007). Em seguida, as

células foram cultivadas em meio Ágar Man Rogosa Sharpe (MRS) inicialmente descrito por Man; Rogosa; Sharpe (1960) com modificações de Costa e *et al.* (2011) e do próprio autor deste trabalho (Apêndice 2) e foram mantidas a uma temperatura de 37°C durante 24h ± 2h em ambiente microaerófilo a 5% de CO₂ (JARAMILLO *et al.*, 2015; OLIVEIRA, 2018). Para manter o ambiente microaerófilo as células foram incubadas em jarra de anaerobiose e o oxigênio foi absorvido através da combustão associada a uma vela acesa. Estudos posteriores mostraram que em condições de microaerofilia *Lactobacillus* spp. é capaz de produzir ácido láctico em maior quantidade (JARAMILLO *et al.*, 2015; OLIVEIRA, 2018). Após as confirmações, para a realização dos testes, as células foram colhidas e lavadas com tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,2 e ajustadas em meio TYE em três diferentes concentrações, densidade óptica de 0,4 a 530nm, equivalente a 5x10⁷ células mL⁻¹, densidade óptica de 0,1 a 530nm, equivalente a 5x10⁶ células mL⁻¹ e densidade óptica de 0,05 a 530nm, equivalente a 5x10⁵ células mL⁻¹ segundo Oliveira (2018) com modificações. O número de células foi obtido a partir do teste de viabilidade celular descrito a seguir.

4.4 VIABILIDADE CELULAR

4.4.1 Viabilidade Celular de *L. casei*

Para elucidação da proposta que *L. casei* exibia potencial de crescimento em meio não seletivo TYE e BHI meio seletivo MRS, teste de viabilidade celular com corante azul de Trypan foi conduzido com auxílio de visualização através da câmera de Neubauer.

Lactobacillus casei foi ressuspendido em uma solução salina de NaCl e ajustado a escala 0,5 de Macfarland. Em seguida, 100 µL de tais suspensões foram adicionadas a 5 mL dos meios citados acima. Foram incubados a 37°C durante 48h e interrompidos após as primeiras 24h para a realização do teste.

Corante Azul de Trypan 0,4% foi preparado na proporção 1:1 (1mL da suspensão celular e 1mL do corante), e uma alíquota foi adicionada à câmara de Neubauer, e a viabilidade foi determinada por observação microscópica das células excluídas.

O ensaio de exclusão por Azul de Trypan é um método amplamente utilizado por se tratar de ser um método conveniente e barato. A exclusão ocorre devido ao fato do Azul de Trypan ser interiorizado pelas células mortas para seu citoplasma, devido à

fragilidades na membrana plasmática (MARTINS, 2013; MARTINS, 2017). As células vivas por sua vez, permanecem intactas, sendo assim, a seleção ocorre excluindo as células coradas de azul (MARTINS, 2017). A contagem pode ser feita através de uma câmara de Neubauer com profundidade de 0,1mm. Esta câmara consiste em uma lâmina microscópica mais alta que a convencional, que estão gravadas marcações que a dividem em quadrantes com 1 mm de área. Sendo assim, a contagem é feita seguindo-se essas marcações (SILVA *et al.*, 2015).

Para realizar o cálculo de concentração e o número de células visualizadas na câmara de Neubauer é aplicada a seguinte fórmula:

$$\text{Concentração (células/mL)} = \text{número de células} / \text{volume (em mL)}$$

Sendo assim, o número de células será a soma de todas as células contadas em todos os quadrados contados. O volume de um quadrado é de 0,1 cm² e a profundidade da câmara de 0,01 cm. Assim, para a câmara de Neubauer, a fórmula utilizada na contagem dos grandes quadrados é:

$$\text{Concentração} = \text{Número de células} \times 10.000 / \text{Número de quadrados}$$

No caso, a aplicação de uma diluição deve ser levada em consideração, assim temos:

$$\text{Concentração} = \text{Número de células} \times 10.000 / \text{Número de quadrados} \times \text{Diluição}$$

Neste trabalho, a concentração é de 1:1, sendo assim, temos:

$$\text{Concentração} = \text{Número de células} \times 10.000 / \text{Número de quadrados} \times 1$$

Após a contagem em câmara de Neubauer, foi possível determinar a concentração de células (valor de densidade óptica) em relação ao número de células.

4.4.2 Viabilidade Celular de *L. casei* em interação com *Candida* spp.

Células de *C. albicans* e *C. krusei* também foram adicionadas a *L. casei* para validar a proposta que os respectivos microrganismos se desenvolviam em interação ao *L. casei*. As células foram suspensas em solução salina de NaCl e ajustado a escala 0,5 de Macfarland. Em seguida, 100 µL de tais suspensões foram adicionadas a 5 mL dos meios TYE, BHI e MRS contendo *L. casei* nas concentrações citadas no item 4.3. Foram incubados a 37°C durante 48h e interrompidos após as primeiras 24h para a realização do teste. Teste de viabilidade celular com corante azul de Trypan foi conduzido e a leitura foi realizada em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico. Durante os ensaios realizados o pH foi aferido ao final do ensaio.

4.5 INTERAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Candida spp.* AO *L. casei* EM ESTADO PLANCTÔNICO

A fim de avaliar o potencial anti-*Candida* de *L. casei*, *C. albicans* e *C. krusei* foram expostos ao *L. casei*, ambos microrganismos, *L. casei* e *Candida spp.*, em sua forma planctônica, em três tempos, tempo 1, tempo 2 e tempo 3, sendo:

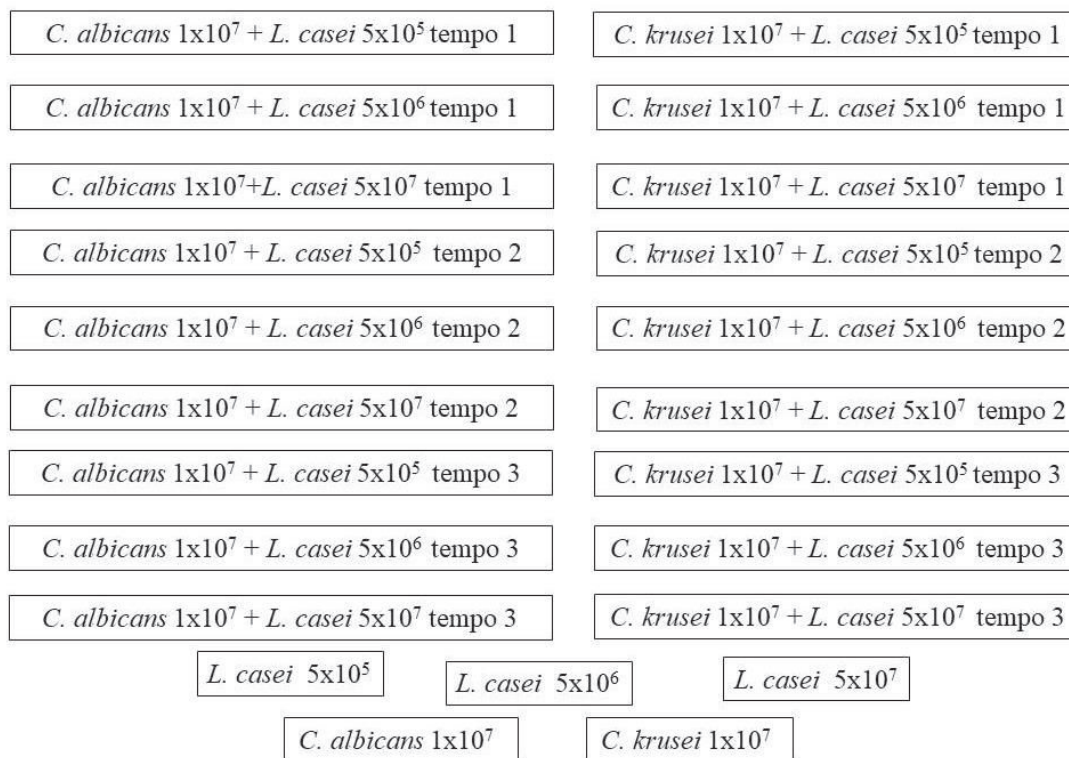
Tempo 1: adição de *L. casei* no momento de incubação;

Tempo 2: adição de *L. casei* durante a fase exponencial;

Tempo 3: adição de *L. casei* após a fase estacionária.

Todos os ensaios foram feitos em triplicatas em três experimentos independentes e tiveram a aferição do pH ao final do ensaio. Os tempos foram definidos conforme estudo de Panariello e *et al.* (2021).

Figura 9- Representação dos expostos de *C. albicans* e *C. krusei* ao *L. casei* em diferentes concentrações e em três tempos distintos, e seus respectivos controles de crescimento.



Fonte: Do autor

Legenda: Todos os microrganismos em estado planctônico. Tempo 1: adição de *L. casei* no momento de incubação, tempo 2: adição de *L. casei* durante a fase exponencial, tempo 3: adição de *L. casei* após a fase estacionária.

Os isolados foram obtidos conforme item 4.3, em seguida foram subcultivados em caldo TYE e incubados em temperatura de 37°C durante $24\text{h} \pm 2\text{h}$ em câmara incubadora de agitação orbital MARCONi® MA-420 a 180 rotação por minuto (rpm), em ambiente microaerófilo.

Os isolados de *C. krusei* e *C. albicans* foram expostos ao *L. casei* nas diferentes concentrações e tempos citados, separadamente, e controles de *C. albicans* e *C. krusei* foram realizados a fim de avaliar o seu crescimento isoladamente, ou seja, na ausência de *L. casei*. Também foram realizados controles de todas as concentrações de *L. casei* com a finalidade de avaliar o desenvolvimento desses. Assim, obtivemos os expostos esclarecidos na Figura 9.

Em seguida foi realizado o ensaio de atividade metabólica por redução de sal de tetrázólio XTT conforme item 4.11.

4.6 FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Candida* spp.

As condições de crescimento e formação de biofilme foram adaptadas como descrito inicialmente por Ramage e *et al.* (2001), com algumas modificações sugeridas por Melo e *et al.* (2011) e Panariello e *et al.* (2021). Foram utilizados dois métodos para quantificar o crescimento e formação de biofilme de *Candida* spp. e *L. casei*, que incluíram método de coloração com Cristal Violeta adaptado de Xu e *et al.* (2016) e ensaios de redução XTT que foram adaptados de acordo com Meletiadis e *et al.* (2001) e Silva e *et al.* (2008).

Para a formação de biofilme os isolados foram cultivados conforme item 4.3. Biofilmes foram produzidos em placa de microtitulação de 96 poços de fundo chato de poliestireno, através da transferência de 100 µL da suspensão de células na microplaca. Em seguida foram incubados em câmara incubadora de agitação orbital MARCONi® MA-420 a 75rpm em temperatura de 37°C, em ambiente microaerófilo. Após 1h30m a formação de biofilme foi interrompida e as células não aderidas foram removidas por lavagem com 100µL de tampão PBS e 200µL de meio TYE foram adicionados em cada poço, em seguida foram incubados durante 24h ± 2h em câmara incubadora de agitação orbital MARCONi® MA-420 a 75rpm em temperatura de 37°C, em ambiente microaerófilo para permitir a maturação do biofilme.

4.7 BIOFILME DE *Candida* spp. EXPOSTAS AO *L. casei*

A fim de avaliar o potencial antibiofilme de *L. casei*, células sésseis de *C. albicans* e *C. krusei* foram expostas às células planctônicas de *L. casei* em três tempos:

Tempo 1: *L. casei* adicionado no momento de incubação;

Tempo 2: *L. casei* adicionado durante a proliferação;

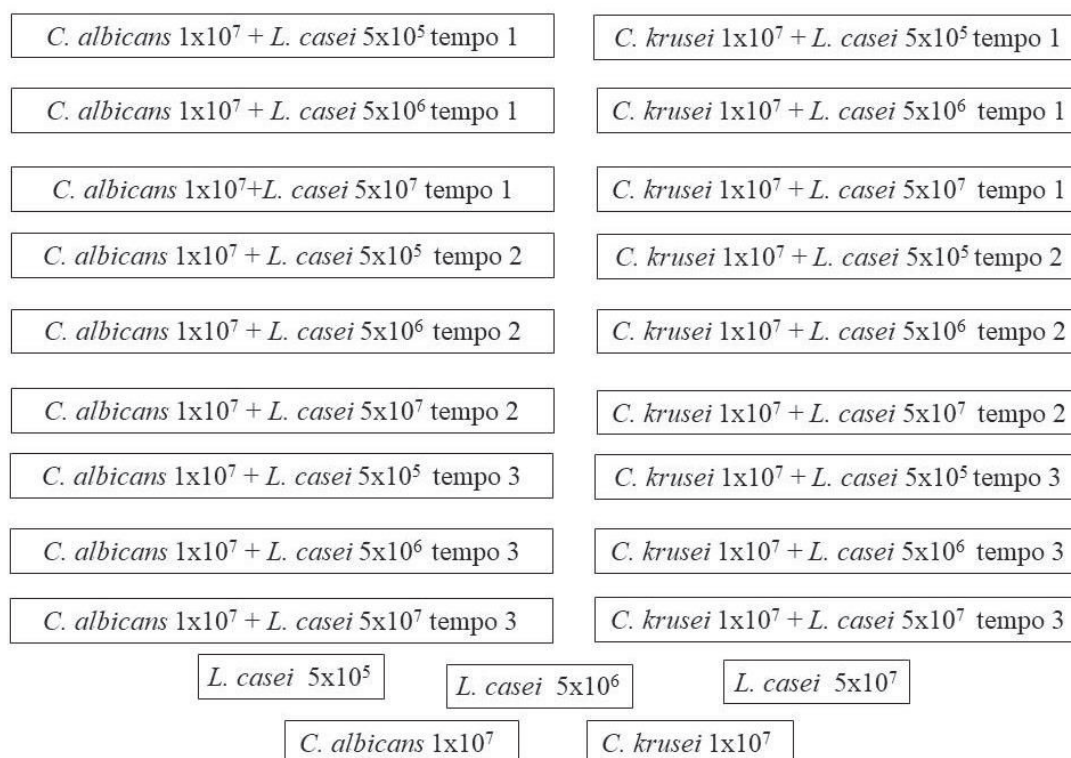
Tempo 3: *L. casei* adicionado na fase de maturação.

Os três tempos foram definidos conforme estudo de Jaramillo e *et al.* (2015).

Biofilmes de *Candida* spp. foram formados conforme item 4.6. Os isolados foram expostos ao *L. casei* nas diferentes concentrações citadas no item 4.3 e nos diferentes tempos citados acima, separadamente, e controles de *C. albicans* e *C. krusei* foram realizados a fim de avaliar o crescimento isoladamente, ou seja, na ausência de *L. casei*. Também foram realizados controles das concentrações de *L. casei* com a finalidade de avaliar o desenvolvimento de *L. casei*. Os biofilmes em questão foram

interrompidos no tempo 2 e tempo 3 e as células não aderidas foram removidas por lavagem com 100µL de tampão PBS e 200µL de meio TYE foram adicionados em cada poço, e 200µL de *L. casei* nas diferentes concentrações foram adicionados aos poços que não haviam sido expostos ao *L. casei* anteriormente, ou seja, no momento de incubação. Assim, obtivemos os expostos esclarecidos na Figura 10. Os expostos foram incubados em ambiente microaerófilo durante 24h ± 2h em câmara incubadora de agitação orbital MARCONi® MA-420 a 75rpm em temperatura de 37°C para permitir a maturação do biofilme. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas em três experimentos independentes.

Figura 10- Representação dos expostos de biofilme de *C. albicans* e *C. krusei* ao *L. casei* em estado planctônico em diferentes concentrações e em três tempos distintos, e seus respectivos controles de crescimento.



Fonte: Do autor

Legenda: Tempo 1: adição de *L. casei* no momento de incubação, tempo 2: adição de *L. casei* durante a fase de proliferação, tempo 3: adição de *L. casei* ao longo da fase de maturação.

Em seguida foi realizado o ensaio de atividade metabólica por redução de sal de tetrázólio XTT conforme item 4.11 e o ensaio de biomassa com cristal violeta conforme item 4.12.

4.8 FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *L. casei*

Para a formação de biofilme de *L. casei* uma pesquisa bibliográfica em torno de biofilmes de *Lactobacillus* spp. foi realizada e, a partir de métodos avaliados anteriormente foi proposto um sistema eficaz para a formação de biofilme. Esse método foi validado a partir da quantificação do crescimento e formação de biofilme de *L. casei* a partir do método de coloração por cristal violeta, leitura de densidade óptica e observação microscópica. Foi mensurada sua densidade óptica e biomassa em diferentes tempos de formação de biofilme.

A fim de formar biofilme de *L. casei*, os isolados foram obtidos conforme item 4.3. Para a formação do biofilme, 100µL da suspensão celular na concentração de 5×10^7 células mL⁻¹ foram adicionados ao poço da placa de microtitulação de 96 poços de fundo chato de poliestireno e incubado em câmara incubadora de agitação orbital MARCONi® MA-420 a 75rpm em temperatura de 37°C e em ambiente microaerófilo. Após 1h30m a formação de biofilme foi interrompida e as células não aderidas foram removidas por lavagem com 100µL de tampão PBS e 200µL de meio TYE foram adicionados em cada poço, em seguida foram incubados em ambiente microaerófilo durante 24h ± 2h em câmara incubadora de agitação orbital MARCONi® MA-420 a 75rpm em temperatura de 37°C para permitir a maturação do biofilme.

4.9 BIOFILMES DE *Candida* spp. EXPOSTOS ÀS CÉLULAS SÉSSEIS DE *L. casei*

Células em estado de biofilme exibem maior potencial e resistência conforme descrito no item 2.2.2, em meio a isto foi avaliado o potencial de células de *L. casei* em fase de proliferação de biofilme, nas diferentes concentrações citadas, como bloqueio na fase de maturação do biofilme de *Candida* spp..

Para isso, os biofilmes de *C. albicans* e *C. krusei* foram formados conforme item 4.6 e biofilme de *L. casei* foi formado conforme item 4.8. Formação de biofilme de *L. casei* foi interrompida durante a fase de proliferação, tiveram suas células sésseis removidas por lavagem com 100µL de tampão PBS, posteriormente foram adicionados 200µl de meio TYE, os poços foram raspados com auxílio de alça descartável estéril 10

μL para a obtenção das células aderidas ao fundo. Estas células foram adicionadas ao biofilme interrompido, após 1h30m de incubação, de *C. albicans* e *C. krusei*, seguidamente foram incubadas em ambiente microaerófilo durante $24\text{h} \pm 2\text{h}$ em câmara incubadora de agitação orbital MARCONi® MA-420 a 75rpm em temperatura de 37°C . Controles foram conduzidos por adição de meio TYE em substituição à suspensão de células de *L. casei* para a obtenção de um biofilme de *C. albicans* e *C. krusei* não associado/exposto ao *L. casei*. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas em três experimentos independentes.

Em seguida foi realizado o ensaio de atividade metabólica por redução de sal de tretazólio XTT conforme item 4.11 e o ensaio de biomassa com cristal violeta conforme item 4.12.

4.10 BIOFILMES DE *C. albicans* EXPOSTOS AO BIOFILME DE *L. casei*

Foi analisado o potencial de células sésseis de *L. casei* em estado de maturação em vicissitude ao desenvolvimento de biofilme de *C. albicans*.

Para isso os biofilmes de *C. albicans* foram formados conforme item 4.6 e biofilme de *L. casei* foi formado conforme item 4.8. Para a exposição de *C. albicans* ao biofilme de *L. casei*, biofilmes de *L. casei* foram formados e após 24h de incubação, foram lavados com tampão PBS e posteriormente foram adicionados $200\mu\text{L}$ de meio TYE, os poços foram raspados com auxílio de alça descartável estéril $10\mu\text{L}$ para a obtenção das células aderidas ao fundo. As células obtidas foram adicionadas ao biofilme de *C. albicans* no tempo 1 e no tempo 2, seguidamente foram incubadas em ambiente microaerófilo, durante $24\text{h} \pm 2\text{h}$ em câmara incubadora de agitação orbital MARCONi® MA-420 a 75rpm em temperatura de 37°C para permitir a maturação do biofilme. Controles foram conduzidos por adição de meio TYE em substituição à suspensão de células de *L. casei* para a obtenção de um biofilme de *C. albicans* não associado/exposto ao *L. casei*. Os testes foram feitos em triplicatas em três experimentos independentes.

Em seguida foi realizado o ensaio de atividade metabólica por redução de sal de tretazólio XTT conforme item 4.11 e o ensaio de biomassa com cristal violeta conforme item 4.12.

4.11 ENSAIO DE ATIVIDADE METABÓLICA POR REDUÇÃO DE SAL DE TETRAZÓLIO XTT

Os sais de tetrazólio são compostos orgânicos heterocíclicos que substituem o aceptor final natural (oxigênio) no processo biológico redox e são reduzidos a derivados de formazan recebendo elétrons de substâncias do sistema de transporte de hidrogênio ou não enzimaticamente a partir de transportadores de elétrons artificiais (metossulfato de fenazina e menadiona) que aumentam a reação. Os sais de tetrazólio podem penetrar rapidamente em células intactas e diretamente em membranas subcelulares com atividade de desidrogenase, onde são convertidos em derivados de formazan. O sal de tetrazólio MTT tem sido usado em testes de avaliação da sensibilidade antifúngica de várias leveduras e fungos filamentosos, entretanto a desvantagem do MTT é que o processo inclui a solubilização de derivados de formazan. Como uma alternativa, um novo sal de tetrazólio, 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5- [(sulfenilamino) carbonil] -2H-tetrazólio-hidróxido) (XTT), tem sido empregado para testes de susceptibilidade antifúngica de leveduras e resultou em pontos finais claros para vários agentes antifúngicos (MELETIADIS *et al.*, 2001). XTT é convertido em um composto solúvel em água, o formazan, evitando assim as etapas adicionais para a solubilização de derivados de formazan, no entanto, necessita da presença de um agente de acoplamento de elétrons.

A natureza e a concentração deste agente são fundamentais para obter uma boa correlação entre a produção de formazan e o número de fungos viáveis e curvas de efeito de concentração menos variáveis (MELETIADIS *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2016).

XTT tem sido usado como teste de viabilidade celular antifúngica e para estudar formação de biofilme de *Candida* spp. porque mede a atividade celular, ou seja, células metabolicamente ativas. A redução intracelular de XTT libera um composto de formazan que pode ser quantificado por estimativa colorimétrica. A formulação do ensaio de redução XTT contém três componentes, nomeadamente XTT, um agente acoplador de elétrons como a menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) e tampão fosfato salino (PBS) (SILVA *et al.*, 2008). A redução de XTT depende da atividade celular, em vez da massa celular. Sal de tetrazólio XTT não é metabolizado até que um agente de

acoplamento eletrônico seja adicionado, a menadiona é o agente com maior potencial. (SILVA *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2016).

A fim de quantificar a atividade celular de *Candida* spp. foi realizado o ensaio de redução do sal de tetrazólio XTT conforme descrito por Meletiadis *et al.* (2001) e Silva *et al.* (2008) com modificações. O XTT foi solubilizado a 1 mg mL^{-1} em PBS e reservado. Uma solução de Menadiona foi preparada a 0,4 mM em acetona e misturada à solução de XTT, à proporção de 1:5 (v/v), respectivamente. Cada poço da microplaca foi pré-lavado duas vezes com PBS, foram adicionados 200 μL da solução XTT-Menadiona e a microplaca incubada ao abrigo da luz, durante 2h a 37°C. Em seguida, foi realizado o teste de absorção, através da leitura de densidade óptica, em Leitor de Elisa Anthos 200rt® a 490nm. Mudança na coloração é proporcional ao número de células vivas e pode ser quantificada. O ensaio de redução de XTT quantifica a capacidade da enzima desidrogenase presente na mitocôndria fúngica de converter o sal tetrazólio hidrossolúvel (XTT) (cor amarela) em compostos de formazan (cor laranja).

4.12 ENSAIO DE BIOMASSA COM CRISTAL VIOLETA

O ensaio de Cristal Violeta foi descrito pela primeira vez por Christensen e *et al.* (1985), em seguida, tem sido aprimorado constantemente para ser adequado para a quantificação de biofilme. Cristal Violeta (CV) é um corante de proteína, apresenta caráter básico, e cora moléculas de superfície carregadas negativamente e matriz extracelular de polissacarídeos. Células viáveis, células mortas e matriz extracelular podem ser coradas por CV, o que prova que o ensaio CV tem uma vantagem em avaliar o nível de biomassa em um biofilme (XU *et al.*, 2016).

Para a avaliação da biomassa do biofilme, utilizou-se cristal violeta a 0,4%. Os poços da microplaca tiveram o meio aspirado e foram lavados com tampão PBS, para a remoção de células não aderidas e dos compostos. Após isso, retirou-se todo o líquido residual e deixou-se a placa secar por 20 min a 35°C. Após isto, adicionou-se em cada poço 100 μL de solução aquosa de Cristal Violeta 0,4% e aguardou-se 15 min. Retirou-se o corante lavando os poços duas vezes com 200 μL de água destilada. Em seguida, Adicionou-se 200 μL de Etanol 95% e aguardou-se 15 min. Após a descoloração, transferiram-se 100 μL de cada poço para uma nova placa e fez-se leitura em Leitor de Elisa Anthos 200rt® a 595 nm.

4.13 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE BIOFILME DE *Candida spp.* EXPOSTOS ÀS CÉLULAS PLANCTÔNICAS DE *L. casei*

Sensibilidade antifúngica foi determinada usando a metodologia CLSI M27-A2 de acordo com as diretrizes do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (*Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI) (CLSI, 2012). Este teste é realizado em microplacas de 96 poços. Para avaliar a interação foram utilizadas células de *L. casei* obtidas conforme item 4.3 e o antifúngico fluconazol. O ensaio foi feito em triplicatas em três experimentos independentes.

O fluconazol foi testado a partir da concentração de 2048 $\mu\text{g mL}^{-1}$ até 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (MALCHIKOVA; KLYASOVA, 2021; RAUT *et al*, 2017). A coluna 1 foi utilizada como controle de esterilidade do meio de cultura; a coluna 12 como controle de crescimento de *Candida spp.*; a linha G como controle de turvação do antifúngico e as colunas 2-11 como controle de atividade do antifúngico (antifúngico mais microrganismo) em suas respectivas diluições. As linhas A, B, C continham as respectivas concentrações de *L. casei* (5×10^5 , 5×10^6 , 5×10^7 células mL^{-1}) + *Candida spp.* + antifúngico. As Linhas D, E, F continham *Candida spp.* + antifúngico. A linha H foi utilizada como controle de crescimento de *L. casei*.

Biofilmes de *Candida spp.* foram formados conforme item 4.6 e expostos ao *L. casei* conforme item 4.7, foi utilizado o meio RPMI, conforme procedimento do CLSI (CLSI, 2012).

Os biofilmes de *Candida spp.* foram interrompidos no tempo 2 (durante fase de proliferação) e as células não aderidas foram removidas por lavagem com 100 μL de tampão PBS e 100 μL da diluição do fluconazol + *L. casei* foram adicionados. Em seguida foram incubados em estufa de agitação orbital MARCONi® MA-420 75rpm a 37°C durante 24h \pm 2h em ambiente microaerófilo

Após 24h foi realizado o ensaio de atividade metabólica por redução de sal de tetracólio XTT conforme item 4.11.

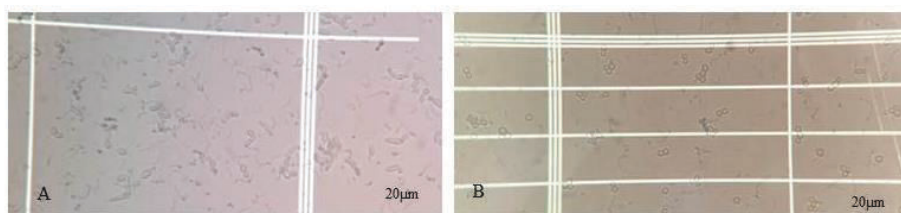
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 VIABILIDADE CELULAR DE *L. casei* E INTERAÇÃO COM *Candida* spp.

Para avaliar a viabilidade celular de *L. casei*, foi realizada a observação microscópica em câmara de Neubauer com corante azul de Trypan conforme descrito no item 4.4.1. Além disso, células de *C. albicans* e *C. krusei* também foram adicionadas ao *L. casei* para validar a proposta que respectivos microrganismos se desenvolviam em interação ao *L. casei* de acordo com item 4.4.2.. Conforme o teste de Viabilidade Celular com Azul de Trypan, ambos microrganismos se desenvolveram no tempo de 24h e 48h. Sendo assim, os testes posteriores foram feitos utilizando-se do meio TYE selecionado.

A figura 11 apresenta imagens de microscopia óptica em câmara de Neubauer utilizando-se o teste de viabilidade celular com corante azul de Trypan de ambas associações com meio TYE: *L. casei* + *C. krusei* (Figura 11A) e *L. casei* + *C. albicans* (Figura 11B). É possível observar poucas células coradas em azul, indicando que ambos microrganismos cresceram em interação.

Figura 11- Microscopia óptica em câmara de Neubauer utilizando-se teste de viabilidade celular com corante Azul de Trypan.



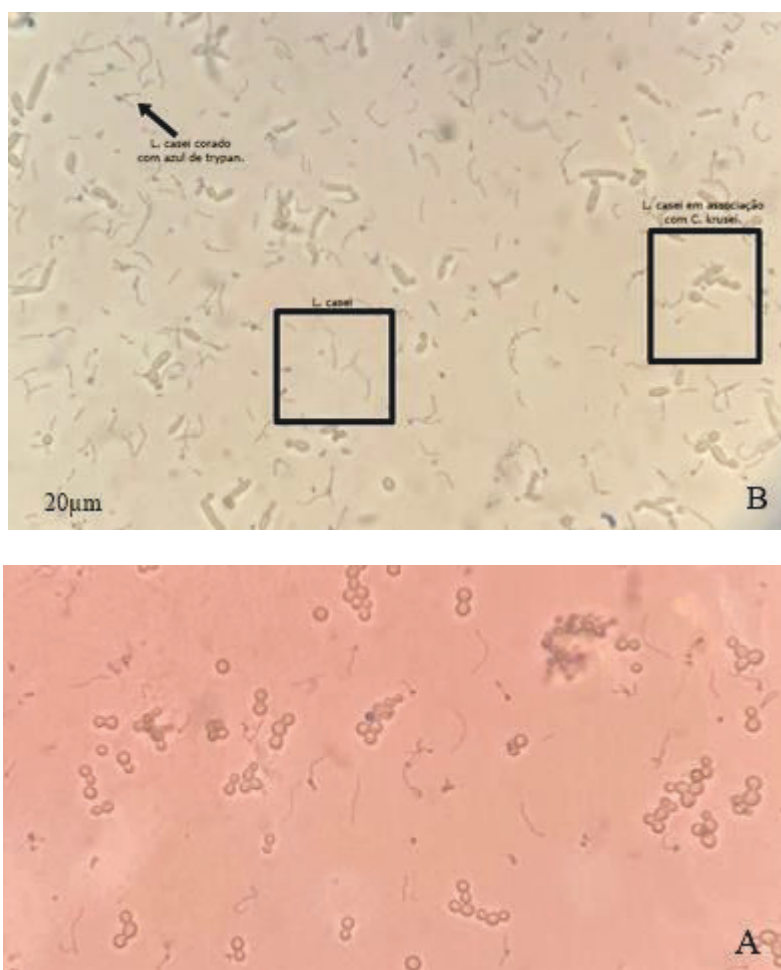
Fonte: Do Autor.

Legenda: Meio TYE, escala 20µm. **A.** *L. casei* + *C. krusei* em quadrante de 1 mm de área e 0,1 mm de profundidade. **B.** *L. casei* + *C. albicans* em quadrante de 0,05mm de área e 0,1 mm de profundidade. Células coradas em azul apresentam células mortas, apontadas pela seta. Observam-se poucas células coradas em azul, indicando que ambos os microrganismos se desenvolveram em interação. Imagem: Arquivo Pessoal.

A partir do teste de viabilidade celular com corante azul de Trypan, foi possível identificar que as células de *L. casei* se desenvolvem no meio TYE, e também foi possível realizar a contagem das células, e determinar que na DO de 0,4 a concentração de células de *L. casei* foi de 5×10^7 célula mL⁻¹. A partir disso, procurou-se entender se *L. casei* era capaz de se desenvolver na presença de *C. albicans* e *C. krusei*.

De acordo com a realização do teste de viabilidade celular com corante azul de Trypan, e contagem na câmara de Neubauer, considerou-se que, as células de *L. casei* eram capazes de se desenvolver na presença de *C. albicans* e *C. krusei*, em meio TYE. Conforme mostrado na figura 12. Também foi possível notar a formação de hifas por *Candida* spp. conforme mostrado na figura 13, onde podemos observar que em interação com *L. casei*, *C. krusei* induziu a formação de hifas, o mesmo ocorreu com *C. albicans*.

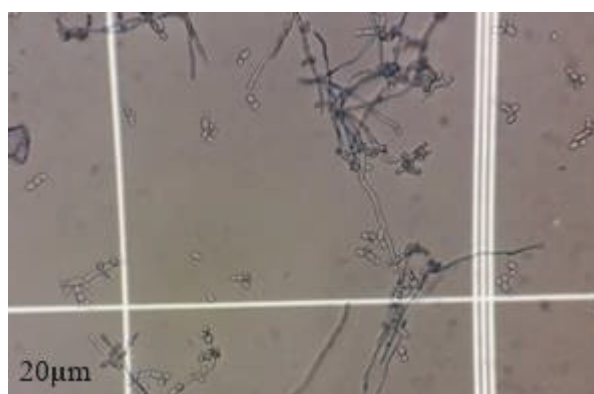
Figura 12- Teste de viabilidade celular com corante azul de *Trypan* da interação de *Candida* spp. com *L. casei*.



Fonte: Arquivo Pessoal

Legenda: Microscopia óptica em câmara de Neubauer, escala 20µm.. A. *L. casei* + *C. krusei* em quadrante de 1 mm de área e 0,1 mm de profundidade, X 100. As células de *L. casei* foram cultivadas em meio TYE e associadas com *Candida* spp., foram incubadas durante 24h e a leitura foi feita utilizando corante Azul de *Trypan*. O ensaio de exclusão por Azul de *Trypan* ocorre devido ao fato do corante ser absorvido pelas células mortas em razão do rompimento da membrana plasmática. Portanto, células coradas em azul indicam células mortas, e células intactas pelo corante indicam células ativas metabolicamente (MARTINS, 2017). A. *L. casei* em interação com *C. albicans* em meio TYE. B. *L. casei* em interação com *C. krusei* em meio TYE, seta indica células de *L. casei* coradas em azul, devido à ação do azul de *trypan*.

Figura 13- Fotografia de microscopia óptica em câmera de Neubauer com corante azul de Trypan apresenta hifas de *C. krusei*.



Fonte: Arquivo Pessoal

Legenda: *C. krusei* é capaz de produzir hifas verdadeiras como expressão de um fator de virulência, que está associado ao desenvolvimento em ambientes extremos (GÓMEZ-GAVIRIA; MORA-MONTES, 2020).

Espécies de *Candida* como *C. albicans* e *C. krusei* são capazes de formar hifas verdadeiras, devido a sua capacidade de adaptação a ambientes extremos. Essa capacidade está associada a um fator de virulência encontrado em *Candida* spp. isso porque, células em morfologia de hifas possuem maior capacidade de escape às células do sistema imunológico, habilidade de sobrevivência a terapia antifúngica, além de, células em hifas, disporem de aptidão superior na absorção de nutrientes, devido ao aumento da superfície de contato (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Nossa hipótese é que a formação de hifas por *Candida* spp. na presença de *L. casei* pode ocorrer devido à interferência no crescimento de *Candida* devido à competição por *L. casei*.

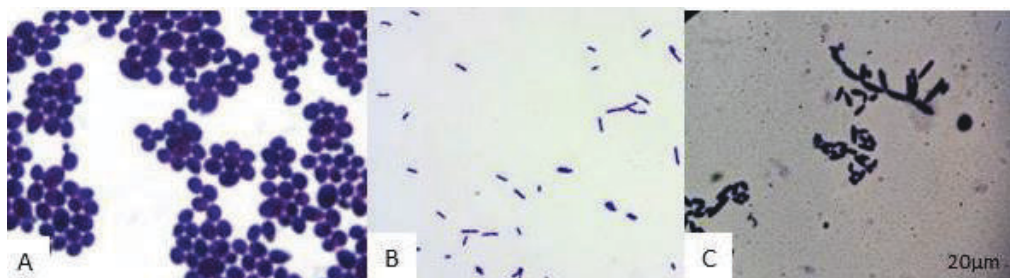
Durante os ensaios realizados o pH foi aferido ao final do ensaio. Os valores de pH para as interações entre *L. casei* e *Candida* spp. em estado planctônico e em biofilme, variou de 5,0 – 6,0. O pH do meio MRS foi medido antes da realização do teste e o valor encontrado foi de 6,4, assim como o pH do meio TYE, que teve seu valor de 7,0, antes da realização dos ensaios. Em estudo realizado por Cubas-Cano, González-Fernández e Tomás-Pejó (2019), foi possível observar que *L. pentosus* ATCC 8041 é capaz de produzir ácido láctico em extensas proporções mesmo que em ambiente de

baixo pH. A concentração de ácido láctico vaginal está relacionada à concentração de íons de hidrogênio (pH baixo) e não a concentração de lactato presente. Estudos *in vitro* mostraram que lactobacilos cultivados atingiram um pH médio em torno de $3,92 \pm 0,22$ (O'HANLON; COME; MOENCH, 2019).

Candida albicans tem a habilidade de se proliferar em ambientes que variam amplamente no pH; essa capacidade é necessária para colonizar diferentes nichos do corpo como o estômago, mucosa vaginal e o trato gastrointestinal. A habilidade de *C. albicans* em se adaptar a diferentes pHs envolve a remodelação da parede celular, onde, em meios mais ácidos a camada externa da parede celular torna-se menos fibrilar (SHERRINGTON *et al.*, 2017). Em estudo realizado por Bulgasem; Huda-Faujan; Lani, (2017) foi possível observar que sobrenadante de *L. plantarum* inibiu o crescimento de *C. krusei* em pH 3,0 – 5,0. A partir de pH 7,0, o sobrenadante perdeu sua atividade antifúngica contra *C. krusei*. Vylkova e Lorenz (2014) observaram que células de *C. albicans* cultivadas em condições que mimetizam o fagolisossomo alcalinizam eficientemente o ambiente, resultando na indução da morfogênese das hifas.

Biofilmes de *L. casei* foram formados, conforme item 4.8, nas diferentes concentrações e três meios de cultura foram testados: MRS, BHI e TYE. Nos meios MRS e BHI não se observou crescimento suficiente para a continuação dos testes de formação de biofilme, sendo assim, foram excluídos e o meio TYE foi selecionado.

Figura 14- Microscopia Óptica, em aumento 1000x, células de *Candida* spp. e *L. casei* coradas através da coloração diferencial de Gram



Fonte: Arquivo pessoal.

Legenda: (Figura14B) e *C. krusei* (Figura14C) coradas com coloração diferencial de Gram. **A.** *C. albicans* em forma de levedura. **B.** *L. casei* em forma livre. **C.** *C. krusei* em sua morfologia de transição de levedura para hifa.

5.2 INTERAÇÃO DE *L. casei* A *C. albicans* EM ESTADO PLANCTÔNICO

Para analisar se *L. casei* interfere no crescimento planctônico de *Candida* spp., interação das células de *Candida* spp. ao *L. casei* foram feitos conforme item 4.5.

A tabela 1 apresenta as médias dos valores encontrados no teste de atividade metabólica da interação de *C. albicans* ao *L. casei*. Nota-se que, em comparação ao controle, o tempo 1, na concentração de 5×10^6 e 5×10^7 células mL^{-1} diferem estatisticamente ($p < 0,05$), sendo que a atividade metabólica nesse tempo e nessas concentrações, foram menores que o controle. Também no tempo 2, observa-se redução significativa ($p < 0,05$) da atividade metabólica, em comparação ao controle de *C. albicans*, nas concentrações de 5×10^6 e 5×10^7 células mL^{-1} .

Pode-se observar que houve maior redução da atividade metabólica no tempo 2, devido ao fato de que *L. casei* foi adicionado no momento de proliferação de *C. albicans* o que acomete diretamente seu desenvolvimento, diminuindo assim, sua atividade metabólica. Na concentração 5×10^5 células mL^{-1} houve redução da atividade metabólica, porém não significativa ($p < 0,05$) quando comparada ao controle. A concentração de 5×10^6 células mL^{-1} no tempo 1 e no tempo 2 foi suficiente para diminuir significativamente ($p < 0,05$) a atividade metabólica de *C. albicans*, sendo então considerada uma concentração eficiente para reduzir essa.

Pandolfi e *et al.* (2019) discutem o fato de *Lactobacillus* spp. serem capazes de reduzir a proliferação de *C. albicans*, diminuindo assim sua atividade metabólica. Além disso, no tempo 1 de crescimento, *L. casei* inicia sua fase de proliferação, consequentemente, está preparado para aumentar seu número de células, enquanto *C. albicans* está entrando em sua fase estacionária neste mesmo tempo devido a isso, *L. casei* pode expressar fatores de crescimento maiores, competindo assim com *C. albicans* por nutrientes e até mesmo, por espaço (PANDOLFI *et al.*, 2019). Aarti e *et al.* (2018) demonstraram que *L. crispatus*, *L. vaginalis* e *L. pentosus* são capazes de impedir a adesão de *C. albicans*, além de reduzir sua proliferação devido à competição por nutrientes, exibindo assim, atividade probiótica contra *C. albicans*.

Tabela 1- Médias dos valores de atividade metabólica da interação de *C. albicans* em estado planctônico ao *L. casei*, em diferentes tempos e concentrações.

Tratamento**	Atividade Metabólica
Controle <i>C. albicans</i>	0,745*
5x10 ⁵ tempo 1	0,479
5x10 ⁶ tempo 1	0,455*
5x10 ⁷ tempo 1	0,496*
5x10 ⁵ tempo 2	0,625
5x10 ⁶ tempo 2	0,403*
5x10 ⁷ tempo 2	0,446*
5x10 ⁵ tempo 3	0,799
5x10 ⁶ tempo 3	0,825
5x10 ⁷ tempo 3	0,684

Fonte: Do autor

Nota: *valores diferem estatisticamente entre si, expressados por Teste de Tukey p<0,05.

** Tratamento: Adição de *L. casei* em estado planctônico em diferentes concentrações e três tempos distintos. Tempo 1: *L. casei* adicionado no momento de incubação, tempo 2: *L. casei* adicionado durante a fase exponencial. Tempo 3: *L. casei* adicionado na fase estacionária. Leitura realizada por redução de sal de tetrazólio XTT após 24h de incubação. Controle *C. albicans*: *C. albicans* não exposta ao *L. casei*.

5.3 INTERAÇÃO DE *L. casei* A *C. krusei* EM ESTADO PLANCTÔNICO

Interação de *C. krusei* ao *L. casei* em estado planctônico foram conduzidos conforme item 4.5.

Tempo 1 e tempo 2 foram escolhidos nesse teste devido ao fato do tempo de crescimento de *C. krusei* se diferenciar, após 24h de incubação, células planctônicas de *C. krusei* perdem estabilidade e passam a reduzir sua atividade metabólica (GÓMEZ-GAVIRIA; MORA-MONTES, 2019), portanto, definiu-se somente tempo 1 e tempo 2 para este teste, para que o tempo de vida de *C. krusei* não interferisse no resultado.

A tabela 2 apresenta as médias de densidade óptica encontradas no teste de redução do sal de tetrázólio XTT da exposição de *C. krusei* ao *L. casei*.

Todos os tratamentos foram capazes de diminuir significativamente ($p < 0,05$) a atividade metabólica de *C. krusei*. Em estudo realizado por Salari, Seddighi e Almani (2018) espécies de *Lactobacillus* spp. foram capazes de diminuir a formação de hifas de *C. krusei*. Sugere-se que *L. casei* possua essa capacidade, que pode ser devido ao fato de produzir metabólitos extracelulares, como o ácido láctico, como observado em outras espécies de *Lactobacillus* spp.. A formação de hifas em *C. krusei* contribui para a sua absorção de nutrientes (RICETO *et al.*, 2015), sendo assim, a interação entre *C. krusei* e *L. casei* pode ter ocasionado a diminuição na formação de hifas, consequentemente a redução na absorção de nutrientes por *C. krusei* e como resultado, a atenuação da atividade metabólica.

Tabela 2- Médias dos valores de atividade metabólica da interação de *L. casei* a *C. krusei* em Estado Planctônico em diferentes tempos e concentrações.

Tratamento**	Atividade Metabólica
Controle <i>C. krusei</i>	0,606*
5×10^5 tempo 1	0,223*
5×10^6 tempo 1	0,295*
5×10^7 tempo 1	0,435*
5×10^5 tempo 2	0,223*
5×10^6 tempo 2	0,232*
5×10^7 tempo 2	0,340*

Fonte: Do autor

Nota: *valores diferem estatisticamente entre si, expressados por Teste de Tukey $p < 0,05$.

**Tratamento: Adição de *L. casei* em estado planctônico em diferentes concentrações e dois tempos distintos. Tempo 1: *L. casei* adicionado no momento de incubação, tempo 2: *L. casei* adicionado durante a fase exponencial. Leitura realizada por redução de sal de tetrázólio XTT após 24h de incubação. Controle *C. krusei*: *C. krusei* não exposta ao *L. casei*.

5.4 INTERAÇÃO DE BIOFILME DE *C. albicans* AO *L. casei* PREVIAMENTE CULTIVADO EM ESTADO PLANCTÔNICO

Com o sentido de avaliar se células planctônicas de *L. casei* interferem no desenvolvimento de biofilme de *Candida* spp., células planctônicas de *L. casei* foram adicionadas aos biofilmes de *C. albicans* conforme descrito no item 4.7. Em seguida testes de atividade metabólica e biomassa foram realizados conforme item 4.11 e 4.12, respectivamente, após 48h de incubação.

A tabela 3 apresenta as médias obtidas a partir de teste de atividade metabólica e biomassa realizados. Nota-se que no tempo 3 na concentração 5×10^7 células mL⁻¹ obteve-se a menor média na atividade metabólica, 0,315, em comparação ao controle que apresentou média de atividade metabólica de 0,363. Enquanto as médias encontradas para biomassa, para o controle, foram de 0,346 e para a concentração citada anteriormente, também no tempo 3, de 0,279.

Tabela 3- Médias dos valores de atividade metabólica e biomassa realizados na interação de biofilme *C. albicans* ao *L. casei* previamente cultivado em estado planctônico.

Tratamento**	Atividade Metabólica	Biomassa
Controle <i>C. albicans</i>	0,363*	0,346*
Controle <i>L. casei</i>	-	0,239*
5×10^5 tempo 2	0,335	0,247*
5×10^6 tempo 2	0,380	0,558*
5×10^7 tempo 2	0,436	0,399*
5×10^5 tempo 3	0,362	0,859*
5×10^6 tempo 3	0,354	0,516*
5×10^7 tempo 3	0,315*	0,279*

Fonte: Do autor

Nota: *valores diferem estatisticamente entre si, expressados por Teste de Tukey $p < 0,05$.

** Ensaio: Adição de *L. casei* em estado planctônico em diferentes concentrações e dois tempos distintos. Tempo 2: *L. casei* adicionado durante a proliferação; Tempo 3: *L. casei* adicionado na fase de maturação. Leitura de Atividade Metabólica realizada por redução de sal de tetraxólio XTT, após 48h de incubação. Leitura

de Biomassa realizada com corante Cristal Violeta após 48h de incubação.
Controle *C. albicans*: *C. albicans* não exposta ao *L. casei*.

Observou-se que a adição de *L. casei* a 5×10^7 células mL⁻¹ no tempo 3 diminuiu significativamente ($p < 0,05$) a atividade metabólica em relação ao controle de *C. albicans*, também, nesse mesmo tratamento, a biomassa foi menor quando comparada ao controle, nesse caso não houve crescimento suficiente das células de *C. albicans*, devido, possivelmente, à competição por lactobacilos. Uma compreensão clara do mecanismo de redução da formação de biofilme de *C. albicans* é importante para concepção e desenvolvimento de novos medicamentos antimicrobianos e probióticos (RYBALCHENKO *et al.*, 2015). Em estudo realizado por Panariello e *et al.* (2021) foi possível identificar que, na presença de *L. casei*, biofilme de *C. albicans* reduziu significativamente o número de colônias. Em ensaio realizado por Parolin e *et al.* (2015), *L. crispatus*, *L. gasseri* e *L. vaginalis*, provenientes de mulheres saudáveis, reduziram significativamente a adesão de *C. albicans* por meio dos mecanismos de exclusão, competição e deslocamento. Existe a possibilidade de que *L. casei*, em nossas avaliações, apresente comportamento semelhante ao das espécies de lactobacilos citadas.

5.5 INTERAÇÃO DE BIOFILME DE *C. krusei* AO *L. casei* PREVIAMENTE CULTIVADO EM ESTADO PLANCTÔNICO

Células planctônicas de *L. casei* foram adicionadas aos biofilmes de *C. krusei* conforme descrito no item 4.7. Em seguida avaliação de atividade metabólica e teor de biomassa foram realizados conforme item 4.11 e 4.12, respectivamente, após 24 horas e 48 horas de incubação.

A tabela 4 apresenta as médias obtidas a partir dos testes de atividade metabólica e biomassa. O tempo 1 na concentração 5×10^7 células mL⁻¹ apresentou menor média estatisticamente significante ($p < 0,05$), 0,250, para atividade metabólica enquanto o controle de *C. albicans* foi de 0,303.

Tabela 4- Médias dos valores de atividade metabólica e biomassa** obtidos na interação de biofilme de *C. krusei* aos isolados de *L. casei* em diferentes tempos e concentrações.

Tratamento	Leitura em 24h		Leitura em 48h	
	Atividade Metabólica	Biomassa	Atividade Metabólica	Biomassa
Controle <i>C. albicans</i>	0,303 ^a	0,186	0,274	0,402 ^a
Controle <i>L. casei</i>	-	0,192	-	0,439
5x10 ⁵ tempo 1	0,278	0,182	0,272	0,468 ^b
5x10 ⁶ tempo 1	0,287	0,160	0,285	0,601 ^b
5x10 ⁷ tempo 1	0,250 ^b	0,193	0,257	0,557 ^b
5x10 ⁵ tempo 2	0,271	0,155	0,287	0,536 ^b
5x10 ⁶ tempo 2	0,279	0,153	0,277	0,536 ^b
5x10 ⁷ tempo 2	0,258	0,151	0,271	0,449 ^b
5x10 ⁷ tempo 3	-	-	0,273	0,713 ^b

Fonte: Do autor

Nota: ^a^b Letras diferentes expressam diferença estatística, expressos por teste Tukey (p>0,05).

** Tratamento: Adição de *L. casei* em estado planctônico em diferentes concentrações e três tempos distintos. Tempo 1: *L. casei* adicionado no momento de incubação; Tempo 2: *L. casei* adicionado durante a proliferação; Tempo 3: *L. casei* adicionado na fase de maturação. Leitura de atividade metabólica realizada por redução de sal de tretazólio XTT e, leitura de Biomassa realizada com corante Cristal Violeta, após 24 horas e após 48h de incubação.

Percebe-se que no tratamento de 5x10⁷ células mL⁻¹ no tempo 1 houve redução da atividade metabólica significativa estatisticamente (p<0,05) em comparação ao controle de *C. albicans*. Nota-se que a biomassa teve resultados que se diferenciaram estatisticamente (p<0,05) entre si, portanto, é possível concluir que as células de *C. krusei* tiveram sua atividade metabólica prejudicada pela interação com *L. casei* e isso pode ser devido à liberação de metabólitos por *L. casei* e na redução da formação de

hifas e blastoconídios (SONG; LEE, 2017). Contudo, percebe-se que nas outras concentrações/tempo já não houve redução significativa da atividade metabólica, como observado na leitura após 24h, ao contrário, houve aumento da atividade metabólica, exceto na concentração 5×10^5 células mL^{-1} no tempo 1, que se manteve semelhante ao controle, isso pode ser pela menor quantidade de células de *L. casei* adicionadas (5×10^5 células mL^{-1}), sendo que *L. casei* pode não ter se desenvolvido totalmente, o que mostra diferença no tempo 1, é possível concluir que *L. casei* 5×10^5 células mL^{-1} adicionado no tempo 1 não resistiu ao tempo, enquanto o *L. casei* adicionado no tempo 2 manteve seu crescimento.

A partir dessas observações, tendo a concentração de 5×10^7 células mL^{-1} considerada a com maior potencial de interrupção de atividade metabólica de *C. krusei*, sugeriu-se adicionar *L. casei* nessa concentração em biofilme formado de *C. krusei* (24 horas de crescimento) com o objetivo de compreender se *L. casei* interferiria na colonização de *C. krusei* e assim, interromperia a fase de maturação. Foi possível observar que *L. casei* 5×10^7 células mL^{-1} adicionado após 24 horas em biofilme formado de *C. krusei*, não interfere em sua atividade metabólica, já que não houve diferença significativa ($p < 0,05$). Podemos concluir que, *L. casei* na concentração de 5×10^7 células mL^{-1} adicionado imediatamente com *C. krusei* e no tempo 1 tem a capacidade de diminuir sua atividade metabólica.

É possível observar que o teor de biomassa das interações com *L. casei* foram maiores quando comparadas ao controle de *C. krusei*. Com isso, é possível concluir que ambas as células, *L. casei* e *C. krusei* estavam presentes, a redução na atividade metabólica pode ser justificada pela ação de *L. casei* às células *C. krusei*, possivelmente causadas por liberação de metabólitos por *L. casei*. Aarti e *et al.* (2018) investigaram características probióticas, anti-*Candida* e antibiofilme de *L. pentosus*. *L. pentosus* apresentou atividade anti-*Candida* sendo capaz tanto de reduzir quanto inibir a formação do biofilme. Esta atividade está relacionada pela propriedade anti-adesão de *L. pentosus*. Além disso, *L. pentosus* reduziu a viabilidade de *Candida* spp. Esta atividade anti-*Candida* de *L. pentosus* está relacionada à secreção de compostos bioativos e componentes do isolado que são capazes de inibir a filamentação de *Candida* spp. (AARTI *et al.*, 2018).

5.6 INTERAÇÃO DE BIOFILME DE *C. albicans* COM BIOFILME PRÉ-FORMADO DE *L. casei*

Para investigar se biofilme de *L. casei* interfere no desenvolvimento de biofilme de *Candida* spp., exposição de biofilme de *Candida* spp. às células sésseis de *L. casei* foram conduzidos conforme item 4.9. A tabela 5 apresenta as médias dos valores de atividade metabólica e biomassa obtidos na interação de biofilme de *C. albicans* e biofilme pré-formado de *L. casei*. Em relação ao controle de *C. albicans* que apresentou média de 0,356 para atividade metabólica e 0,250 para biomassa, o tratamento no tempo 2 com *L. casei* exibiu média na atividade metabólica de 0,302 e 0,703 de média para biomassa.

Tabela 5- Médias dos valores de Atividade Metabólica e Biomassa** obtidos na Interação de Biofilme de *C. albicans* com Biofilme Pré-Formado de *L. casei*.

Tratamento**	Atividade Metabólica	Biomassa
Controle <i>C. albicans</i>	0,356*	0,250 ^a
Controle <i>L. casei</i>	-	0,239 ^a
Tempo 2	0,302*	0,703 ^b

Fonte: Do autor

Nota: *Valores diferem estatisticamente entre si, expressados por Teste de Tukey $p < 0,05$

^{ab} Valores diferem estatisticamente entre si, expressados por Teste de Tukey $p < 0,05$

** Tratamento: Exposição de biofilme de *C. albicans* ao biofilme pré-formado de *L. casei* Tempo 2: *L. casei* adicionado durante a proliferação do biofilme. Leitura de atividade metabólica realizada por redução de sal de tretazólio XTT e, leitura de Biomassa realizada com corante Cristal Violeta, após 24 horas de incubação.

Foi observado que a interação de *C. albicans* com o biofilme pré-formado de *L. casei* diminuiu estatisticamente ($p < 0,05$) a atividade metabólica de *C. albicans*. Houve diferença significativa estatisticamente ($p < 0,05$) entre a biomassa do controle de *C. albicans* e a interação com *L. casei*, na qual as células em interação obtiveram maior biomassa. Observa-se que a biomassa foi maior devido ao maior número de células adicionadas (*L. casei* + *C. albicans*). Atividade metabólica foi reduzida, sugere-se que *L. casei* possa ter causado perturbação no desenvolvimento de *C. albicans*, devido a

diminuição da atividade metabólica observada e o aumento da biomassa quando em comparação ao controle. *L. casei* pode fornecer tanto medidas preventivas quanto efeitos terapêuticos relacionadas à formação de biofilme em superfície resinosas acrílicas (SONG; LEE, 2017), Rybalchenko e *et al.* (2015) identificaram atividade anti-biofilme em *L. fermentum* e observaram que essa atividade foi devido à redução do crescimento e do desenvolvimento de biofilmes de *C. albicans* ocasionado pela destruição da parede celular e do citoplasma por formação de poros transitórios na membrana citoplasmática, essa atividade pode estar também relacionada ao *L. casei* e justificar a sua atividade anti-biofilme observada. Assim como nesse estudo, Panariello e *et al.* (2021) também identificaram aumento da biomassa de biofilmes mistos de *C. albicans* e *L. casei*.

5.7 INTERAÇÃO DE BIOFILME DE *C. krusei* COM BIOFILME PRÉ-FORMADO DE *L. casei*

Exposição de biofilme de *Candida* spp. às células sésseis de *L. casei* foram conduzidos conforme item 4.9. Em seguida, testes de Atividade Metabólica e biomassa foram realizados conforme item 4.11 e 4.12, respectivamente.

Conforme apresentados na tabela 6, a média da biomassa no tratamento realizado no tempo 2 foi de 0,511 enquanto no controle foi estatisticamente menor ($p < 0,05$), de 0,176. Em relação à atividade metabólica, o controle apresentou média de 0,373 e o tratamento com *L. casei* no tempo 2 de 0,298.

Tabela 6- Médias dos valores de Atividade Metabólica e Biomassa** obtidos na Interação de Biofilme de *C. krusei* com Biofilme Pré-Formado de *L. casei*

Tratamento	Atividade Metabólica	Biomassa
Controle <i>C. krusei</i>	0,373*	0,176 ^a
Controle <i>L. casei</i>	-	0,239 ^a
Tempo 2	0,298*	0,511 ^b

Fonte: Do autor

Nota: *Valores diferem estatisticamente entre si, expressados por Teste de Tukey $p < 0,05$

^{ab} Valores diferem estatisticamente entre si, expressados por Teste de Tukey $p < 0,05$

**Tratamento: Tempo 2: *L. casei* adicionado na fase de proliferação do biofilme.

Leitura de atividade metabólica realizada por redução de sal de tretazólio XTT e, leitura de Biomassa realizada com corante Cristal Violeta, após 24 horas de incubação.

Observou-se redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$). da atividade metabólica, em relação ao controle de *C. krusei* após a adição do biofilme pré-formado de *L. casei*. Observou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre biomassa do controle de biofilme de *C. krusei* e o biofilme associado a *L. casei*. A biomassa do biofilme associado a *L. casei* é maior quando comparada ao controle de *C. krusei*. Com isso, sugere-se que, há maior quantidade de células devido à associação do biofilme, e que devido à diminuição na atividade metabólica, sugere-se que as células de *C. krusei* tiveram sua atividade metabólica reduzida devido à ação de *L. casei*, fator que pode estar associado à liberação de metabólitos por *L. casei* como o ácido lático (ALLONSIUS *et al.*, 2019). Rossoni e *et al.* (2018) mostraram que *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum* atuaram na diminuição da formação de biofilme de *C. albicans* ATCC 18804 reduzindo o número de células, inibindo formação de hifas e desestabilizando o arco do biofilme, esses efeitos também ocorreram quando apenas o sobrenadante de cepas de *Lactobacillus* spp. foi adicionado ao biofilme, sugerindo que as cepas de *Lactobacillus* spp. podem produzir ácidos ou exometabólitos capazes de inibir o crescimento de *C. albicans*, sugere-se que o mesmo possa ocorrer com *C. krusei*.

5.8 INTERAÇÃO DE BIOFILME DE *C. albicans* COM BIOFILME *L. casei*

Como obtivemos resultados dentre os quais foi possível identificar que *L. casei* reduziu a atividade metabólica de *C. albicans* e, sendo *C. albicans* a espécie mais prevalente e responsável por candidíases, como descrito no item 2.2., foi proposta a exposição de biofilme de *C. albicans* ao biofilme já formado de *L. casei*. O ensaio foi conduzido conforme descrito no item 4.10.

Os resultados, conforme tabela 7, apresentam a média dos valores de atividade metabólica e biomassa. Observa-se que no tempo 2 a média foi de 0,284 para atividade metabólica e 0,467 para biomassa enquanto no tempo 1 a média para atividade metabólica foi de 0,330 e 0,419 para biomassa, em comparação com o controle que apresentou média de 0,372 para atividade metabólica e 0,344 para biomassa, a atividade metabólica no tempo 2 foi significativamente menor ($p < 0,05$).

Tabela 7- Médias dos valores de Atividade Metabólica e Biomassa** realizados na Interação de Biofilme de *C. albicans* ao Biofilme de *L. casei*.

Tratamento	Atividade Metabólica	Biomassa
Controle <i>C. albicans</i>	0,372*	0,344 ^a
Controle <i>L. casei</i>	-	0,329 ^a
Tempo 1	0,330	0,419 ^b
Tempo 2	0,284*	0,467 ^b

Fonte: Do autor

Nota: *Valores diferem estatisticamente entre si, expressados por Teste de Tukey $p < 0,05$

^{ab} Valores diferem estatisticamente entre si, expressados por Teste de Tukey $p < 0,05$

**Tratamento: Tempo 1: *L. casei* adicionado no momento de incubação, tempo 2: *L. casei* adicionado na fase de proliferação. Leitura de atividade metabólica realizada por redução de sal de tretazólio XTT e, leitura de Biomassa realizada com corante Cristal Violeta, após 24 horas de incubação.

Observou-se que, em comparação ao controle, *L. casei* adicionado no tempo 2 reduziu significativamente ($p < 0,05$) a atividade metabólica de *C. albicans*. Sugere-se que as células sésseis de *L. casei* impediram a adesão das células de *C. albicans*, que pode ser devido à competição por espaço, isso justifica a diminuição da atividade

metabólica no momento de formação. James e *et al.* (2016) realizaram testes de interação entre *L. plantarum* e *L. helveticus* e observaram que essa interação reduziu a habilidade de adesão de *C. albicans*, devido à inibição do gene *ECE1* de *C. albicans*, no caso da interação entre o *L. casei* e *C. albicans* sugere-se que algo semelhante possa ter ocorrido. Além disso, é possível observar que as células de *L. casei* estão sujeitas a impedir que células de *C. albicans*, já aderidas, passem para a próxima fase de formação de biofilme, a maturação, isso pode ser devido competição por nutrientes no ambiente, à liberação de metabólitos por *L. casei*, ou até mesmo a limitação de espaço (MAILÄNDER-SÁNCHEZ *et al.*, 2017). Mailander-Sánchez e *et al.* (2017) identificaram que na presença de *L. rhamnosus*, *C. albicans* apresenta mudanças no metabolismo, além disso, *C. albicans* indica efeitos na indução de genes que estão envolvidos no catabolismo de ácidos graxos, ciclo do glioxilato e gliconeogênese e na supressão de genes que contribuem para glicólise e biossíntese de ergosterol.

Em relação à biomassa foi observado que no tempo 1 e no tempo 2 o valor foi maior quando comparado ao controle, isso pode ser justificado pela adição de maior quantidade de células em comparação ao controle, *L. casei* + *C. albicans*, enquanto o controle possui somente células de *C. albicans*. Podemos constatar que os valores de biomassa foram maiores quando houve a adição de *L. casei*, mas houve uma redução na atividade metabólica de *C. albicans*, isso pode ser explicado pela ação de *L. casei* sobre *C. albicans*, principalmente devido à ação de metabólitos como o ácido D-lático, L-lático e ácido lático produzido por *L. casei* (ALLONSIUS *et al.*, 2019). O ácido lático produzido por lactobacilos são capazes de inibir o crescimento de *C. albicans*. (ALLONSIUS *et al.*, 2019).

Células em biofilme exibem maior resistência às ações do sistema imune do hospedeiro (ALLONSIUS *et al.*, 2019), além disso, são capazes de aumentar sua sobrevivência através do aumento da absorção de nutrientes, rápida colonização e alta resistência a antibióticos (BASMACIYAN *et al.*, 2019). As células sésseis de *L. casei* foram capazes de diminuir a atividade metabólica de *C. albicans*, isso pode ter ocorrido devido ao fato das células em biofilme exibirem maior capacidade de sobrevivência expressando fatores capazes de inibir a atividade metabólica de *C. albicans* (BASMACIYAN *et al.*, 2019).

5.9 SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE BIOFILME DE *Candida spp.* EM INTERAÇÃO AO *L. casei*

Com o intuito de determinar a sensibilidade antifúngica de biofilmes de *Candida spp.* após contato com *L. casei*, sensibilidade antifúngica foi determinada usando a metodologia CLSI M27-A2 de acordo com as diretrizes do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (*Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI*) e com modificações para biofilme, como descrito no item 4.13.

Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) encontrados estão expressos na tabela 8. Nota-se que a CIM de fluconazol para *C. krusei* e *C. albicans* foi de 1024 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Autores apresentam que espécies de *Candida spp.*, que incluem *C. krusei* ATCC 6258 e *C. albicans* 10231, em estado de biofilme, são resistentes ao fluconazol, apresentando CIM iguais ou superiores a 1024 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (MALCHIKOVA; KLYASOVA, 2021; RAUT *et al.*, 2017). Resultado semelhante foi encontrado nesse trabalho.

Em estado planctônico, *C. krusei* ATCC 6258 apresenta resistência ao fluconazol, quando exibem CIM a partir de concentrações maiores que 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (CLSI, 2012; ARENDRUP *et al.*, 2020). Alguns autores demonstram CIM para *C. krusei* entre 32-64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (PFALLER *et al.*, 2020). Enquanto em outros trabalhos realizados a partir de amostras de *C. krusei* coletadas de pacientes, CIM para fluconazol foi superior ou igual a 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *C. krusei* em estado planctônico (MALCHIKOVA; KLYASOVA, 2021). Entretanto, em estado de biofilme, são intrinsecamente resistentes ao fluconazol podendo apresentar sensibilidade em concentrações maiores que 1024 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (MALCHIKOVA; KLYASOVA, 2021; RAUT *et al.*, 2017).

Células planctônicas de *C. albicans* exibem CIM de 0.125-0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ao fluconazol (MALCHIKOVA; KLYASOVA, 2021; ZHANG *et al.*, 2020). Contudo em estado de biofilme, *C. albicans* é resistente (BASSYOUNI *et al.*, 2019; MALCHIKOVA; KLYASOVA, 2021). Testes realizados por Bassyouni e *et al.* (2019), com biofilmes de *C. albicans* ATCC 10231, mostraram que os biofilmes de *C. albicans* são resistentes ao fluconazol. Estudos apontam que, em estado de biofilme, *C. albicans* passa a apresentar sensibilidade ao fluconazol em concentrações maiores que 1024 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (MALCHIKOVA; KLYASOVA, 2021).

Tabela 8- Valores de Concentração Inibitória Mínima (em $\mu\text{g mL}^{-1}$) de Fluconazol e *L. casei* sobre biofilmes de *C. albicans* e *C. krusei*

	Fluconazol	Fluconazol + <i>L. casei</i> 5×10^7	Fluconazol + <i>L. casei</i> 5×10^5	Fluconazol + <i>L. casei</i> 5×10^6
<i>C. albicans</i>	1024	64	-	-
<i>C. krusei</i>	1024	256	-	-

Nota: μ Valores expressos em células mL^{-1}

- Não houve atividade antifúngica

Um dos principais problemas na terapia antimicrobiana é a resistência a agentes quimioterápicos existente com subsequente falha do tratamento. Nos últimos anos tem-se observado aumento nos índices de resistência a antifúngicos por espécies não *albicans* de *Candida* spp. (BASSYOUNI *et al.*, 2019). A incidência de infecções causadas por estas espécies, incluindo *C. krusei* está emergindo. Além disso, essas leveduras são capazes de formar biofilmes, fato associado a maiores probabilidades de estas espécies apresentarem-se resistentes aos antifúngicos, dentre eles o fluconazol. *C. albicans*, em estado planctônico, apresenta sensibilidade ao fluconazol, entretanto, em estado de biofilme, essa levedura apresenta resistência (ZHANG *et al.*, 2020). Portanto, existe a necessidade de desenvolver novas estratégias terapêuticas para combater as infecções causadas por esses patógenos oportunistas. Uma dessas abordagens é por meio de terapias combinadas com outros compostos como proposto por Jamiu e *et al.* em 2021 e acrescentamos aqui a possibilidade de terapias combinadas entre antifúngicos e outros microrganismos tal como a proposição e resultados obtidos em nossa pesquisa.

A partir dos resultados anteriores desse trabalho, foi possível considerar que *L. casei* reduz a habilidade metabólica de *Candida* spp.. Em vista disso, procurou-se compreender se *L. casei* atuaria de forma sinérgica com fluconazol, ampliando assim, a ação desse antifúngico contra biofilmes de *C. albicans* e *C. krusei*.

Na tabela 8, estão apresentados os resultados de CIM para fluconazol e *L. casei* contra biofilmes de *C. albicans* e *C. krusei*. Observa-se que a CIM de fluconazol

combinado às células de *L. casei* na concentração de 5×10^7 células mL^{-1} para biofilmes de *C. albicans* foi de 64 ug ml^{-1} e com redução de 50% do biofilme de *C. albicans*. As demais concentrações de *L. casei*, *L. casei* 5×10^5 células mL^{-1} e *L. casei* 5×10^6 células mL^{-1} , combinados ao antifúngico, não tiveram ação contra biofilmes de *C. albicans*.

Nota-se que CIM para fluconazol combinado às células de *L. casei* na concentração de 5×10^7 células mL^{-1} para biofilmes de *C. krusei* foi de 256 ug ml^{-1} , com redução de 50% de biofilme de *C. krusei*. As demais concentrações de *L. casei*, *L. casei* 5×10^6 células mL^{-1} e *L. casei* 5×10^5 células mL^{-1} , combinados ao antifúngico, não tiveram ação contra biofilmes de *C. krusei*.

Em comparação à ação isolada de fluconazol, é possível constatar que houve sinergismo entre o antifúngico e as células de *L. casei*, visto que, ao combinar ambos, biofilmes de *Candida* spp. tiveram seu crescimento reduzido.

A resposta de *C. albicans* ao fluconazol é influenciada por Eed1p, uma proteína crítica para a manutenção do crescimento das hifas (ARKOWITZ; BASSILANA, 2019). Além disso, genes reguladores e responsáveis pela resistência exibida em *C. albicans* têm sido altamente expressos e identificados por diversos autores. (ARKOWITZ; BASSILANA, 2019; WALL *et al.*, 2019). Matsuda e *et al.* (2018) revelaram espécies de *Lactobacillus* como, *L. gasseri* e *L. crispatus*, espécies predominantes na microbiota de mulheres saudáveis, como sendo responsáveis pela supressão da expressão de genes responsáveis pelo processo de desenvolvimento de biofilme como *HWPI*, *ECE1*, *ALS3*, *BCR1*, *EFG1*, *TEC1* e *CPHI*, inibindo assim, a formação de biofilme de *C. albicans*, sugere-se que *L. casei* tenha apresentado habilidades semelhantes. Rossoni e *et al.* (2018a) mostraram que *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum* possuem atividade probiótica, e são capazes de diminuir a formação de biofilme de *C. albicans* através da redução do número de células e da desestabilização da produção de vesículas extracelulares, responsáveis pelo transporte de macromoléculas que, por sua vez, são encarregadas de transportar moléculas pertencentes à matriz extracelular do biofilme de *C. albicans* (ZARNOWSKI *et al.*, 2018). *L. casei* interferiu na atividade metabólica de *C. albicans*, levando à diminuição da mesma, e apresentou sinergismo com o antifúngico testado, isso pode ser devido ao fato de possuir a capacidade de liberar metabólitos, entretanto, para confirmação desta hipótese, faz-se necessário a realização de estudos posteriores referentes à identificação quantitativa e qualitativa de tais produtos liberados por *L. casei*.

Candida krusei é resistente ao fluconazol em estado planctônico, conseqüentemente em biofilme (SALARI; SEDDIGHI; ALMANI, 2018). Devido ao fato de *C. krusei* ser capaz de produzir aspartil proteinases, fosfolipases, hemolisinas, e capaz de desenvolver biofilmes, a espécie está associada a elevado potencial de letalidade em situações de processos infecciosos (ORTEGA-RIVEROS *et al.*, 2017). Autores apresentam espécies de *Lactobacillus* como tendo ação profilática contra *C. krusei* em estado planctônico, como *L. rhamnosus* (SANTOS *et al.*, 2019). Kunyeit e *et al.* (2019) apresentaram espécies de *Lactobacillus* como sendo responsáveis pela inibição da adesão de *C. krusei*, entretanto esses autores não identificaram sinergismo entre *Lactobacillus* e antifúngicos. Algumas espécies de *Lactobacillus* são capazes de produzirem ácido láctico, o que auxilia na sua ação contra *C. krusei*, devido ao fato do ácido láctico promover alterações no pH extracelular (HALM *et al.*, 2014).

6 CONCLUSÕES

Em relação às condições de crescimento e a formação de biofilme misto, foi possível desenvolver um método de crescimento misto entre as espécies estudadas. Foi elucidado o desenvolvimento de *L. casei* em interação com *C. albicans* e *C. krusei*. Foi executável a formação de biofilme de *L. casei* e biofilme misto entre diferentes reinos. Este trabalho possibilitou a construção de um método eficaz de formação de biofilme misto de *L. casei* e *C. albicans* e *L. casei* e *C. krusei*.

No que diz respeito à avaliação da interação entre *L. casei* e as espécies de *Candida* estudadas, em estado planctônico, *L. casei*, a partir da concentração de 5×10^6 células mL^{-1} foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,05$) a atividade metabólica de células planctônicas de *C. albicans* adicionados no momento de incubação e durante a fase exponencial. Também *L. casei*, em estado planctônico, foi capaz de diminuir a atividade metabólica de células planctônicas *C. krusei* a partir da concentração de 5×10^5 células mL^{-1} .

Quanto à investigação da influência de células planctônicas de *L. casei* sobre biofilme de *Candida* spp., a adição de células planctônicas de *L. casei* ao biofilme de *C. albicans* na fase de maturação, a partir da concentração de 5×10^7 células mL^{-1} , reduziu significativamente ($p < 0,05$) a atividade metabólica de *C. albicans*, também *L. casei* reduziu significativamente ($p < 0,05$) a atividade metabólica de biofilme de *C. krusei* a partir da sua adição no momento de incubação na concentração de 5×10^7 células mL^{-1} .

No que se refere à ação de biofilme pré-formado de *L. casei* em *Candida* spp., acréscimo de biofilme pré-formado de *L. casei* foi capaz de diminuir significativamente ($p < 0,05$) a atividade metabólica de biofilme de *C. albicans* e também de biofilme de *C. krusei*. Em questão de biofilme de *L. casei* em interação com biofilme de *C. albicans*, biofilme de *L. casei* foi capaz de diminuir significativamente ($p < 0,05$) a atividade metabólica de biofilme de *C. albicans*, quando adicionado na fase de proliferação.

Com respeito à biomassa dos biofilmes mistos formados, foi possível identificar que *L. casei* é capaz de formar biofilmes mistos com *Candida* spp..

Biofilme de *Candida* spp. apresentou resistência ao antifúngico fluconazol, com valor de CIM de $1024 \mu\text{g mL}^{-1}$. O valor desta CIM foi reduzido quando houve a interação do antifúngico fluconazol com *L. casei* 5×10^7 células mL^{-1} , sendo que CIM para biofilme de *C. albicans* foi de $64 \mu\text{g mL}^{-1}$ e CIM de biofilme de *C. krusei* foi de

256 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Por fim, biofilme de *C. albicans* e *C. krusei* não foram afetados pelo antifúngico fluconazol na interação com *L. casei* 5×10^5 e 5×10^6 células mL^{-1} .

Em resposta aos objetivos desse trabalho, podemos concluir que foi possível o desenvolvimento de biofilmes mistos de *Candida* spp. e *L. casei*. *L. casei* interfere no crescimento planctônico e no desenvolvimento de biofilmes de *Candida* spp.. Também, *L. casei* e fluconazol atuam sinergicamente contra biofilmes de *Candida* spp., esse foi o primeiro relato na literatura de tal atividade sinérgica entre *L. casei* e fluconazol contra biofilmes de *Candida* spp..

Para completar, *L. casei* interfere na atividade metabólica de células planctônicas e biofilme de *C. albicans* e *C. krusei* além de mostrar capacidade em reduzir a resistência a monodrogas.

Esses resultados demonstram as possibilidades de interações entre espécies fúngica e bacteriana, simulando muitas vezes, o que pode estar a ocorrer no contexto do microbioma humano. Infecções por espécies de *Candida* têm se tornado cada vez mais frequentes, principalmente em meios hospitalares e clínicos. O aparecimento, cada vez mais constante de espécies não-*albicans* resistentes aos antifúngicos existentes e responsáveis por candidíases locais e candidíases invasivas, trazem preocupações para a saúde pública além de estarem inclusas em debates e trabalhos científicos com maior constância. Ademais, cada vez mais espécies de *Candida* têm expressado fatores associados à virulência, o que impede a ação dos antifúngicos atuais, além de confundir a resposta do sistema imunológico. A preocupação em desenvolver medidas naturais e eficientes contra *Candida* spp. do meio farmacêutico e científico têm avançado cada vez mais. Sendo assim, visa a importância de trabalhos como esse que apresentam medidas alternativas ao tratamento de infecções causadas por *Candida* spp. Aqui apresentamos *L. casei* como uma ação preservativa ao tratamento de infecções causadas por *C. albicans* e *C. krusei*. A partir dos resultados desse trabalho, podemos considerar *L. casei* um potencial probiótico que atua como protetor do microbioma, capaz de formar biofilmes mistos com *C. albicans* e *C. krusei*, e, também um auxiliar na terapêutica antifúngica. Contudo, trabalhos futuros onde se possam compreender quais mecanismos estão envolvidos na redução da atividade metabólica observada em *L. casei* são relevantes. Além de estudos pós-ter, onde exista a possibilidade de se relacionar os fatores associados à interação entre *L. casei* e fluconazol. Também ensaios onde há a possibilidade de compreender a ação probiótica de *L. casei* são pertinentes.

O conhecimento destes prováveis mecanismos naturais de interação e controle do crescimento de uma espécie frente à outra, mostra-se como uma ferramenta altamente promissora principalmente no que se refere à profilaxia e tratamento de infecções associadas à *Candida* spp.

REFERÊNCIAS

- ALLONSIUS, C. N. *et al.* Inhibition of *Candida albicans* morphogenesis by chitinase from *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Scientific reports**, [S.I.], v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.
- ALONSO, M. F. *et al.* Macrophage migration is impaired within *Candida albicans* biofilms. **Journal of Fungi**, [S.I.], v. 3, n. 3, p. 31, 2017.
- ARENDRUP, M. C.; JØRGENSEN, K. M.. Manogepix (APX001A) displays potent in vitro activity against human pathogenic yeast, but with an unexpected correlation to fluconazole MICs. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [S.I.], v. 64, n. 7, p. e00429-20, 2020.
- ARKOWITZ, R. A.; BASSILANA, M.. Recent advances in understanding *Candida albicans* hyphal growth. **F1000Research**, [S.I.], v. 8, 2019.
- ATCC. Disponível em: <https://www.atcc.org>.. Acesso em: Julho. 2021.
- BANDARA, H. M. H. N.; PANDUWAWALA, C. P.; SAMARANAYAKE, L. P.. Biodiversity of the human oral mycobiome in health and disease. **Oral diseases**, [S.I.], v. 25, n. 2, p. 363-371, 2019.
- BASMACIYAN, L. *et al.* *Candida albicans* interactions with the host: crossing the intestinal epithelial barrier. **Tissue Barriers**, [S.I.], v. 7, n. 2, p. 1612661, 2019.
- BASSYOUNI, Rasha H. *et al.* Fennel oil: A promising antifungal agent against biofilm forming fluconazole resistant *Candida albicans* causing vulvovaginal candidiasis. **Journal of Herbal Medicine**, [S.I.], v. 15, p. 100227, 2019.
- BERKOW, E.L.; LOCKHART, S. R. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. **Infection and drug resistance**, [S.I.], v. 10, p. 237, 2017.
- BLANKENSHIP, J. R.; MITCHELL, A. P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Current opinion in microbiology**, [S.I.], v. 9, n. 6, p. 588-594, 2006.
- BÖHRINGER, M. *et al.* *Candida albicans* infection leads to barrier breakdown and a MAPK/NF- κ B mediated stress response in the intestinal epithelial cell line C2BBel. **Cellular microbiology**, [S.I.], v. 18, n. 7, p. 889-904, 2016.
- BORGES, S.; SILVA, J.; TEIXEIRA, P.. The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. **Archives of gynecology and obstetrics**, [S.I.], v. 289, n. 3, p. 479-489, 2014.
- BRANDÃO, H. N. *et al.* Fitoterapia no tratamento da candidíase oral: Um protocolo de revisão de escopo. **Research, Society and Development**, [S.I.], v. 10, n. 7, p. e35010716653-e35010716653, 2021.
- BROWN, A.JP *et al.* Metabolism impacts upon *Candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. **Trends in microbiology**, [S.I.], v. 22, n. 11, p. 614-622, 2014.
- BROWN, G. D. *et al.* Hidden killers: human fungal infections. **Science translational medicine**, [S.I.], v. 4, n. 165, p. 165rv13-165rv13, 2012.
- BROWN, L. *et al.* Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. **Nature Reviews Microbiology**, [S.I.], v. 13, n. 10, p. 620-630, 2015.

- BULGASEM; HUDA-FAUJAN; LANI. Effect of pH, heat treatment and enzymes on the antifungal activity of lactic acid bacteria against *Candida* species. 2017.
- CHEN, H. *et al.* Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S.I.], v. 101, n. 14, p. 5048-5052, 2004.
- CHO, T. *et al.* Quorum sensing and morphological regulation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. **Journal of Oral Biosciences**, [S.I.], v. 52, n. 3, p. 233-239, 2010.
- CHRISTENSEN, G. D. *et al.* Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **Journal of clinical microbiology**, [S.I.], v. 22, n. 6, p. 996-1006, 1985.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement; CLSI document M27-S4 (ISBN 1-56238-863-0). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2012.
- CUBAS-CANO, E.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; TOMÁS-PEJÓ, E. Evolutionary engineering of *Lactobacillus pentosus* improves lactic acid productivity from xylose-rich media at low pH. **Bioresource technology**, [S.I.], v. 288, p. 121540, 2019.
- DALLE, F. *et al.* Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. **Cellular microbiology**, [S.I.], v. 12, n. 2, p. 248-271, 2010.
- DEVEAU, A.; HOGAN, D. A. Linking quorum sensing regulation and biofilm formation by *Candida albicans*. In: **Quorum Sensing**. [S.I.], Humana Press, 2011. p. 219-233.
- FAN, D. *et al.* Activation of HIF-1 α and LL-37 by commensal bacteria inhibits *Candida albicans* colonization. **Nature medicine**, [S.I.], v. 21, n. 7, p. 808-814, 2015.
- FERNANDES, R. A. *et al.* Biofilm formation by *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* in the presence of farnesol: a quantitative evaluation. **Biofouling**, [S.I.], v. 32, n. 3, p. 329-338, 2016.
- GARCÍA, C. *et al.* The human gut microbial metabolome modulates fungal growth via the TOR signaling pathway. **MSphere**, [S.I.], v. 2, n. 6, p. e00555-17, 2017.
- GILBERT, J. A. *et al.* Current understanding of the human microbiome. **Nature medicine**, [S.I.], v. 24, n. 4, p. 392-400, 2018.
- GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, Terezinha Inez Estivalet. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [S.I.], v. 46, p. 225-234, 2010.
- GÓMEZ-GAVIRIA, M.; MORA-MONTES, H. M. Current aspects in the biology, pathogeny, and treatment of *Candida krusei*, a neglected fungal pathogen. **Infection and Drug Resistance**, [S.I.], v. 13, p. 1673, 2020.
- GONG, J. *et al.* Genetic differentiation, diversity, and drug susceptibility of *Candida krusei*. **Frontiers in microbiology**, [S.I.], v. 9, p. 2717, 2018.
- HAGEE, D. *et al.* Genomic clustering within functionally related gene families in Ascomycota fungi. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [S.I.], 2020.

HALM, M. *et al.* Lactic acid tolerance determined by measurement of intracellular pH of single cells of *Candida krusei* and *Saccharomyces cerevisiae* isolated from fermented maize dough. **International journal of food microbiology**, [S.I.], v. 94, n. 1, p. 97-103, 2004.

HANSEN, C.. **Nossas cepas probióticas**. Disponível em: <https://www.chr-hansen.com/pt/human-health-and-probiotics/our-probiotic-strains/l-casei>. Acesso em: 22 dez. 2021.

HAUTALA, T. *et al.* A cluster of *Candida krusei* infections in a haematological unit. **BMC infectious Diseases**, [S.I.], v. 7, n. 1, p. 1-8, 2007.

HE, J. *et al.* The oral microbiome diversity and its relation to human diseases. **Folia microbiologica**, [S.I.], v. 60, n. 1, p. 69-80, 2015.

HIMEDIA. **Tryptone Yeast Extract Broth (ISP Medium No. 1)**. Disponível em: <https://himedialabs.com/TD/M356.pdf>. Acesso em: 29 fev. 2020.

HORNBY, J. M. *et al.* Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. **Applied and environmental microbiology**, [S.I.], v. 67, n. 7, p. 2982-2992, 2001.

HUTTENHOWER, C. *et al.* Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **nature**, v. 486, n. 7402, p. 207, 2012.

JAMIU, A. T. *et al.* Inhibitory effect of polyunsaturated fatty acids alone or in combination with fluconazole on *Candida krusei* biofilms in vitro and in *Caenorhabditis elegans*. **Medical Mycology**, [S.I.], v. 59, n. 12, p. 1225-1237, 2021.

JARAMILLO, L. A. *et al.* Avaliação Das Condições De Crescimento, Fermentação E Componentes Do Meio Para Produção De Acido D (-) Lático Mediante Fermentação Por *Lactobacillus coryniformis* sp. *torquens*. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, [S.I.], v. 1, n. 2, p. 2662-2669, 2015.

JUAN, T.; FÜRTHAUER, M.. Biogenesis and function of ESCRT-dependent extracellular vesicles. In: *Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press, 2018. p. 66-77.

KAUFFMAN, C. A. Diagnosis and management of fungal urinary tract infection. **Infectious Disease Clinics**, [S.I.], v. 28, n. 1, p. 61-74, 2014.

KAUR, H. *et al.* Prolonged outbreak of *Candida krusei* candidemia in pediatric ward of tertiary care hospital. **Mycopathologia**, [S.I.], v. 185, n. 2, p. 257-268, 2020.

KAVANAUGH, N. L. *et al.* Mucins suppress virulence traits of *Candida albicans*. **MBio**, [S.I.], v. 5, n. 6, p. e01911-14, 2014.

KERNIEN, J. F.; JOHNSON, C. J.; NETT, J. E. Conserved inhibition of neutrophil extracellular trap release by clinical *Candida albicans* biofilms. **Journal of Fungi**, [S.I.], v. 3, n. 3, p. 49, 2017.

KHALIFA, H. O. *et al.* Prevalence of Antifungal Resistance, Genetic Basis of Acquired Azole and Echinocandin Resistance, and Genotyping of *Candida krusei* recovered from an International Collection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. AAC. 01856-21, 2021.

KRANEVELD, E. A. *et al.* A relação entre a carga oral de *Candida* e os perfis do microbioma bacteriano em idosos holandeses. 2012.

- KUNYEIT, L. *et al.* Probiotic yeasts inhibit virulence of non-albicans Candida species. **MBio**, [S.I.], v. 10, n. 5, p. e02307-19, 2019.
- LEUNG, K. C. M. *et al.* Sjögren's syndrome sufferers have increased oral yeast levels despite regular dental care. **Oral diseases**, [S.I.], v. 14, n. 2, p. 163-173, 2008.
- MACPHERSON, S. *et al.* Candida albicans zinc cluster protein Upc2p confers resistance to antifungal drugs and is an activator of ergosterol biosynthetic genes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [S.I.], v. 49, n. 5, p. 1745-1752, 2005.
- MAILÄNDER-SÁNCHEZ, D. *et al.* Antifungal defense of probiotic Lactobacillus rhamnosus GG is mediated by blocking adhesion and nutrient depletion. **PLoS One**, [S.I.], v. 12, n. 10, p. e0184438, 2017.
- MAJITHIYA, J. *et al.* Efficacy of isavuconazole, voriconazole and fluconazole in temporarily neutropenic murine models of disseminated Candida tropicalis and Candida krusei. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.I.], v. 63, n. 1, p. 161-166, 2009.
- MALCHIKOVA, A. O.; KLYASOVA, G. A.. In vitro activity of anidulafungin, caspofungin, fluconazole and amphotericin B against biofilms and planktonic forms of Candida species isolated from blood culture in patients with hematological malignancies. **Journal of Medical Mycology**, [S.I.], p. 101162, 2021.
- MAN, J. C.; ROGOSA, de M; SHARPE, M. E.. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of applied Bacteriology**, [S.I.], v. 23, n. 1, p. 130-135, 1960.
- MARSHALL, Kevin C. Planktonic versus sessile life of prokaryotes. **The prokaryotes**, [S.I.], v. 2, p. 3-15, 2006.
- MARTINS, A. F.. Efeito da Rosiglitazona e do GQ-16, agonista total e parcial de PPAR γ , sobre a viabilidade de linhagem celular de feocromocitoma. 2017.
- MARTINS, C. M.. Seiva Sangue de Dragão (Croton lechleri) como meio de estocagem de dentes avulsionados: estudo in vitro da viabilidade celular. 2013.
- MARTINS, N. *et al.* Candidiasis: predisposing factors, prevention, diagnosis and alternative treatment. **Mycopathologia**, [S.I.], v. 177, n. 5, p. 223-240, 2014.
- MATSUBARA, V. H. *et al.* Probiotic lactobacilli inhibit early stages of Candida albicans biofilm development by reducing their growth, cell adhesion, and filamentation. **Applied microbiology and biotechnology**, [S.I.], v. 100, n. 14, p. 6415-6426, 2016.
- MATSUDA, Y. *et al.* Culture supernatants of Lactobacillus gasseri and L. crispatus inhibit Candida albicans biofilm formation and adhesion to HeLa cells. **Mycopathologia**, [S.I.], v. 183, n. 4, p. 691-700, 2018.
- MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B.. Candida albicans pathogenicity mechanisms. **Virulence**, [S.I.], v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.
- MELETIADIS, J. *et al.* Colorimetric assay for antifungal susceptibility testing of Aspergillus species. **Journal of clinical microbiology**, [S.I.], v. 39, n. 9, p. 3402-3408, 2001.

- MELO *et al.*, C.AL. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. **Med Mycol.** [S.I.], v. 49 ,n.3, p. 253-62, 2011.
- MOHAJERI, M. H. *et al.* The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications. **European journal of nutrition**, [S.I.], v. 57, n. 1, p. 1-14, 2018.
- NISHIMURA, S. *et al.* Factors associated with esophageal candidiasis and its endoscopic severity in the era of antiretroviral therapy. **PLoS One**, [S.I.], v. 8, n. 3, p. e58217, 2013.
- NEWMAN, R.. Almost There. *In*: ROSE, A. N.. **The princess and the frog**. Disney Music, 2009.
- NUNEZ, I. N. *et al.* Lactobacillus casei CRL 431 administration decreases inflammatory cytokines in a diet-induced obese mouse model. **Nutrition**, [S.I.], v. 31, n. 7-8, p. 1000-1007, 2015.
- O'HANLON, D. E.; COME, R. A.; MOENCH, T. R. Vaginal pH measured in vivo: lactobacilli determine pH and lactic acid concentration. **BMC microbiology**, [S.I.], v. 19, n. 1, p. 1-8, 2019.
- OEVER, J. T.; NETEA, M. G. The bacteriome–mycobiome interaction and antifungal host defense. **European journal of immunology**, [S.I.], v. 44, n. 11, p. 3182-3191, 2014.
- OLIVEIRA, N. M. de. Influência da utilização de adesivos para prótese na adesão e formação de biofilme simples e misto. 2018.
- OLIVER, J. C. *et al.* *Candida* spp. and phagocytosis: multiples evasion mechanisms. **Antonie van Leeuwenhoek**, [S.I.], p. 1-15, 2019.
- ORTEGA-RIVEROS, M. *et al.* Usefulness of the non-conventional *Caenorhabditis elegans* model to assess *Candida* virulence. **Mycopathologia**, [S.I.], v. 182, n. 9, p. 785-795, 2017.
- PANARIELLO, B. HD *et al.* Lactobacillus casei reduces the extracellular matrix components of fluconazole-susceptible *Candida albicans* biofilms. **Biofouling**, [S.I.], p. 1-16, 2021.
- PAROLIN, C. *et al.* Isolation of vaginal lactobacilli and characterization of anti-*Candida* activity. **PloS one**, [S.I.], v. 10, n. 6, p. e0131220, 2015.
- PEREIRA, V. G.; GOMEZ, R. J.. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, [S.I.], p. 229-239, 2007.
- PFALLER, M. A. *et al.* Activity of a long-acting echinocandin, rezafungin, and comparator antifungal agents tested against contemporary invasive fungal isolates (SENTRY Program, 2016 to 2018). **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [S.I.], v. 64, n. 4, p. e00099-20, 2020.
- PIERCE, C. G. *et al.* Antifungal therapy with an emphasis on biofilms. **Current opinion in pharmacology**, [S.I.], v. 13, n. 5, p. 726-730, 2013.
- PIERCE, C. G. *et al.* The *Candida albicans* biofilm matrix: composition, structure and function. **Journal of Fungi**, [S.I.], v. 3, n. 1, p. 14, 2017.

POUPET, C. *et al.* Lactobacillus rhamnosus Lcr35 as an effective treatment for preventing Candida albicans infection in the invertebrate model Caenorhabditis elegans: First mechanistic insights. **PLoS One**, [S.I.], v. 14, n. 11, p. e0216184, 2019.

RAUT, J. S. *et al.* Activity of allyl isothiocyanate and its synergy with fluconazole against Candida albicans biofilms. **Journal of microbiology and biotechnology**, [S.I.], v. 27, n. 4, p. 685-693, 2017.

RAMAGE, G. *et al.* Characteristics of biofilm formation by Candida albicans. **Revista iberoamericana de micología**, [S.I.], v. 18, n. 4, p. 163-170, 2001.

RICARDO, E. *et al.* Mechanisms of acquired in vivo and in vitro resistance to voriconazole by Candida krusei following exposure to suboptimal drug concentration. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [S.I.], v. 64, n. 4, p. e01651-19, 2020.

RICETO, E. B. de M. *et al.* Enzymatic and hemolytic activity in different Candida species. **Revista iberoamericana de micología**, [S.I.], v. 32, n. 2, p. 79-82, 2015.

RICHARDSON, J. P. *et al.* Candidalysin drives epithelial signaling, neutrophil recruitment, and immunopathology at the vaginal mucosa. **Infection and immunity**, [S.I.], v. 86, n. 2, p. e00645-17, 2018.

ROLLENHAGEN, C. *et al.* Stimulation of cell motility and expression of late markers of differentiation in human oral keratinocytes by Candida albicans. **Cellular microbiology**, [S.I.], v. 11, n. 6, p. 946-966, 2009.

ROSSI, T. de *et al.* Interações entre Candida albicans e Hospedeiro. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, [S.I.], v. 32, n. 1, p. 15-28, 2011.

ROSSONI, R. D. *et al.* Antifungal activity of clinical Lactobacillus strains against Candida albicans biofilms: identification of potential probiotic candidates to prevent oral candidiasis. **Biofouling**, [S.I.], v. 34, n. 2, p. 212-225, 2018a.

ROSSONI, R. D. *et al.* Clinical strains of Lactobacillus reduce the filamentation of Candida albicans and protect Galleria mellonella against experimental candidiasis. **Folia microbiologica**, [S.I.], v. 63, n. 3, p. 307-314, 2018b.

RUMBAUGH, K. P.; SAUER, Karin. Biofilm dispersion. **Nature Reviews Microbiology**, [S.I.], v. 18, n. 10, p. 571-586, 2020.

SACHIVKINA, N.; PODOPRIGORA, I.; BOKOV, D.. Morphological characteristics of Candida albicans, Candida krusei, Candida guilliermondii, and Candida glabrata biofilms, and response to farnesol. **Veterinary World**, [S.I.], v. 14, n. 6, p. 1608, 2021.

SALARI, S.; SEDDIGHI, N. S.; ALMANI, P. G. N.. Evaluation of biofilm formation ability in different Candida strains and anti-biofilm effects of Fe₃O₄-NPs compared with Fluconazole: an in vitro study. **Journal de mycologie medicale**, [S.I.], v. 28, n. 1, p. 23-28, 2018.

SALVATORI, O. *et al.* Innate immunity and saliva in Candida albicans-mediated oral diseases. **Journal of dental research**, [S.I.], v. 95, n. 4, p. 365-371, 2016.

SANDAI, D. *et al.* Resistance of Candida albicans Biofilms to Drugs and the Host Immune System. **Jundishapur Microbiology**. [S.I.], v. 9, n. 11, 2016.

- SANGLARD, D.. Mechanisms of drug resistance in *Candida albicans*. In: **Candida albicans: Cellular and Molecular Biology**. Springer, Cham, 2017. p. 287-311.
- SANTOS, R. B. *et al.* Lactobacillus species increase the survival of *Galleria mellonella* infected with *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* clinical isolates. **Medical mycology**, [S.I.], v. 57, n. 3, p. 391-394, 2019.
- SARDI, J. C. O. *et al.* *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of medical microbiology**, v. 62, n. 1, p. 10-24, 2013.
- SCHUSTER, M. G. *et al.* Risk factors and outcomes of *Candida krusei* bloodstream infection: a matched, case-control study. **Journal of Infection**, [S.I.], v. 66, n. 3, p. 278-284, 2013.
- SEBAA, S.; BOUCHERIT-OTMANI, Z.; COURTOIS, P.. Effects of tyrosol and farnesol on *Candida albicans* biofilm. **Molecular medicine reports**, [S.I.], v. 19, n. 4, p. 3201-3209, 2019.
- SHARMA, Y.; CHUMBER, S. K.; KAUR, M.. Studying the prevalence, species distribution, and detection of in vitro production of phospholipase from *Candida* isolated from cases of invasive candidiasis. **Journal of global infectious diseases**, [S.I.], v. 9, n. 1, p. 8, 2017.
- SHERRINGTON, S. L. *et al.* Adaptation of *Candida albicans* to environmental pH induces cell wall remodelling and enhances innate immune recognition. **PLoS pathogens**, [S.I.], v. 13, n. 5, p. e1006403, 2017.
- SILVA, A. M. da *et al.* Relações entre a câmara de Neubauer a espectrofotometria utilizadas para a determinação da concentração espermática de catetos (Pecari tajacu). **Ciência Rural**, [S.I.], v. 44, p. 1494-1498, 2014.
- SILVA, S. *et al.* *Candida* species biofilms' antifungal resistance. **Journal of Fungi**, [S.I.], v. 3, n. 1, p. 8, 2017.
- SILVA, W. J. da *et al.* Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. **Brazilian dental journal**, [S.I.], v. 19, p. 364-369, 2008.
- SUDBERY, P.; GOW, N.; BERMAN, J.. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. **Trends in microbiology**, [S.I.], v. 12, n. 7, p. 317-324, 2004.
- TAVAKOLI, M. *et al.* Upregulation of the ERG11 gene in *Candida krusei* by azoles. **Daru: journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences**, [S.I.], v. 18, n. 4, p. 276, 2010.
- TSUI, C.; KONG, E. F.; JABRA-RIZK, M. A.. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. **Pathogens and disease**, [S.I.], v. 74, n. 4, 2016.
- UNDERHILL, D. M.; ILIEV, I. D. The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. **Nature Reviews Immunology**, [S.I.], v. 14, n. 6, p. 405-416, 2014.
- VYLKOVA, S.; LORENZ, M. C.. Modulation of phagosomal pH by *Candida albicans* promotes hyphal morphogenesis and requires Stp2p, a regulator of amino acid transport. **PLoS pathogens**, [S.I.], v. 10, n. 3, p. e1003995, 2014.

WÄCHTLER, B. *et al.* From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. **PloS one**, [S.I.], v. 6, n. 2, p. e17046, 2011.

WALL, G. *et al.* *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. **Current opinion in microbiology**, [S.I.], v. 52, p. 1-6, 2019.

WANG, S. *et al.* Antimicrobial compounds produced by vaginal *Lactobacillus crispatus* are able to strongly inhibit *Candida albicans* growth, hyphal formation and regulate virulence-related gene expressions. **Frontiers in microbiology**, [S.I.], v. 8, p. 564, 2017.

WESTBROOK, S. D. *et al.* *Candida krusei* sepsis secondary to oral colonization in a hemopoietic stem cell transplant recipient. **Medical mycology**, [S.I.], v. 45, n. 2, p. 187-190, 2007.

WIEDERHOLD, N. P.. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. **Infection and drug resistance**, [S.I.], v. 10, p. 249, 2017.

WIESNER, S. M. *et al.* Adherence of yeast and filamentous forms of *Candida albicans* to cultured enterocytes. **Critical care medicine**, [S.I.], v. 30, n. 3, p. 677-683, 2002.

XU, Z. *et al.* Crystal violet and XTT assays on *Staphylococcus aureus* biofilm quantification. **Current microbiology**, [S.I.], v. 73, n. 4, p. 474-482, 2016.

ZANGL, I. *et al.* The role of *Lactobacillus* species in the control of *Candida* via biotrophic interactions. **Microbial Cell**, [S.I.], v. 7, n. 1, p. 1, 2020.

ZARNOWSKI, R. *et al.* *Candida albicans* biofilm–induced vesicles confer drug resistance through matrix biogenesis. **PLoS biology**, [S.I.], v. 16, n. 10, p. e2006872, 2018.

ZHANG, M. *et al.* Antifungal activity of ribavirin used alone or in combination with fluconazole against *Candida albicans* is mediated by reduced virulence. **International journal of antimicrobial agents**, [S.I.], v. 55, n. 1, p. 105804, 2020.

APÊNDICE A- MEIO EXTRATO DE TRIPTONA E LEVEDURA (TYE)

Composição

Ingredientes:

Peptona de Carne 5.0 g

Extrato de Levedura 3.0 g

Glicose 10.0 g

Água Destilada 1.0L

pH Final: 7.0±2

(HIMEDIA, 2020)

Apêndice B- Meio Man Rogosa Sharpe (MRS)

Peptona Bacteriológica de Carne	10.0 g
Pó de Extrato de Carne	10.0 g
Extrato de Levedura	5.0 g
Glicose	20.0 g
Acetato de Sódio	5.0 g
Tween 20	1.0 g
Fosfato de Potássio	2.0 g
Fosfato de Amônio Monobásico	2.0 g
Sulfato de Magésio	0,1 g
Sulfato de Manganês	0,05 g
Água Destilada	1L

pH Final: 6.3±2

Man; Rogosa; Sharpe (1960) com modificações de Costa e *et al.* (2011)

Anexo A

Figura 15- Anexo A



Technical Data

Tryptone Yeast Extract Broth (ISP Medium No. 1)

M356

Intended Use:

A general purpose enrichment medium for not particularly fastidious microorganisms.

Composition**

Ingredients	Gms / Litre
Tryptone	5.000
Yeast extract	3.000
Final pH (at 25°C)	7.0±0.2

**Formula adjusted, standardized to suit performance parameters

Directions:

Suspend 8.0 grams in 1000 ml purified / distilled water. Heat if necessary to dissolve the medium completely. Dispense into tubes or flasks or as desired and sterilize by autoclaving at 15 lbs pressure (121°C) for 15 minutes.

Principle And Interpretation

Tryptone Yeast Extract Broth is formulated as per International Streptomyces Project (4). Tryptone and yeast extract provide nitrogenous compounds, carbon, sulphur, vitamin B complex and trace elements, necessary for bacterial metabolism. With added carbohydrate and a pH indicator, it can also be used for fermentation studies.

Inoculate the tubes with the test organism and incubate at 30°C ± 2°C for upto 96 hours. Inoculate ISP Medium No. 2 (M424) or ISP Medium No. 4 (M359) with the test organisms by placing approximately 0.1 ml of the inoculum near the edge of the plate. Five parallel streaks across the plate are made from this 0.1 ml of inoculum followed by four perpendicular streaks. Incubate the plates. ISP Medium No. 1 is used as an enrichment medium for *Streptomyces* species.

Type of specimen

Food samples

Specimen Collection and Handling:

For food samples, follow appropriate techniques for sample collection and processing as per guidelines (3). After use, contaminated materials must be sterilized by autoclaving before discarding.

Warning and Precautions :

Read the label before opening the container. Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/ face protection. Follow good microbiological lab practices while handling specimens and culture. Standard precautions as per established guidelines should be followed while handling specimens. Safety guidelines may be referred in individual safety data sheets.

Limitations :

1. Further biochemical tests must be carried out for confirmation.

Performance and Evaluation

Performance of the medium is expected when used as per the direction on the label within the expiry period when stored at recommended temperature.

Quality Control

Appearance

Cream to yellow homogeneous free flowing powder

Colour and Clarity of prepared medium

Light amber coloured clear solution without any precipitate

Reaction

Reaction of 0.8% w/v aqueous solution at 25°C. pH : 7.0±0.2

pH

6.80-7.20

Cultural Response

Cultural characteristics observed after an incubation at 28-32°C for upto 4 days.

Organism

Growth

Please refer disclaimer Overleaf.

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (00013*)	luxuriant
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC 25923 (00034*)	luxuriant
<i>Streptomyces lavendulae</i> ATCC 8664	luxuriant
<i>Streptomyces albus</i> subsp. <i>albus</i> ATCC 3004	luxuriant

* Corresponding WDCM numbers

Storage and Shelf Life

Store between 10-30°C in a tightly closed container and the prepared medium at 15-25°C. Use before expiry date on the label. On opening, product should be properly stored dry, after tightly capping the bottle in order to prevent lump formation due to the hygroscopic nature of the product. Improper storage of the product may lead to lump formation. Store in dry ventilated area protected from extremes of temperature and sources of ignition. Seal the container tightly after use. Product performance is best if used within stated expiry period.

Disposal

User must ensure safe disposal by autoclaving and/or incineration of used or unusable preparations of this product. Follow established laboratory procedures in disposing of infectious materials and material that comes into contact with sample must be decontaminated and disposed of in accordance with current laboratory techniques (1,2).

Reference

1. Isenberg, H.D. Clinical Microbiology Procedures Handbook 2nd Edition.
2. Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A., Carroll, K.C., Funke, G., Landry, M.L., Richter, S.S and Tenover, D.W. (2015) Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition. Vol. 1.
3. Salfinger Y., and Tortorello M.L. Fifth (Ed.), 2015. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, American Public Health Association, Washington, D.C.
4. Shering E.B. and Gotlieb.,1966, International J. Systemic Bacteriol., 16:3.

Revision : 01 / 2020

Disclaimer :

User must ensure suitability of the product(s) in their application prior to use. Products conform solely to the information contained in this and other related HiMedia™ publications. The information contained in this publication is based on our research and development work and is to the best of our knowledge true and accurate. HiMedia™ Laboratories Pvt Ltd reserves the right to make changes to specifications and information related to the products at any time. Products are not intended for human or animal or therapeutic use but for laboratory, diagnostic, research or further manufacturing use only, unless otherwise specified. Statements contained herein should not be considered as a warranty of any kind, expressed or implied, and no liability is accepted for infringement of any patents.

HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. Reg. office : 23, Vadhani Ind. Est., LBS Marg, Mumbai-400088, India. Customer care No.: 022-6116 9797 Corporate office : A-516, Swastik Doha Business Park, Via Vadhani Ind. Est., LBS Marg, Mumbai-400088, India. Customer care No.: 022-6147 1919 Email: techhelp@himedialabs.com Website: www.himedialabs.com