

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

BRUNA MACIEL DE ALENCAR

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA AÇÃO MICROBICIDA DE *LACTOBACILLUS* SPP. SOBRE  
*CANDIDA* SPP.

BRASÍLIA

2020

Bruna Maciel de Alencar

*AVALIAÇÃO IN VITRO DA AÇÃO MICROBICIDA DE LACTOBACILLUS SPP. SOBRE  
CANDIDA SPP.*

Defesa de Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

**Orientadora:** Profa Dra Yanna Karla de Medeiros Nobrega

**Co-orientadora:** Profa. Dra Rosane Mansan Almeida

Brasília

2020

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

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

MA368a Maciel de Alencar, Bruna  
AVALIAÇÃO IN VITRO DA AÇÃO MICROBICIDA DE LACTOBACILLUS  
SPP. SOBRE CANDIDA / Bruna Maciel de Alencar; orientador  
Yanna Karla de Medeiros Nobrega; co-orientador Rosane  
Mansan Almeida. -- Brasília, 2020.  
104 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências Farmacêuticas) -  
Universidade de Brasília, 2020.

1. Candidíase Vulvovaginal. 2. Candida. 3. Lactobacillus.  
4. antifúngico. I. Karla de Medeiros Nobrega, Yanna ,  
orient. II. Mansan Almeida, Rosane, co-orient. III. Título.

**Bruna Maciel de Alencar**

*AValiação IN VITRO DA AÇÃO MICROBICIDA DE LACTOBACILLUS SPP. SOBRE CANDIDA SPP.*

Defesa de Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 24 de novembro de 2020.

**Banca Examinadora**

---

Profa. Dra. Yanna Karla de Medeiros Nobrega – Universidade de Brasília  
Presidente - Membro Interno PPGCF

---

Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni- Universidade de Brasília  
Membro Interno PPGCF

---

Profa. Dra. Fabiana Brandão Alves Silva - Universidade de Brasília  
Membro Externo PPGCF

---

Profa. Dra. Simoni Campos Dias – Universidade Católica de Brasília  
Membro Externo UnB

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por permitir a realização desse sonho e ter mostrado soluções às adversidades vividas nos últimos anos. Finalizo essa etapa com minha fé fortalecida e tendo a certeza de que, para Ele, nada é impossível.

Agradeço à minha orientadora Professora Doutora Yanna Karla de Medeiros Nóbrega que me acolheu quando eu estava prestes a desistir do curso. Agradeço por ouvir minha história e me dizer: “É possível!”. Agradeço por ter acreditado em mim e me encorajado a seguir adiante. Gratidão por todos os ensinamentos teóricos, técnicos e da vida.

Agradeço à minha coorientadora Doutora Rosane Mansan pelos ensinamentos teóricos, técnicos e pela parceria na rotina do laboratório. Enfrentamos muitas dificuldades, mas foram amenizadas quando ela sugeria ótimas soluções. Gratidão por incríveis lembranças da rotina do laboratório.

Agradeço à Professora Doutora Fabiana Brandão Alves da Silva pelos ensinamentos teóricos e técnicos, por suas ideias e pelos contatos com outros laboratórios para viabilizar experimentos.

Agradeço às minhas orientadoras anteriores Silvana Nair Leite e Dayde Lane Mendonça da Silva que me proporcionaram a oportunidade de cursar os cursos de mestrado e doutorado. Agradeço pelos ensinamentos e apoio.

Agradeço à Universidade de Brasília pela oportunidade de cursar mestrado e doutorado na instituição, com ensino gratuito e de excelência.

Agradeço aos docentes do departamento de Farmácia que contribuíram torceram para que eu finalizasse o curso.

Agradeço aos técnicos da Universidade de Brasília: Carlos Ribeiro, Carolina Simioni, Clarisse Moraes, Gabriel Craesmeyer, Ívina Natalino, Jhones Dias, Júlia Müller, Luma de Lira, Patrícia Marques, Taynara Ferreira e Vanessa Campos pela parceria e apoio durante o curso.

Agradeço ao meu filho, Felipe, por toda a paciência e compreensão, quando muitas vezes não pude me dedicar às brincadeiras ou dedicar atenção como gostaria, mesmo aos finais de semana e feriados. Agradeço por ter se sacrificado em muitos momentos, mas creio que, em breve, colheremos frutos. Desejo ser motivo de inspiração e muito orgulho a ele.

Agradeço ao meu companheiro, Alexandre. Pela parceria, motivação, apoio emocional, carinho e paciência. Tantas abdições para apoiar-me nesta jornada. Muitas vezes, acolheu-

me quando estava no olho do furacão. Gratidão por acreditar em mim, todos os dias. Gratidão por acolher minhas preocupações, agústias e vibrar com minhas vitórias.

Agradeço à minha mãe, Yolanda, por torcer e orar muito para que eu superasse as dificuldades enfrentadas no curso e na vida pessoal. Agradeço por ter estado presente, superando as dificuldades de saúde e distância.

Agradeço ao meu pai, Tarcísio, e à minha família pelas orações, torcida e por acreditarem que eu realizaria esse sonho.

Agradeço às minhas amigas que torceram muito, riram e choraram comigo nesses anos. Foram momentos intensos, que vocês me mostraram que eu não estava sozinha. Agradeço por cada vez que se preocuparam comigo, tentaram encontrar soluções para me ajudar e entenderam minha ausência.

Agradeço aos psicólogos Lorena Nery, Marianna Braga e Victor Guevara e ao psiquiatra Flávio Vieira. Graças ao apoio e suporte consegui finalizar o curso. Estiveram ao meu lado quando mais precisei de apoio e discernimento, em situações extremamente difíceis. Estiveram comigo e não mediram esforços para cuidar de mim e do Felipe. A empatia demonstrada nos mostrou a importância do acolhimento e nos deu segurança para seguirmos adiante. Eu jamais poderei retribuir o que fizeram e ainda fazem por nós. Eu não estaria aqui se não fosse pela dedicação e apoio de vocês.

*“Só um humano pode curar outro humano.”*

*Jean Piaget*

## RESUMO

ALENCAR, Bruna Maciel de. AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA AÇÃO MICROBICIDA DE *LACTOBACILLUS* SPP. SOBRE *CANDIDA* SPP. Brasília, 2020. Defesa de Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

As infecções vulvovaginais representam importante parcela das infecções fúngicas, e são causadas, por leveduras do gênero *Candida*, quando são chamadas de candidíase vulvovaginal (CVV), um problema de importância global em saúde, que mesmo sem prevalência exata, possui uma estimativa de que 75% das mulheres adultas apresentam pelo menos um episódio ao longo de suas vidas. Alguns estudos comprovaram que determinadas cepas de *Lactobacillus* spp. inibem o crescimento de *Candida*, dificultam sua adesão às células epiteliais e são capazes de interferir negativamente na formação de tubos germinativos, hifas e de biofilmes por *C. albicans*, reduzindo a patogenicidade. A ação microbicida de *Lactobacillus* spp., é atribuída à sua presença predominante na microbiota de mulheres saudáveis e a secreção de substâncias por estes micro-organismos, o que despertou o interesse no desenvolvimento de uma pesquisa investigativa *in vitro* da ação microbicida de *Lactobacillus* spp. sobre *C. albicans* e *C. glabrata*, leveduras predominantes na CVV. A investigação da ação de *Lactobacillus* spp. pode auxiliar terapias de CVV, estratégias de proteção da microbiota vaginal e redução dos impactos causados à saúde. O objetivo foi investigar a atividade inibitória de *Lactobacillus* spp. sobre cepas de *C. albicans* e *C. glabrata* em modelo *in vitro*. Avaliou-se a atividade microbicida de cepas de *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. casei shirota*, *L. crispatus*, *L. johnsonii*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus* sobre as cepas de *C. albicans* e *C. glabrata*. por meio da contagem de Unidades Formadoras de Colônia (CFU/mL). Para avaliação da ação entre *Lactobacillus* spp. e *Candida* spp. sobre biofilme, cultivou-se cepas em lamínulas coradas pela técnica de Gram e avaliou-se em microscópio óptico. Para a análise da resistência às substâncias antifúngicas, realizou-se o teste MIC. Analisou-se as imagens microscópicas da interação entre cepas cocultivadas para a avaliação do efeito sobre a formação de hifas e biofilme. Os testes de avaliação da atividade microbicida por intermédio da contagem de CFU, a avaliação de MIC, a avaliação sobre a formação de hifas e a produção de biofilme sugerem que as interações entre *Lactobacillus* spp. e *Candida* spp. cultivados *in vitro* apresentam diferentes resultados, inclusive entre cepas de mesma espécie. A ação microbicida e a interferência na formação do biofilme sugerem que a ação inibitória está relacionada à presença de *Lactobacillus* spp. Apesar da limitação observada na ação do sobrenadante, estudos indicam que a concentração de metabólitos secretados pelos probióticos após cocultivo com as leveduras, está diretamente relacionada ao efeito antifúngico observado. É possível que a secreção de compostos como enzimas hidrolíticas pela cepa de *C. albicans* tenha afetado negativamente *Lactobacillus* spp. presentes neste cocultivo, reduzindo sua viabilidade. Os resultados indicam que *L. casei*, *L. crispatus*, *L. rhamnosus* sobre *C. albicans* e *C. glabrata* podem ser utilizadas como probióticos na prevenção de CVV. A atividade antimicrobiana de *Lactobacillus* spp. é cepa-específica. A ação sobre a formação de hifas está relacionada às substâncias metabólicas secretadas pelos *Lactobacillus* spp. Entretanto, a ação microbicida é mais significativa quando há presença do probiótico. A associação eficiente para o tratamento de CVV deve ser cuidadosamente avaliada por estudos que associem cepas probióticas com os patógenos a serem inibidos.

**Palavras-chave:** *Candida*, *Lactobacillus*, candidíase vulvovaginal, antifúngico

## ABSTRACT

ALENCAR, Bruna Maciel de. *IN VITRO* EVALUATION OF THE MICROBICIDAL ACTION OF *LACTOBACILLUS* SPP. STRAINS ON *CANDIDA* SPP. Brasília, 2020. Defense of Thesis (Doctorate in Pharmaceutical Sciences) - Faculty of Health Sciences, University of Brasilia, Brasilia, 2020.

Vulvovaginal infections represent an important part of fungal infections, and are caused, by yeasts of the genus *Candida*, when they are called vulvovaginal candidiasis (CVV), a problem of global importance in health, which even without exact prevalence, has an estimate that 75% of adult women experience at least one episode in their lifetime. Some studies have shown that certain strains of *Lactobacillus* spp. inhibit the growth of *Candida*, hinder its adhesion to epithelial cells and are able to interfere negatively in the formation of germ tubes, hyphae and biofilms by *C. albicans*, reducing pathogenicity. The microbicidal action of *Lactobacillus* spp., is attributed to its predominant presence in the microbiota of healthy women and the secretion of substances by these microorganisms, which aroused the interest in the development of an *in vitro* investigative research on the microbicidal action of *Lactobacillus* spp. on *C. albicans* and *C. glabrata*, yeasts prevalent in CVV. The investigation of the action of *Lactobacillus* spp. can assist VVC therapies, strategies to protect the vaginal microbiota and reduce health impacts. Objective: to investigate the inhibitory activity of *Lactobacillus* spp. on strains of *C. albicans* and *C. glabrata* in an *in vitro* model. Methodology: the microbicidal activity of *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. casei shirota*, *L. crispatus*, *L. johnsonii*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus* strains on *C. albicans* and *C. glabrata* strains were examined. The microbicidal activity of *Lactobacillus* spp. on the species of *Candida* spp. by counting CFU/mL. To evaluate the action between *Lactobacillus* spp. and *Candida* spp. on biofilm, strains were cultivated in coverslips stained by Gram's technique and evaluated under an optical microscope. For the analysis of the resistance to antifungal substances, the MIC test was performed. Microscopic images of the interaction between co-cultivated strains were analyzed to assess the effect on the formation of hyphae and biofilm. Results and Discussions: tests to assess microbicidal activity by counting CFU, evaluating MIC, evaluating hyphae formation and biofilm production showed that the interactions between *Lactobacillus* spp. and *Candida* spp. cultivated *in vitro* have different results, including between strains of the same species. The microbicidal action and the interference in the formation of the biofilm suggest that the inhibitory action is also related to the presence of the bacteria. Despite the limitation observed in the action of the supernatant, studies indicate that the concentration of metabolites secreted by probiotics is directly related to the observed antifungal effect. It is possible that the secretion of compounds as hydrolytic enzymes by the strain of *C. albicans* has negatively affected the bacteria, *Lactobacillus* spp. present in this coculture, reducing its viability. The present study observed that the effect of *L. casei*, *L. crispatus*, *L. rhamnosus* on *C. albicans* and *C. glabrata* suggests that these species can be used as probiotics in the prevention of VVC. Conclusion: The antimicrobial activity of *Lactobacillus* spp. it is strain-specific. The action on the formation of hyphae is related to the metabolic substances secreted by *Lactobacillus* spp. However, the microbicidal action is more significant when the probiotic is present. The efficient association for the treatment of VVC must be carefully evaluated by studies that associate probiotic strains with the pathogens to be inhibited.

**Keywords:** *Candida*, *Lactobacillus*, vulvovaginal candidiasis, antifungal.

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

Figura 1 – Etapas de formação do biofilme de <i>Candida</i> spp.	26
Figura 2 – Ilustração do Cocultivo: <i>Candida albicans</i> ATCC 90023 e <i>Lactobacillus crispatus</i>	40
Figura 3 – Ilustração do experimento MIC	43
Figura 4 – Contagem de CFU após cocultivo com <i>Lactobacillus acidophilus</i>	46
Figura 5 – Contagem de CFU após cocultivo com <i>Lactobacillus casei</i>	48
Figura 6 – Contagem de CFU após cocultivo com <i>Lactobacillus casei shirota</i>	50
Figura 7 – Contagem de CFU após cocultivo com <i>Lactobacillus crispatus</i>	52
Figura 8 – Contagem de CFU após cocultivo com <i>Lactobacillus johnsonii</i>	54
Figura 9 – Contagem de CFU após cocultivo com <i>Lactobacillus paracasei</i>	56
Figura 10 – Contagem de CFU após cocultivo com <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	58
Figura 11 – Imagens microscópicas (ampliação 40x) do cocultivo de <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. casei</i> e <i>L. casei shirota</i> com <i>Candida albicans</i> ATCC 90023 e IC 216	61
Figura 12 – Imagens microscópicas (ampliação 40x) do cocultivo de <i>Lactobacillus crispatus</i> , <i>L. johnsonii</i> e <i>L. paracasei</i> com <i>Candida albicans</i> ATCC 90023 e IC 216	63
Figura 13 – Imagens microscópicas (ampliação 40x) do cocultivo de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> e com <i>Candida albicans</i> ATCC 90023 com IC 216	65
Figura 14 – Imagens microscópicas (ampliação 40x) do cocultivo de <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. casei</i> e <i>L. casei shirota</i> com <i>Candida glabrata</i> ATCC 90030 e IC 15	66
Figura 15 – Imagens microscópicas (ampliação 40x) do cocultivo de <i>Lactobacillus crispatus</i> , <i>L. johnsonii</i> e <i>L. paracasei</i> com <i>Candida glabrata</i> ATCC 90030 e IC 15	68
Figura 16 – Imagens microscópicas (ampliação 40x) do cocultivo de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> com <i>Candida glabrata</i> ATCC 90030 e IC 15	70

- Figura 17 – Imagens microscópicas (ampliação 400x) da interação de *Candida albicans* com *Lactobacillus crispatus* após 24h de cocultivo 72
- Figura 18 – Imagens microscópicas (ampliação 400x) da interação de *Candida albicans* com *Lactobacillus crispatus* após 24h de cocultivo 74
- Figura 19 – Imagens microscópicas (ampliação 400x) da interação de *Candida albicans* com *Lactobacillus rhamnosus* após 24h de cocultivo 76

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Atividade microbicida de <i>Lactobacillus</i> sobre as cepas de <i>Candida</i> avaliadas	47
Tabela 2 – Avaliação do MIC dos antifúngicos sobre as cepas de <i>Candida</i> spp.	77
Tabela 3 – Avaliação do potencial inibitório mínimo de substâncias com ação antifúngica do sobrenadante de cultivo sobre as cepas de <i>Candida</i> spp.	78

**LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 – Grupos de micro-organismos analisados em cultivo e cocultivo	37
Quadro 2 – Grupos de micro-organismos analisados em cultivo e cocultivo (potencial inibitório mínimo)	41

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ATCC	<i>American Type Culture Colletion</i>
CFU	Unidade formadora de colônia
CLR	Lectina do tipo C
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
CVV	Candidíase vulvovaginal
CVVR	Candidíase vulvovaginal recorrente
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Óptica
DIU	Dispositivo Intrauterino
EPS	Substância Polimérica Extracelular
FS	Faculdade de Saúde
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HUB	Hospital Universitário de Brasília
IC	Isolado clínico
IF	Infecções Fúngicas
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight</i>
MBV	Microbiota vaginal
MIC	Concentração mínima inibitória
MRS	<i>Man, Rogosa e Sharpe</i>
RPMI	Meio de cultura <i>Memorial Institute Roswell Park</i>
SDA	Sabouraud Dextrose Sólido
SFB	Soro Fetal Bovino
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>

TTC	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
YM	<i>Yeast Malt</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1	Epidemiologia e relevância das infecções fúngicas .....	17
1.2	Infecções vulvovaginais e o gênero <i>Candida</i> . .....	17
1.3	Impacto da Candidíase vulvovaginal .....	18
1.4	<i>Candida</i> spp.: fatores de virulência e infecção. ....	21
1.5	Resistência a antifúngicos .....	26
1.6	Outras estratégias terapêuticas para tratamento da CVV .....	28
1.7	Microbiota vaginal e importância de <i>Lactobacillus</i> spp.....	30
1.8	Justificativa .....	32
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
2.1	Objetivo geral.....	33
2.2	Objetivos específicos.....	33
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>34</b>
3.1	Origem dos micro-organismos e aspectos éticos .....	34
3.2	Manutenção e cultivo de <i>Candida</i> spp. e <i>Lactobacillus</i> spp. ....	34
3.3	Preparo dos meios de cultura YM e MRS empregados para cultivo de micro-organismos .....	35
3.4	Método empregado para o cocultivo .....	36
3.5	Contagem de Unidades Formadoras Colônias (CFU).....	38
3.6	Ação de <i>Lactobacillus</i> spp. sobre biofilmes de <i>Candida</i> spp.....	39
3.7	Avaliação do potencial inibitório mínimo.....	40
3.8	Ensaio de interação entre cepas de <i>Candida albicans</i> , <i>Lactobacillus</i> spp. e solução sobrenadante de cultivo de <i>Lactobacillus</i> spp. para avaliação sobre a formação de hifas e a produção de biofilme .....	43
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
4.1	Avaliação da atividade microbicida de cepas de <i>Lactobacillus</i> sobre espécies de <i>Candida</i> spp. ....	45
4.2	Ação de <i>Lactobacillus</i> spp. sobre biofilme de <i>Candida</i> spp. ....	60
4.3	Ensaio de interação entre cepas de <i>Candida albicans</i> , <i>Lactobacillus</i> spp. e solução sobrenadante de cultivo de <i>Lactobacillus</i> spp. para avaliação sobre a formação de hifas e a produção de biofilme .....	71
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>90</b>
	<b>APÊNDICE</b> .....	<b>104</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Epidemiologia e relevância das infecções fúngicas

Fungos são micro-organismos eucariotos, sendo a vasta maioria saprofitas no ambiente. Entretanto, algumas espécies são causadores de doenças que abrangem desde infecções de pele, alergias a infecções sistêmicas.

Cerca de um bilhão de infecções de pele, mais de 100 milhões de infecções nas mucosas, 10 milhões de alergias graves e mais de um milhão de mortes anualmente, estão relacionadas a fungos. Mundialmente, a mortalidade por infecções fúngicas é maior do que por malária e câncer de mama. As taxas são semelhantes às encontradas em doenças como Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e tuberculose. Muito embora as estatísticas mundiais relacionadas essas infecções sejam alarmantes, as doenças fúngicas são sabidamente negligenciadas (CASADEVALL e PIROFSKI, 2003).

Quanto ao tipo de processo infeccioso, as infecções fúngicas (IF), também conhecidas como micoses, são classificadas em: superficiais (cutâneas, subcutâneas e mucosas) ou invasivas (profundas ou sistêmicas) (WEBB et al, 2018; ARENAS et al, 2012).

As IF superficiais são responsáveis pela alta prevalência global das micoses, sendo em alguns casos capazes de levar a estigmas no indivíduo acometido, como no caso das infecções vaginais discutidas adiante (WEBB et al, 2018; PFALLER e DIEKEMA, 2010). As IF Invasivas, por sua vez, podem acometer estruturas ósseas, órgãos, sangue e podendo disseminar causando infecções sistêmicas; neste caso estão associadas ao aumento da morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos ou hospitalizados. Nas últimas três décadas, as IF estão entre as principais causas de doenças nesses pacientes (WEBB et al, 2018; NEOFYTOS et al, 2009).

## 1.2 Infecções vulvovaginais e o gênero *Candida*.

As infecções vulvovaginais representam uma parcela importante das IF superficiais, especificamente aquelas associadas às mucosas (PAPON et al, 2013). Essas infecções são causadas, notadamente, por leveduras do gênero *Candida* (COLOMBO e GUIMARÃES; 2003), que pertencem ao reino Fungi, filo *Ascomycota*, classe *Saccharomycetes*, ordem *Saccharomycetales* e família *Saccharomycetaceae* (GUARRO, GENÉ e STCHIGEL, 1999).

O gênero *Candida* é amplo e engloba diferentes espécies, que apresentam diversidade nos atributos de virulência e na patogenicidade. As espécies mais frequentes nas infecções vulvovaginais são: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (PFALLER e DIEKEMA, 2010; SOBEL, 1993). Comumente, as leveduras do gênero *Candida* são encontrados como parte das microbiotas do trato digestivo e vaginal e, ocasionalmente, podem colonizar a pele. Em indivíduos imunocompetentes, normalmente não ocorre o crescimento excessivo e a invasão sistêmica (VALDERRAMA et al, 2018). Dessa forma, *Candida* spp. podem ser consideradas patógenos oportunistas que, em humanos, apresenta o trato digestivo e a mucosa vaginal como principais reservatórios (MATSUBARA, 2016).

A interação patógeno-hospedeiro do processo infeccioso resultante por *Candida* spp. é complexo e depende de um conjunto de fatores, como a expressão dos fatores de virulência das espécies, da condição imunitária do hospedeiro, e da relação com a microbiota presente no ambiente. Diferentes estudos apontam para o importante papel da microbiota vaginal, uma vez que, em situações onde o patógeno adquire vantagens, podendo causar infecções e sintomas, ocorre um processo denominado disbiose (desequilíbrio) dessa microbiota (BALDIM et al, 2012), favorecendo o desenvolvimento da candidíase (DELMONTE et al, 2017; BASSO et al, 2012; CAMARGO et al, 2008; SOBEL, 2007).

### **1.3 Impacto da Candidíase vulvovaginal**

A Candidíase Vulvovaginal (CVV) não é uma doença de notificação compulsória (BRASIL, 2020). Assim, a prevalência da CVV é baseada em pesquisas com metodologias e variáveis diversas, podendo não refletir a realidade para algumas populações (SOBEL, 1998).

Outro fator que torna desconhecida a prevalência real da CVV é a automedicação e o autodiagnóstico. É possível que algumas mulheres apresentem aumento da secreção vaginal, um dos critérios clínicos sugestivos de CVV, fisiológica e autolimitada, relacionada ao ciclo menstrual e interpretem este fato como recorrência da infecção por *Candida* spp. Tal interpretação pode favorecer ao autodiagnóstico e à automedicação, muitas vezes desnecessárias, uma vez que ao final do ciclo menstrual os sintomas desaparecem, e nestes casos a conduta terapêutica foi incorreta ou desnecessária, resultando em ocorrência de reações adversas e a seleção de micro-organismos resistentes aos antifúngicos (MUÑOZ et al, 2012; CIUDAD-REYNAUD, 2007).

Por outro lado, uma vez estabelecida a infecção, esta geralmente apresenta sintomas como prurido, ardor, dor, eritema, edema da vulva e da mucosa vaginal, por vezes com secreção

vaginal espessa e inodora, que podem ficar aderidas à superfície da mucosa (SOBEL, 1997; PETERS et al, 2014), e pode haver ainda leucorreia e placas esbranquiçadas aparentes na mucosa vaginal (ANDRIOLI, 2009). Durante o período pré-menstrual, é comum a intensificação dos sintomas, em virtude da alteração dos níveis hormonais e do pH vaginal (ECKERT, HAWES e STEVENS, 1998).

A CVV tem um relevante impacto sobre a qualidade de vida das mulheres (KANG et al, 2017; POSSER et al, 2015), e atinge 138 milhões de mulheres anualmente no mundo (DENNING et al, 2018), estigmatizando uma parcela significativa das mulheres infectadas, interferindo em relações sexuais e afetivas, devido ao grande desconforto causado pelos sintomas clínicos (WHO, 2013).

Um fator agravante a esse quadro é o elevado número de casos de infecções recorrentes (CVVR), muitas vezes relacionados a falha no tratamento e surgimento de linhagens resistentes de *Candida* spp. A prevalência da CVV e de CVV recorrente (CVVR) é superior em mulheres imunocomprometidas e em gestantes, principalmente durante o terceiro trimestre de gestação, devido ao elevado nível de progesterona e estrogênio (VARANO et al, 2019; AGUIN e SOBEL, 2015; REED, 1992). Nessas pacientes, é importante o diagnóstico precoce, tratamento e monitoramento da infecção para evitar complicações clínicas e episódios recorrentes (MITCHELL, 2004).

Um ponto que requer maior cuidado está relacionado ao grupo de gestantes colonizadas por *Candida* spp. Esse grupo apresenta maior risco de desenvolvimento de vaginite bacteriana (VB) (EGAN et al, 2008), risco de parto prematuro (EGAN et al, 2008) e de transmitir o fungo ao recém-nascido durante o parto vaginal (BLASCHKE-HELLMESSEN, 1998). Em recém-nascidos, a taxa de *C. albicans* oral é de 22 a 24 % (BLASCHKE-HELLMESSEN, 1998).

A CVV é considerada a segunda causa mais frequente de sintomas de vulvovaginite, após a vaginite bacteriana (SOBEL, 2007), embora existam cerca de 20 a 25 % das mulheres saudáveis e assintomáticas, que apresentam culturas vaginais positivas para leveduras do gênero *Candida* (SOBEL, 1993).

As leveduras presentes no intestino (reto) e na microbiota perianal retroalimentam a microbiota vaginal, devido à proximidade local. Relações sexuais também são fontes importantes de compartilhamento de leveduras, que colonizam a região vulvovaginal e, em situações de disbiose, vulnerabilidade ou imunocomprometimento, proliferam e expressam fatores de virulência, culminando com a invasão da mucosa e ocasionando a CVV sintomática (SOARES, VIEIRA-BAPTISTA e TAVARES, 2017; BALDIM et al, 2012; BARRENETXEA, 2002).

Para o desenvolvimento da CVV é importante o conhecimento dos fatores de risco relacionados ao hospedeiro, ou seja, às mulheres portadoras da infecção, e dos fatores relacionados ao patógeno, que são as espécies de *Candida* spp. associadas à infecção (GONÇALVES, 2015; SOBEL, 2016).

Entre os fatores de risco associados ao hospedeiro, podemos elencar, por exemplo, gestação (VARANO et al, 2019; AGUIN e SOBEL, 2015; REED, 1992), terapia hormonal (ROSA e RUMEL, 2004; FIDEL et al, 2000; REED, 1992), relações sexuais (SOARES et al, 2017), uso de dispositivo intrauterino (DIU) (DOUGLAS, 2003), terapia antimicrobiana (SOBEL, 2007 e 1990), disbiose (SOBEL, 2007 e 1990), predisposições genéticas (SOBEL, 2016), diabetes não controlada (CARRARA et al, 2010; SOBEL, 2007 e 1990) e hábitos de higiene e vestuário (PATEL et al, 2005; ROSA e RUMEL, 2004; SOBEL, 1993; SOBEL, 1990).

É mais frequente em mulheres em idade reprodutiva. Os altos níveis de estrogênio e progesterona em mulheres que estão entre a puberdade e a menopausa, principalmente em pacientes grávidas, que utilizam contraceptivos orais ou realizam terapia de reposição hormonal estão relacionados ao surgimento de CVV e CVVR (ANDRIOLI et al, 2009; COTCH et al, 1998; REED, 1992). O aumento dos níveis de estrogênio e progesterona, fisiológico ou sintético, aumenta o nível de glicogênio, substrato nutricional das leveduras (ROSA e RUMEL, 2004; FIDEL et al, 2000; REED, 1992).

Outro fator de risco relacionado aos contraceptivos é o uso do dispositivo intrauterino (DIU). Este favorece ao aparecimento da CVV devido à adesão de *Candida* spp. ao dispositivo contraceptivo e à formação de biofilme (DOUGLAS, 2003).

Pacientes que receberam terapia antimicrobiana prolongada, frequentemente, apresentam alteração da microbiota vaginal e intestinal, a disbiose. Tal alteração, reduz a microbiota protetora e deixam as mulheres mais vulneráveis ao surgimento da CVV (SOBEL, 2007 e 1990).

Tratamentos com imunossupressores e corticosteroides favorecem à adesão de *Candida*, reduzem a resposta imunológica e a imunidade local (SOBEL, 1993). Fatores genéticos, como polimorfismo em genes do sistema imune também estão relacionados à CVV (SOBEL, 2016). Mulheres que vivem com HIV/Aids apresentam maiores índices de colonização vaginal com *Candida*, principalmente, cepas de *Candida* não *albicans* (DUERR et al, 2003).

Mulheres portadoras diabetes, não controlada, também apresentam predisposição à CVV. O aumento dos níveis de glicogênio e redução do pH vaginal, o que favorece o desenvolvimento excessivo da levedura (CARRARA et al, 2010; SOBEL, 2007 e 1990).

Alimentação rica em carboidratos simples aumenta as chances de ocorrência de CVV e CVVR (SOBEL et al, 1998).

Hábitos de higiene também estão relacionados aos fatores de risco do aparecimento da CVV sintomática. O uso de sabonetes íntimos que alteram o pH e a microbiota vaginal. Realizar a higiene íntima, no sentido ânus-vagina, pode levar resíduos de fezes para a vulva e vagina, comprometendo a microbiota vaginal (ROSA e RUMEL, 2004; SOBEL, 1993). O uso frequente de roupas justas ou sintéticas, por exemplo, favorecem à CVV por aumentarem a umidade e temperatura local (PATEL et al, 2005; SOBEL,1990).

O conhecimento destes fatores é fundamental para a avaliação da suscetibilidade da paciente à ocorrência da CVV sintomática e para a prevenção de CVVR, quando a paciente apresenta mais do que 3 ou 4 episódios de candidíase no intervalo de um ano (SOBEL, 2016; ANDRIOLI, 2009; ÁLVARES, SVIDZINSK e CONSOLARO, 2007; SOBEL, 1997; FIDEL e SOBEL, 1996).

A CVV representa um problema de importância global em saúde, afetando todos os estratos sociais. Embora sua exata prevalência seja desconhecida, estima-se que 75 % das mulheres adultas tenham, pelo menos, um episódio de CVV ao longo da vida, de 40 % a 50 % tenham reinfecção e 5 % tenham CVVR (SOBEL, 1993).

Em mulheres saudáveis e sem fatores de risco associados ao desenvolvimento de CVVR, *Candida* spp. pode persistir por meses e anos sem que o aparecimento de sintomas. Assim, a simbiose das leveduras com a microbiota vaginal é assintomática. Os sintomas surgem com o desequilíbrio da simbiose, associado aos fatores de risco, e a proliferação de *Candida* spp. (SOBEL, 2016).

De maneira geral, *Candida albicans* está presente em pequeno número, naturalmente, na microbiota humana, podendo habitar a pele, mucosas oral, trato gastrointestinal e geniturinário (SOBEL, 2016). É a principal espécie isolada em casos de CVV, sendo estimada a prevalência de 80 a 95 % (FERRER, 2000; SOBEL, 2007).

#### **1.4 *Candida* spp.: fatores de virulência e infecção.**

A colonização e adesão de *Candida* spp. às superfícies das células epiteliais da mucosa vaginal causam lesões e destruição tecidual pela ação de enzimas proteolíticas e/ou toxinas secretadas por estas leveduras. Assim, promovem a degradação de elementos da mucosa, como queratina e colágeno, o aparecimento de resposta inflamatória e anticorpos (OMBRELLA, RAMOS e RAMOS, 2008; RIBEIRO, 2008).

Cada espécie da levedura apresenta peculiaridades relativas aos fatores de virulência (KALAIARASAN et al, 2018; LUO et al, 2001). Em relação ao patógeno, muitos fatores de virulência são conhecidos na literatura, podemos citar: adesão (SIVASUBRAMANIAN e SOBEL, 2009), produção de enzimas proteolíticas e/ou toxinas (KALAIARASAN et al, 2018; AKTAS, YIGIT e AYVILDIZ, 2002), alterações fenotípicas (KULETA, KOZIK e KOZIK, 2009), formação de hifas e pseudohifas e formação de biofilme (SILVA et al, 2012; JAYATILAKE et al, 2006; KUMAMOTO e VINCES, 2005).

A forma filamentosa de algumas espécies de *Candida*, como *C. albicans*, é um importante fator de virulência, pois aumenta poder de invasão e resistência ao sistema imunológico (MATSUBARA, 2016). Deste modo, o processo de transição levedura-hifa é considerado necessário para garantir o sucesso nas etapas de infecção, e este processo tem por gatilho o desenvolvimento da inflamação. Estudos indicam que estas tenham importante participação na invasão tecidual e proporcionem maior resistência mecânica e aos mecanismos de fagocitose. Cepas com menor capacidade de formação de hifas apresentam menor capacidade de invasão tecidual (SILVA et al, 2012; JAYATILAKE, et al, 2006; KUMAMOTO e VINCES, 2005). Cada espécie de levedura do gênero *Candida* apresenta peculiaridades relativas aos fatores de virulência (KALAIARASAN, SINGH e CHATURVEDULA, 2018; LUO, SAMARANAYAKE e YAU, 2001).

A espécie *C. albicans* é a mais prevalente, segundo os dados epidemiológicos atuais, apresenta características de maior adesão às células epiteliais, quando comparada às demais espécies de *Candida* (DOUGLAS, 1987). Apresenta outros importantes fatores de virulência como atividade hemolítica (KALAIARASAN et al, 2018), produção de biofilme (KALAIARASAN et al, 2018), secreção de proteinase (SACHIN, RUCHI e SANTOSH, 2013), de fosfolipase (SACHIN, RUCHI e SANTOSH, 2013), de lipases (SILVA et al, 2012) e síntese de esterase (KALAIARASAN et al, 2018; AKTAS, YIGIT e AYVILDIZ, 2002). Essa produção de enzimas hidrolíticas extracelulares favorecem à adesão e colonização. aos tecidos e causam danos que proporcionam alterações da resposta imunológica dos hospedeiros (PICHOVÁ et al, 2001).

As espécies de *Candida* não *albicans* demonstram vêm demonstrando aumento na prevalência nos últimos anos, e são de identificação importante devido à maior resistência aos antifúngicos (FERRAZA et al, 2005; WHO, 2013). *Candida glabrata* se destaca por ser a cepa mais resistente a antifúngicos e a principal responsável pelos casos de CVV causadas por *C. não albicans*, aproximadamente 5% do total de infecções (BARBOSA, et al, 2012; SOBEL 2004 e 1998). Esta espécie apresenta atividade hemolítica (KALAIARASAN et al, 2018), atividade

de fosfolipase (SACHIN et al, 2013), atividade de proteinase (KALAIARASAN et al, 2018), atividade estearase (KALAIARASAN et al, 2018; AKTAS, YIGIT e AYVILDIZ, 2002), como fatores de virulência. Contudo, não apresenta o fenótipo de formação de pseudohifa ou tubo germinativo a 37°C (LARONE, 2002).

Infecções por *Candida* podem, ocasionalmente, ocorrerem em processos de coinfeção, representando menos que 10 % dos diagnósticos, porém, quando ocorre, as espécies mais comumente encontradas são *C. albicans* associada a *C. glabrata* (SOBEL, 1998); embora na prática clínica outras associações entre espécies já foram observadas (dados não publicados). Neesses casos, o tratamento de coinfeções fúngicas é mais difícil, principalmente, pela dificuldade em diagnosticar e em definir o antifúngico ideal, muitas vezes sendo necessária a escolha de mais de um fármaco para a terapia (THEIN et al, 2009).

Outra alteração fenotípica importante a virulência de *Candida* é a transição branco-opaco. As microcolônias apresentar coloração branca ou opaca, a alternância nas colorações é conhecida como “alternância branca-opaca”. As leveduras podem apresentar-se em formato redondo e ovoide (fase branca) ou em formato alongado e maior (fase opaca), semelhante ao do grão de feijão (SOLL, 2004).

O fenômeno de variedade fenotípica é denominado *switching*. É reversível e está associado ao patógeno adaptar-se às mudanças ambientais durante a infecção e disseminação. Em ambientes estressores, o patógeno altera a superfície celular e da colônia, metabolismo e características bioquímicas e moleculares. Tal fenômeno torna o patógeno mais virulento (KULETA, KOZIK e KOZIK, 2009).

A incrível capacidade de colonização e de resistência fúngica de algumas espécies de *Candida*, estão diretamente relacionadas a habilidade desses micro-organismos desenvolverem estruturas tri-dimensionais complexas, denominadas Biofilme. (SILVA et al, 2012). Inicialmente, a adesão de leveduras de *Candida* spp. aos tecidos e superfícies sólidas é necessária à formação de biofilme, que pode se formar na superfície de mucosas e até mesmo em superfícies não biológicas, como catéteres e dispositivo intra-uterino (DIU) (SIVASUBRAMANIAN e SOBEL, 2009). Após a infecção, a formação do biofilme é a etapa crucial à sobrevivência fúngica, levando a significativas falhas de tratamento (PERCIVAL et al, 2011).

A imunidade inata é responsável pela defesa inicial contra a infecção por *Candida* spp. A primeira linha de defesa é desempenhada pela ação de neutrófilos e macrófagos, ativação da cascata do sistema complemento, morte celular do patógeno, e opsonização através de receptores do sistema complemento. Receptores, como TOLL-LIKE (TLRs) e as lectinas do

tipo C (CLRs), atuam no reconhecimento de padrões moleculares presentes na parede celular de *C. albicans*. (SMEEKENS et al, 2013). As células do sistema imune produzem citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e induzem atividades coestimulatórias e apresentação de antígenos (ROMANI, 2004).

O biofilme, inicia-se com a adesão das células fúngicas a um substrato e, em camadas, a uma superfície biótica ou abiótica. Esta adesão inicial acontece mediada por um filme de condicionamento que é resultado da modificação físico-química da superfície original (MITTELMAN, 1996).

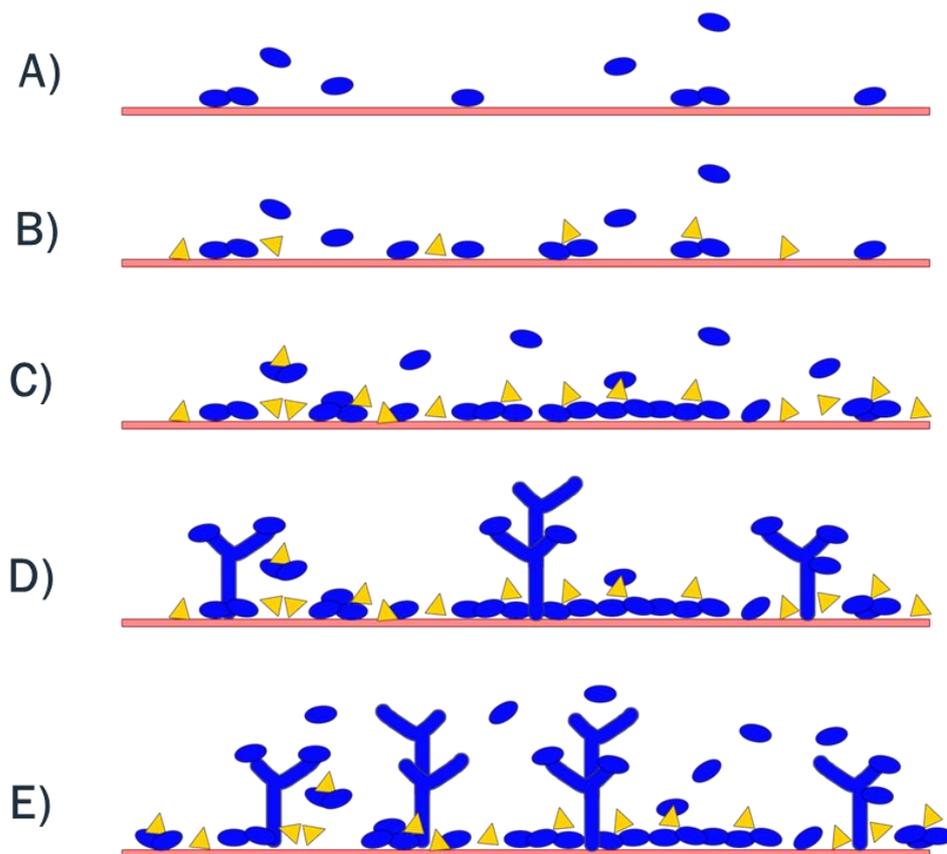
Uma das problemáticas do surgimento de biofilmes se deve a adesão e incorporação de uma comunidade microbiana a uma matriz extracelular (ECM) composta por substâncias secretadas pelas leveduras, denominada Substâncias Poliméricas Extracelulares (EPSs) (MENOITA et al, 2012). A ECM é composta por glicoproteínas (55%), carboidratos (25%), lipídios (15%) e ácido nucléico (5%) (ZARNOWSKI et al, 2014). A densidade e espessura dos biofilmes são fatores importantes na patogênese de *Candida* spp., por dificultarem a ação farmacológica dos antifúngicos e, conseqüentemente, o tratamento da candidíase (RAMAGE et al, 2006). A estrutura tridimensional apresenta canais que permitem a circulação de nutrientes assim, os micro-organismos envolvidos nessa matriz tornam-se mais tolerantes às condições desfavoráveis, resistentes às pressões do ambiente (ORTEGA-PEÑA e HERNÁNDEZ-ZAMORA, 2018; CERCA, et al 2017).

O biofilme proporciona ao fungo o aumento da resistência aos antifúngicos, não apenas pela presença de ECM que dificulta ou impede a penetração do agente antimicrobiano (PERCIVAL et al, 2011; DONOLAN e COSTERTON, 2002; DONLAN, 2001), mas também devido à possibilidade composição polimicrobiana (JUNG et al, 2017) ao crescimento alterado (COSTERTON, 2011), resistência aumentada ao estresse físico e químico (HENRIQUES, VASCONCELOS, CERCA, 2013), cooperação metabólica (DONLAN, 2002), expressão de genes de resistência (DONLAN, 2002) e presença de micro-organismos reduzem seu metabolismo e tornam-se persistentes por inibirem a ação de moléculas antimicrobianas (LEBEAUX, GHIGO, BELOIN, 2014; SILVA et al, 2010; DONLAN, 2002). O biofilme também dificulta a resposta imune de neutrófilos e macrófagos (NETEA et al, 2008).

A formação do filme está relacionada à concentração de substâncias orgânicas disponíveis no meio e à interação do micro-organismo com a superfície colonizada. secretam secreção de EPSs promovem ainda mais adesão de outras leveduras, entre si e à superfície. A multiplicação celular forma microcolônias de leveduras aderidas à superfície e o aumento de EPS disponíveis entre as células. As células do biofilme formam hifas e pseudohifas, e a ECM

acumulada amadurece, atingindo crescimento contínuo, e as leveduras não aderidas ao biofilme são liberadas e podem colonizar o meio circundante. O desprendimento de fragmentos do biofilme (etapa de dispersão) está intrinsecamente relacionado à propagação da infecção, auto-renovação da comunidade microbiológica e formação de novos biofilmes (Figura 1) (PERCIVAL et al, 2011).

Figura 1: Etapas de formação do biofilme de *Candida* spp.



A) Adesão inicial de *Candida* spp à superfície biótica ou abiótica. B) Secreção de substâncias poliméricas extracelulares pelas leveduras. C) Multiplicação celular e formação de microcolônias de leveduras aderidas à superfície. D) Formação de hifas, pseudohifas e da matriz polimérica extracelular que envolve as células. E) Dispersão das leveduras.

A formação inicial dos biofilmes pode variar de acordo a cepa de *Candida* spp. Os biofilmes de *C. albicans*, por exemplo, são formados principalmente, por dois tipos de células: leveduras (pequenas e ovais) e hifas (longas e tubulares). As leveduras proliferam e crescem em formas filamentosas, formando as hifas e pseudohifas (etapas de iniciação) (FINKEL e MITCHELL, 2011).

*Candida albicans*, adapta a captação de nutrientes e o metabolismo às mudanças na disponibilidade de nutrientes. As alterações interferem na sobrevivência e virulência das

leveduras. Déficit de nitrogênio e glicose em meio de cultivo, por exemplo, favorecem à transição de leveduras para hifas quando *in vitro* (RAMACHANDRA et al, 2014; MAYER et al, 2013; HUANG, 2012; HUDSON et al, 2004).

Para a erradicação do biofilme, podem ser necessários a terapia antifúngica a longo prazo e a remoção física do biofilme para controlar a infecção (TUMBARELLO et al, 2007; RAMAGE et al, 2006; RAMAGE, MARTINEZ e LOPEZ-RIBOT, 2006; BAILLIE e DOUGLAS, 2000), ou ainda o uso, quando possível, de ácido bórico, que atua rompendo o biofilme na CVV (NEAL et al, 2019).

Em estudos *in vitro*, a maturidade do biofilme é atingida em 24h. O biofilme maduro que contém células leveduriformes, hifas e pseudohifas, apresenta maior estabilidade estrutural (LOHSE et al, 2018). Ensaios em microplacas observaram que as leveduras em biofilme demandam maior Concentração Inibitória Mínima (MIC) do antifúngico. Para algumas leveduras, mesmo doses elevadas de antifúngico, acima da dose terapêutica, não são eficazes na erradicação do biofilme (BECKER et al, 2016; ALMEIDA et al, 2015; RAMAGE et al, 2012 e 2009).

É importante o conhecimento das espécies de *Candida* mais prevalentes de acordo com a região, uma vez que a suscetibilidade aos medicamentos antifúngicos varia entre as espécies. O estudo das características de *Candida* spp. pode identificar novos alvos terapêuticos e o desenvolvimento de novas drogas. A terapia contra *Candida* spp. deve respeitar as características do paciente, a patologia inicial, uso de terapia antifúngica prévia (inclusive profilática), foco da infecção e possibilidade de disseminação (YEH et al, 2020; VALDERRAMA et al, 2018; AGUADO et al, 2011; LORTHOLARY, 2011).

## **1.5 Resistência a antifúngicos**

Os medicamentos antifúngicos têm sido fundamentais para conter a disseminação e os agravos das infecções fúngicas (WENZEL, 1995). A resistência aos antifúngicos pode ocasionar o avanço das IF em pacientes de alto risco que receberam profilaxia com antifúngicos, além de comprometimento do prognóstico e maior gasto com a terapia medicamentosa (RENTZ, HALPERN e BOWDEN, 1998). Assim, o teste de suscetibilidade antifúngica é importante para a gestão da terapia medicamentosa e monitoramento da resistência aos medicamentos antifúngicos (FREITAS, 2014; PFALLER, 2012).

A resistência aos medicamentos antifúngicos pode ser microbiológica e/ou clínica. A resistência microbiológica acontece quando o micro-organismo é inibido apenas por

concentrações do antifúngico superiores ao previsto. A resistência clínica acontece quando a inibição ocorre em concentrações do antifúngico previstas, mas está associada à alta probabilidade de falha terapêutica. Quando a resistência microbiológica e clínica ocorre simultaneamente, não há inibição do crescimento fúngicos na dose prevista pela posologia da terapia antifúngica, que é a considerada segura. Nestas situações, os resultados do MIC indicam probabilidade de resistência microbiológica (PFALLER, 2012; TURNIDGE e PATERSON, 2007).

A resistência está associada a diversos fatores. A persistência e progressão da infecção pode acontecer devido à terapia medicamentosa ineficaz (WHITE, MARR, e BOWDEN, 1988), ou por desenvolvimento de mecanismos moleculares pelos fungos, na presença de antifúngicos que deveriam ser tóxicos. São exemplos desses mecanismos a mutação dos receptores do fármaco (PEMAN, CANTON e ESPINEL-INGROFF, 2009), expressão de um sistema de bombas de efluxo (SANGLARD et al, 1997; ALBERTSON et al, 1996), existência de biofilme (KUHN et al, 2002) e respostas pleiotrópicas (PFALLER, 2012).

A melhoria da capacidade de identificação e validação de alvos antifúngicos, influenciada pela tecnologia disponível para a manipulação de fungos patogênicos, tem permitido melhores processos para o desenvolvimento de medicamentos e vacinas mais eficientes (MEDICI e POETA, 2015; CASSONE, 2014). As ferramentas genéticas também permitiram que as pesquisas considerem que o alvo do fármaco deve ser essencial para a sobrevivência fúngica no processo infeccioso; o alvo ou inibidor também deve apresentar toxicidade altamente seletiva para garantir uma relação tóxico-terapêutica segura e ser farmacoeconomicamente viável (HURTGEN, 2012; NOSANCHUK, 2006).

Um fator a ser considerado nas CVV é a resistência aos azólicos. Estes são os fármacos antifúngicos mais utilizados na prática clínica, principalmente o Fluconazol. Apresentam baixo custo, exibem toxicidade limitada e estão disponíveis para administração por via oral. Cepas não *albicans*, de modo geral, possuem maior tolerância a essa classe de medicamentos (KENNEDY e SOBEL, 2010). Isolados de *C. krusei* são resistentes intrínsecos a Fluconazol e *C. glabrata* tem a maior incidência de resistência ao azólicos entre isolados clínicos de *Candida* (PFALLER, 2012; SOBEL, 2007; SINGH et al, 2002).

Mutações em cepas originalmente sensíveis também geram falha terapêutica e a necessidade do uso de antifúngicos mais potentes, que podem causar efeitos colaterais potencialmente graves. Antifúngicos da mesma classe terapêutica apresentam padrões de sensibilidade e resistência semelhantes (CHEN et al, 2018).

É contínua a busca pela identificação de estratégias para superar a resistência fúngica aos medicamentos atuais e a descoberta de fármacos antifúngicos com novos mecanismos de ação e atuação em novos alvos fúngicos (XIE et al, 2014). A investigação quimiogenômica pesquisa o alto rendimento, em nível genômico, da interação de pequenas moléculas com células, dessa forma, pode encontrar genes cuja expressão é modulada pelo tratamento de uma célula com um ou mais compostos. A investigação quimiogenômica atua identificando genes inativados que proporcionam sensibilidade ou resistência a um composto químico específico ou a um grupo de moléculas, ou estabelecendo quais compostos químicos interagem física ou funcionalmente com um alvo biologicamente definido (CHEN et al, 2018; BREDEL e JACOBY, 2004), o que pode representar uma alternativa para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para as infecções fúngicas.

### **1.6 Outras estratégias terapêuticas para tratamento da CVV**

Embora as novas estratégias de desenvolvimento de antifúngicos sejam altamente promissoras, atualmente, há poucos antifúngicos seguros e eficientes para o tratamento de CVV, levando à busca pelo desenvolvimento de outras estratégias coadjuvantes de tratamento.

Os probióticos são micro-organismos vivos (bactérias), usados em alimentos e em preparações farmacêuticas, que apresentam efeitos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos (PEIVASTEHR-ROUDSARI et al, 2019; ANADÓN, MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; MARTÍNEZ, 2006; FULLER, 1989), e que foram assim designados inicialmente por Lilley e Stillwell (1965) (OLIVEIRA et al, 2002).

A ação dos probióticos melhora a saúde e impactam positivamente na modulação do sistema imune (PRAKASH-ROUDSARI et al, 2011). Além disso, a escolha das bactérias probióticas deve ser embasada na segurança ao ser humano. Preferencialmente, as cepas devem ter origem no trato gastrointestinal de humanos saudáveis, para estimularem a resposta imune (SAARELA et al, 2000), não causarem doenças nem efeitos colaterais (SAARELA et al, 2000), serem resistentes aos sais biliares (SAARELA et al, 2000), não possuírem genes indutores de resistência aos antimicrobianos (SAARELA et al, 2000), apresentarem boa capacidade de aderir e colonizar mucosas (SAARELA et al, 2000), produzirem compostos antimicrobianos, ter atividade metabólica intestinal (CHARTERIS et al, 1998), e serem capazes de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal, para que possam colonizar o intestino (SAARELA et al, 2000; YAMAZAKI, et al, 1982).

Tradicionalmente, são empregadas como probióticos cepas microbianas de espécies de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. (HASSLÖF e STECKSÉN-BLICKS, 2020), embora novas cepas microbianas sejam incluídas como probióticos, como, por exemplo, *Bacillus coagulans* e *Bacillus subtilis* (JAFARI et al, 2017).

Apesar do risco de infecção por *Lactobacillus* spp. relatado ser de um em um milhão e o risco de morte seja muito baixo, é importante garantir a segurança e eficácia aos usuários dos probióticos, principalmente, se os usuários forem imunocomprometidos, pela vulnerabilidade às infecções oportunistas (SANDERS et al, 2010; BORRIELLO et al, 2003). Alguns estudos, relacionam *Lactobacillus* spp. às infecções como bacteremia, endocardite, meningite e pneumonia (SALMINEN et al, 2002; PEIVASTEHR-ROUDSARI et al, 2019; MACKAY et al, 1999).

Por outro lado, o emprego destes micro-organismos, como coadjuvantes no tratamento de CVV, é relevante. Estudos demonstram que a presença de *Lactobacillus* spp. na microbiota vaginal promove a redução do desenvolvimento de CVV (BEAMER et al, 2017; SPURBECK e ARVISON, 2011; SOBEL, 1990).

*Lactobacillus* spp. são os micro-organismos predominantes na microbiota vaginal da maioria das mulheres sem infecções vaginais (PETROVA et al, 2015), presentes na microbiota vaginal, exercem função protetora e reduzem a virulência de *Candida* spp. (VERDENELLI et al, 2014). *Lactobacillus* spp. impedem o crescimento de outros micro-organismos devido à competição por nutrientes (MATSUBARA et al, 2016) e por locais de adesão às células epiteliais (REID, 2000), inclusive, produzem substâncias biosurfactantes que reduzem a adesão de *Candida* spp. (ZAKARIA, 2013). Também são descritas na literatura a capacidade de suprimirem a expressão de genes inflamatórios induzidos por *C. albicans* (LEBEER, VANDERLEYDEN, DE KEERSMAECKER, 2010), melhorarem a resposta imunológica das células epiteliais vaginais (MATSUBARA et al, 2016; MENDONÇA et al, 2012), produzirem substâncias microbidas (FUOCHI et al, 2018; SGIBNEV e KREMLEVA, 2015; AROUTCHEVA et al, 2001) e interferirem na formação de tubos germinativos, hifas e biofilmes (MATSUBARA et al, 2016; ORSI et al, 2014).

*Lactobacillus* spp. também produzem diversas substâncias com ação microbida, como por exemplo ácido acético, ácido láctico (TACHEDJIAN et al, 2017), bacteriocinas (FUOCHI et al, 2018; ZIARRUSTA, 2002), biosurfactantes (SATPUTE, 2016), peróxido de hidrogênio (SGIBNEV e KREMLEVA, 2015) e moléculas de coagregação (KOVACHEV, 2018; AROUTCHEVA et al, 2001).

O ácido láctico, por exemplo, é produzido pelos *Lactobacillus* spp. por meio da fermentação de carboidratos, principalmente glicogênio e proporciona proteção contra colonização de micro-organismos patógenos (O'HANLON, MOENCH e CONE, 2013). As bacteriocinas permeiam a membrana celular de patógenos (STOYANCHEVA et al, 2014).

A produção de peróxido de hidrogênio, por *Lactobacillus* spp., é favorecida em testes *in vitro*. Entretanto, estudos indicam que, em ambiente anaeróbio como é o meio vaginal, a produção pode ser insuficiente para causar toxicidade aos patógenos (O'HANLON, MOENCH e CONE, 2013).

Assim, estudos sugerem que *Lactobacillus* spp. podem atuar na inibição direta do crescimento de *Candida* spp., no desenvolvimento do biofilme, no processo de transição levedura-hifa, modulação da resposta imune e desenvolvimento da candidíase (TACHEDJIAN et al, 2017; MATSUBARA, 2016).

### **1.7 Microbiota vaginal e importância de *Lactobacillus* spp.**

Ao longo da vida, a microbiota vaginal sofre alterações quantitativas e qualitativas. Inclusive alterações hormonais e do epitélio vaginal (GAJER et al, 2012; FARAGE e MAIBACH, 2006). Em mulheres saudáveis, inúmeros micro-organismos convivem na microbiota vaginal. *Lactobacillus* spp. são os principais componentes da secreção vaginal, aproximadamente entre  $10^7$  e  $10^8$  Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (CFU/mL) (MARTINEZ, 2008).

Atualmente, a microbiota vaginal é classificada em cinco categorias ou *Community State Types* (CST), a saber: CST I (dominada por *Lactobacillus crispatus*), CST II (por *Lactobacillus gasseri*), CST III (por *Lactobacillus iners*), CST IV-A (possui proporções menores de *Lactobacillus* spp. e maiores de micro-organismos anaeróbios, dos gêneros *Anaerococcus*, *Peptoniphilus*, *Prevotella* e *Streptococcus*; e espécies que podem ser patogênicas *Gardnerella vaginalis* ou *Mobiluncus* spp.), CST IV-B (reduzida quantidade de *Lactobacillus* spp. e proporções elevadas de *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* sp., *Clostridiales*, entre outras espécies que causam vaginite bacteriana). As CST I e CST II são consideradas como mais protetoras contra infecções (MITRA et al, 2016; BROTMAN et al, 2014; GAJER et al, 2012; RAVEL et al, 2011).

Além das espécies citadas acima, também costumam ser encontrados na vagina *L. jensenii*, além de outros como *L. rhamnosus*, *L. casei* e *L. plantarum*, que acessam o trato genital devido à proximidade ao ânus (CASTRO et al, 2015; GONÇALVES et al, 2016).

Leão et al (2015) relataram que *L. rhamnosus* proporciona redução significativa do crescimento de *C. albicans*, quando comparado ao crescimento desenvolvido no cultivo da levedura apenas. Nesse estudo, houve redução na formação do tubo germinativo de *Candida* após interação por 48 ou 72 horas e redução na formação do biofilme. Os resultados sugerem que a coexistência poderia reduzir a patogenicidade e favorecer o controle da candidíase. Outra hipótese levantada pelos autores é a de que os *L. rhamnosus* são capazes de produzir substâncias com atividade antifúngica ou modificar o ambiente a ponto de prejudicar o crescimento das leveduras.

Matsubara et al (2016) demonstraram que além de *L. rhamnosus*, também *L. casei* e *L. acidophilus* são capazes de reduzir a formação de biofilmes de *Candida* e inibir a diferenciação celular da levedura, principalmente na fase inicial de colonização. Ensaio clínico indicam a eficácia do uso de cepas probióticas de *Lactobacillus* no tratamento de CVV complicada. O uso de probióticos mostrou ser capaz de reduzir a recorrência de complicações de CVV em um período de 6 meses (DAVAR et al, 2016).

O uso de *Lactobacillus* probióticos combinados com medicamentos antifúngicos foi estudado por De Seta et al (2014). Os resultados sugerem um aumento significativo de *Lactobacillus* spp. e melhora do desconforto vaginal, após tratamento com probióticos seguido por medicação antifúngica. Martinez et al (2009) descreveu a ação do *L. rhamnosus*, por via oral, associado ao tratamento com Fluconazol. A associação reduziu os sintomas da CVV em quatro semanas, assim como o crescimento *in vitro* da levedura.

O trabalho de Kohler et al (2012) mostrou que a presença de *L. rhamnosus* e *L. reuteri* aumenta a expressão de genes relacionados ao estresse e diminui a expressão de genes envolvidos na resistência ao Fluconazol em *C. albicans*, o que pode explicar o aumento da erradicação do fungo em terapias combinadas de probióticos e antifúngicos.

O estudo realizado por Davar et al (2016) sugere que o tratamento com Fluconazol 150mg (dose única) e probióticos, durante seis meses, apresentou maior redução de aparecimento de CVVR, quando comparado ao resultado apresentado pelo grupo de mulheres que recebeu com Fluconazol 150mg (dose única) e placebo de probióticos.

Embora, os trabalhos citados sugiram fortemente que o uso de *Lactobacillus* e probióticos podem contribuir para a resolução dos casos de CVV e CVVR, existem algumas limitações nesses estudos, como a realização do teste somente *in vitro* e da inclusão apenas de uma espécie fúngica, geralmente ATCC. Entretanto, o estudo preocupou-se em avaliar *C. albicans*, a espécie ainda considerada a mais prevalente em casos de CVV nos últimos anos, além de incluir *C. glabrata* a segunda espécie mais frequente em CVV (SOBEL, 2010), cujo

número de casos de CVV tem aumentado, embora tenhamos permanecido no campo da avaliação *in vitro*. Destaco que é importante estudar o efeito do uso de probióticos nestas espécies e em outras espécies de *Candida* envolvidas na etiologia das doenças vulvovaginais, principalmente em estudos clínicos.

## 1.8 Justificativa

A possibilidade da ação microbicida de *Lactobacillus* spp., devido à secreção de substâncias e a presença na microbiota de indivíduos saudáveis despertou interesse no desenvolvimento de uma pesquisa que avaliasse *in vitro* a ação microbicida de *Lactobacillus* spp. sobre *C. albicans* e *C. glabrata*, leveduras predominantes nas CVV. A investigação da ação de *Lactobacillus* spp. pode auxiliar como coadjuvantes às terapias antifúngicas de CVV, como estratégias de proteção e/ou recuperação da microbiota vaginal e pode reduzir os impactos causados à saúde.

*C. albicans* foi selecionada para o estudo por ser a espécie dominante nas CVV e CVVR, e por estar presente na microbiota gastrointestinal e no trato geniturinário da maioria das mulheres (SOBEL, 2016). *Candida glabrata* foi selecionada para o estudo por ser a espécie não-*albicans* mais isolada da vagina, em mulheres sintomáticas. Além das cepas padrão (ATCC), as espécies de *C. albicans* e *C. glabrata* estudadas, foram oriundas de isolados clínicos laboratoriais de mulheres com CVV, e ambas as espécies apresentam multirresistência aos antifúngicos usuais.

Cepas de *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. casei shirota*, *L. crispatus*, *L. johnsonii*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus* foram selecionados em virtude de características como a secreção de substâncias com ação microbicida, presença na microbiota gastrointestinal e no trato geniturinário de pessoas saudáveis (FUOCHI et al, 2018; SGIBNEV e KREMLEVA, 2015), além da sua disponibilidade. As cepas foram gentilmente cedidas à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Yanna Nóbrega, pela Farmacotécnica<sup>®</sup>, farmácia de manipulação.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Investigar a atividade inibitória de *Lactobacillus* spp. sobre cepas de *Candida albicans* e *C. glabrata* em modelo *in vitro*.

### 2.2 Objetivos específicos

Avaliar a ação inibitória das cepas de *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. casei shirota*, *L. crispatus*, *L. johnsonii*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus* sobre cepas de *C. albicans* ATCC 90023, *C. albicans* IC 216 e *C. glabrata* ATCC 90030 e IC 15.

Investigar o efeito inibitório das cepas de *Lactobacillus* spp. sobre a produção de hifas e pseudo-hifas em *C. albicans* (ATCC 90023, IC 216 e SC 5314).

Analisar o efeito inibitório das cepas de *Lactobacillus* spp. sobre a formação de biofilme em cepas de *C. albicans* (ATCC 90023 e IC 216) e *C. glabrata* (ATCC 90030 e IC 15).

Comparar a ação de *Lactobacillus* spp. e de solução sobrenadante de cultivo de *Lactobacillus* spp sobre a formação de hifas e biofilme em cepas *C. albicans* (ATCC 90023 e SC 5314).

Avaliar o efeito antifúngico dos sobrenadantes de *Lactobacillus* spp. e compará-los ao efeito da Anfotericina B e Fluconazol.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Origem dos micro-organismos e aspectos éticos

Foram utilizadas, nesta pesquisa, as cepas: *C. albicans* American Type Culture Collection ATCC 90023, *C. albicans* IC 216 (isolado clínico), *C. glabrata* American Type Culture Collection ATCC 90030, *C. glabrata* IC 15 (isolado clínico) e *C. albicans* SC 5314, que apresenta proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein – GFP*), esta última, gentilmente cedida pela professora Ildinete Silva-Pereira, do Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (IB-UnB).

As cepas de *Lactobacillus* utilizadas – *L. acidophilus* (cepa LA85, Active Pharmaceutica, Lote WK20191003002), *L. casei* (Gamma, Lote AF43180921), *L. casei shirota* (Yakult<sup>®</sup>, Lote H1336), *L. crispatus* (cepa THT031402, Lemma, Lote H14C2), *L. johnsonii* (cepa LJ-G55, Lemma, Lote IG1703), *L. paracasei* (Gamma, Lote AF43190287), *L. rhamnosus* (cepa LR-G14, Lemma, Lote HK0202), foram gentilmente cedidas pela Farmacotécnica<sup>®</sup>, farmácia de manipulação. *L. casei shirota* utilizado foi isolado a partir de leite fermentado comercial (Yakult<sup>®</sup> – Lote H1336), e sua identidade foi confirmada empregando a metodologia de MALDI TOF.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa/ Faculdade de Medicina (CEP/FM) pelo parecer consubstanciado número 1.572.449/2016, no que tange às cepas clínicas empregadas no estudo, pois o trabalho *in vitro* com uso de cepas ATCC, não necessita de aprovação ética.

#### 3.2. Manutenção e cultivo de *Candida* spp. e *Lactobacillus* spp.

##### 3.2.1. Manutenção e cultivo de *Candida* spp.

Todas as amostras empregadas foram conservadas em solução aquosa de glicerol a 10% e congeladas a -20°C em microtubos de 1,5mL até utilização na pesquisa. Em momento oportuno, os isolados fúngicos foram cultivados a 35°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) por 24 horas, em tubos de ensaio contendo 2mL de caldo *Yeast Malt* (YM) Acumedia<sup>®</sup> (Neogen do Brasil, São Paulo, Brasil) para emprego nos ensaios realizados.

### 3.2.2 Manutenção e cultivo de *Lactobacillus* spp.

Todas as amostras isoladas foram conservadas em solução aquosa de glicerol a 10% e congeladas a -20°C em microtubos de 1,5mL, onde foram mantidas para recuperação e processamento posterior. Os isolados bacterianos de *Lactobacillus* spp. foram cultivados a 35°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) por 24 horas, em tubos de ensaio contendo 2mL de caldo *Man, Rogosa e Sharpe* (MRS), do fabricante Acumedia® (Neogen do Brasil, São Paulo, Brasil) para emprego nos ensaios realizados.

### 3.3. Preparo dos meios de cultura YM e MRS empregados para cultivo de micro-organismos

#### 3.3.1. Meio de cultura YM

O meio de cultura YM BROTH Acumedia® (Neogen do Brasil, São Paulo, Brasil) foi utilizado para o cultivo das espécies fúngicas de *Candida* spp. O caldo YM é composto por: gelatina 0,5%, extrato de malte 0,3%, dextrose 1% e extrato de levedura 0,3%. O pH do meio líquido foi medido e ajustado para obtenção de um pH final de 6,2 ( $\pm 2$ ) em pHmetro (GEHAKA® PG2000, São Paulo, Brasil).

Após a reidratação, o meio YM foi distribuído em tubos de ensaio contendo 2mL do caldo YM, que foram esterilizados a 121 °C por 15 minutos em autoclave a vapor. Nos tubos estéreis, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  da suspensão de cada amostra isolada conservadas em solução aquosa de glicerol a 10%. Após a inoculação de uma amostra por tubo, foi realizado o cultivo a 35°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) por 24 horas.

#### 3.3.2. Meio de cultura MRS

*Lactobacillus* spp. foram cultivados em meio de cultura LACTOBACILLI MRS BROTH Acumedia® (Neogen do Brasil, São Paulo, Brasil). Este meio é conhecido assim, por ter sido inicialmente formulado por seus autores Man, Rogosa e Sharpe em 1960 (DE MAN, ROGOSA E SHARPE, 1960). O caldo do meio MRS utilizado é composto por: enzima digestiva de tecido animal 1%, extrato de carne 1%, extrato de levedura 0,5%, dextrose 2%, acetato de sódio 0,5%, polissorbato 80 0,1%, fosfato de dissódio 0,2%, citrato de amônio 0,2%, sulfato de magnésio 0,01% e sulfato de manganês 0,005%. O pH do meio líquido foi mensurado

e ajustado para obtenção de um pH final de 6,5 ( $\pm 2$ ) em pHmetro (GEHAKA® PG2000, São Paulo, Brasil).

O meio foi suspenso em água destilada e distribuído em tubos de ensaio contendo 2mL do caldo MRS, que foram esterilizados a 121°C por 15 minutos em autoclave. Nos tubos estéreis, foram adicionados 10 $\mu$ L da suspensão de cada amostra isolada conservadas em solução aquosa de glicerol a 10%. Após a inoculação de uma amostra por tubo, foi realizado o cultivo a 35°C ( $\pm 2^\circ$ C) por 24 horas.

### 3.4. Método empregado para o cocultivo

#### 3.4.1. Isolados microbianos empregados no cocultivo

Para a técnica de cocultivo de micro-organismos, foram utilizados isolados de *C. albicans* ATCC 90023, *C. albicans* IC 216, *C. albicans* SC 5314, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. glabrata* IC 15, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. casei shirota*, *L. crispatus*, *L. johnsonii*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus*.

A partir de culturas puras e frescas de *C. albicans* e *C. glabrata* cultivadas em caldo YM Acumedia® (Neogen do Brasil, São Paulo, Brasil) a 35°C ( $\pm 2^\circ$ C) por 24 h, e culturas puras e frescas de *Lactobacillus* spp. cultivadas em caldo MRS Acumedia® (Neogen do Brasil, São Paulo, Brasil), por 24 h a 35°C ( $\pm 2^\circ$ C) foi realizada a técnica de cocultivo de acordo com Kang et al. (2017), com modificações descritas a seguir.

Após o período de incubação de 24h, os cultivos isolados foram analisados por espectrofotometria empregando Espectrofotômetro BTS 310 (BioSystems®, Barcelona, Espanha) e comprimento de onda de 578 nm, e as leituras em Densidade Óptica (DO) foram ajustadas.

Os meios de cultura YM para *Candida* spp. e MRS para *Lactobacillus* spp. puros foram considerados solução de referência para leitura do espectrofotômetro. Após a preparação dos inóculos com *Candida* spp. e *Lactobacillus* spp., as DO foram ajustadas para valores entre 0.070 e 0.085, que correspondem ao número de micro-organismos, neste caso leveduras e bactérias na concentração de  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^8$  micro-organismos/mL, respectivamente (KANG et al, 2018; CLSI, 2004)..

Os cocultivos foram realizados em tubos contendo 4mL de caldo MRS e YM volume/volume (v/v), e inóculo ajustado na mesma concentração de *Candida* spp. ( $1 \times 10^6$

bactérias/mL) e *Lactobacillus* spp ( $1 \times 10^8$  leveduras/mL) (KANG et al, 2018; CLSI, 2004). Os grupos avaliados estão descritos no quadro 1.

Os tubos com o cocultivo foram incubados à temperatura de 35°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ), no período de 48h. Como Controle Positivo (CP), sem interferência externa de crescimento, para as espécies de *Candida* foram utilizados 2mL de caldo YM e  $1 \times 10^6$  leveduras/mL, para os *Lactobacillus* spp. foram utilizados 2mL de caldo MRS e  $1 \times 10^8$  bactérias/mL. Os meios YM e MRS puros foram empregados como controles negativos (CN). Todos os CPs foram incubados na mesma condição dos testes, que foram realizados em triplicata técnica e biológica.

Quadro 1 – Grupos de micro-organismos analisados em cultivo e cocultivo

Grupos	Cocultivo
1	<i>Candida albicans</i> ATCC 90023 (CP)
2	<i>Candida albicans</i> ATCC 90023 + <i>Lactobacillus acidophilus</i>
3	<i>Candida albicans</i> ATCC 90023 + <i>Lactobacillus casei</i>
4	<i>Candida albicans</i> ATCC 90023 + <i>Lactobacillus casei shirota</i>
5	<i>Candida albicans</i> ATCC 90023 + <i>Lactobacillus crispatus</i>
6	<i>Candida albicans</i> ATCC 90023 + <i>Lactobacillus johnsonii</i>
7	<i>Candida albicans</i> ATCC 90023 + <i>Lactobacillus paracasei</i>
8	<i>Candida albicans</i> ATCC 90023 + <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
9	<i>Candida albicans</i> IC 216 (CP)
10	<i>Candida albicans</i> IC 216 + <i>Lactobacillus acidophilus</i>
11	<i>Candida albicans</i> IC 216 + <i>Lactobacillus casei</i>
12	<i>Candida albicans</i> IC 216 + <i>Lactobacillus casei shirota</i>
13	<i>Candida albicans</i> IC 216 + <i>Lactobacillus crispatus</i>
14	<i>Candida albicans</i> IC 216 + <i>Lactobacillus johnsonii</i>
15	<i>Candida albicans</i> IC 216 + <i>Lactobacillus paracasei</i>
16	<i>Candida albicans</i> IC 216 + <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
17	<i>Candida albicans</i> SC 5314 (CP)
18	<i>Candida albicans</i> SC 5314 + <i>Lactobacillus acidophilus</i>
19	<i>Candida albicans</i> SC 5314 + <i>Lactobacillus casei</i>
20	<i>Candida albicans</i> SC 5314 + <i>Lactobacillus casei shirota</i>
21	<i>Candida albicans</i> SC 5314 + <i>Lactobacillus crispatus</i>
22	<i>Candida albicans</i> SC 5314 + <i>Lactobacillus johnsonii</i>
23	<i>Candida albicans</i> SC 5314 + <i>Lactobacillus paracasei</i>
24	<i>Candida albicans</i> SC 5314 + <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
25	<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030 (CP)
26	<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030 + <i>Lactobacillus acidophilus</i>
27	<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030 + <i>Lactobacillus casei</i>
28	<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030 + <i>Lactobacillus casei shirota</i>
29	<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030 + <i>Lactobacillus crispatus</i>

Continua

Continuação

Grupos	Cocultivo
30	<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030 + <i>Lactobacillus johnsonii</i>
31	<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030 + <i>Lactobacillus paracasei</i>
32	<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030 + <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
33	<i>Candida glabrata</i> IC 15 (CP)
34	<i>Candida glabrata</i> IC 15 + <i>Lactobacillus acidophilus</i>
35	<i>Candida glabrata</i> IC 15 + <i>Lactobacillus casei</i>
36	<i>Candida glabrata</i> IC 15 + <i>Lactobacillus casei shirota</i>
37	<i>Candida glabrata</i> IC 15 + <i>Lactobacillus crispatus</i>
38	<i>Candida glabrata</i> IC 15 + <i>Lactobacillus johnsonii</i>
39	<i>Candida glabrata</i> IC 15 + <i>Lactobacillus paracasei</i>
40	<i>Candida glabrata</i> IC 15 + <i>Lactobacillus rhamnosus</i>

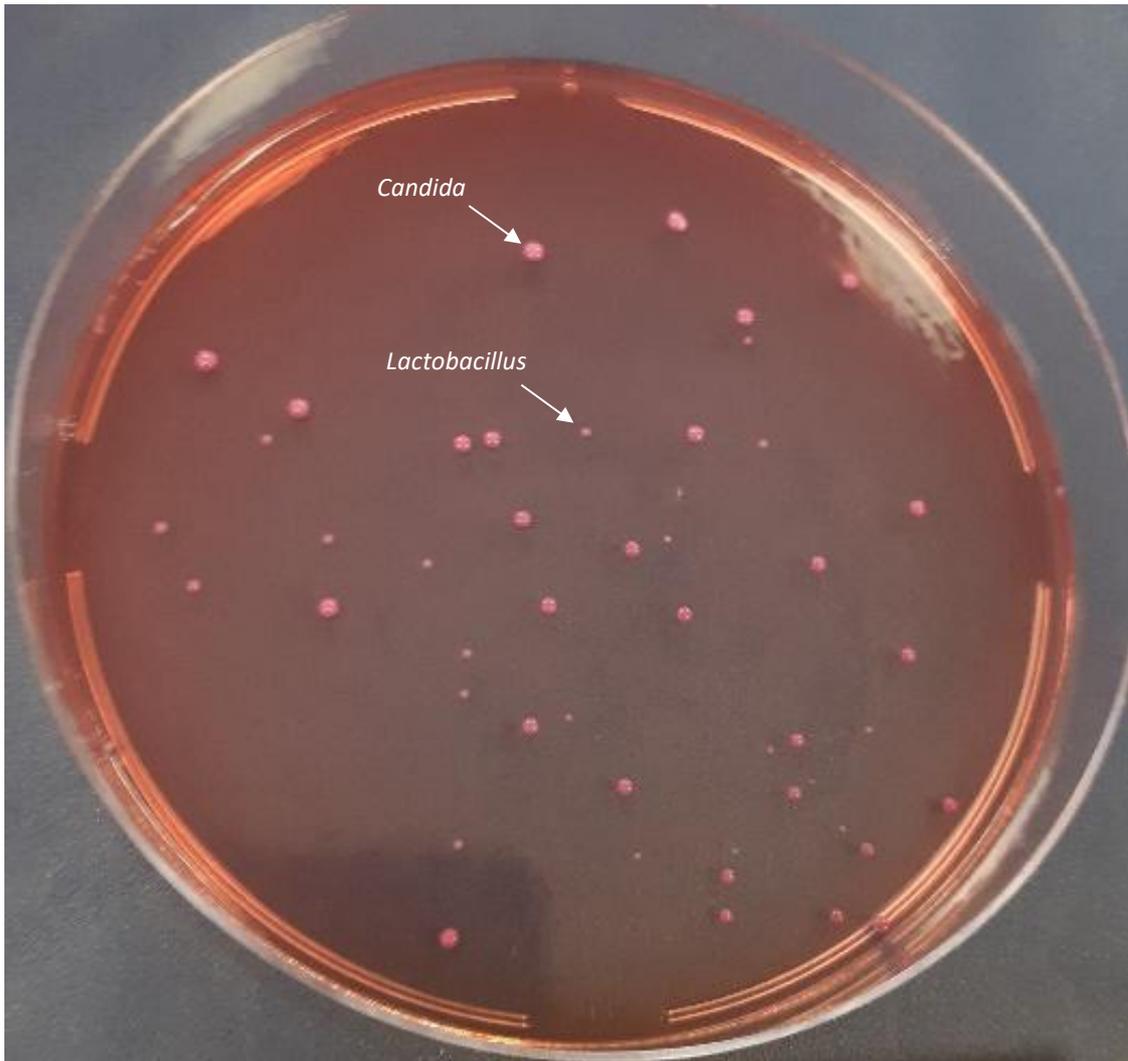
CP- Controle Positivo

### 3.5. Contagem de Unidades Formadoras Colônias (CFU)

Após o período de incubação no meio misto empregado durante o cocultivo, foi retirada uma alíquota de 10µL para fazer uma diluição de 1:100 em solução salina 0,9%. A partir desta diluição foi realizada uma nova diluição de 1:1000 em solução salina 0,9% (CLSI, 2005). Da diluição final (1:100.000) foram inoculados 10µL em placas de Petri contendo o meio MRS sólido suplementado com o corante vermelho neutro a 1%, que foram incubados a 37°C por 48 horas. A atividade microbicida de *Lactobacillus* spp. sobre as espécies de *Candida* spp. foi avaliada pela contagem de CFU/mL. Todas as amostras e CPs foram testadas em triplicata técnica e biológica.

O corante vermelho neutro foi empregado para facilitar a distinção entre as colônias de *Candida* spp. e *Lactobacillus* spp. O corante proporciona coloração diferente às colônias de *Candida* spp. e *Lactobacillus* spp, que varia em tons de rosa. Para a triagem, as colorações das colônias foram comparadas à coloração das colônias do CP e realizou-se esfregaço em lâmina, seguida da aplicação da técnica de coloração de *Gram*. Finalmente, realizou-se a contagem, individualmente, para cada espécie (Figura 2).

Figura 2 – Ilustração do Cocultivo: *Candida albicans* ATCC 90023 e *Lactobacillus crispatus*



### 3.6. Ação de *Lactobacillus* spp. sobre biofilmes de *Candida* spp.

Para avaliação da ação de *Lactobacillus* spp. sobre o biofilme de *Candida* spp., foram utilizadas  $1 \times 10^6$  leveduras/mL e  $1 \times 10^8$  células bacterianas/mL de cada espécie de *Lactobacillus*. As cepas de fungos foram cultivadas em caldo de YM e as de bactérias em caldo MRS, por 24h. Após o cultivo inicial, as soluções foram analisadas por espectrofotometria empregando o método descrito no item 3.4.1.

Em placa de 24 poços de fundo chato foram adicionadas lamínulas circulares. As lamínulas foram lavadas, previamente, com ácido acético glacial 10%, em seguida com álcool 96°GL, secas em estufa e esterilizadas a 121°C por 15 minutos em autoclave a vapor e secas novamente em estufa a 100°C.

Em seguida, foi realizado o cocultivo de inóculos ajustados na mesma concentração de *Candida* spp. e *Lactobacillus* spp em 750µL q.s.p. de caldo MRS e YM volume/volume (v/v). Posteriormente, ao cocultivo, adicionou-se 750µL meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB). O volume final foi de 1500 µL/poço.

Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 24h. Após a incubação, as lamínulas circulares foram coradas, pelo método da coloração de Gram, ainda dentro da placa. Após a coloração, as lamínulas foram retiradas das placas, fixadas em lâminas para microscopia com verniz vitral e fotografadas em microscópio óptico Nikon® Labophoto-2, com a lente objetiva de aumento de 40x.

As cepas de *Candida* spp. testadas foram: *C. albicans* ATCC 90023, *C. albicans* (SC 5314), *C. albicans* IC 216, *C. glabrata* ATCC 90030 e *C. glabrata* IC 15. As cepas de *Lactobacillus* spp. utilizadas foram: *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. casei shirota*, *L. crispatus*, *L. johnsonii*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus*. A combinação de micro-organismos inoculados está descrita no quadro 1.

### 3.7 Avaliação do potencial inibitório mínimo

Para a análise da resistência das leveduras aos fármacos antifúngicos, foi realizado o teste do potencial inibitório. Este teste identificou a menor concentração de agente antimicrobiano, fármaco ou solução de sobrenadantes de *Lactobacillus* spp. que inibe completamente o crescimento do organismo nos poços de microdiluição, conforme detectado a olho nu. A técnica foi adaptada a partir do teste de Concentração Inibitória Mínima (MIC) (BARRY et al, 1978).

Para esta análise foi empregado a solução sobrenadante do cultivo de *Lactobacillus* spp. após 24h, sem nenhuma diluição. As soluções foram centrifugadas e filtradas usando filtro de 0.22µ e reservadas para emprego no teste.

Foram utilizadas placas de 96 poços contendo RPMI 1640, suplementado com 10% (v/v) de SFB, e  $1 \times 10^3$  levedura/poço (Figura 3). O volume total de cada poço totalizou 100 µL. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 24h. Após a incubação inicial, foram adicionados 20µL de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) em cada poço. Esse corante é incolor na forma oxidada e vermelho quando reduzido por micro-organismos, devido à formação de formazano, sendo utilizado como teste para comprovar a viabilidade celular. A placa foi, novamente, incubada a 37°C por 2 horas (BELOTI et al, 1999).

As cepas de *Candida* spp. testadas foram: *C. albicans* ATCC 90023, *C. albicans* IC 216, *C. glabrata* ATCC 90030 e *C. glabrata* IC 15. As substâncias antifúngicas testadas foram: Anfotericina B, Fluconazol, e sobrenadantes de *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. casei shitora*, *L. crispatus*, *L. johnsonii*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus*.

Os fármacos Anfotericina B (Lote: 019202, United Medical LTDA, EUA) e Fluconazol (Lote: AKP07106, Sanofi Medley Farmacêutica LTDA, Brasil), solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) foram selecionados como substâncias controle para avaliação do potencial inibitório. As soluções foram preparadas nas concentrações Anfotericina B 0,25µg/mL e Fluconazol 2µg/mL. Os grupos avaliados estão descritos no quadro 2.

Quadro 2 – Grupos de micro-organismos analisados em cultivo e cocultivo (potencial inibitório mínimo)

Grupos	Cocultivo
1	<i>Candida albicans</i> ATCC 90023 (CP)
2	<i>Candida albicans</i> ATCC 90023 + Anfotericina B
3	<i>Candida albicans</i> ATCC 90023 + Fluconazol
4	<i>Candida albicans</i> ATCC 90023 + sobrenadante <i>Lactobacillus acidophilus</i>
5	<i>Candida albicans</i> ATCC 90023 + sobrenadante <i>Lactobacillus casei</i>
6	<i>Candida albicans</i> ATCC 90023 + sobrenadante <i>Lactobacillus casei shirota</i>
7	<i>Candida albicans</i> ATCC 90023 + sobrenadante <i>Lactobacillus crispatus</i>
8	<i>Candida albicans</i> ATCC 90023 + sobrenadante <i>Lactobacillus johnsonii</i>
9	<i>Candida albicans</i> ATCC 90023 + sobrenadante <i>Lactobacillus paracasei</i>
10	<i>Candida albicans</i> ATCC 90023 + sobrenadante <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
11	<i>Candida albicans</i> IC 216 (CP)
12	<i>Candida albicans</i> IC 216 + Anfotericina B
13	<i>Candida albicans</i> IC 216 + Fluconazol
14	<i>Candida albicans</i> IC 216 + sobrenadante <i>Lactobacillus acidophilus</i>
15	<i>Candida albicans</i> IC 216 + sobrenadante <i>Lactobacillus casei</i>
16	<i>Candida albicans</i> IC 216 + sobrenadante <i>Lactobacillus casei shirota</i>
17	<i>Candida albicans</i> IC 216 + sobrenadante <i>Lactobacillus crispatus</i>
18	<i>Candida albicans</i> IC 216 + sobrenadante <i>Lactobacillus johnsonii</i>
19	<i>Candida albicans</i> IC 216 + sobrenadante <i>Lactobacillus paracasei</i>
20	<i>Candida albicans</i> IC 216 + sobrenadante <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
21	<i>Candida albicans</i> SC 5314 (CP)
22	<i>Candida albicans</i> SC 5314 + Anfotericina B
23	<i>Candida albicans</i> SC 5314 + Fluconazol
24	<i>Candida albicans</i> SC 5314 + sobrenadante <i>Lactobacillus acidophilus</i>
25	<i>Candida albicans</i> SC 5314 + sobrenadante <i>Lactobacillus casei</i>
26	<i>Candida albicans</i> SC 5314 + sobrenadante <i>Lactobacillus casei shirota</i>
27	<i>Candida albicans</i> SC 5314 + sobrenadante <i>Lactobacillus crispatus</i>
28	<i>Candida albicans</i> SC 5314 + sobrenadante <i>Lactobacillus johnsonii</i>
29	<i>Candida albicans</i> SC 5314 + sobrenadante <i>Lactobacillus paracasei</i>

Continua

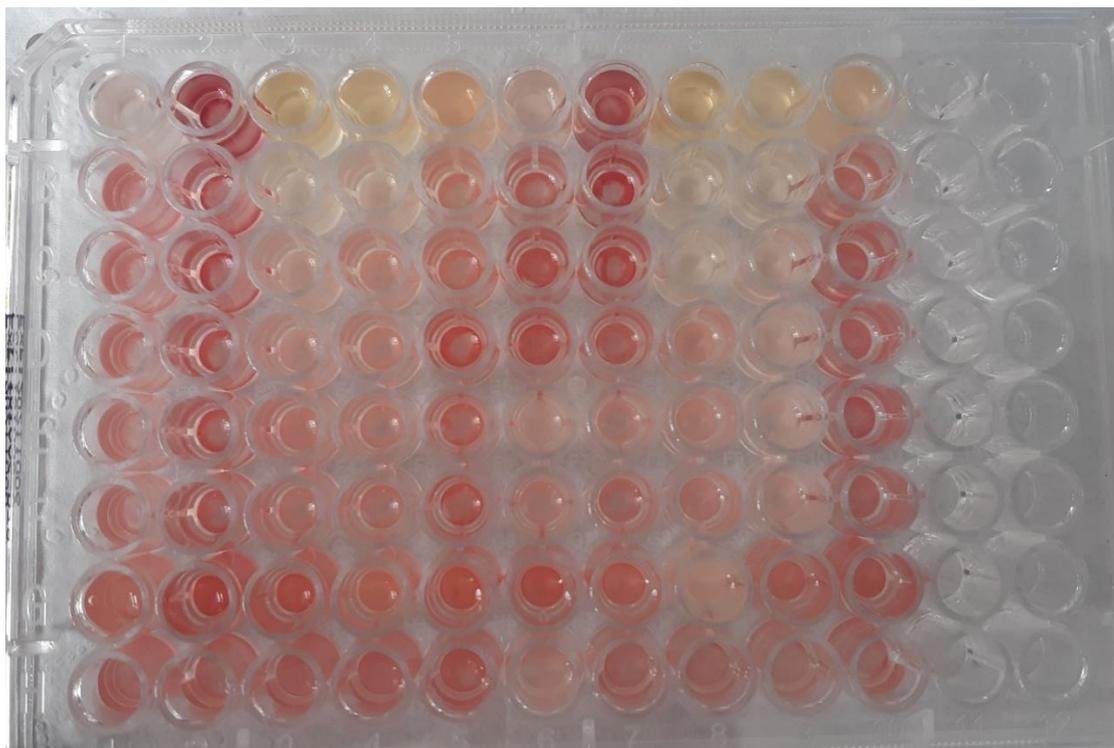
Continuação

<b>Grupos</b>	<b>Cocultivo</b>
30	<i>Candida albicans</i> SC 5314 + sobrenadante <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
31	<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030 (CP)
32	<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030 + Anfotericina B
33	<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030 + Fluconazol
34	<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030 + sobrenadante <i>Lactobacillus acidophilus</i>
35	<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030 + sobrenadante <i>Lactobacillus casei</i>
36	<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030 + sobrenadante <i>Lactobacillus casei shirota</i>
37	<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030 + sobrenadante <i>Lactobacillus crispatus</i>
38	<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030 + sobrenadante <i>Lactobacillus johnsonii</i>
39	<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030 + sobrenadante <i>Lactobacillus paracasei</i>
40	<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030 + sobrenadante <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
41	<i>Candida glabrata</i> IC 15 (CP)
42	<i>Candida glabrata</i> IC 15 + Anfotericina B
43	<i>Candida glabrata</i> IC 15 + Fluconazol
44	<i>Candida glabrata</i> IC 15 + sobrenadante <i>Lactobacillus acidophilus</i>
45	<i>Candida glabrata</i> IC 15 + sobrenadante <i>Lactobacillus casei</i>
46	<i>Candida glabrata</i> IC 15 + sobrenadante <i>Lactobacillus casei shirota</i>
47	<i>Candida glabrata</i> IC 15 + sobrenadante <i>Lactobacillus crispatus</i>
48	<i>Candida glabrata</i> IC 15 + sobrenadante <i>Lactobacillus johnsonii</i>
49	<i>Candida glabrata</i> IC 15 + sobrenadante <i>Lactobacillus paracasei</i>
50	<i>Candida glabrata</i> IC 15 + sobrenadante <i>Lactobacillus rhamnosus</i>

CP- Controle Positivo

Após a incubação final, foi retirada uma alíquota de 10 $\mu$ L de cada poço que não apresentou crescimento da levedura. Esta alíquota foi semeada em placa contendo o meio Sabouraud Dextrose sólido (SDA) e incubadas a 37°C por 24h. Ao final do período de incubação, verificou-se o número de CFUs para confirmação da inibição do crescimento de leveduras, quando houve ausência total de crescimento microbiano.

Figura 3 – Ilustração do experimento MIC



### 3.8. Ensaio de interação entre cepas de *Candida albicans*, *Lactobacillus* spp. e solução sobrenadante de cultivo de *Lactobacillus* spp. para avaliação sobre a formação de hifas e a produção de biofilme

Para avaliação da interação entre *Lactobacillus* spp. e *C. albicans* foram analisadas as cepas de *L. casei*, *L. crispatus*, *L. rhamnosus*, *C. albicans* ATCC 90023 e *C. albicans* SC 5314. Neste ensaio, utilizou-se a câmara de Neubauer para contagem de células, após cultivo dos micro-organismos. *Candida* spp. foram cultivadas em caldo YM e *Lactobacillus* spp. foram cultivadas em caldo MRS. A suspensão das células em caldo foi padronizada, após cada cultivo, por espectrofotometria empregando Espectrofotômetro BTS 310 (BioSystems®, Barcelona, Espanha) e comprimento de onda de 578 nm e as leituras em Densidade Óptica (DO) foram ajustadas. Ajustou-se o inóculo na mesma concentração de *Candida* spp. ( $1 \times 10^6$  bactérias/mL) e *Lactobacillus* spp ( $1 \times 10^8$  leveduras/mL) (KANG et al, 2018; MOSTAÇO-GUIDOLIN, 2009).

Em seguida, 100µL de cada uma das concentrações descritas anteriormente, diluídas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) foram adicionadas em placas de 96 poços de fundo chato totalizando um volume final de 200µL/ poço. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 24h. Após a incubação, as placas foram fotografadas com

microscópio Eclipse Nikon E200 Mrm e câmera CCD (Carl Zeiss GmbH), com a lente objetiva de aumento de 400x. As imagens foram capturadas empregando o software Zen® (Carl Zeiss, 2012).

A cepa *C. albicans* SC 5314 é fluorescente e inicia a produção de tubo germinativo após 2h de cultivo. Para efeitos comparativos da ação das cepas de *Lactobacillus* spp. sobre *C. albicans* SC 5314, empregou-se a cepa *C. albicans* ATCC 90023 para comparação com a ação das espécies de *Lactobacillus* spp. sobre a formação de hifas e a produção de biofilme pelas espécies de *Candida* avaliadas.

## 4 RESULTADOS

### 4.1. Avaliação da atividade microbicida de cepas de *Lactobacillus* sobre espécies de *Candida* spp.

Para análise da atividade microbicida das cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*, sobre as cepas de *Candida albicans* (ATCC 90023 e IC 216), e *Candida glabrata* (ATCC 90030 e IC 15), após o método de cocultivo, empregou-se a análise quantitativa de células leveduriformes e bacterianas, viáveis em meio ágar MRS corado com corante vermelho neutro por meio da contagem de colônias em Unidades Formadoras de Colônias por mL (CFU/mL - *Colony Forming Unit*), que foi comparada aos controles positivos.

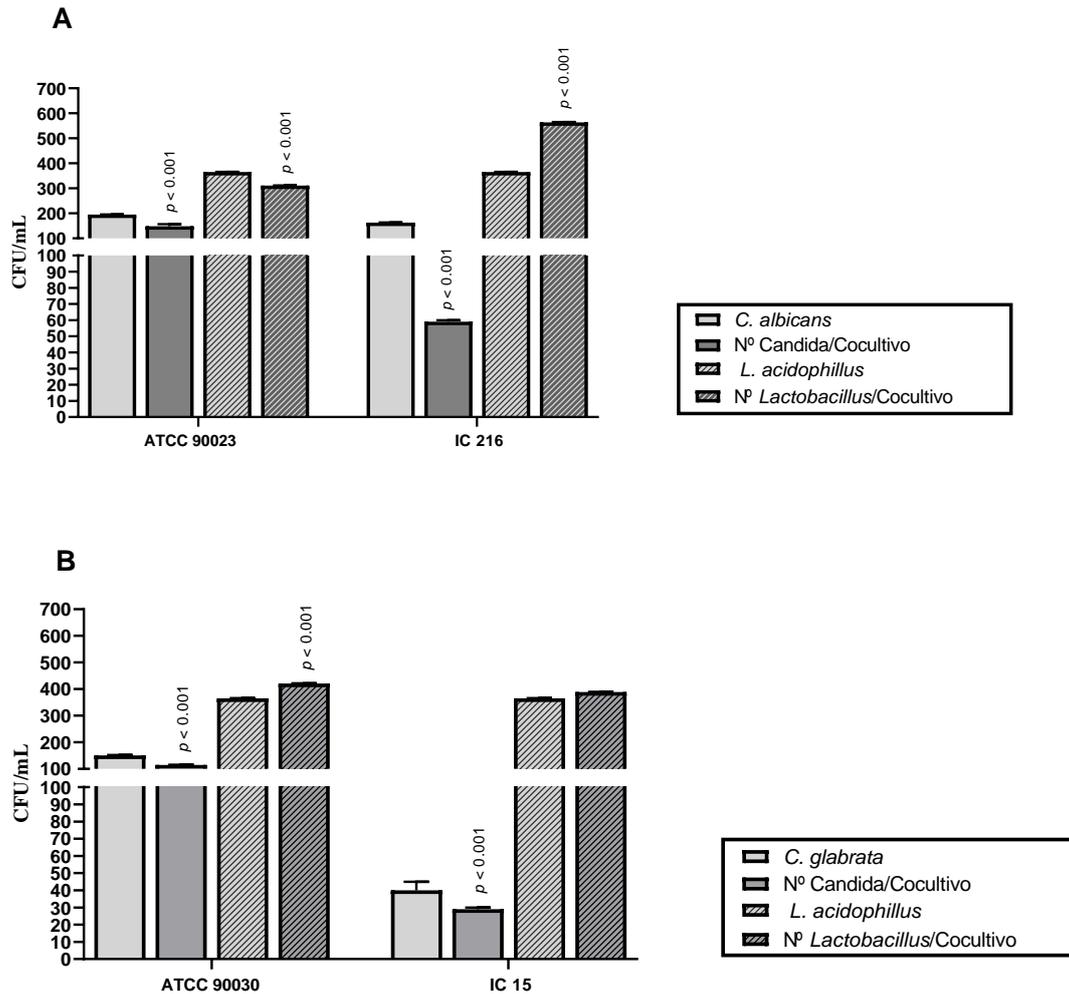
O meio ágar MRS foi empregado para semeio após o cocultivo de *Lactobacillus* spp. e *Candida* spp.. Paniagua (2019) comparou os resultados de semeio nos meios ágar YM e MRS e não observou alterações quanto ao crescimento de CFU, favorecendo o crescimento exuberante de *Lactobacillus* spp. e *Candida* spp. O corante possibilitou a melhor visualização, diferenciação e contagem de CFU/mL, como foi possível visualizar na Figura 2.

Para avaliação da atividade microbicida das cepas de *Lactobacillus* spp. sobre *Candida* spp., os dados de crescimento em CFU/mL de cada espécie de *Candida* spp. ou *Lactobacillus* spp. isoladas consideradas CP e após o cocultivo foram contabilizados e transformados em porcentagem. A atividade microbicida (%) foi calculada de forma específica para cada espécie de *Candida* spp. e *Lactobacillus* spp.

A atividade microbicida de *Lactobacillus* spp. sobre as espécies fúngicas testadas, baseada na contagem de CFU/mL, é demonstrada a seguir:

#### 4.1.1. Avaliação da atividade microbicida de cepas de *Lactobacillus acidophilus*

Após o cocultivo com *L. acidophilus* com *C. albicans* ATCC 90023 observa-se uma redução de crescimento de *C. albicans* ATCC 90023 (CFU/mL 148) quando comparado ao CP (CFU/mL 195) ( $p < 0,001$ ). Uma redução também é observada na contagem de CFU de *L. acidophilus* após cocultivo (CFU/mL 311) com *C. albicans* ATCC 90023 quando comparado ao seu CP (CFU/mL 365) ( $p < 0,001$ ) (Figura 4A e Apêndice A).

Figura 4 – Contagem de CFU após cocultivo com *Lactobacillus acidophilus*

Os dados representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata técnica. As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste ANOVA de duas vias, com pós-teste múltiplo de Tukey, o  $p$  value indicado representa a comparação entre *Candida* spp. em cultura pura e após cocultivo, e entre *Lactobacillus acidophilus*. em cultura pura e sua contagem após cocultivo.

No cocultivo de *C. albicans* IC 216 com essa mesma cepa de *Lactobacillus*, observa-se uma redução do CFU/mL de *C. albicans* IC 216 após o cocultivo em comparação ao seu CP (CFU/mL 163 para 59) ( $p < 0,001$ ), embora o CFU de *L. acidophilus* após o cocultivo com *C. albicans* IC 216, tenha aumentado em relação ao CP, passando de CFU/mL 365 para 564 ( $p < 0,001$ ) (Figura 4A e Apêndice A).

Esta avaliação sugere que a cepa de *L. acidophilus* apresentou atividade microbicida e inibiu, em cocultivo, o crescimento de *C. albicans* ATCC 90023 em 24,1% e de *C. albicans* IC 216 em 63,8% (Tabela 1).

Tabela 1 - Atividade microbicida de *Lactobacillus* sobre as cepas de *Candida* avaliadas

<i>Candida</i> spp./ <i>Lactobacillus</i> spp.	Atividade Microbicida (%)			
	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida glabrata</i>	
	ATCC 90023	IC 216	ATCC 90030	IC 15
<i>L. acidophilus</i>	24,1	63,8	23,8	27,5
<i>L. casei</i>	92,8	92,6	92,1	77,5
<i>L. casei shirota</i>	80,5	83,4	6,0	17,5
<i>L. crispatus</i>	93,8	87,1	92,1	62,5
<i>L. johnsonii</i>	79,0	66,3	91,4	30,0
<i>L. paracasei</i>	54,4	77,9	9,3	12,5
<i>L. rhamnosus</i>	92,8	93,3	62,9	60,0

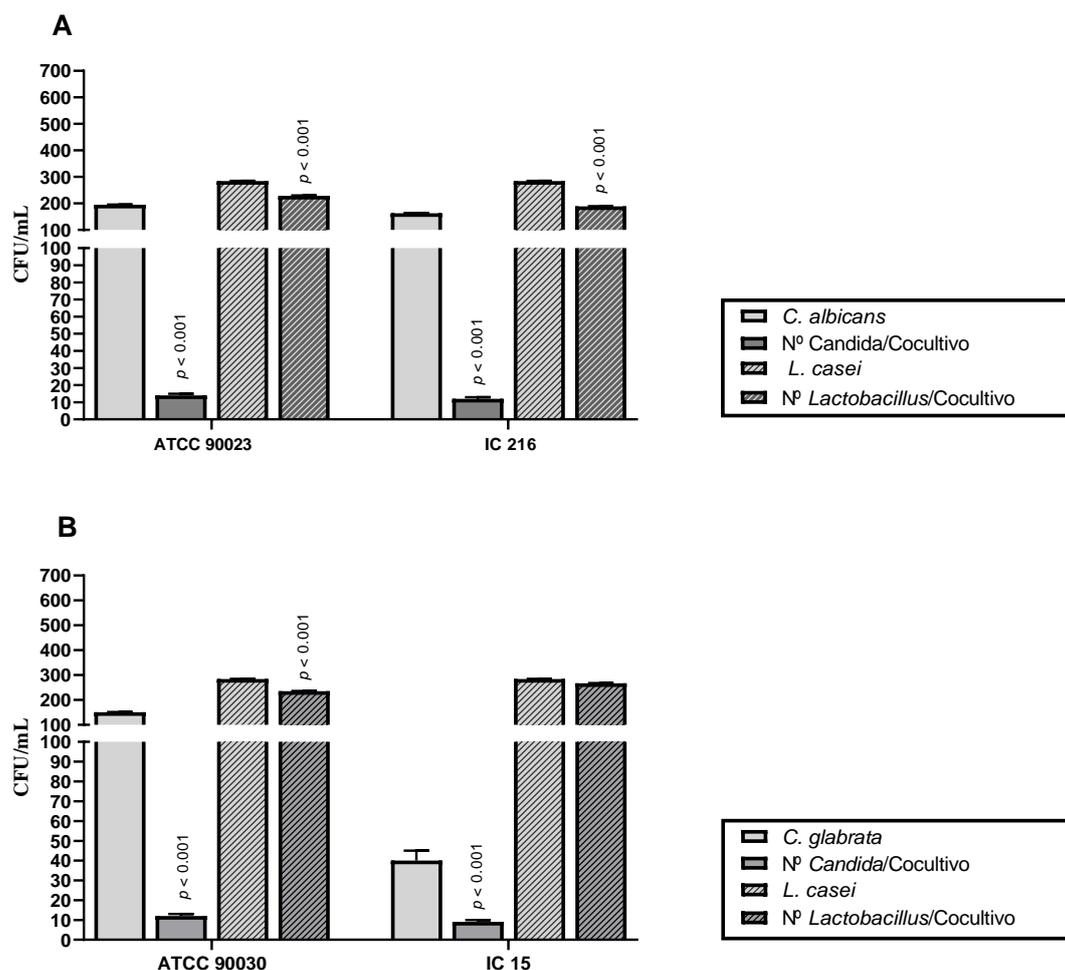
Após cocultivo com *L. acidophilus* com *C. glabrata* ATCC 90030 observa-se redução de crescimento de *C. glabrata* ATCC 90030 (CFU/mL 115), quando comparado ao CP (CFU/mL 151) ( $p < 0,001$ ). Um aumento é observado na contagem de CFU de *L. acidophilus* após cocultivo (CFU/mL 421) com *C. glabrata* ATCC 90030 quando comparado ao seu CP (CFU/mL 365) ( $p < 0,001$ ) (Figura 4B e Apêndice A).

No cocultivo de *C. glabrata* IC 15 com *L. acidophilus* observa-se uma redução de CFU/mL de *C. glabrata* IC 15 após o cocultivo em comparação ao seu CP ( $p < 0,001$ ) (CFU/mL 40 para 29), embora o CFU de *L. acidophilus* após o cocultivo, tenha aumentado em relação ao CP, passando de CFU/mL 365 para 389, não estatisticamente significativo (Figura 4B e Apêndice A).

Esta avaliação sugere que a cepa de *L. acidophilus* apresentou atividade microbicida e inibiu, em cocultivo, o crescimento de *C. glabrata* ATCC 90030 em 23,8% e de *C. glabrata* IC 15 em 27,5%. (Tabela 1), sem perda do crescimento de *L. acidophilus*.

#### 4.1.2. Avaliação da atividade microbicida de cepas de *Lactobacillus casei*

Após o cocultivo com *L. casei* com *C. albicans* ATCC 90023 observa-se redução de crescimento de *C. albicans* ATCC 90023 (CFU/mL 14), quando comparado ao CP (CFU/mL 195) ( $p < 0,001$ ). Uma redução também é observada na contagem de CFU de *L. casei* após cocultivo (CFU/mL 229) com *C. albicans* ATCC 90023 quando comparado ao seu CP (CFU/mL 284) ( $p < 0,001$ ) (Figura 5A e Apêndice A).

Figura 5 – Contagem de CFU após cocultivo com *Lactobacillus casei*

Os dados representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata técnica. As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste ANOVA de duas vias, com pós-teste múltiplo de Tukey, o  $p$  value indicado representa a comparação entre *Candida* spp. em cultura pura e após cocultivo, e entre *Lactobacillus casei*. em cultura pura e sua contagem após cocultivo.

No cocultivo de *C. albicans* IC 216 com essa mesma cepa de *Lactobacillus*, observa-se uma redução de CFU/mL de *C. albicans* IC 216 após o cocultivo em comparação ao seu CP (CFU/mL 163 para 12) ( $p < 0,001$ ). Também se observa redução de CFU de *L. casei* após o cocultivo com *C. albicans* IC 216, em relação ao CP, passando de CFU/mL 284 para 189 ( $p < 0,001$ ) (Figura 5A e Apêndice A).

Esta avaliação sugere que a cepa de *L. casei* apresentou atividade microbicida e inibiu, em cocultivo, o crescimento de *C. albicans* ATCC 90023 em 92,8% e de *C. albicans* IC 216 em 92,6%. (Tabela 1).

Após cocultivo com *L. casei* com *C. glabrata* ATCC 90030 observa-se redução de crescimento de *C. glabrata* ATCC 90030 (CFU/mL 12), quando comparado ao CP (CFU/mL 151) ( $p < 0,001$ ). Também se observa redução na contagem de CFU de *L. casei* após cocultivo

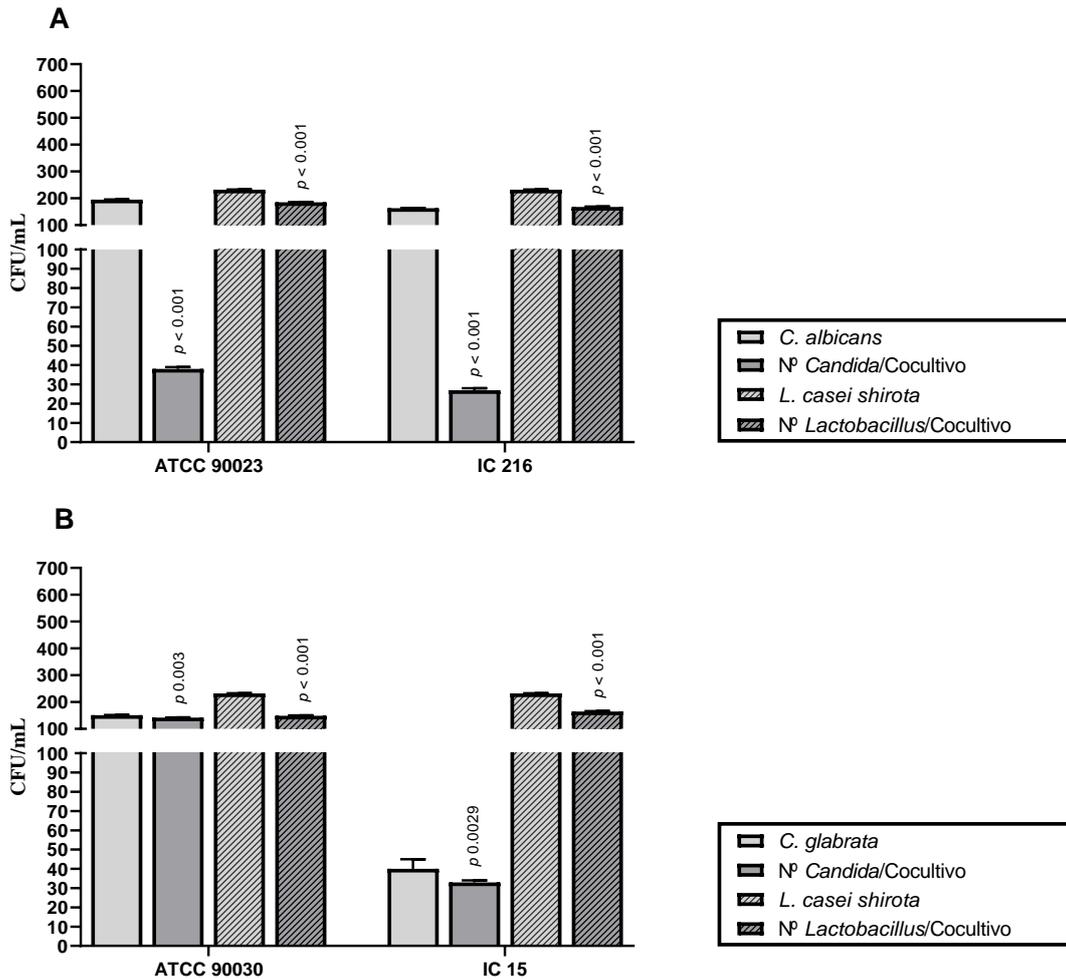
(CFU/mL 235) quando comparado ao seu CP (CFU/mL 284) ( $p < 0,001$ ) (Figura 5B e Apêndice A).

No cocultivo de *C. glabrata* IC 15 com *L. casei* observa-se redução de CFU/mL de *C. glabrata* IC 15 após o cocultivo em comparação ao seu CP (CFU/mL 40 para 9) ( $p < 0,001$ ). Também se observa redução de CFU de *L. casei* após o cocultivo com *C. glabrata* IC 15, em relação ao CP, passando de CFU/mL 284 para 267, porém não estatisticamente significativo (Figura 5B e Apêndice A).

Esta avaliação sugere que a cepa de *L. casei* apresentou atividade microbica e inibiu, em cocultivo, o crescimento de *C. glabrata* ATCC 90030 em 92,1% e de *C. glabrata* IC 15 em 77,5% (Tabela 1).

#### 4.1.3. Avaliação da atividade microbica de cepas de *Lactobacillus casei shirota*

Após o cocultivo com *L. casei shirota* com *C. albicans* ATCC 90023 observa-se redução de crescimento de *C. albicans* ATCC 90023 (CFU/mL 38), quando comparado ao CP (CFU/mL 195) ( $p < 0,001$ ). Uma redução também é observada na contagem de CFU de *L. casei shirota* após cocultivo com (CFU/mL 168) com *C. albicans* ATCC 90023 quando comparado ao seu CP (CFU/mL 232) ( $p < 0,001$ ) (Figura 6A e Apêndice A).

Figura 6 – Contagem de CFU após cocultivo com *Lactobacillus casei shirota*

Os dados representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata técnica. As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste ANOVA de duas vias, com pós-teste múltiplo de Tukey, o  $p$  value indicado representa a comparação entre *Candida* spp. em cultura pura e após cocultivo, e entre *Lactobacillus casei shirota*. em cultura pura e sua contagem após cocultivo.

No cocultivo de *C. albicans* IC 216 com essa mesma cepa de *Lactobacillus*, observa-se uma redução de CFU/mL de *C. albicans* IC 216 após o cocultivo em comparação ao seu CP (CFU/mL 163 para 27) ( $p < 0,001$ ). Também se observa redução de CFU de *L. casei shirota* após o cocultivo com *C. albicans* IC 216, em relação ao CP, passando de CFU/mL 232 para 168 ( $p < 0,001$ ) (Figura 6A e Apêndice A).

Esta avaliação sugere que a cepa de *L. casei shirota* apresentou atividade microbicida e inibiu, em cocultivo, o crescimento de *C. albicans* ATCC 90023 em 80,5% e de *C. albicans* IC 216 em 83,4% (Tabela 1).

Após cocultivo com *L. casei shirota* com *C. glabrata* ATCC 90030 observa-se redução de crescimento de *C. glabrata* ATCC 90030 (CFU/mL 142), quando comparado ao CP (CFU/mL 151) ( $p < 0,001$ ). Também é observada redução na contagem de CFU de *L. casei*

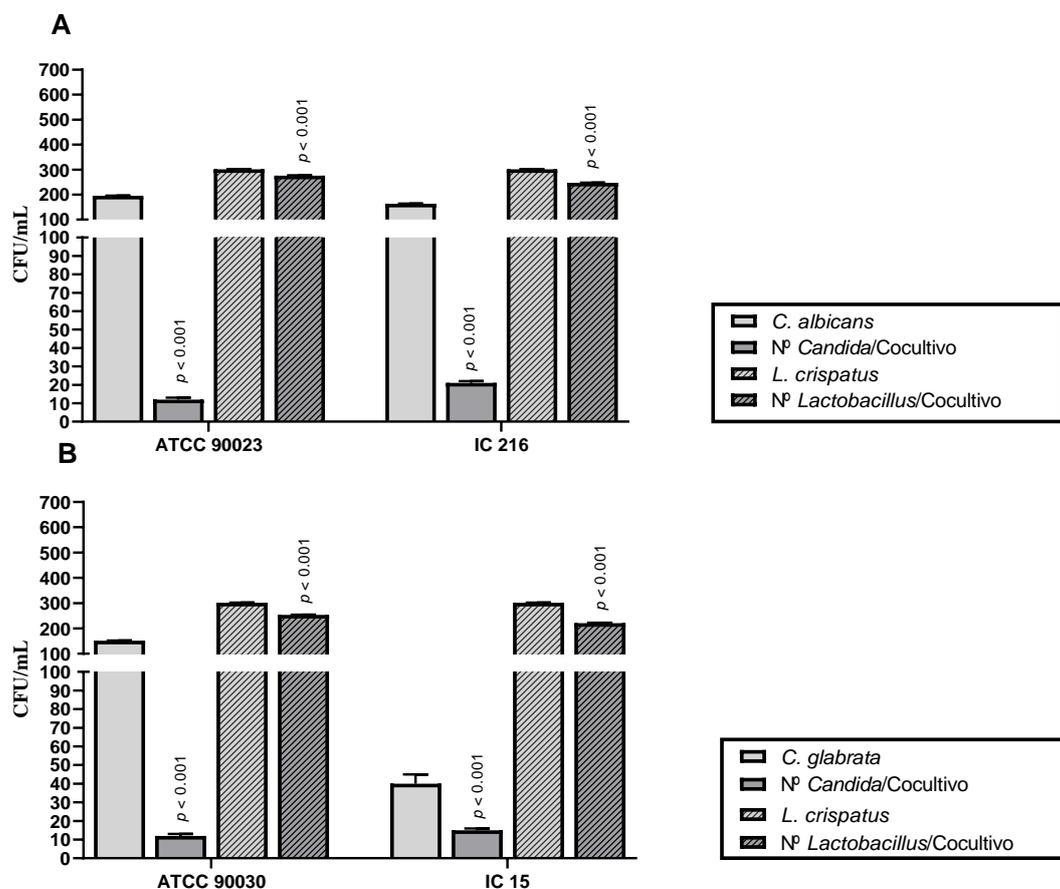
*shirota* após cocultivo (CFU/mL 149) com *C. glabrata* ATCC 90030 quando comparado ao seu CP (CFU/mL 232) ( $p < 0.003$ ) (Figura 6B e Apêndice A).

No cocultivo de *C. glabrata* IC 15 com *L. casei shirota* observa-se redução de CFU/mL de *C. glabrata* IC 15 após o cocultivo em comparação ao seu CP (CFU/mL 40 para 33) ( $p < 0,001$ ). Também se observa redução de CFU de *L. casei shirota* após o cocultivo, em relação ao CP, passando de CFU/mL 232 para 165 ( $p < 0.0029$ ) (Figura 6B e Apêndice A).

Esta avaliação sugere que a cepa de *L. casei shirota* apresentou atividade microbicida e inibiu, em cocultivo, o crescimento de *C. glabrata* ATCC 90030 em 6% e de *C. glabrata* IC 15 em 17,5% (Tabela 1).

#### 4.1.4. Avaliação da atividade microbicida de cepas de *Lactobacillus crispatus*

Após o cocultivo com *L. crispatus* com *C. albicans* ATCC 90023 observa-se redução de crescimento de *C. albicans* ATCC 90023 (CFU/mL 12), quando comparado ao CP (CFU/mL 195) ( $p < 0,001$ ). Uma redução também é observada na contagem de CFU de *L. crispatus* após cocultivo (CFU/mL 276) com *C. albicans* ATCC 90023 quando comparado ao seu CP (CFU/mL 301) ( $p < 0,001$ ) (Figura 7A e Apêndice A).

Figura 7 – Contagem de CFU após cocultivo com *Lactobacillus crispatus*

Os dados representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata técnica. As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste ANOVA de duas vias, com pós-teste múltiplo de Tukey, o  $p$  value indicado representa a comparação entre *Candida* spp. em cultura pura e após cocultivo, e entre *Lactobacillus crispatus*. em cultura pura e sua contagem após cocultivo.

No cocultivo de *C. albicans* IC 216 com essa mesma cepa de *Lactobacillus*, observa-se uma redução de CFU/mL de *C. albicans* IC 216 após o cocultivo em comparação ao seu CP (CFU/mL 163 para 21) ( $p < 0,001$ ). Também se observa redução de CFU de *L. crispatus* após o cocultivo com *C. albicans* IC 216, em relação ao CP, passando de CFU/mL 301 para 247 ( $p < 0,001$ ) (Figura 7A e Apêndice A).

Esta avaliação sugere que a cepa de *L. crispatus* apresentou atividade microbicida e inibiu, em cocultivo, o crescimento de *C. albicans* ATCC 90023 em 93,8% e de *C. albicans* IC 216 em 87,1% (Tabela 1).

Após cocultivo com *L. crispatus* com *C. glabrata* ATCC 90030 observa-se redução de crescimento de *C. glabrata* ATCC 90030 (CFU/mL 12), quando comparado ao CP (CFU/mL 151) ( $p < 0,001$ ). Também é observada redução na contagem de CFU de *L. crispatus* após

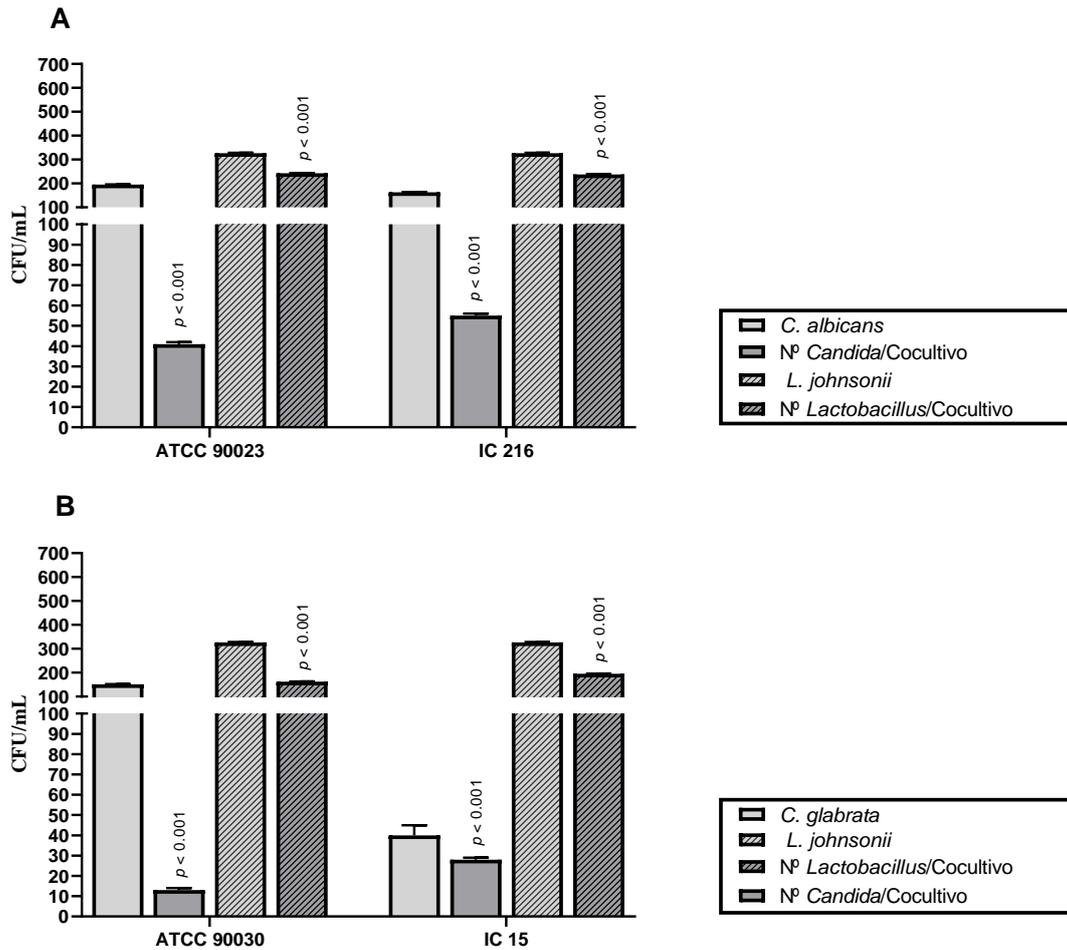
cocultivo (CFU/mL 253) quando comparado ao seu CP (CFU/mL 301) ( $p < 0,001$ ) (Figura 7B e Apêndice A).

No cocultivo de *C. glabrata* IC 15 com *L. crispatus* observa-se redução de CFU/mL de *C. glabrata* IC 15 após o cocultivo em comparação ao seu CP (CFU/mL 40 para 15) ( $p < 0,001$ ). Também se observa redução de CFU de *L. crispatus* após o cocultivo com *C. glabrata* IC 15, em relação ao CP, passando de CFU/mL 301 para 221 ( $p < 0,001$ ) (Figura 7B e Apêndice A).

Esta avaliação sugere que a cepa de *L. crispatus* apresentou atividade microbicida e inibiu, em cocultivo, o crescimento de *C. glabrata* ATCC 90030 em 92,1% e de *C. glabrata* IC 15 em 62,5% (Tabela 1).

#### 4.1.5. Avaliação da atividade microbicida de cepas de *Lactobacillus johnsonii*

Após o cocultivo com *L. johnsonii* com *C. albicans* ATCC 90023 observa-se redução de crescimento de *C. albicans* ATCC 90023 (CFU/mL 41), quando comparado ao CP (CFU/mL 195) ( $p < 0,001$ ). Uma redução também é observada na contagem de CFU de *L. johnsonii* após cocultivo (CFU/mL 243) com *C. albicans* ATCC 90023 quando comparado ao seu CP (CFU/mL 327) ( $p < 0,001$ ) (Figura 8A e Apêndice A).

Figura 8 – Contagem de CFU após cocultivo com *Lactobacillus johnsonii*

Os dados representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata técnica. As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste ANOVA de duas vias, com pós-teste múltiplo de Tukey, o  $p$  value indicado representa a comparação entre *Candida* spp. em cultura pura e após cocultivo, e entre *Lactobacillus johnsonii* em cultura pura e sua contagem após cocultivo.

No cocultivo de *C. albicans* IC 216 com essa mesma cepa de *Lactobacillus*, observa-se uma redução de CFU/mL de *C. albicans* IC 216 após o cocultivo em comparação ao seu CP (CFU/mL 163 para 55) ( $p < 0,001$ ). Também se observa redução de CFU de *L. johnsonii* após o cocultivo *C. albicans* IC 216, em relação ao CP, passando de CFU/mL 327 para 238 ( $p < 0,001$ ) (Figura 8A e Apêndice A).

Esta avaliação sugere que a cepa de *L. johnsonii* apresentou atividade microbicida e inibiu, em cocultivo, o crescimento de *C. albicans* ATCC 90023 em 79% e de *C. albicans* IC 216 em 66,3% (Tabela 1).

Após cocultivo com *L. johnsonii* com *C. glabrata* ATCC 90030 observa-se redução de crescimento de *C. glabrata* ATCC 90030 (CFU/mL 13), quando comparado ao CP (CFU/mL

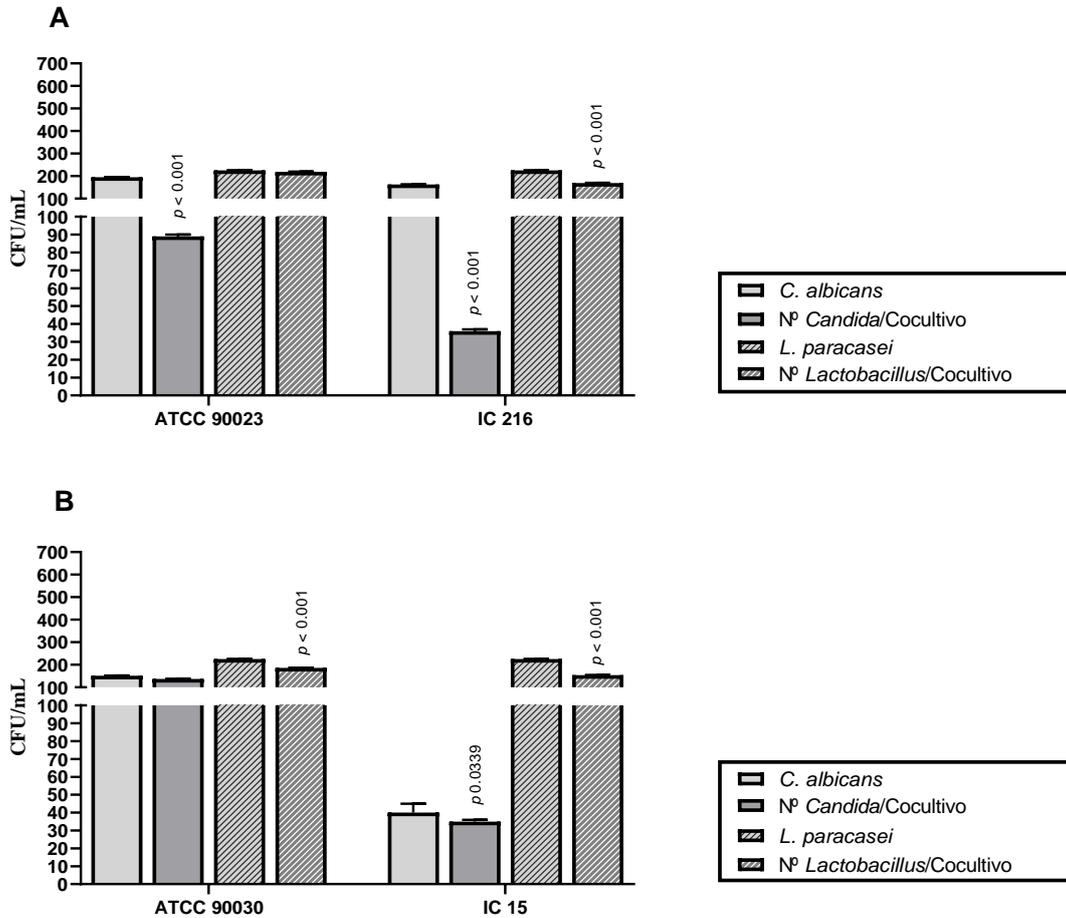
151) ( $p < 0,001$ ). Também é observada redução na contagem de CFU de *L. johnsonii* após cocultivo (CFU/mL 162) com *C. glabrata* ATCC 90030 quando comparado ao seu CP (CFU/mL 327) ( $p < 0,001$ ) (Figura 8B e Apêndice A).

No cocultivo de *C. glabrata* IC 15 com *L. johnsonii* observa-se redução de CFU/mL de *C. glabrata* IC 15 após o cocultivo em comparação ao seu CP (CFU/mL 40 para 28) ( $p < 0,001$ ). Também se observa redução de CFU de *L. johnsonii* após o cocultivo com *C. glabrata* IC 15, em relação ao CP, passando de CFU/mL 327 para 195 ( $p < 0,001$ ) (Figura 8B e Apêndice A).

Esta avaliação sugere que a cepa de *L. johnsonii* apresentou atividade microbicida e inibiu, em cocultivo, o crescimento de *C. glabrata* ATCC 90030 em 91,4% e de *C. glabrata* IC 15 em 30% (Tabela 1).

#### 4.1.6. Avaliação da atividade microbicida de cepas de *Lactobacillus paracasei*

Após o cocultivo com *L. paracasei* com *C. albicans* ATCC 90023 observa-se moderada redução de crescimento de *C. albicans* ATCC 90023 (CFU/mL 89), quando comparado ao CP (CFU/mL 195) ( $p < 0,001$ ). Uma redução também é observada na contagem de CFU de *L. paracasei* após cocultivo (CFU/mL 219) com *C. albicans* ATCC 90023 quando comparado ao seu CP (CFU/mL 225), não estatisticamente significativo (Figura 9A e Apêndice A).

Figura 9 – Contagem de CFU após cocultivo com *Lactobacillus paracasei*

Os dados representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata técnica. As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste ANOVA de duas vias, com pós-teste múltiplo de Tukey, o  $p$  value indicado representa a comparação entre *Candida* spp. em cultura pura e após cocultivo, e entre *Lactobacillus paracasei*. em cultura pura e sua contagem após cocultivo.

No cocultivo de *C. albicans* IC 216 com essa mesma cepa de *Lactobacillus*, observa-se uma redução de CFU/mL de *C. albicans* IC 216 após o cocultivo em comparação ao seu CP (CFU/mL 163 para 36) ( $p < 0,001$ ). Também se observa redução de CFU de *L. paracasei* após o cocultivo com *C. albicans* IC 216, em relação ao CP, passando de CFU/mL 225 para 169 ( $p < 0,001$ ) (Figura 9A e Apêndice A).

Esta avaliação sugere que a cepa de *L. paracasei* apresentou atividade microbicida e inibiu, em cocultivo, o crescimento de *C. albicans* ATCC 90023 em 54,4% e de *C. albicans* IC 216 em 77,9% (Tabela 1).

Após cocultivo com *L. paracasei* com *C. glabrata* ATCC 90030 observa-se redução de crescimento de *C. glabrata* ATCC 90030 (CFU/mL 137), quando comparado ao CP (CFU/mL 151), não estatisticamente significativo. Também é observada redução na contagem de CFU de

*L. paracasei* após cocultivo (CFU/mL 186) com *C. glabrata* ATCC 90030 quando comparado ao seu CP (CFU/mL 225) ( $p < 0,001$ ) (Figura 9B e Apêndice A).

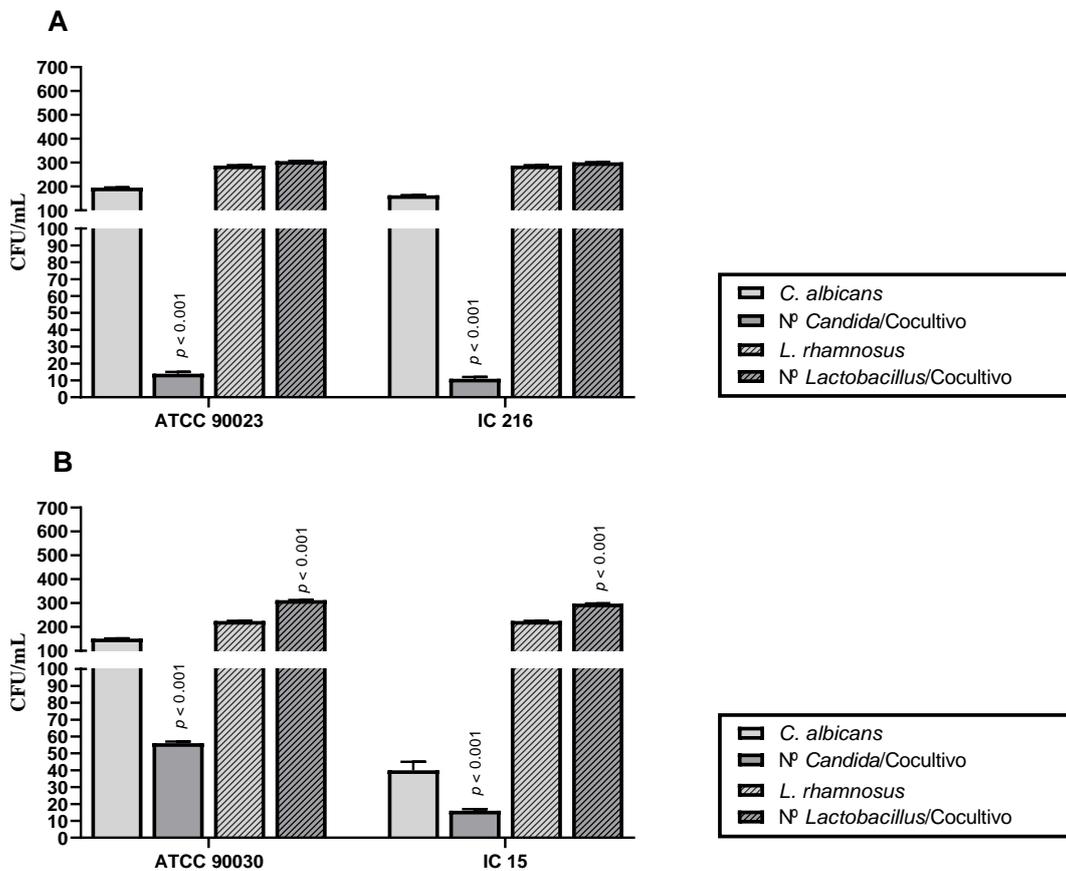
No cocultivo de *C. glabrata* IC 15 com *L. paracasei* observa-se redução de CFU/mL de *C. glabrata* IC 15 após o cocultivo em comparação ao seu CP (CFU/mL 40 para 35) ( $p 0.0339$ ). Também se observa redução de CFU de *L. paracasei* após o cocultivo com *C. glabrata* IC 15, em relação ao CP, passando de CFU/mL 225 para 154 ( $p < 0,001$ ) (Figura 9B e Apêndice A).

Esta avaliação sugere que a cepa de *L. paracasei* apresentou atividade microbicida e inibiu, em cocultivo, o crescimento de *C. glabrata* ATCC 90030 em 9,3% e de *C. glabrata* IC 15 em 12,5% (Tabela 1).

#### 4.1.7. Avaliação da atividade microbicida de cepas de *Lactobacillus rhamnosus andida*

Após o cocultivo com *L. rhamnosus* com *C. albicans* ATCC 90023 observa-se uma redução de crescimento de *C. albicans* ATCC 90023 (CFU/mL 14), quando comparado ao CP (CFU/mL 195) ( $p < 0,001$ ). Um discreto aumento é observado na contagem de CFU de *L. rhamnosus* após cocultivo (CFU/mL 306) com *C. albicans* ATCC 90023 quando comparado ao seu CP (CFU/mL 288), não estatisticamente significativo (Figura 10A e Apêndice A).

Figura 10 – Contagem de CFU após cocultivo com *Lactobacillus rhamnosus*



Os dados representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata técnica. As análises estatísticas foram realizadas empregando o teste ANOVA de duas vias, com pós-teste múltiplo de Tukey, o  $p$  value indicado representa a comparação entre *Candida* spp. em cultura pura e após cocultivo, e entre *Lactobacillus rhamnosus*. em cultura pura e sua contagem após cocultivo.

No cocultivo de *C. albicans* IC 216 com essa mesma cepa de *Lactobacillus*, observa-se uma redução de CFU/mL de *C. albicans* IC 216 após o cocultivo em comparação ao seu CP (CFU/mL 163 para 11) ( $p < 0,001$ ). Embora o resultado de CFU de *L. rhamnosus* após o cocultivo com *C. albicans* IC 216, tenha aumentado em relação ao CP, passando de CFU/mL 288 para 301, não estatisticamente significativo (Figura 10A e Apêndice A).

Esta avaliação sugere que a cepa de *L. rhamnosus* apresentou atividade microbicida e inibiu, em cocultivo, o crescimento de *C. albicans* ATCC 90023 em 92,8% e de *C. albicans* IC 216 em 93,3% (Tabela 1).

Após cocultivo com *L. rhamnosus* com *C. glabrata* ATCC 90030 observa-se redução de crescimento de *C. glabrata* ATCC 90030 (CFU/mL 56), quando comparado ao CP (CFU/mL 151) ( $p < 0,001$ ). Um aumento é observado na contagem de CFU de *L. rhamnosus* após cocultivo (CFU/mL 312) com *C. glabrata* ATCC 90030 quando comparado ao seu CP (CFU/mL 288) ( $p < 0,001$ ) (Figura 10B e Apêndice A).

No cocultivo de *C. glabrata* IC 15 com *L. rhamnosus* observa-se uma redução de CFU/mL de *C. glabrata* IC 15 após o cocultivo em comparação ao seu CP ( $p < 0,001$ ) (CFU/mL 40 para 16). Embora o resultado de CFU de *L. rhamnosus* após o cocultivo com *C. glabrata* IC 15, tenha aumentado em relação ao CP, passando de CFU/mL 288 para 298 ( $p < 0,001$ ) (Figura 10B e Apêndice A).

Esta avaliação sugere que a cepa de *L. rhamnosus* apresentou atividade microbicida e inibiu, em cocultivo, o crescimento de *C. glabrata* ATCC 90030 em 62,9% e de *C. glabrata* IC 15 em 60%. (Tabela 1).

As cepas de *Candida* apresentaram comportamento diferentes nos cocultivo com *Lactobacillus* spp. *Candida albicans* ATCC 90023 apresentou maior inibição de crescimento ( $\geq 79\%$ ) quando cocultivada com *L. casei*, *L. casei shirota*, *L. crispatus*, *L. johnsonii* e *L. rhamnosus*. Entretanto, quando cocultivada com *L. acidophilus* e *L. paracasei* demonstraram ação inibitória abaixo de 60% (Tabela 1).

Sobre a cepa oriunda de isolado clínico, *C. albicans* IC 216, *L. casei*, *L. casei shirota*, *L. crispatus*, *L. johnsonii* e *L. rhamnosus* apresentaram ação inibitória igual ou superior a 77,9%. Já em cocultivo com *L. acidophilus* e *L. johnsonii* demonstraram ação inibitória abaixo de 70% (Tabela 1).

As cepas de *Lactobacillus* demonstraram menor ação inibitória sobre *C. glabrata* do que a demonstrada sobre *C. albicans*. *Candida glabrata* ATCC 90030 apresentou inibição de crescimento acima de 90% quando cocultivada com *L. casei*, *L. crispatus* e *L. johnsonii*. As demais cepas, *L. acidophilus*, *L. casei shirota*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus* demonstraram inibição abaixo de 70% (Tabela 1).

Entretanto, estas cepas não demonstraram a mesma ação sobre a cepa oriunda de isolado clínico, *C. glabrata* IC 15. Apenas *L. casei* apresentou ação inibitória superior a 70% sobre *C. glabrata* IC 15 (Tabela 1). As cepas *L. acidophilus*, *L. casei shirota*, *L. johnsonii* e *L. paracasei* apresentaram ação inibitória igual ou inferior a 30%. Além destas cepas *L. crispatus* e *L.*

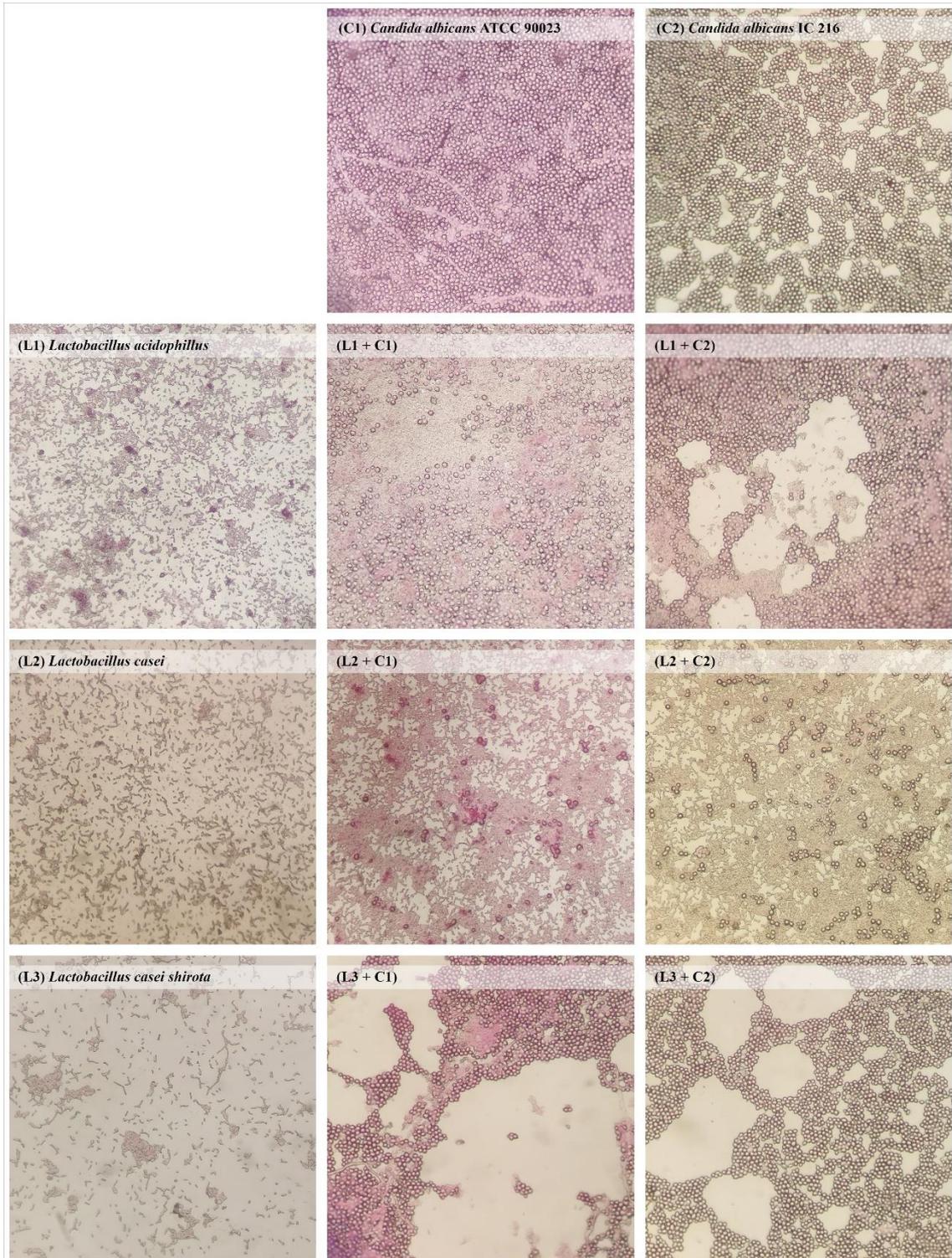
*rhamnosus* apresentaram ação inibitória superior a 60%, quando cocultivadas com *C. glabrata* IC 15 (Tabela 1).

#### **4.2. Ação de *Lactobacillus* spp. sobre biofilme de *Candida* spp.**

Para a avaliação da ação de *Lactobacillus* spp. sobre biofilme de *Candida* spp. foram analisadas as fotos das imagens microscópicas das lamínulas coradas por coloração de Gram. Para a análise, foram utilizadas as cepas *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus paracasei*, e *Lactobacillus rhamnosus*, sobre as cepas de *Candida albicans* (ATCC 90023 e IC 216) e *Candida glabrata* (ATCC 90030 e IC 15). Os biofilmes das cepas, cultivadas isoladamente, foram considerados como controle e comparados aos biofilmes dos cocultivos em cada uma das figuras.

Em cultivo isolado, *C. albicans* ATCC 90023 (Figura 11 C1) e *C. albicans* IC 216 (Figura 11 C2) apresentaram crescimento intenso, morfologia leveduriforme e biofilme denso, e *L. acidophilus* (Figura 11 L1), *L. casei* (Figura 11 L2), *L. casei shirota* (Figura 11 L3) apresentaram formato bacilar, crescimento intenso e tamanho menor do que as leveduras.

Figura 11 - Imagens microscópicas (ampliação 40x) do cocultivo de *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* e *L. casei shirota* com *Candida albicans* ATCC 90023 e IC 216.



Em cocultivo com *L. acidophilus*, *C. albicans* ATCC 90023 apresentou redução no crescimento, com pontos isolados de formação de biofilme. As leveduras não apresentaram formação de hifas e foi possível ver o *L. acidophilus* em quantidade, preenchendo os espaços entre as células de *C. albicans* ATCC 90023 (Figura 11 L1 + C1).

*Candida albicans* IC 216 apresentou comportamento semelhante em cocultivo com *L. acidophilus*. A inibição do crescimento foi maior do que aconteceu com a *C. albicans* ATCC 90023, assim como a redução do biofilme. As células de leveduras apresentaram-se isoladas e em menor quantidade. *Lactobacillus acidophilus* apresentou-se bem distribuído e em grande quantidade (Figura 11 L1 + C2).

O estudo do biofilme de *C. albicans* ATCC 90023 em cocultivo com *L. casei*, apresentou que redução do crescimento fúngico, do biofilme e da formação de hifas. Foi possível perceber o número de *L. casei* em torno de *C. albicans* ATCC 90023 e diversos espaços vazios, diferentemente do visualizado no controle (Figura 11 L2 + C1).

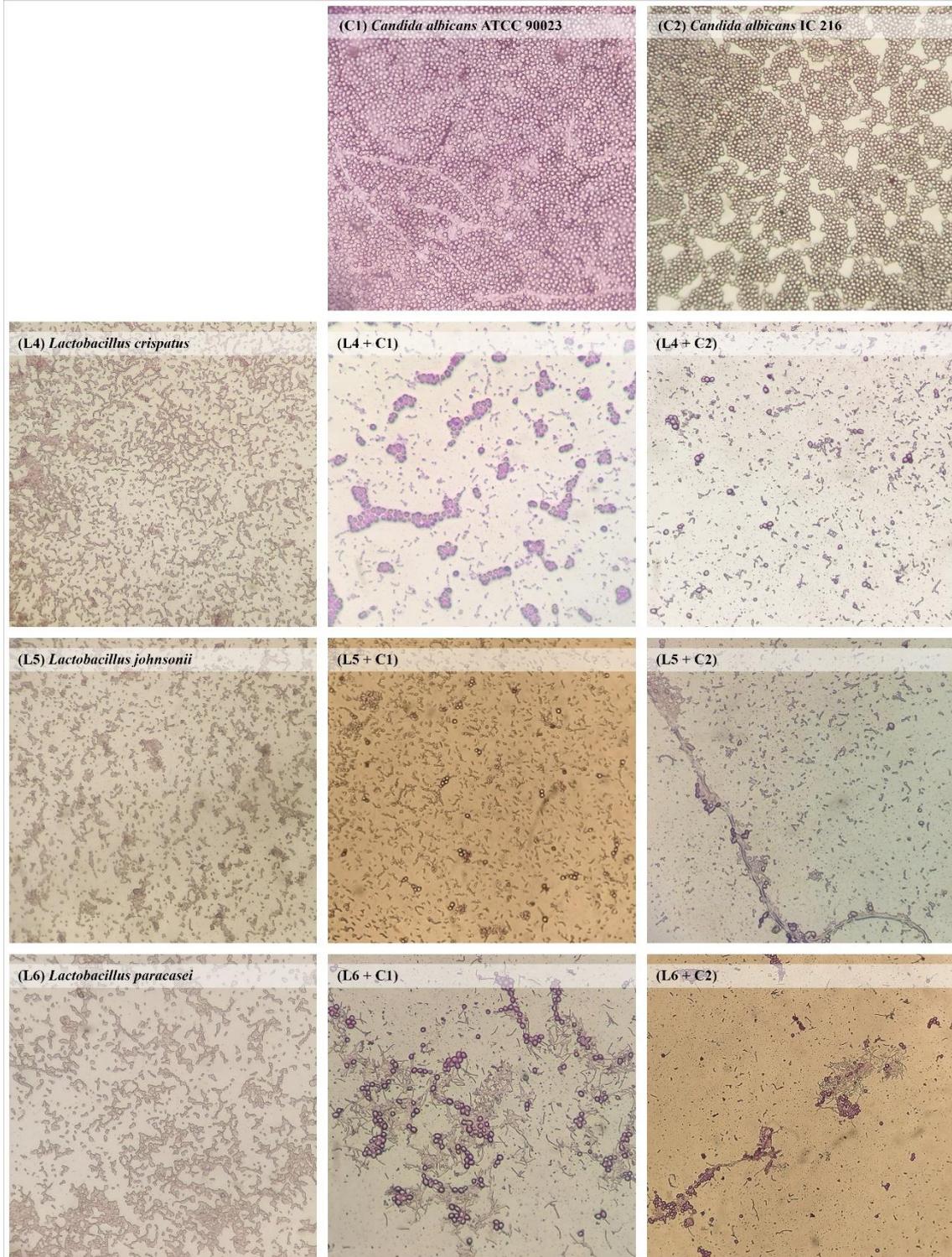
As imagens microscópicas do cocultivo de *C. albicans* IC 216 e *L. casei*, sugerem que a bactéria promoveu a inibição do crescimento de *C. albicans* IC 216, redução na formação de hifas e na formação de biofilme. A lâmina apresentava pontos isolados de biofilme e quantidade de células de *L. casei* (Figura 11 L2 + C2).

As lâminas do cocultivo de *C. albicans* ATCC 90023 e *L. casei shirota* apresentaram as células de leveduras dispostas em biofilme, com alguns espaços vazios na lâmina e algumas leveduras apresentaram hifas. Entretanto, *L. casei shirota* era escasso (Figura 11 L3 + C1).

Em cocultivo, *C. albicans* IC 216 e *L. casei shirota* apresentaram comportamento semelhante ao percebido no cocultivo de *C. albicans* ATCC 90023 com *L. casei shirota*. Entretanto, *C. albicans* IC 216 apresentou maior número de hifas, inclusive em maior número e tamanho das ramificações, quando comparada às imagens do controle de *C. albicans* IC 216 e do cocultivo de *C. albicans* ATCC 90023 com *L. casei shirota*. No cocultivo de *C. albicans* IC 216 com *L. casei shirota*, houve redução do número de células de ambos os microorganismos (Figura 11 L3 + C2).

*Candida albicans* ATCC 90023 apresentou intensa redução no crescimento quando cocultivado com *L. crispatus*, com poucos pontos isolados de formação de biofilme. As leveduras não apresentaram formação de hifas e foi possível ver o *L. crispatus* em menor quantidade, bem distribuído e preenchendo os espaços entre as células de *C. albicans* ATCC 90023 (Figura 12 L4 + C1).

Figura 12 - Imagens microscópicas (ampliação 40x) do cocultivo de *Lactobacillus crispatus*, *L. johnsonii* e *L. paracasei* com *Candida albicans* ATCC 90023 e IC 216.



*Candida albicans* IC 216 também apresentou intensa redução no crescimento, quando cocultivado com *L. crispatus*, não apresentou formação de hifas e poucos pontos isolados de biofilme. Neste caso, também houve redução de *L. crispatus* (Figura 12 L4 + C2).

As imagens do estudo do biofilme de *C. albicans* ATCC 90023 em cocultivo com *L. johnsonii* indicam inibição do crescimento da levedura, redução no aparecimento de hifas e na formação do biofilme. *Lactobacillus johnsonii* também apresentou redução, mas não foi tão intensa quanto a inibição de *C. albicans* ATCC 90023 (Figura 12 L5 + C1).

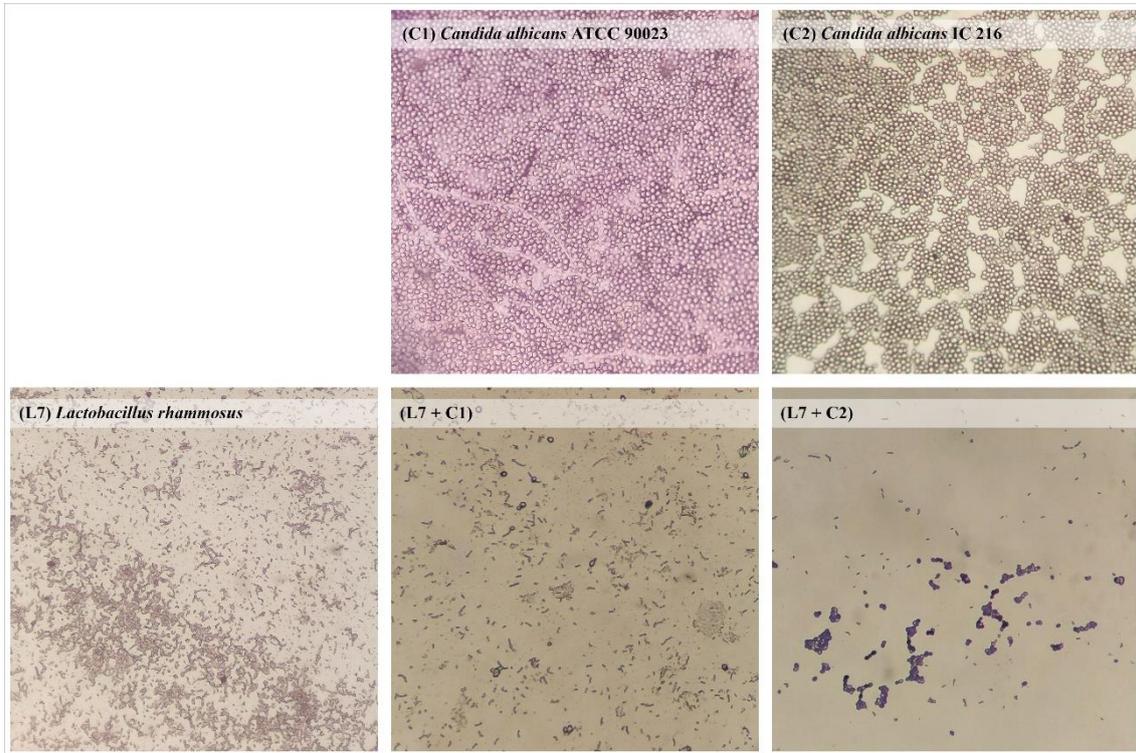
*Candida albicans* IC 216 apresentou intensa redução, em cocultivo com *L. johnsonii*, mas apresentou maior número de pontos de biofilme, assim como hifas em maior número e tamanho das ramificações, quando comparada às imagens do controle de *C. albicans* IC 216 e do cocultivo de *C. albicans* ATCC 90023. *Lactobacillus johnsonii* também apresentou redução do número de células (Figura 12 L5 + C2).

Em cocultivo com *L. paracasei*, *C. albicans* ATCC 90023 apresentou menor crescimento quando comparado ao controle, muitas células apresentaram formação de hifas com longos prolongamentos e pontos de biofilme ao longo da lâmina. *Lactobacillus paracasei* apresentou crescimento semelhante ao controle (Figura 12 L6 + C1).

*Candida albicans* IC 216 também apresentou redução no crescimento, entretanto foi possível perceber biofilme e muitas células com formação de hifas com longos prolongamentos. *Lactobacillus paracasei* apresentou crescimento inferior, em cocultivo com *C. albicans* IC 216, quando comparada às imagens do controle de *C. albicans* IC 216 e do cocultivo de *C. albicans* ATCC 90023 (Figura 12 L6 + C2).

As lâminas do cocultivo de *C. albicans* ATCC 90023 e *L. rhamnosus* apresentaram as células de leveduras distantes, com algumas células agrupadas e sem a formação de hifas e de biofilme na lâmina. *Lactobacillus rhamnosus* apresentou-se de forma escassa nas lâminas de cocultivo quando comparadas às lâminas de controle (Figura 13 L7 + C1).

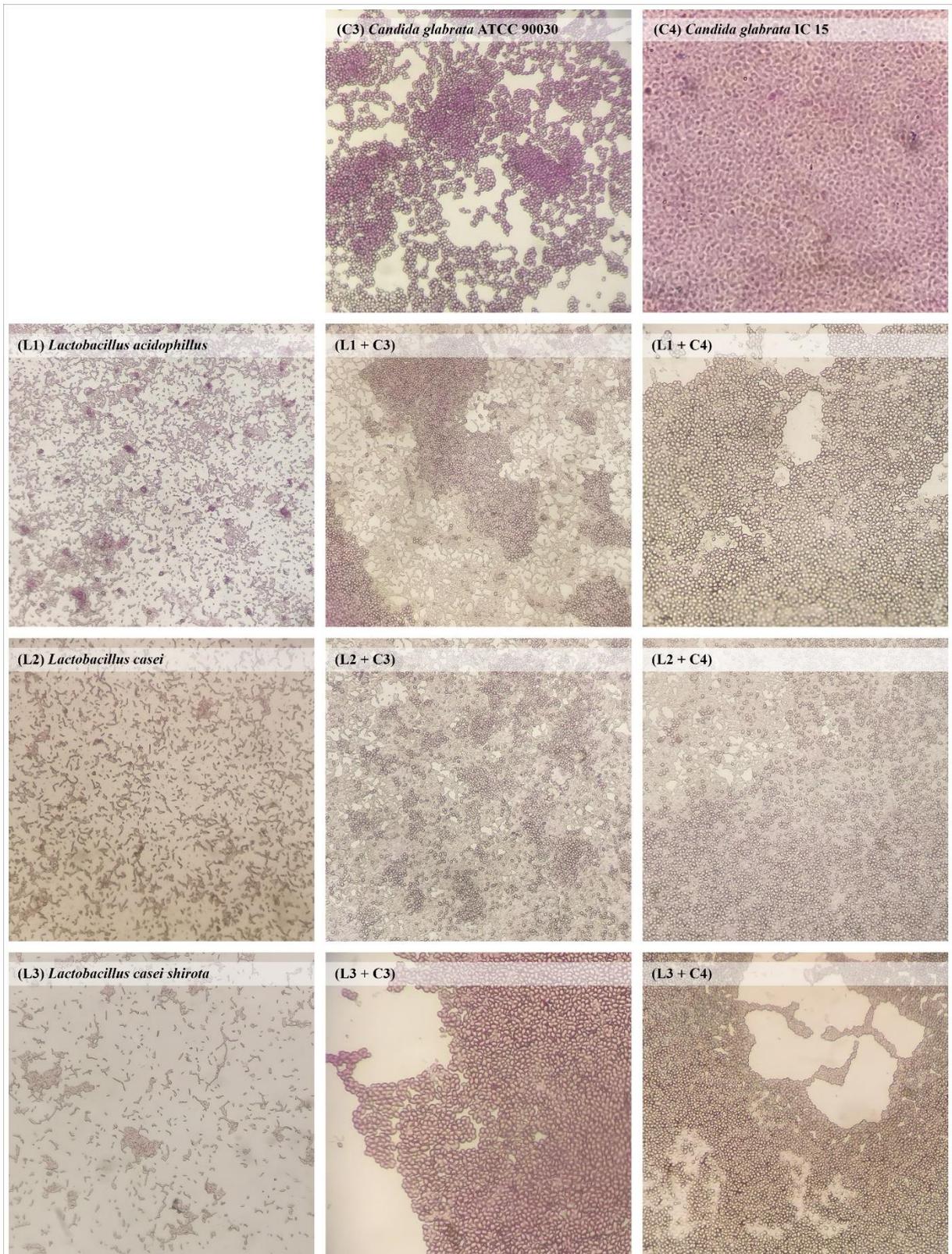
Figura 13- Imagens microscópicas (ampliação 40x) do cocultivo de *Lactobacillus rhamnosus* com *Candida albicans* ATCC 90023 e IC 216



*Lactobacillus rhamnosus* apresentou maior ação inibitória quando cocultivado com *C. albicans* IC 216. As células de levedura estavam escassas, sem pontos de biofilme e formação de hifas (Figura 13 L7 + C2).

Em cultivo isolado, *C. glabrata* ATCC 90030 (Figura 14 C3) e *C. glabrata* IC 15 (Figura 14 C4) apresentou crescimento intenso, ausência de hifas (característica da espécie) e formação de biofilme. As células fúngicas apresentaram morfologia leveduriforme, grande número de células, próximas e com poucos espaços vazios na lamínula. *Lactobacillus* spp. apresentaram-se em formato bacilar e em menor tamanho, quando comparadas às leveduras. *Candida glabrata* não apresenta a propriedade de formar hifas, característica percebida nas imagens de controle e cocultivo (Figura 14).

Figura 14 – Imagens microscópicas (ampliação 40x) do cocultivo de *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* e *L. casei shirota* com *Candida glabrata* ATCC 90030 e IC 15



As imagens microscópicas do cocultivo de *C. glabrata* ATCC 90030 e *L. acidophilus* indicam a redução do crescimento da levedura, células fúngicas dispersas, redução na formação de biofilme e aumento na quantidade de bactérias presentes no cocultivo (Figura 14 L1 + C3).

*Candida glabrata* IC 15 também apresentou redução no crescimento e na formação de biofilme. As leveduras apresentaram-se dispersas ao longo das lâminas estudadas. *Lactobacillus acidophilus* apresentou redução no crescimento, quando comparado às imagens do controle (Figura 14 L1 + C4).

Em cocultivo com *L. casei*, *C. glabrata* ATCC 90030 apresentou intensa redução do crescimento, comparada ao controle. As células de levedura apresentaram-se dispersas e sem formação de biofilme. *Lactobacillus casei* apresentaram crescimento inferior ao apresentado na lâmina controle (Figura 14 L2 + C3).

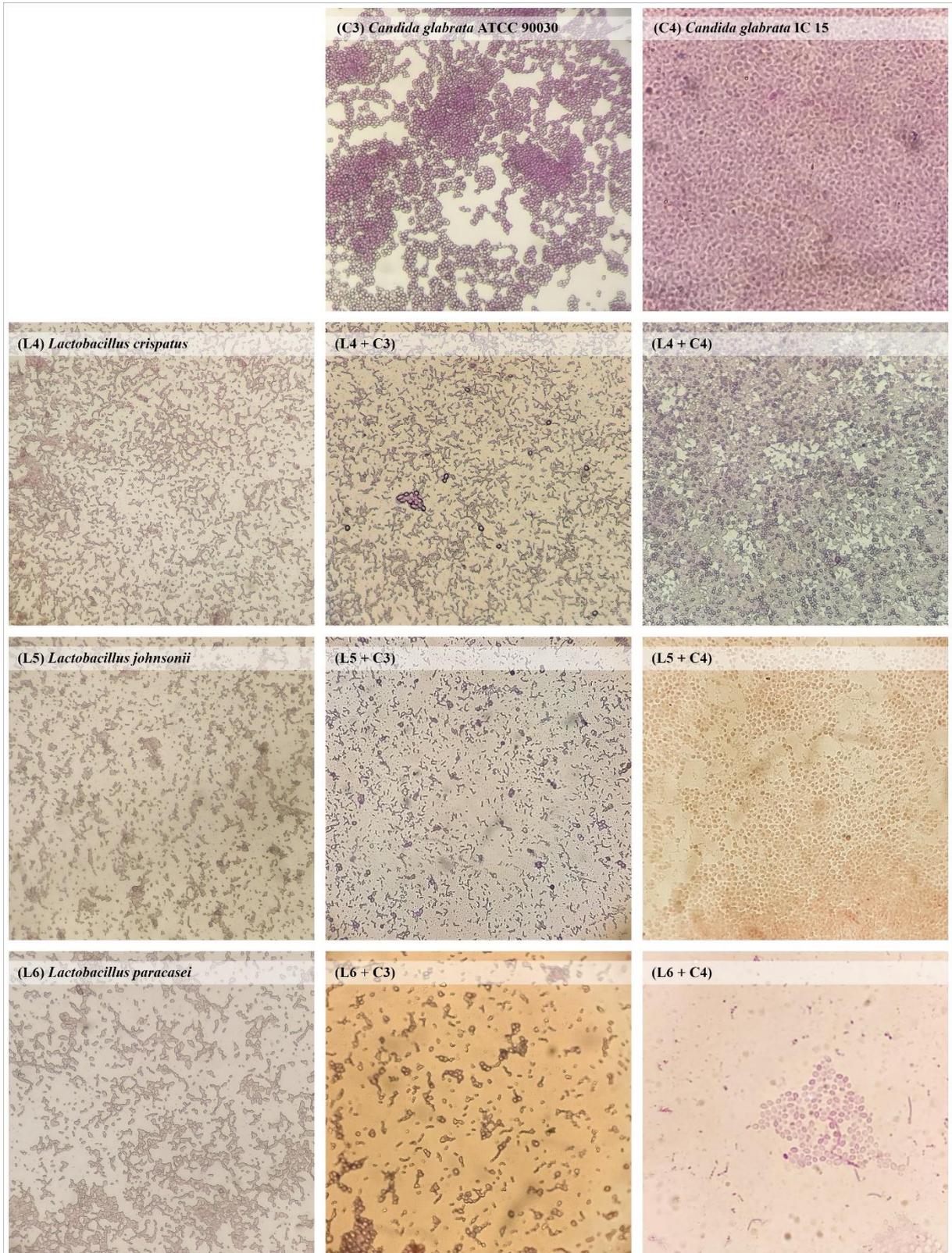
Comportamento semelhante foi apresentado por *C. glabrata* IC 15, que apresentou intensa redução no crescimento, com células dispersas e sem formação de biofilme. *Lactobacillus casei* também mostrou crescimento inferior, quando comparado ao apresentado na lâmina controle e nas lâminas de cocultivo com *C. glabrata* ATCC 90030 (Figura 14 L2 + C4).

*Candida glabrata* ATCC 90030 mostrou inibição após cocultivo com *L. casei shirota*, quando comparada ao controle. As células estavam dispostas em grupos e em alguns pontos da lâmina apresentavam biofilme. *Lactobacillus casei shirota* apresentou redução quando comparada à imagem controle (Figura 14 – Figura L3+ C3).

*Candida glabrata* IC 15 também apresentou comportamento semelhante, a *C. glabrata* ATCC 90030, quando cocultivada com *L. casei shirota*. As leveduras também estavam dispostas em grupos e em alguns pontos da lâmina apresentavam biofilme. *Lactobacillus casei shirota* apresentou redução quando comparada à imagem controle, mas em quantidade um pouco maior do que havia no cocultivo com *C. glabrata* ATCC 90030 (Figura 14 L3 + C4).

As imagens do estudo do cocultivo de *C. glabrata* ATCC 90030 com *L. crispatus*, revelaram que houve redução de crescimento do número de células de *C. glabrata* ATCC 90030. A redução no crescimento do biofilme foi intensa neste cocultivo. As células de levedura estavam escassas e sem presença de biofilme nas lâminas. *Lactobacillus crispatus* apresentou aumento no crescimento, quando comparada ao controle (Figura 15 L4 + C3).

Figura 15 – Imagens microscópicas (ampliação 40x) do cocultivo de *Lactobacillus crispatus*, *L. johnsonii* e *L. paracasei* com *Candida glabrata* ATCC 90030 e IC 15



Intensa inibição do crescimento das leveduras também aconteceu no cocultivo de *C. glabrata* IC 15 com *L. crispatus*. Foi possível perceber redução na quantidade de células e na formação de biofilme e apenas algumas células aglomeradas. *Lactobacillus crispatus* apresentou aumento no crescimento, quando comparada ao controle, mas em quantidade um pouco maior do que havia no cocultivo com *C. glabrata* ATCC 90030 (Figura 15 L4 + C4).

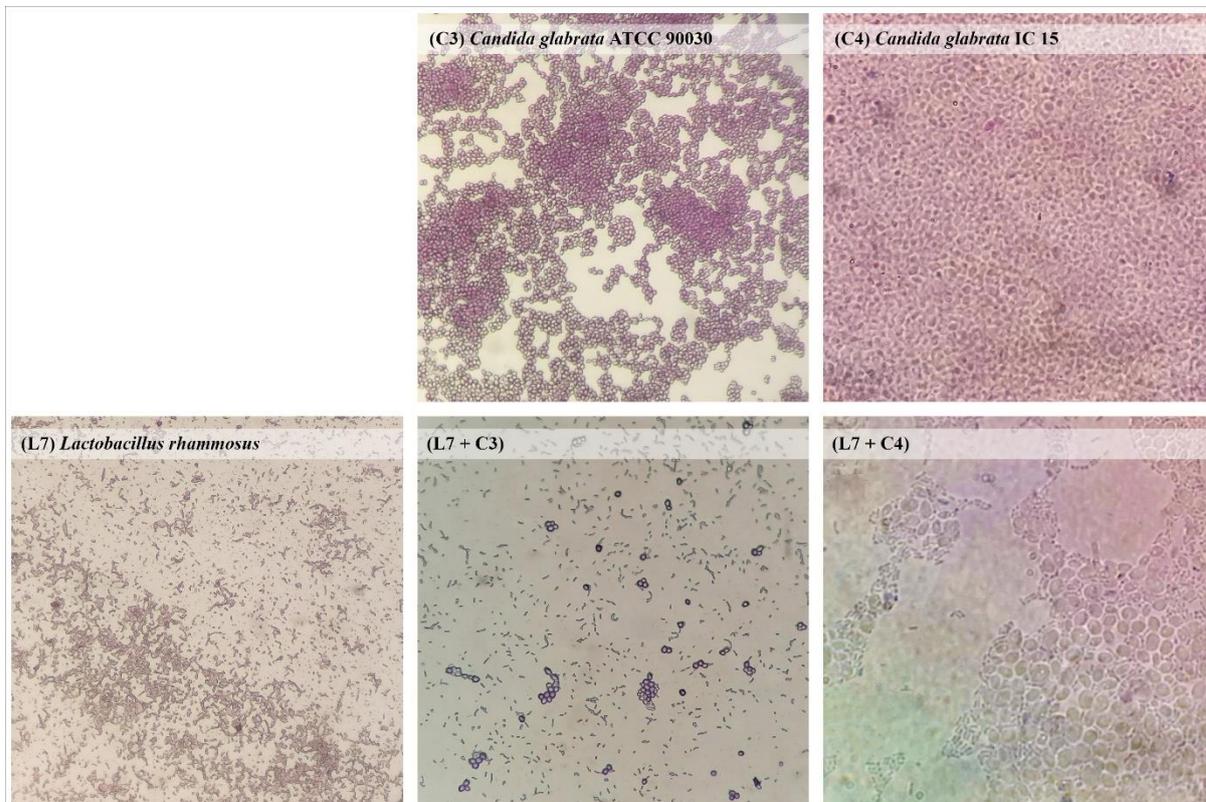
As lâminas do cocultivo de *C. albicans* ATCC 90030 com *L. johnsonii* apresentaram as células de leveduras distantes, com algumas células agrupadas e poucos pontos apresentaram formação de biofilme. *Lactobacillus johnsonii* também apresentou redução do crescimento, quando comparada à lâmina do cultivo controle (Figura 15 L5 + C3).

Já as lâminas de *C. glabrata* IC 15 com *L. johnsonii* apresentaram redução do crescimento, quando comparadas às lâminas de controle. Outro aspecto percebido foi maior quantidade de leveduras agrupadas e mais pontos de biofilme, do que visualizados na lâmina do cocultivo de *C. glabrata* ATCC 90030 com *L. johnsonii*. No cocultivo com *C. glabrata* IC 15, *L. johnsonii* apresentou redução maior do que aconteceu com o controle e, ainda maior, do que aconteceu com *C. albicans* ATCC 90030 (Figura 15 L5 + C4).

Foi possível perceber pontos de biofilme na lâmina do cocultivo de *C. glabrata* ATCC 90030 com *L. paracasei* apresentou redução do crescimento quando comparada à visualizada no cultivo controle do mesmo (Figura 15 L6 + C3).

Na lâmina com *C. glabrata* IC 15, observa-se a formação de biofilme, assim como o crescimento das leveduras, quando comparado às lâminas controle de *C. glabrata* IC 15. *Lactobacillus paracasei* também apresentou redução no crescimento, tanto comparada ao controle quanto às lâminas de cocultivo de *C. glabrata* ATCC 90030 com *L. paracasei* (Figura 15 L6 + C4).

Figura 16 – Imagens microscópicas (ampliação 40x) do cocultivo de *Lactobacillus rhamnosus* com *Candida glabrata* e IC 15



As imagens microscópicas do cocultivo de *C. glabrata* ATCC 90030 e *L. rhamnosus* indicaram intensa redução no crescimento das leveduras. As células de *C. glabrata* ATCC 90030 apresentaram-se dispersas e não houve formação de biofilme. *Lactobacillus rhamnosus* apresentou crescimento superior ao controle (Figura 16 L7 + C3).

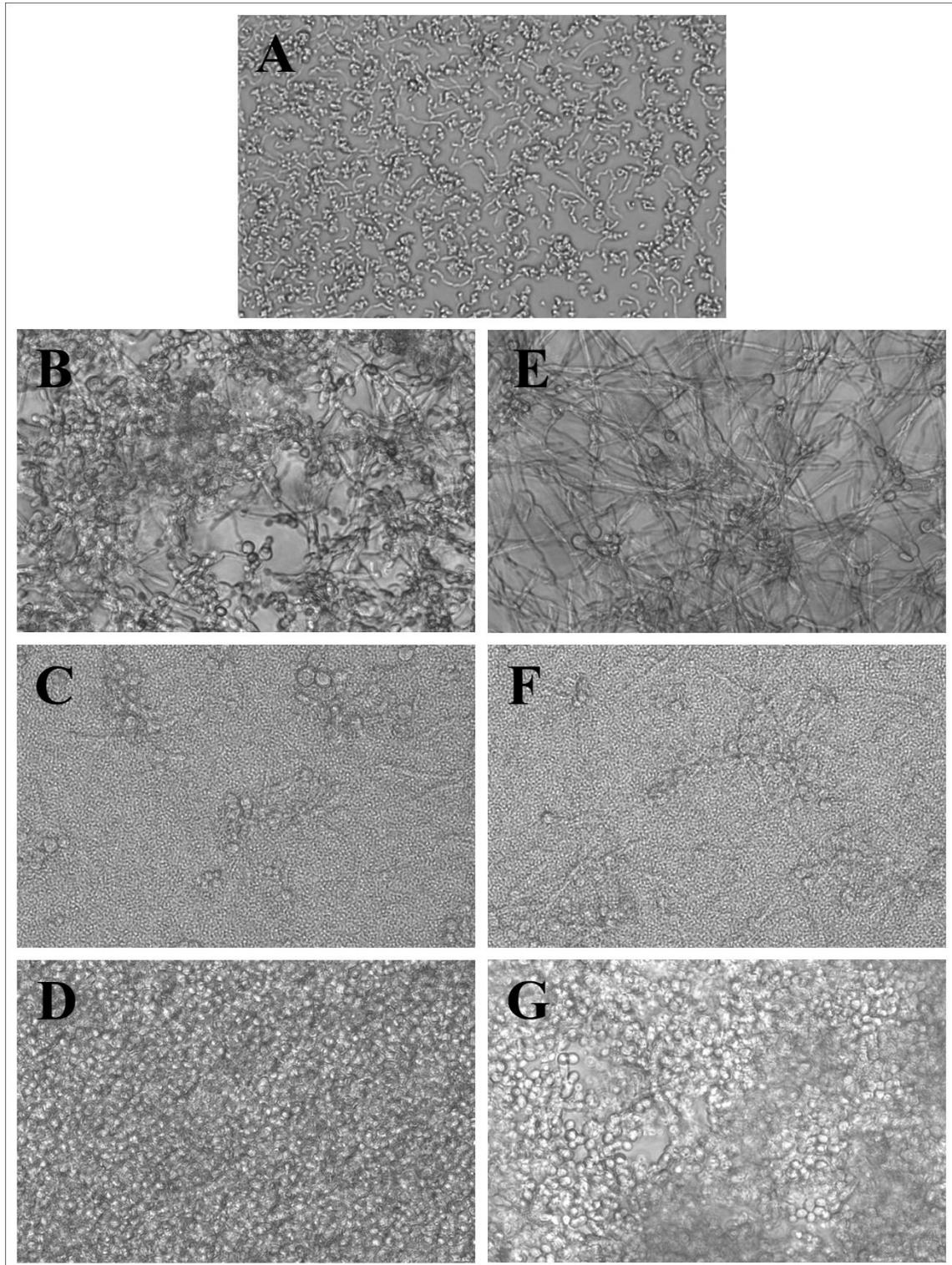
O cocultivo de *C. glabrata* IC 15 com *L. rhamnosus* revelou redução do número de células de *C. glabrata* IC 15, células de levedura dispersas e a não formação de biofilme. Entretanto, foi possível perceber maior quantidade de *C. glabrata* IC 15, do que nas lâminas do cocultivo de *C. glabrata* ATCC 90030 com *L. rhamnosus*. *Lactobacillus rhamnosus* apresentou-se em menor quantidade do que a encontrada na lâmina controle (Figura 16 L7 + C4).

### **4.3. Ensaio de interação entre cepas de *Candida albicans*, *Lactobacillus* spp. e solução sobrenadante de cultivo de *Lactobacillus* spp. para avaliação sobre a formação de hifas e a produção de biofilme**

4.3.1. Ensaio de interação entre cepas de *Candida albicans*, *Lactobacillus casei* e solução sobrenadante de cultivo de *Lactobacillus casei* para avaliação sobre a formação de hifas e a produção de biofilme

*C. albicans* ATCC 90023 (Figura 17B) após o cocultivo com *L. casei* (Figura 17A), apresentou redução na quantidade de leveduras e na produção de hifas (Figura 17C). O cocultivo de *C. albicans* ATCC 90023 com a solução sobrenadante de *L. casei* apresentou que *C. albicans* ATCC 90023 não apresenta a formação de hifas em 24 h, apesar de não ter apresentado redução no crescimento (Figura 17D).

Figura 17 – Imagens microscópicas (ampliação 400x) da interação de *Candida albicans* e *Lactobacillus casei* após 24h de cocultivo



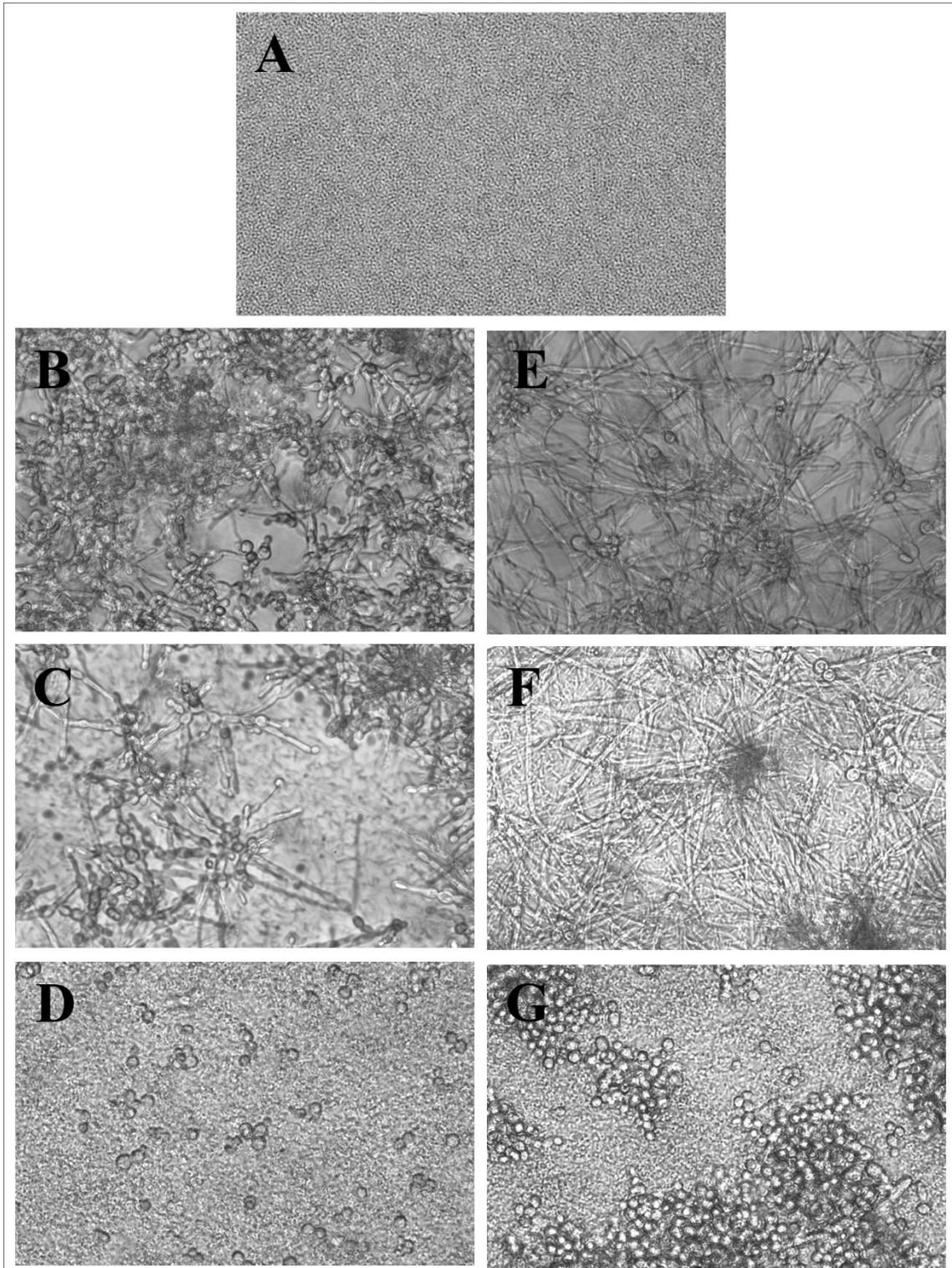
(A) *Lactobacillus casei*; (B) *Candida albicans* ATCC 90023; (C) Cocultivo entre *Candida albicans* ATCC 90023 e *Lactobacillus casei*; (D) Cocultivo *Candida albicans* ATCC 90023 e solução sobrenadante do cultivo de *Lactobacillus casei*; (E) *Candida albicans* SC 5314; (F) Cocultivo entre *Candida albicans* SC 5314 e *Lactobacillus casei* (G) Cocultivo *Candida albicans* SC 5314 e solução sobrenadante do cultivo de *Lactobacillus casei*.

Após interação entre *L. casei* (Figura 17A) e *C. albicans* SC 5314 (Figura 17E), observa-se comportamento semelhante ao apresentado pela *C. albicans* ATCC 90023. Houve redução na quantidade de leveduras e na produção de hifas (Figura 17F). O cocultivo de *C. albicans* SC 5314 com a solução sobrenadante de *L. casei* apresentou que *C. albicans* SC 5314 não apresentou a formação de hifas em 24 h, apesar de não ter demonstrado redução no crescimento (Figura 17G).

4.3.2. Ensaio de interação entre cepas de *Candida albicans*, *Lactobacillus crispatus* e solução sobrenadante de cultivo de *Lactobacillus crispatus* para avaliação sobre a formação de hifas e a produção de biofilme

Após cocultivo com *L. crispatus* (Figura 18A), *C. albicans* ATCC 90023 (Figura 18B) apresentou redução na quantidade de leveduras e na produção de hifas (Figura 18C). O cocultivo de *C. albicans* ATCC 90023 com a solução sobrenadante de *L. crispatus* apresentou que *C. albicans* ATCC 90023 não apresentou a formação de hifas em 24 h, e apresentou intensa redução no crescimento (Figura 18D).

Figura 18 – Images microscópicas (ampliação 400x) da interação de *Candida albicans* com *Lactobacillus crispatus* após 24h de cocultivo



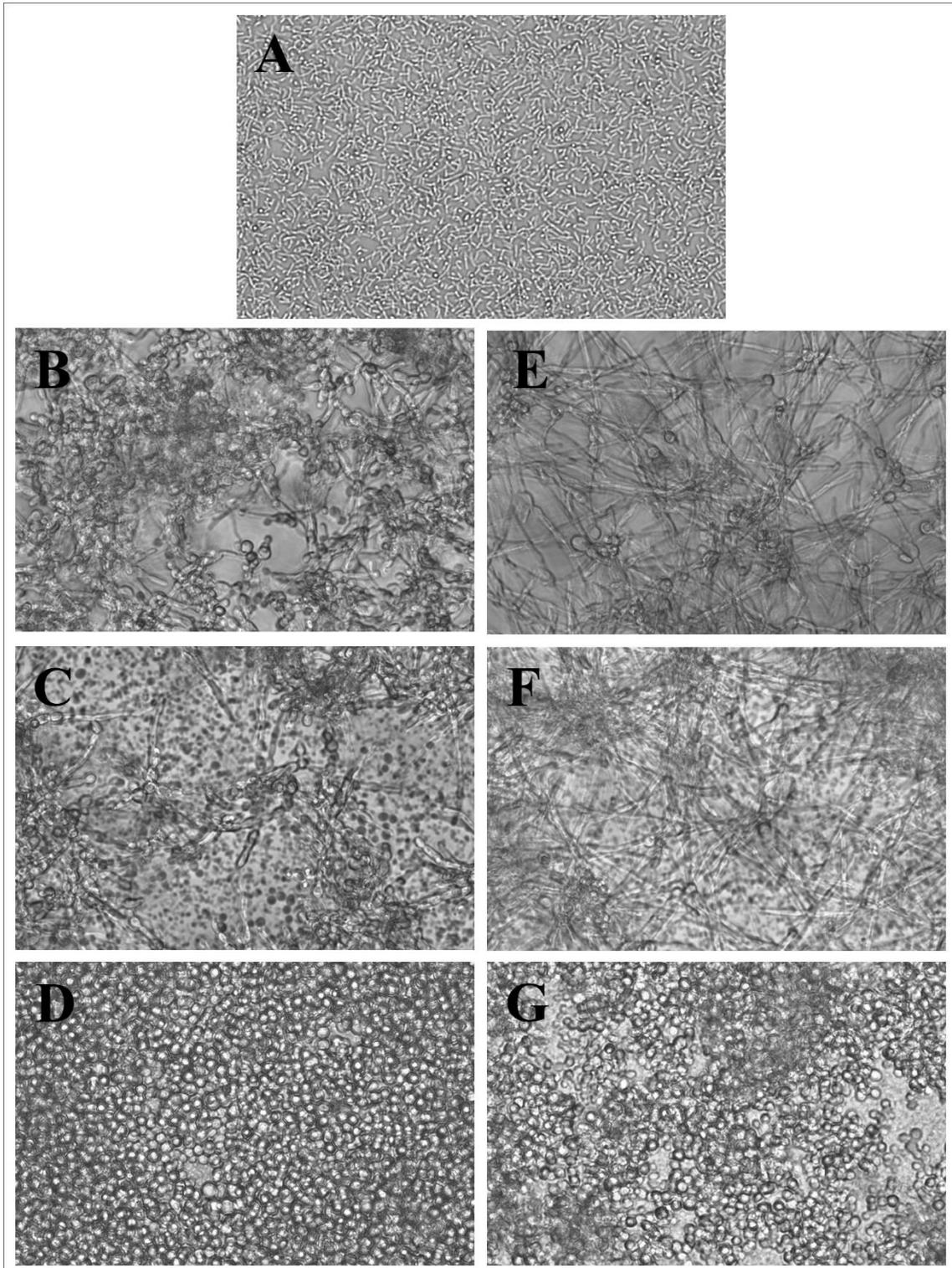
(A) *Lactobacillus crispatus*; (B) *Candida albicans* ATCC 90023; (C) Cocultivo entre *Candida albicans* ATCC 90023 e *Lactobacillus crispatus*; (D) Cocultivo *Candida albicans* (ATCC 90023) e solução sobrenadante do cultivo de *Lactobacillus crispatus*; (E) *Candida albicans* SC 5314; (F) Cocultivo entre *Candida albicans* SC 5314 e *Lactobacillus crispatus* (G) Cocultivo *Candida albicans* SC 5314 e solução sobrenadante do cultivo de *Lactobacillus crispatus*.

Após interação entre *L. crispatus* (Figura 12A) e *C. albicans* SC 5314 (Figura 18E), não se observa redução na quantidade de leveduras e na produção de hifas (Figura 18F). O cocultivo de *C. albicans* SC 5314 com a solução sobrenadante de *L. crispatus* apresentou que *C. albicans* SC 5314 apresentou redução no crescimento das leveduras e não apresentou a formação de hifas em 24 h (Figura 18G).

4.3.3. Ensaio de interação entre cepas de *Candida albicans*, *Lactobacillus rhamnosus* e solução sobrenadante de cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* para avaliação sobre a formação de hifas e a produção de biofilme

Após cocultivo com *L. rhamnosus* (Figura 19A), *C. albicans* ATCC 90023 (Figura 19B) apresentou redução na quantidade de leveduras e na produção de hifas (Figura 19C). O cocultivo de *C. albicans* ATCC 90023 com a solução sobrenadante de *L. rhamnosus* apresentou que *C. albicans* ATCC 90023 não apresentou a formação de hifas em 24 h, e apresentou intensa redução no crescimento (Figura 19D).

Figura 19 – Imagens microscópicas (ampliação 400x) da interação de *Candida albicans* e *Lactobacillus rhamnosus* após 24h de cocultivo



(A) *Lactobacillus rhamnosus*; (B) *Candida albicans* ATCC 90023; (C) Cocultivo entre *Candida albicans* ATCC 90023 e *Lactobacillus rhamnosus*; (D) Cocultivo *Candida albicans* (ATCC 90023) e solução sobrenadante do cultivo de *Lactobacillus rhamnosus*; (E) *Candida albicans* SC 5314; (F) Cocultivo entre *Candida albicans* SC 5314 e *Lactobacillus rhamnosus* (G) Cocultivo *Candida albicans* SC 5314 e solução sobrenadante do cultivo de *Lactobacillus rhamnosus*.

Após interação entre *L. rhamnosus* (Figura 13A) e *C. albicans* SC 5314 (Figura 19E), observa-se redução na quantidade de leveduras e na produção de hifas (Figura 19F). O cocultivo de *C. albicans* SC 5314 com a solução sobrenadante de *L. rhamnosus* apresentou que *C. albicans* SC 5314 apresentou redução no crescimento das leveduras e na formação de hifas em 24 h (Figura 19G).

#### 4. 4. Avaliação do potencial inibitório mínimo de substâncias com ação antifúngica

Para esta análise foi empregado o sobrenadante do cocultivo de *Candida* spp. e o respectivo *Lactobacillus* spp. após 24h sem nenhuma diluição, e a partir desse sobrenadante sem diluição (aqui chamado de 1) e foram realizadas diluições seriadas a partir dele 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32. Esse sobrenadante foi filtrado usando filtro de 0.22 $\mu$  e reservado para emprego no teste do potencial inibitório mínimo de substâncias com ação antifúngica sobre as cepas de *Candida* spp..

A cepa *C. albicans* ATCC 90023 apresentou inibição de crescimento pelos antifúngicos Anfotericina B na concentração de 0,125 $\mu$ g/mL e Fluconazol em concentrações superiores a 2 $\mu$ g/mL (Tabela 2). O crescimento desta cepa foi inibido pelas soluções sobrenadante de *L. acidophilus*  $\geq$ 1, *L. casei* 1:2, *L. casei shirota* 1 (não diluído), *L. crispatus* 1:2, *L. johnsonii* 1:2, *L. paracasei* 1:2 e *L. rhamnosus* 1 (não diluído) (Tabela 3).

Tabela 2 - Avaliação do MIC dos antifúngicos sobre as cepas de *Candida* spp.

	<i>C. albicans</i> ATCC 90023	<i>C. albicans</i> IC 216	<i>C. albicans</i> SC 5314	<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	<i>C. glabrata</i> IC 15
<b>Anfotericina B</b>	0,125 $\mu$ g/ $\mu$ L	0,125 $\mu$ g/ $\mu$ L	0,062 $\mu$ g/ $\mu$ L	0,125 $\mu$ g/ $\mu$ L	$\geq$ 0,25 $\mu$ g/ $\mu$ L
<b>Fluconazol</b>	$\geq$ 2 $\mu$ g/mL	$\geq$ 2 $\mu$ g/mL	2 $\mu$ g/ $\mu$ L	$\geq$ 2 $\mu$ g/mL	$\geq$ 2 $\mu$ g/mL

Valores de Referência: Anfotericina B – sensível MIC  $\leq$  0,25 $\mu$ g/ $\mu$ L; Fluconazol – sensível MIC  $\leq$  2 $\mu$ g/ $\mu$ L

FONTE: (SOBEL e SOBEL, 2018)

Tabela 3 – Avaliação do potencial inibitório mínimo de substâncias com ação antifúngica do sobrenadante de cultivo sobre as cepas de *Candida* spp.

	<i>C. albicans</i> ATCC 90023	<i>C. albicans</i> IC 216	<i>C. albicans</i> SC 5314	<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	<i>C. glabrata</i> IC 15
<b>Sobrenadante</b> <i>L. acidophilus</i>	≥ 1	1	1:8	≥ 1	≥ 1
<b>Sobrenadante</b> <i>L. casei</i>	1:2	1:2	1:32	1:32	1:4
<b>Sobrenadante</b> <i>L. casei shirota</i>	1	≥ 1	1:16	≥ 1	≥ 1
<b>Sobrenadante</b> <i>L. crispatus</i>	1:2	1:2	1:32	1:32	1:32
<b>Sobrenadante</b> <i>L. johnsonii</i>	1:2	1	1:16	1	≥ 1
<b>Sobrenadante</b> <i>L. paracasei</i>	1:2	≥ 1	1:16	≥ 1	≥ 1
<b>Sobrenadante</b> <i>L. rhamnosus</i>	1	≥ 1	1:32	1:4	1

A cepa *C. albicans* IC 216 apresentou comportamento semelhante à *C. albicans* ATCC 90023. Apresentou inibição de crescimento pelos antifúngicos Anfotericina B na concentração de 0,125µg/mL e Fluconazol em concentrações superiores a 2µg/mL (Tabela 2). O crescimento desta cepa foi inibido pelas soluções sobrenadante de *L. acidophilus* 1, *L. casei* 1:2, *L. casei shirota* ≥1, *L. crispatus* 1:2 e *L. johnsonii* 1, *L. paracasei* ≥1 e *L. rhamnosus* ≥1 (Tabela 3).

*Candida albicans* SC 5314 apresentou inibição de crescimento pelos antifúngicos Anfotericina B 0,062µg/mL e Fluconazol 2µg/mL (Tabela 2). O crescimento desta cepa foi inibido com metade das concentrações necessárias para as cepas *C. albicans* ATCC 90023 e *C. albicans* IC 216. O crescimento de *C. albicans* SC 5314 foi inibido por todas as soluções sobrenadante, nas concentrações pelas soluções sobrenadante de *L. acidophilus* 1:8, *L. casei* 1:32, *L. casei shirota* 1:16, *L. crispatus* 1:32 e *L. johnsonii* 1:16, *L. paracasei* 1:16 e *L. rhamnosus* 1:32 (Tabela 3).

A cepa *C. glabrata* ATCC 90030 apresentou inibição do crescimento pela Anfotericina B 0,125µg/mL e por Fluconazol em concentrações superiores a 2µg/mL (Tabela 2). O crescimento desta cepa foi inibido pelas soluções sobrenadante de *L. acidophilus* ≥1, *L. casei* 1:32, *L. casei shirota* ≥1, *L. crispatus* 1:32 e *L. johnsonii* 1, *L. paracasei* ≥1 e *L. rhamnosus* 1:4 (Tabela 3).

*C. glabrata* IC 15 apresentou inibição do crescimento pela Anfotericina B 2µg/mL e por Fluconazol em concentrações superiores a 2µg/mL (Tabela 2). O crescimento desta cepa

foi inibido pelas soluções sobrenadante de *L. acidophilus*  $\geq 1$ , *L. casei* 1:4, *L. casei shirota*  $\geq 1$ , *L. crispatus* 1:32 e *L. johnsonii*  $\geq 1$ , *L. paracasei*  $\geq 1$  e *L. rhamnosus* 1 (Tabela 3).

## 5 DISCUSSÃO

*Candida* spp. e *Lactobacillus* spp. são micro-organismos presentes na microbiota vaginal. As leveduras, do trato gastrointestinal inferior, migram para a vagina e os *Lactobacillus* spp. vaginais migram para o trato gastrointestinal inferior, vivendo em simbiose (SOARES VIEIRA-BAPTISTA e TAVARES, 2017; BARRENETXEA, 2002; SOBEL, 1993). A microbiota vaginal é influenciada pelos níveis do hormônio estrogênio, período menstrual e pós menopausa. O desequilíbrio hormonal, citopatológico ou imune, pode desencadear a proliferação desordenada de micro-organismos, conhecida por disbiose. Essa tem importante correspondência com as vulvovaginites. A adesão de *Candida* spp. ao epitélio vaginal reduz a colonização de *Lactobacillus* spp. (ANDRIOLI, 2009; ROSA e RUMEL, 2004; FIDEL et al, 2000; SOBEL, 1990).

A segunda infecção genital mais comum é a CVV (WHO, 2013). Muitas espécies de *Candida* são resistentes aos antifúngicos da classe dos azóis, ocasionando falhas terapêuticas e CVV recorrentes (PFALLER, 2012; SOBEL, 2007). *Lactobacillus* spp. tem apresentado atividade microbicida sobre *Candida* spp. sem apresentar efeitos colaterais, como os antifúngicos tão utilizados na prática clínica (RODRIGUÉZ-CERQUEIRA et al, 2019; KIM e PARK, 2017; GONÇALVES et al, 2016; SOBEL, 2016), mostrando claramente que podem ser empregados em sinergia com o tratamento farmacológico.

Analisou-se a atividade microbicida de cepas de *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. casei shirota*, *L. crispatus*, *L. johnsonii*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus* sobre as cepas de *C. albicans* (ATCC 90023 e IC 216) e *C. glabrata* (ATCC 90030 e IC 15), após o método de cocultivo, analisou-se a quantidade de células leveduriformes e bacterianas, viáveis em meio ágar MRS corado com corante vermelho neutro.

Cepas de *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. casei shirota*, *L. crispatus*, *L. johnsonii*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus* foram selecionadas em virtude de características como a secreção de ácidos orgânicos, especialmente ácido lático (TACHEDJIAN et al, 2017), bacteriocinas (FUOCHI et al, 2018; ZIARRUSTA, 2002), biosurfactantes (SATPUTE, 2016) e peróxido de hidrogênio (SGIBNEV e KREMLEVA, 2015). Estes micro-organismos apresentam ação microbicida, competição por nutrientes e receptores no momento da adesão ao epitélio, e presença na microbiota do trato gastrointestinal e geniturinário de pessoas saudáveis. As características acima mencionadas que ratificam a importância de *Lactobacillus* vaginais no controle do crescimento de *Candida* spp. (FUOCHI et al, 2018; SGIBNEV e KREMLEVA, 2015; VÁSQUEZ et al, 2005).

Os testes de avaliação da atividade microbicida por meio da contagem de CFU, avaliação sobre a formação de hifas e a produção de biofilme, e avaliação de MIC sugerem que as interações entre *Lactobacillus* spp. e *Candida* spp. cultivados *in vitro*, apresentam diferentes resultados, espécie-específico.

Os testes de avaliação sobre a formação de hifas e a produção de biofilme (Figuras 11, 12 e 13) e avaliação do potencial inibitório mínimo de substâncias com ação antifúngica (Tabela 2) foram realizados com as cepas *L. casei*, *L. crispatus*, *L. rhamnosus* uma vez que estas cepas apresentaram os maiores percentuais de atividade microbicida sobre a cepa padrão *C. albicans* ATCC 90023, acima de 90% (Tabela 1).

*C. albicans* ATCC 90023 e *C. albicans* SC 5314 foram escolhidas por serem cepas padronizadas e apresentarem a capacidade de formação de hifas e de produção de biofilme. As cepas de *C. glabrata* foram incluídas nos ensaios para avaliar se o sobrenadante causaria efeito inibitório, como percebido nas cepas *C. albicans*.

Além de serem estudadas as cepas ATCC, cujo comportamento biológico é conhecido, neste estudo foram incluídas cepas de *C. albicans* e *C. glabrata* isoladas de infecções vaginais, que apresentavam padrão de resistência aos antifúngicos usuais, e que foram incluídas na pesquisa para avaliarmos como estas cepas clínicas se comportam na presença de *Lactobacillus* spp., uma vez que mimetizam comportamentos de cepas oriundas de infecções reais (PANIAGUA, 2019).

*Lactobacillus acidophilus* fazem parte da microbiota intestinal normal, são ácido produtores, acidificando o meio colonizado (SGIBNEV e KREMLEVA, 2015). Em cocultivo, foi a cepa que apresentou menor atividade microbicida sobre *C. albicans* ATCC 90023 e sobre *C. albicans* IC 216, e a terceira menor atividade microbicida sobre *C. glabrata* ATCC 90030 e *C. glabrata* IC 15. Estes dados sugerem que *L. acidophilus* não é um probiótico com potencial para prevenção de biofilme e formação de hifas por *Candida* spp., o que preveniria as infecções por *C. albicans* e *C. glabrata*, estes achados são semelhantes ao encontrado no estudo de Hasslöf et al (2010), que também identificou baixa atividade inibitória de *Candida* spp.

Apesar disso, após cocultivo com as cepas de *C. albicans* IC 216, *C. glabrata* ATCC 90030 e *C. glabrata* IC 15, *L. acidophilus* apresentou aumento no número de colônias (Apêndice A) indicando sua viabilidade após a interação com *Candida* spp.. Este comportamento corrobora com sua capacidade de continuar produzindo substâncias microbicidas, estratégia importante e considerada mecanismo de ação dos probióticos (FALAGAS, BETSI e ATHANASIOU, 2007).

A solução concentrada do sobrenadante do cultivo da cepa *L. acidophilus* inibiu o crescimento de *C. albicans* IC 216 e a solução sobrenadante, na concentração 1:8, foi suficiente para inibir o crescimento de *C. albicans* SC 5314 (Tabela 3), sugerindo que *L. acidophilus* parece apresentar grande produção de substâncias microbidas, não mensuradas na pesquisa, mas que podem inferir os mesmos achados suportados pelos estudos de *L. acidophilus* empregados para o tratamento de VB, que pela produção de peróxido de hidrogênio, ácido láctico e bacteriocinas, inibem o crescimento bacteriano e impedem o desenvolvimento da VB (FALAGAS, BETSI e ATHANASIOU, 2007; TACHEDJIAN et al., 2017).

*Lactobacillus casei* compõem a microbiota intestinal normal, são produtores de ácido e resistentes ao medicamento antimicrobiano vancomicina (CHARTERIS et al, 1998). Apresenta excelente atividade microbida sobre cepas *C. albicans* ATCC 90023, *C. albicans* IC 216 e *C. glabrata* ATCC 90030, embora tenha apresentado atividade microbida inferior sobre a cepa *C. glabrata* IC 15, representando uma boa opção para inibir crescimento de *Candida* spp. Nos testes *in vitro*, foi a cepa de *Lactobacillus* spp. que apresentou melhor atividade microbida sobre *C. glabrata* IC 15 (Tabela 1 e Figura 11). A atividade microbida foi acompanhada da redução concomitante do crescimento das cepas de *L. casei* (Apêndice A), demonstrando que sua atividade microbida sobre o fungo induz sua eliminação.

*Lactobacillus casei* reduziu o crescimento e a formação de hifas e de biofilme das cepas *C. albicans* (Figura 11). Redução significativa aconteceu no cocultivo com *C. albicans* ATCC 90023 (Figura 11D). Observa-se significativa redução na formação de hifas quando as cepas de *C. albicans* ATCC 90023 (Figura 11D) e *C. albicans* SC 5314 (Figura 11G) foram cocultivadas com a solução sobrenadante. Entretanto, nas mesmas figuras é possível perceber que a solução sobrenadante não proporcionou redução no crescimento da levedura e formação de biofilme. Assim, percebe-se que os metabólitos de *L. casei*, solúveis na solução sobrenadante, podem reduzir a formação de hifas, importante fator de virulência relacionado à *C. albicans*. Entretanto, a ação microbida sobre o fungo foi observada quando o cocultivo foi realizado com *L. casei* e não apenas com a solução sobrenadante (Figuras 11C e 11F). Matsubara (2016) observou resultado semelhante em seu estudo, quando as células de *L. casei* inibiram o crescimento fúngico e o desenvolvimento de biofilme.

As cepas *C. albicans* ATCC 90023 e *C. albicans* IC 216 necessitaram de maiores concentrações de sobrenadante (1:2) para inibir o crescimento da levedura (Tabela 3), quando comparadas as demais cepas. Os resultados observados, sugerem que as cepas de *L. casei* promovem a redução do número de colônias fúngicas e a formação de hifas, provalmente pelas substâncias secretadas. A inibição da formação do biofilme por *Lactobacillus* spp. acontece

pelo bloqueio da adesão de *Candida* às superfícies (KANG et al, 2018; SANTOS et al, 2019; PAROLIN et al, 2015), competição por sítios de receptores e deslocamento das células de leveduras aderidas contato direto entre as células fúngicas e bacterianas (PAROLIN et al, 2015). Assim, *L. casei* pode ser um probiótico para prevenção e tratamento de infecções por *C. albicans* e *C. glabrata*.

*Lactobacillus casei shirota* é uma cepa amplamente utilizada como probiótico por demonstrar ação sobre a modulação do sistema imunológico (TOI et al, 2013; DONG et al, 2010), indícios de redução do risco de cânceres de bexiga (SUR et al, 2011), cólon (FUJITA et al, 2013) e mama (NAGATA et al, 2011) e atenuar sintomas de infecções gastrointestinais (TAKADA et al, 2016).

Em cocultivo, a atividade microbica de *L. casei shirota* foi uma das mais baixas, sendo as menores sobre *C. glabrata* (Tabela 1). *Lactobacillus casei shirota* também apresentou significativa redução no número de colônias, sugerindo ação de um mecanismo de competição para manter sob controle ambas as populações (Apêndice A). Sutula et al (2012 e 2013) também não identificou efeito microbica significativa de *L. casei shirota* sobre *Candida* spp.

*Lactobacillus casei shirota* não promoveu redução significativa na formação de biofilme em nenhuma das cepas de *Candida* avaliadas. Embora sobre *C. albicans* inibiu a formação de hifas da cepa oriunda de isolado clínico.

A cepa *C. albicans* ATCC 90023 foi inibida apenas pela solução sobrenadante concentrada de *L. casei shirota*. A cepa *C. albicans* SC 5314 foi inibida por uma solução menos concentrada de *L. casei shirota* (1:16). A solução concentrada de *L. casei shirota* não inibiu o crescimento de outras cepas de *C. glabrata* (Tabela 3). Este resultado indica que as substâncias secretadas por *L. casei shirota* não possuem ação microbica sobre *C. glabrata* e confirma a atividade cepa-específica, considerando que apresenta resultados bem diferentes entre as 3 cepas de *C. albicans*.

Portanto indicam que *L. casei shirota* pode não ser um bom probiótico para prevenção de infecções por *C. albicans* e *C. glabrata*, embora muitos efeitos benéficos, já tenham sido atribuídos a essa cepa, como citado anteriormente.

*Lactobacillus crispatus* é uma espécie presente na microbiota vaginal e contribui para a manutenção da microbiota vaginal saudável (FUOCHI et al, 2018; ANTONIO, RABE e HILIER, 2005) e redução da ocorrência de VB (ABDELMAKSOUUD et al, 2016). Apresentou excelentes índices de atividade microbica sobre *C. albicans* ATCC 90023, *C. albicans* IC 216 e *C. glabrata* ATCC 90030, acompanhada da redução concomitante do crescimento das cepas de *Lactobacillus* spp. Em cocultivo com *C. glabrata* IC 15, apresentou atividade inferior e

maior redução do número de colônias de *Lactobacillus* spp. A redução das cepas de *Lactobacillus* spp. concomitantemente às cepas de *C. albicans* e *C. glabrata*, sugere que sua atividade microbicida sobre o fungo induz sua eliminação (Tabela 2 e Apêndice A).

O estudo sobre a ação de *L. crispatus* sobre as cepas de *C. albicans* e *C. glabrata*, apresentou importante redução do número de colônias fúngicas, redução de biofilme e de um importante fator de virulência da *C. albicans*, a formação de hifas (Tabela 1, Figura 12 e Apêndice A).

*Lactobacillus crispatus* reduziu o crescimento, a formação de hifas e de biofilme das cepas *C. albicans* (Figura 12F), apesar da redução na formação de hifas ter sido menos significativa sobre a cepa *C. albicans* SC 5314. A maior redução na formação de hifas foi percebida quando as cepas de *C. albicans* foram cocultivadas com a solução sobrenadante do cultivo de *L. crispatus*. As cepas *C. albicans* ATCC 90023 e *C. albicans* IC 216 necessitaram de maiores concentrações de sobrenadante (1:2) para inibir o crescimento da levedura, quando comparadas às demais cepas, que foram inibidas com a concentração mínima (1:32) do sobrenadante (Tabela 3).

Os resultados acima indicam que *L. crispatus* pode ser um probiótico para prevenção de infecções por *C. albicans* e *C. glabrata*. Estudos indicam que *L. crispatus* apresenta grande produção de substâncias microbicidas, como por exemplo peróxido de hidrogênio (HÜTT et al, 2016; SONG et al, 1999) e ácido láctico (WITKIN et al, 2013), não mensuradas na pesquisa, mas que favorecem aos achados deste estudo.

*Lactobacillus johnsonii* são produtores de substâncias microbicidas e competem por nutrientes com *Candida* spp. (KOHLER, ASSEFA, REID, 2012). Apresentou excelente atividade microbicida sobre cepas *C. albicans* ATCC 90023 e *C. glabrata* ATCC 90030. Sobre a cepa *C. albicans* IC 216 apresentou atividade um pouco menor, mas acima de 60%. Entretanto, apresentou atividade microbicida bem inferior (30%) sobre a cepa *C. glabrata* IC 15 (Tabela 1). A atividade microbicida foi acompanhada de importante redução concomitante do crescimento das cepas de *Lactobacillus* spp. (Apêndice A).

*Lactobacillus johnsonii* inibiu a formação de biofilme nas cepas *C. albicans*, entretanto não proporcionou inibição da formação de hifas *C. albicans* IC 216, como foi possível perceber sobre a cepa *C. albicans* ATCC 90023. Promoveu redução significativa na formação de biofilme no cocultivo com *C. glabrata* ATCC 90030 e redução na formação do biofilme por *C. glabrata* IC 15 (Figura 15).

A solução sobrenadante de *L. johnsonii* não foi eficaz para inibir o crescimento da cepa *C. glabrata* IC 15. Apenas a solução sobrenadante não diluída foi eficaz para inibir o

crescimento das cepas *C. albicans* IC 216 e *C. glabrata* ATCC 90030. Concentrações menores da solução sobrenadante inibiram as cepas *C. albicans* ATCC 90023 e *C. albicans* SC 5314 (Tabela 3).

Os resultados acima indicam que *L. johnsonii* pode ser um bom probiótico para prevenção de infecções por *C. albicans*, entretanto pode não apresentar bons resultados clínicos para *C. glabrata*, resultado semelhante ao encontrado no estudo de Hasslöf et al (2010). KHERADMAND et al (2014) demonstraram que *L. johnsonii* enriquecido por nanopartículas de selênio apresentaram atividade microbicida potenciada, tanto por atividade direta por meio do contato com o fungo quanto por atividade indireta da solução sobrenadante.

*Lactobacillus paracasei* é descrito como um bom probiótico para a manutenção da microbiota intestinal saudável e redução dos sintomas de diarreia em crianças (SARKER et al, 2005; Arici et al, 2004) e adultos (ROCHET et al, 2006). Jahreis et al (2002) relatou a modulação de parâmetros do sistema imune, como significativo aumento do número de anticorpos e linfócitos CD4, por *L. paracasei*.

No presente estudo, *L. paracasei* apresentou boa atividade microbicida apenas sobre a cepa *C. albicans* IC 216. Sobre a cepa *C. albicans* ATCC 90023 a atividade microbicida foi regular e fraca atividade sobre as cepas de *C. glabrata* (Tabela 2). A atividade microbicida foi acompanhada de importante redução concomitante do crescimento das cepas de *L. paracasei* (Apêndice A). Este resultado sugere que a competição pode ser um dos mecanismos para manter sob controle ambas as populações.

*Lactobacillus paracasei* reduziu a formação de biofilme pelas cepas de *C. albicans* e *C. glabrata*. Entretanto, não houve redução significativa na formação de hifas, pelas cepas de *C. albicans*. A solução sobrenadante de *L. paracasei* não foi eficaz para inibir o crescimento da cepa *C. albicans* IC 216, *C. glabrata* ATCC 90030 e *C. glabrata* IC 15. Concentrações menores da solução sobrenadante inibiram as cepas *C. albicans* ATCC 90023 e *C. albicans* SC 5314 (Tabela 3), demonstrando que as substâncias microbicidas solúveis no sobrenadante tem maior atividade sobre cepas *C. albicans*.

Os resultados do cocultivo com *L. paracasei* indicam que este pode ser um bom probiótico para prevenção de infecções por *C. albicans*, mas não é um bom probiótico para *C. glabrata*.

*Lactobacillus rhamnosus* estão presentes na microbiota intestinal normal e são resistentes à vancomicina (CHARTERIS et al, 1998). Estudos indicam que esta espécie de *Lactobacillus* apresenta capacidade de inibirem o crescimento de *Candida* spp. por meio da produção de peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (MARTINEZ, 2008), regulação de genes

envolvidos na formação de hifas (KÖHLER e REID, 2005), autoagregação, coagregação com *C. albicans* e aderência a células do epitélio vaginal (PASCUAL et al, 2008). Apresentou crescimento superior quando cultivado com as cepas de *Candida*, apresentando excelente atividade microbicida sobre cepas *C. albicans* e *C. glabrata*. (Tabela 2). Esse supercrescimento teve uma ação negativa sobre as estirpes de *Candida*, que tiveram seu crescimento reduzido (Apêndice A).

O estudo sobre a ação de *L. rhamnosus* sobre as cepas de *C. albicans* e *C. glabrata*, apresentou significativa redução do número de colônias fúngicas e de um importante fator de virulência da *C. albicans*, a formação de hifas.

O efeito da solução sobrenadante na avaliação do MIC foi bem variado sobre as cepas estudadas, sendo as cepas *C. albicans* SC 5314 e *C. glabrata* ATCC 90030 as mais suscetíveis à inibição (Tabela 3). Os resultados acima indicam que *L. rhamnosus* pode ser um bom probiótico para prevenção de infecções por *C. albicans* e *C. glabrata*. Os resultados foram semelhantes aos observados por Matsubara (2016), que identificou que as soluções sobrenadantes apresentavam atividade microbicida e redutora da formação de biofilme, mas os efeitos eram mais significativos quando havia *L. rhamnosus* no cocultivo.

De Seta et al (2014) afirmam que os *Lactobacillus* spp. inibem a adesão epitelial, o crescimento e a proliferação de outros micro-organismos não pertencentes à microbiota vaginal. O presente estudo observou que o efeito de *L. casei*, *L. crispatus*, *L. rhamnosus* sobre *C. albicans* e *C. glabrata* sugere que essas espécies podem ser utilizadas como probióticos na prevenção de CVV. Apesar de *L. casei shirota* não ter apresentado bons resultados em cocultivo com *C. glabrata*, apresentou bons resultados com *C. albicans* podendo ser um bom probiótico para o controle e profilaxia de IF causadas por essa espécie. *Lactobacillus johnsonii* apresentou boa atividade inibitória apenas sobre a cepa *C. glabrata* ATCC 90030, entretanto a sobre o isolado clínico da mesma espécie a ação foi leve.

De forma homóloga ao que ocorre com a produção de substâncias inibitórias por *Lactobacillus* sobre *Candida*, as leveduras também podem inibir o crescimento bacteriano. *Candida albicans* é um microrganismo patogênico que desenvolveu várias características de virulência, permitindo a invasão dos tecidos do hospedeiro e evitando mecanismos de defesa do hospedeiro. Entre os fatores de virulência que contribuem para esse processo estão as enzimas hidrolíticas secretadas extracelularmente pelo fungo, como proteinases e lipases. Elas provavelmente desempenham um papel na patogenicidade, além do simples papel de nutrição. As proteinases aspárticas, por exemplo, contribuem para a invasão tecidual do hospedeiro digerindo ou destruindo as membranas celulares e degradando as moléculas da superfície do

hospedeiro. Há também evidência de que enzimas hidrolíticas são capazes de atacar células e moléculas do sistema imunológico para resistir à atividade antimicrobiana (SCHALLER et al, 2005).

Embora *Lactobacillus* spp. também produzam substâncias com efeito microbicida sobre outros organismos, ao menos no caso de alguns cocultivos *Lactobacillus* spp./ *C. albicans* é possível que a secreção de compostos como enzimas hidrolíticas pela cepa de *C. albicans* tenha afetado negativamente as bactérias, neste caso os *Lactobacillus* spp. presentes neste cocultivo, reduzindo sua viabilidade.

*C. glabrata* é um patógeno oportunista em infecções humanas. Vários fatores associados à sua virulência estão sendo investigados. No trabalho de Figueiredo-Carvalho et al (2017) isolados de *C. glabrata* obtidos de casos clínicos foram consideradas bons produtores de catalase, protease aspártica, esterase, fitase e hemolisina. Ainda, os autores associaram a produção de destas enzimas hidrolíticas, à resistência a antifúngicos (FIGUEIREDO-CARVALHO et al, 2017).

O aumento do número de leveduras e pseudo-hifas é associado ao aparecimento dos sintomas da CVV (RODRÍGUEZ-CERDEIRA et al, 2019). A transição levedura-hifa inicia com o surgimento das pseudohifas dando início à formação dos biofilmes. Os biofilmes de *Candida* têm um papel importantíssimo na patogênese, tanto pela mudança na expressão gênica como pela presença do biofilme em si, que dificulta o reconhecimento pelo sistema imune e a ação dos antifúngicos. Bandara et al (2013) sugere que *Lactobacillus* spp. e seus metabólitos promovam a redução da formação de hifas devido à modulação da expressão de genes hifa-específicos.

Os ensaios sugerem que *L. crispatus* é capaz de reduzir o crescimento de leveduras, corroborando os resultados encontrados nos testes de CFU. *Lactobacillus rhamnosus* mostrou-se capaz de inibir fortemente a formação de pseudohifas de ambas as cepas de *C. albicans*, conseqüentemente atuando na redução da formação do biofilme.

Para avaliar o efeito das substâncias presentes no sobrenadante de *Lactobacillus* spp., analisamos o MIC de sobrenadante e, conseqüentemente, das substâncias com ação antifúngica sobre as cepas de *Candida* spp. Os resultados dos sobrenadantes de *L. casei*, *L. crispatus* e *L. rhamnosus*, foram comparados aos efeitos de antifúngicos utilizados no tratamento de infecções causadas por *Candida* spp. Os resultados indicaram que o sobrenadante de cultura de *L. casei*, *L. crispatus* e *L. rhamnosus* contém substâncias com efeito antifúngico e que interferem na formação de hifas. Entretanto, a ação microbicida e a interferência na formação do biofilme,

sugerem que a ação inibitória também está relacionada à presença da espécie de *Lactobacillus* spp.

Apesar da limitação observada na ação do sobrenadante, estudos indicam que a concentração de metabólitos secretados, pelos probióticos, está diretamente relacionada ao efeito antifúngico observado (MATSUBARA, 2016; SIMARK-MATTSSON et al, 2009). O estudo realizado por Maldonado-Barragan et al (2013) sugere que os componentes encontrados na solução sobrenadante, alteram a tensão superficial dos blastoporos de *Candida* e, assim, atuam na prevenção da adesão celular e formação do biofilme. São exemplos, desses componentes, os biossurfactantes (RYU et al, 2014), ácido láctico (MALDONADO-BARRAGAN et al, 2013) e bacteriocinas (MALDONADO-BARRAGAN et al, 2013).

## 6 CONCLUSÃO

A atividade antimicrobiana de *Lactobacillus* spp. é cepa-específica. A associação eficiente para o tratamento de CVV deve ser cuidadosamente avaliada por estudos que associem cepas probióticas com os patógenos a serem inibidos. A cepa-especificidade explica os resultados divergentes em estudos sobre a interação entre *Candida* spp. e *Lactobacillus* spp. Apesar de alguns estudos correlacionarem as mesmas espécies, a variação das cepas interfere no comportamento dos micro-organismos, tanto dos probióticos quanto dos patógenos.

A ação fungicida e a interferência na formação de biofilmes estão associadas à presença e interação de *Lactobacillus* spp. no cocultivo, como sugerem as imagens microscópicas dos testes que avaliaram a ação de *Lactobacillus* spp. sobre biofilme de *Candida* spp. e a ação das soluções sobrenadantes de *Lactobacillus* spp. sobre biofilme de *Candida* spp.. A ação sobre a formação de hifas está relacionada às substâncias metabólicas secretadas pelos *Lactobacillus* spp., entretanto, a ação microbicida é mais significativa quando há presença do probiótico. Assim, para o alcance do efeito desejado, é importante que o tratamento de CVV e CVVR incluam as bactérias probióticas e não apenas seus metabólitos (MATSUBARA, 2016; RODRIGUES et al, 2006).

É importante a continuidade de estudos que elucidem o comportamento das diversas espécies e cepas de *Candida* spp. e *Lactobacillus* spp. Estudos sobre a expressão gênica de cepas de *Candida* spp. relacionada à formação de hifas e pseudo-hifas, o isolamento e identificação de metabólitos secretados por *Lactobacillus* spp., bem como o impacto destas substâncias na formação e desenvolvimento do biofilme são sugestões de pesquisas a serem desenvolvidas para o tratamento de CVV e CVVR.

Vale salientar ainda, que o emprego de cepas de *Lactobacillus* spp. combinadas entre si, ou seja, a aplicação de cepas múltiplas, com antifúngicos e agentes quelantes de biofilme, poderão apresentar efeitos ampliados ou potencializados para inibição ou eliminação das infecções por *Candida* vulvovaginais. O emprego de probióticos de forma tópica vaginal, poderá repor ou substituir ainda que temporariamente uma microbiota vaginal que mimetize uma microbiota real saudável, transferindo os benefícios destes probióticos que somados aos efeitos dos antifúngicos empregados permitirão que a microbiota vaginal saudável se recomponha com o fim da infecção.

## 7 REFERÊNCIAS

ABDELMAKSOU, A. A. et al. Comparison of *Lactobacillus crispatus* isolates from *Lactobacillus*-dominated vaginal microbiomes with isolates from microbiomes containing bacterial vaginosis-associated bacteria. [S.l.]: **Microbiol**, 2016.

AGUADO, J. M. et al. Recomendaciones sobre el tratamiento de la candidíase invasiva y otras Infecciones por levaduras de la Sociedade Espanola de Doenças Infecciosas y Microbiologia Clínica (SEIMC): Actualización 2011. [S.l.]: **Enferm Infec Microbiol Clin**, 2011.

AGUIN, T. J.; SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidiasis in pregnancy. [S.l.]: **Curr Infect Dis Rep**, 2015.

AKTAS, E.; YIGIT, N.; AYYILDIZ, A. Esterase Activity in Various *Candida* Species. [S.l.]: **J Int Medical Research**, 2002.

ALBERTSON, G. D. et al. Multiple Efflux Mechanisms Are Involved in *Candida albicans* Fluconazole Resistance. [S.l.]: **Antimicrob Agents Chemother**, 1996.

ALMEIDA, A. A. et al. Genotypic variability and antifungal susceptibility of *Candida tropicalis* isolated from patients with candiduria. [S.l.]: **Rev Iberoam Micol**, 2015.

ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSK, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. [S.l.]: **J Bras Patol Med Lab**, 2007.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; MARTÍNEZ M. A. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. [S.l.]: **Regul Toxicol Pharmacol**, 2006.

ANDRIOLI, J. L. et al. Frequência de leveduras em fluido vaginal com e sem suspeita clínica de candidíase vulvovaginal. [S.l.]: **Rev Bras Ginecol Obstet**, 2009.

ANTONIO, M. A.; RABE, L. K.; HILLIER, S. L. Colonization of the rectum by *Lactobacillus* species and decreased risk of bacterial vaginosis. [S.l.]: **J Infect Dis**, 2005.

ARENAS, R. M. D.; MORENO-COUTIÑO, G. M. D.; WELSH, O. M. D. Classification of subcutaneous and systemic mycoses. [S.l.]: **Clin in Dermat**, 2012.

ARICI, M. et al. Some characteristics of *Lactobacillus* isolates from infant faeces. [S.l.]: **Food Microbiol**, 2004.

AROUTCHEVA, A. et al. Defense factors of vaginal lactobacilli. [S.l.]: **Am J Obstet Gynecol**, 2001.

BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L.J. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agentes. [S.l.]: **J of Antim Chemot**, 2000.

- BALDIM, I. M. et al. Teste de sensibilidade ao quefir de cepas de *Candida* sp. isoladas de vulvovaginites. [S.l.]: **Rev Cienc Farm Bas Apl**, 2012.
- BANDARA, H. M. et al. Secretory products os Escherichia coli biofilm modulate Candida biofilm formation and hyphal development. [S.l.]: **J Investig Clin Dent**, 2013.
- BARBOSA, C. et al. Derivados azólicos no tratamento da candidíase vulvovaginal não complicada. [S.l.]: **Acta Obstet Ginecol Port**, 2012.
- BARRENETXEA, Z. G. Vulvovaginitis candidiásica. [S.l.]: **Rev Iberoam Micol**, 2002.
- BARRY A. L.; JONES R. N.; GAVAN T. L. Evaluation of the Micro-Media System for quantitative antimicrobial drug susceptibility testing. [S.l.]: **Antim Agents Chemother**, 1978.
- BASSO, R. et al. Etiología de la candidiasis vulvovaginal recidivante en la atención primaria de salud en Santa Catarina, Brasil. [S.l.]: **Acta Bioquím Clín Latinoam**, 2012.
- BEAMER, M. A. Bacterial Species Colonizing the Vagina of Healthy Women Are Not Associated with Race. [s. l.]: **Anaerobe**, 2017.
- BECKER, D. L. et al. Biofilm antifungal susceptibility of *Candida* urine isolated from ambulatory patients. Santa Cruz do Sul: **Rev Epidemiol Control Infec**, 2016.
- BELOTI, V. et al. Frequência de bactérias não redutoras de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) em leite pasteurizado. São Paulo: **Rev. Microbiol SP**, 1999.
- BLASCHKE-HELLMESSEN, R. Vertical trasmission of *Candida* and its consequences. [S.l.]: **Mycoses**, 1998.
- BORRIELLO, S. et al. Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. [S.l.]: **Clin Infect Dis**, 2003.
- BRASIL. PORTARIA Nº 1.061, DE 18 DE MAIO DE 2020. Brasília: **MS**, 2020.
- BREDEL, M.; JACOBY, E. Chemogenomics: an emerging strategy for rapid target and drug discovery. [S.l.]: **Nat Rev Genet**, 2004.
- BROTMAN, R. M. et al. Association between the vaginal microbiota, menopause status, and signs of vulvovaginal atrophy. [S.l.]: **Menopause**, 2014.
- CAMARGO, F. P. et al. Isolamento de *Candida* sp. da mucosa vaginal de mulheres atendidas em um serviço de ginecologia do município de Santo Ângelo - RS. [S.l.]: **NewsLab**, 2008.
- CARRARA, M. A. et al. Effect of experimental diabetes on the development and maintenance of vulvovaginal candidiasis in female rats. [S.l.]: **Am J Obstet Gynecol**, 2010.
- CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. The damageresponse framework of microbial pathogenesis. [S.l.]: **Nat. Rev. Microbiol**, 2003.

- CASSONE, A. Vulvovaginal *Candida albicans* infection: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. [S.l.]: **BJOG**, 2014.
- CASTRO, A. et al. Papel de los probióticos en Obstetricia y Ginecología. [S.l.]: **Nutr Hosp**, 2015.
- CERCA, N. et al. Bacterial biofilms in the vagina. [S.l.]: **Res. Microbiol**, 2017.
- CHARTERIS, W. P. et al. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. [S.l.]: **J Food Prot**, 1998.
- CHEN Y. et al. Chemogenomic profiling of the fungal pathogen *Candida albicans*. [S.l.]: **Antimicrob Agents Chemother**, 2018.
- CIUDAD-REYNAUD, A. Infecciones vaginales por cândida: diagnóstico y tratamiento. [S.l.]: **Rev Per Ginecol Obstet**, 2007.
- CLSI. **Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Guideline**. Waive, Pensilvânia - USA, 2004.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute/ NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15. Pennsylvania: **CLSI**, 2005.
- COLLADO, M. C. et al. Role of comercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. [S.l.]: **Lett Appl Microbiol**, 2007.
- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. [S.l.]: **Rev Soc Bras Med Trop**, 2003.
- COSTERTON, A. J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: a common cause of persistent infections. [S.l.]: **Science**, 2011.
- COTCH, M. F. et al. Epidemiology and outcomes associated with moderate to heavy *Candida* colonization during pregnancy. Vaginal Infections and Prematurity Study Group. [S.l.]: **Am. J. Obstet Gynecol**, 1998.
- DAVAR, R.; et al. Comparing the Recurrence of Vulvovaginal Candidiasis in Patients Undergoing Prophylactic Treatment with Probiotic and Placebo During the 6 Months. [S.l.]: **Probiotics & Antimicro. Prot**, 2016.
- DE SETA, F. et al. *Lactobacillus plantarum* P17630 for preventing *Candida vaginitis* recurrence: a retrospective comparative study. [S.l.]: **Eur J of Obst and Gynecol and Reprod Biol**, 2014.
- DELMONTE, M. L. et al. Frecuencia del género *Candida* en vagina de mujeres en edad Reproductiva. [S.l.]: **Kasmera**, 2017.
- DENNING, D. W. et al. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. [S.l.]: **The Lancet Infectious Diseases**, 2018.

DONG, H. et al. Selective effects of *Lactobacillus casei Shirota* on T cell activation, natural killer cell activity and cytokine production. [S.l.]: **Clin Exp Immunol**, 2010.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial life on surfaces. [S.l.]: **Emerg Infect Dis**, 2002.

DONLAN, R. M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. [S.l.]: **Healthc Epidemiol**, 2001.

DONLAN, R. M; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms biofilms. [S.l.]: **Clin. microbiol. Rev**, 2002.

DONOHUE, D. C. Safety of probiotics. Australia: **Asia Pac J Clin Nut**. 2006.

DOUGLAS, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. [S.l.]: **Trends Microbiol**, 2003.

DOUGLAS, L. J. Adhesion of *Candida* species to epithelial surfaces. [S.l.]: **Crit. Rev. Microbiol**, 1987.

DUERR, A. et al. Incident and persistent vulvovaginal candidiasis among human immunodeficiency virus-infected women: risk factors and severity. [S.l.]: **Obstet. Gynecol**, 2003.

ECKERT, L. O.; HAWES, S. E.; STEVENS, C. E. Vulvovaginal candidiasis: clinical manifestations, risk factors, management algorithm. [S.l.]: **Obstet Gynecol**, 1998.

EGAN, L. A. et al. Perfil epidemiológico del parto prematuro. [S.l.]: **Ginecol y Obstet de México**, 2008.

FALAGAS, M. E.; BETSI, G. I.; ATHANASIOU, S. Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. [S.l.]: **Clin Microbiol Infect**, 2007.

FARAGE, M.; MAIBACH, H. Lifetime changes in the vulva and vagina. [S.l.]: **Arch Gynecol Obstet**, 2006.

FERRER, J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. [S.l.]: **Inter J of Gyn and Obst**, 2000.

FIDEL, P. L. Jr. et al. Effects of reproductive hormones on experimental vaginal candidiasis. [S.l.]: **Infect Immun**, 2000.

FIDEL, P. L.; SOBEL J. D. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. [s. l.]: **Clin Microbiol Rev**, 1996.

FIGUEIREDO-CARVALHO, M. H. G et al. Relationship between the antifungal susceptibility profile and the production of virulence-related hydrolytic enzymes in Brazilian clinical strains of *Candida glabrata*. [S.l.]: **Mediat Inflamm**, 2017.

- FINKEL, J. S.; MITCHELL A. P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. [s. l.]: **Nat Rev Microbiol**, 2011.
- FREITAS, A. R. et al. Yeasts iso-lated from nosocomial urinary infections: antifungal susceptibility and biofilmproduction, [S.l.]: **Rev Iberoam Micol**, 2014.
- FUJITA, R. et al. Decreased duration of acute upper respiratory tract infections with daily intake of fermented milk: a multicenter, double-blinded, randomized comparative study in users of day care facilities for the elderly population. [S.l.]: **Am J Infect Control**, 2013.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. Review. [S.l.]: **J Appl Bacteriol**, 1989.
- FUOCHI, V. et al. Biological properties and production of bacteriocins-like-inhibitory substances by *Lactobacillus* sp. strains from human vagina. [S.l.]: **J Applied Microbiol**, 2018.
- GAJER P. et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. [S.l.]: **Sci Transl Med**, 2012.
- GONÇALVES, B. et al. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. [S.l.]: **Critical Reviews in Microbiology**, 2016.
- GOW, N. A. R.; NETEA, M. G. Medical mycology and fungal immunology: new research perspectives addressing a major world health challenge. [S.l.]: **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, 2016.
- GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. [S.l.]: **Clin Microbiol Rev**, 1999.
- HASSLÖF, P., et al. Growth inhibition of oral mutans *Streptococci* and *Candida* by comercial probiotic lactobacilli – an in vitro study. [S.l.]: **BMC Oral Health**, 2010.
- HASSLÖF, P.; STECKSÉN-BLICKS C. Chapter 10: Probiotic Bacteria and Dental Caries. [S.l.]: **Monogr Oral Sci. Epub**. 2019.
- HENRIQUES, A.; VASCONCELOS, C.; CERCA, N. A importância dos biofilmes nas infecções nosocomiais – o estado da arte. [S.l.]: **Arq. de medicina**, 2013.
- HUANG, G. Regulation of phenotypic transitions in the fungal pathogen *Candida albicans*. [S.l.]: **Virulence**, 2012.
- HUDSON, D. A. et al. Identification of the dialysable serum inducer of germ-tube formation in *Candida albicans*. [S.l.]: **Microbiol Read Engl**, 2004.
- HURTGEN, B. J. et al. Construction and evaluation of a novel recombinant T cell epitope-based vaccine against coccidioidomycosis. [S.l.]: **Infection and Immunity**, 2012.
- HÜTT, P. et al. Characterisation of probiotic properties in human vaginal *lactobacilli* strains. [S.l.]: **Microb Ecol Health Dis**. 2016.

- JAFARI, M. et al. Probiotic Bacillus: Fate during sausage processing and storage and influence of different culturing conditions on recovery of their spores. [S.l.]: **Food Res Int. Epub**, 2017.
- JAHREIS, G. et al. Influence of probiotic sausage (*Lactobacillus paracasei*) on blood lipids and immunological parameters of healthy volunteers. [S.l.]: **Food Res Int**, 2002.
- JAIN, N. et al. Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine. [S.l.]: *Appl Environ Microbiol*, 2007.
- JAYATILAKE, J. A. et al. Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and SAP mutants in reconstituted human oral epithelium. [S.l.]: **J Oral Pathol Med**, 2006.
- JUNG, H. -S. et al. Etiology of bacterial vaginosis and polymicrobial biofilm formation. [S.l.]: **Crit Rev Microbiol**, 2017.
- KALAIARASAN, K.; SINGH, R., CHATURVEDULA, L. Changing virulence factors among vaginal non-albicans *Candida* species. [S.l.]: **Indian J Med Microbiol**, 2018.
- KANG, C. H. et al. In Vitro Probiotic Properties of *Lactobacillus salivarius* MG242 Isolated from Human Vagina. **Prob Antimicrob Prot**, 2018.
- KANG, S. J. et al. Clinical characteristics and risk factors for mortality in adult patients with persistent candidemia. [S.l.]: **J Infect**, 2017.
- KENNEDY, M. A.; SOBEL, J. D. Vulvovaginal Candidiasis Caused by Non-albicans *Candida* Species: New Insights. [S.l.]: **Curr Infect Dis Rep**, 2010.
- KHERADMAND, E. et al. The antimicrobial effects of selenium nanoparticle-enriched probiotics and their fermented broth against *Candida albicans*. [S.l.]: **Daru**, 2014.
- KIM, J. M.; PARK, Y. J. Probiotics in the Prevention and Treatment of Postmenopausal Vaginal Infections: Review Article. [S.l.]: **J Menopausal Med**, 2017.
- KOHLER, G. A.; ASSEFA, S.; REID, G. Probiotic interference of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 with the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. [S.l.]: **Infect Dis Obstet Gynecol**, 2012.
- KOHLER, G. A.; REID, G. Profiling the transcriptional response of *Candida albicans* to probiotic lactobacilli. In: ASM Conference on Beneficial Microbes. **Abstract**, Lake Tahoe, 2005.
- KOVACHEV, S. Defence factors of vaginal lactobacilli. [S.l.]: **Crit Rev in Microb**, 2018.
- KUHN, D. M. et al. Antifungal Susceptibility of *Candida* Biofilms: Unique Efficacy of Amphotericin B Lipid Formulations and Echinocandins. [S.l.]: **Antimicrob Agents Chemother**, 2002.
- KULETA, J. K.; KOZIK, M. R.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. Warsaw: **Acta Bioch Pol**, 2009.

- KUMAMOTO, C.A.; VINCES, M.D. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. [S.l.]: **Cell Microbiol**, 2005.
- LARONE, D. Medically Important Fungi: A Guide to Identification. 4. ed. Washington DC: **American Society for Microbiology Press**. 2002.
- LEÃO, M. V. P. et al *Lactobacillus rhamnosus* pode alterar a virulência de *Candida albicans*. [S.l.]: **Rev Bras Ginecol Obstet**, 2015.
- LEBEAUX, D.; GHIGO, J.-M.; BELOIN, C. Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. [S.l.]: **Microbiol Mol Biol Rev**, 2014.
- LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. [S.l.]: **Nature Rev Microb**, 2010.
- LEYVA-GÓMEZ, G. et al. Modifications in Vaginal Microbiota and Their Influence on Drug Release: Challenges and Opportunities. **Pharmaceutics**, [s. l.], 2019.
- LOHSE, M. B. et al. Development and regulation of single-and multi-species *Candida albicans* biofilms. [S.l.]: **Nat. Rev. Microbiol**, 2018.
- LORTHOLARY, O. et al. Recent exposure to caspofungin or Fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients. [S.l.]: **Antimicrob Agents Chemother**, 2011.
- LUO G.; SAMARANAYAKE L. P.; YAU J. Y. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. [S.l.]: **J Clin Microbiol**, 2001.
- MACKAY, A. D. et al. *Lactobacillus endocarditis* caused by a probiotic organism. [S.l.]: **Clinic Microbiol Infect**, 1999.
- MALDONADO-BARRAGAN, A. et al. Induction of bacteriocin production by coculture is widespread among plantaricin-producing *Lactobacillus plantarum* strains with diferente regulatory operons. [S.l.]: **Food Microbiol**, 2013.
- MALDONADO-BARRAGAN, A. et al. Knockout of three-component regulatory system reveals that the apparently constitutive plantaricin-production phenotype show by *Lactobacillus plantarum* on solid médium is regulated via quorum sensing. [S.l.]: **Int J Food Microbiol**, 2013.
- MARTINEZ, R. C. et al. Improved treatment of vulvovaginal candidiasis with Fluconazole plus probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14. [S.l.]: **Lett Appl Microbiol**, 2009.
- MARTINEZ, R. C. R. Efeito da utilização de culturas lácticas probióticas na microbiota vaginal de pacientes acometidos por infecções bacterianas e fúngicas. Tese (Doutorado) (Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia) – Ribeirão Preto, **USP**, 2008.

- MATSUBARA, V. H. Efeito de bactérias probióticas sobre *Candida albicans*: ensaios em cultura de macrófagos e de biofilme. Programa de Pós Graduação em Ciências Odontológicas. Tese (Doutorado) (Doutorado em Prótese Dentária). São Paulo, **USP**, 2016.
- MAYER, F. L. et al. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. [S.l.]: **Virulence**, 2013.
- MEDICI, N. P.; POETA, M. D. New insights on the development of fungal vaccines: from immunity to recente challenges. [S.l.]: **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2016.
- MENDONÇA, F. H. et al. Effects of probiotic bactéria on *Candida* presence and IgA anti-*Candida* in the oral cavity of elderly. [S.l.]: **Braz Dent J**, 2012.
- MENOITA, E. et al. Biofilms: knowing the entity. [S.l.]: **J Aging Innov**, 2012.
- MITCHELL, H. Vaginal discharge-causes, diagnosis, and treatment. [S.l.]: **BMJ**, 2004.
- MITRA, A, et al. The vaginal microbiota, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: what do we know and where are we going next? [S.l.]: **Microbiome**, 2016.
- MITTELMAN, M. W. Adhesion to biomaterials. In: Fletcher M (ed) Bacterial adhesion: molecular and ecological diversity. pp 89–127, New York: **Wiley-Liss**, 1996.
- MOSTAÇO-GUIDOLIN, L. B. Caracterização Bioquímica de Células Sadias e Neoplásicas através de Expectroscopia Vibracional. Programa de Pós Graduação de Física Aplicada à Medicina e Biologia. Dissertação (Mestrado) (Mestrado em Ciências). Ribeirão Preto: **USP**, 2009
- MUÑOZ, E. et al. Aislamiento de *Candida albicans* de mujeres con candidiasis vaginal atendidas en el Hospital Regional Docente de Trujillo-Perú. [S.l.]: **Rev Cient de la Fac de Cien Biol**, 2012.
- NAGATA, S. et al. Effect of the continuous intake of probiotic-fermented milk containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on fever in a mass outbreak of norovirus gastroenteritis and the faecal microbiota in a health service facility for the aged. [S.l.]: **Br J Nutr**, 2011.
- NEAL, C. M. et al. Noncandial vaginitis: a comprehensive approach to diagnosis and management. [S.l.]: **Am J Obstet Gynecol**, 2019.
- NEOFYTOS, D. et al, Epidemiology and Outcomes of Candidemia in 2019 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance Registry. [S.l.]: **Clin Infect Diseases**, 2009.
- NETEA, M. G. et al. An integrated modelo of the recognition of *Candida albicans* by the innate imune system. [S.l.]: **Nat Ver Microbiol**, 2008.
- NOSANCHUK, K. D. Current status and future of fungal therapy for systemic mycoses. [S.l.]: **Recent Patents Anti-Infective Drug Discovery**, 2006.
- O'HANLON D. E., MOENCH, T. R., CONE, R. A. Vaginal pH and microbicidal lactic acid when *Lactobacilli* dominate the microbiota. [S.l.]: **PLoS ONE**, 2013.

OLIVEIRA, M. N. et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. [S.l.]: **Rev Bras Gin Obst. Brasil**, 2002.

OMBRELLA, A. M.; RAMOS, L.; RAMOS, L. Actividades proteinasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de pH. Barcelona: **Rev Iberoam Micol**, 2008.

ORSI, C. F. et al. Inhibitory effects os diferentes lactobacilli on *Candida albicans* hyphal formation and biofilm development. [S.l.]: **J Biol Regul Homeost Agents**, 2014.

ORTEGA-PEÑA, S.; HERNÁNDEZ-ZAMORA, E. Biopelículas microbianas y su impacto en áreas médicas: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. [S.l.]: **Bol Med Hosp Infant Mex**, 2018.

PANIAGUA, A. L. Avaliação microbicide *in vitro* de *Lactobacillus casei* contra *Candida* spp. Brasília: **UnB**, 2019.

PAPON, N. et al. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. [S.l.]: **PLoS Pathogens**, 2013.

PARENTE-ROCHA, J. A. et al, Antifungal Resistance, Metabolic Routes as Drug Targets, and New Antifungal Agents: An Overview about Endemic Dimorphic Fungi. [S.l.]: **Mediat of Inflamm**, 2017.

PAROLIN, C. et al. Isolation of vaginal lactobacilli and characterization of anti-*Candida* activity. [S.l.]: **PLoS ONE**, 2015.

PASCUAL, L. M. et al. *Lactobacillus rhamnosus* L60, a potential probiotic isolated from the human vagina. [S.l.]: **J Gen Appl Microbiol**, 2008.

PATEL D. A. et al. Risk factors for recurrent vulvovaginal candidiasis in women receiving maintenance antifungal therapy: results of a prospective cohort study. [S.l.]: **Am J Obstet Gynecol**, 2005.

PEIVASTEHR-ROUDSARI, et al. Probiotics and food safety: an evidence-based review. Iran: **J Food Safe & Hyg**, 2019.

PEMAN, J., CANTON, E., ESPINEL-INGROFF, A. Antifungal drug resistance mechanisms. [S.l.]: **Expert Rev Anti Infect Ther**, 2009.

PERCIVAL, S. L. et al. Introduction to biofilms. [S.l.]: **Biof Vet Med**, 2011.

PETERS B. M. et al. Fungal morphogenetic pathways are required for the hallmark inflammatory response during *Candida albicans* vaginitis. [S.l.]: **Infect Immun**, 2014.

PETROVA, M. I. et al. *Lactobacillus* species as biomarkers and agents that can promote various aspects of vaginal health. [S.l.]: **Front Phys**, 2015.

- PFALLER, M. A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. [S.l.]: **The Amer J of Med**, 2012.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of Invasive Mycoses in North America. [S.l.]: **Crit Rev in Microb**, 2010.
- PICHOVÁ, I., et al. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. [S.l.]: **Eur J Biochem**, 2001.
- POSSER, J. et al. Estudo das infecções cérvicovaginais diagnosticadas pela citologia. **Rev** [S.l.]: **Saúde Integ**, 2015.
- PRAKASH-ROUDSARI, L. et al. The gut microbiota and human health with na emphasis on the use of microencapsulated bacterial cells. [S.l.]: **J Biomed Biotech**, 2011.
- RAMACHANDRA, S. et al. Regulatory networks controlling nitrogen sensing and uptake in *Candida albicans*. [S.l.]: **PLoS One**, 2014.
- RAMAGE, G. et al. Fungal biofilm resistance. [S.l.]: **Int J Microbiol**, 2012.
- RAMAGE, G. et al. Our current understanding of fungal biofilms fungal biofilms. [S.l.]: **Crit Rev Microbiol**, 2009.
- RAMAGE, G.; MARTINEZ J. P.; LOPEZ-RIBOT J. L. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. [S.l.]: **FEMS Yeast Res**, 2006.
- RAMAGE, G. et al. The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. [S.l.]: **FEMS Microbiol Letters**, 2006.
- RAVEL, J. et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. [S.l.]: **Proc Natl Acad Sci**, 2011.
- REED, B. D. Risk factors for *Candida* vulvovaginitis. [S.l.]: **Obstet Gynecol Surv**, 1992.
- REID, G. *In vitro* testing of *Lactobacillus acidophilus* NCFM as a possible probiotic for the urogenital tract. [S.l.]: **Int Dairy J**, 2000.
- RENTZ, A. M.; HALPERN M. T.; BOWDEN R. The impact of candidemia on length of hospital stay, outcome and overall cost of illness. [S.l.]: **Clin Infec Diseases**, 1998.
- RIBEIRO, E. L. Leveduras de *Candida* isoladas da boca de crianças com Síndrome de Down: aspectos feno-genotípicos, relação intrafamiliar e perfil de imunoglobulinas. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências da Saúde, Brasília, **UnB**, 2008.
- ROCHET, V. et al. Effects of orally administered *Lactobacillus casei* DN-114 001 on the composition or activities of the dominant faecal microbiota in healthy humans. [S.l.]: **Br J Nutr**, 2006.

- RODRIGUES, L. R. et al. Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. [S.l.]: **Colloids Surf B Bioint**, 2006.
- RODRIGUÉZ-CERQUEIRA, C. et al. Biofilms and vulvovaginal candidiasis. [S.l.]: **Colloids Surf B Bioint**, 2019.
- ROMANI, L. Immunity to fungal infections. London: **Nat Rev Microbiol**, 2004.
- ROSA, M.I.; RUMEL, D. Fatores associados à candidíase vulvovaginal: estudo exploratório. [S.l.]: **Rev Bras Ginecol Obstet**, 2004.
- RYU, E. H, et al. Purification and characterization of antifungal compounds from *Lactobacillus plantarum* HD1 isolated from kimchi. [S.l.]: **Food Microbiol**, 2014.
- SAARELA, M. et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. [S.l.]: **J Biotechnol**, 2000.
- SACHIN, C. D.; RUCHI, K.; SANTOSH, S. In vitro evaluation of proteinase, phospholipase and haemolysin activities of *Candida* species isolated from clinical specimens. [S.l.]: **Int J Med Biomed Res**, 2013.
- SALMINEN, M. K., et al. *Lactobacillus bacteremia* during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. [S.l.]: **Clin Infect Dis**, 2002.
- SANDERS, M. E. et al. Safety assessment of probiotics for human use. [S.l.]: **Gut Microb**, 2010.
- SANGLARD, D.; ISCHER, F.; MONOD, M. BILLE, J. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. [S.l.]: **Microbiol**, 1997.
- SANTOS, C.I. et al. Antifungal and antivirulence activity of vaginal *Lactobacillus* spp. products against *Candida* vaginal isolates. [S.l.]: **Pathogens**, 2019.
- SARKER, S. A, et al. *Lactobacillus paracasei* strain ST11 has no effect on rotavirus but ameliorates the outcome of nonrotavirus diarrhea in children from Bangladesh. [S.l.]: **Pediatrics**, 2005.
- SATPUTE, S. K. et al. Biosurfactant/s from Lactobacilli species: Properties, challenges and potential biomedical applications. [S.l.]: **J Basic Microbiol**, 2016.
- SCHALLER, M. et al. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. [S.l.]: **Mycoses**, 2005.
- SGIBNEV, A. V.; KREMLEVA, E. A. Vaginal Protection by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Producing Lactobacilli. [S.l.]: **Jund J microbiol**, 2015.
- SILVA, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. [S.l.]: **FEMS Microbiol Rev**, 2012.

SILVA, S. et al. In Vitro Biofilm Activity, of Non-*Candida albicans* *Candida* Species. [S.l.]: **Current Microbiology**, 2010.

SIMARK-MATTSSON, C. et al. Final affects the interference capacity of naturally occurring oral *Lactobacillus* strais against mutans streptococci. [S.l.]: **Arch Oral Biol**, 2009.

SINGH, S. et al. Vaginitis Due to *Candida krusei*: Epidemiology, Clinical Aspects, and Therapy. [S.l.]: **Clin Infect Dis**, 2002.

SIVASUBRAMANIAN, G.; SOBEL, J. D. Refractory urinary tract and vulvovaginal infection caused by *Candida krusei*. Int. Urogynecol. Int. Urogynecol. [S.l.]: **J. Pélvic Floor Dysfunct**, 2009.

SMEEKENS, S. P. et al. Genetic susceptibility to *Candida* responses. E[S.l.]: **MBO Molec Med**, 2013.

SOARES, R.; VIEIRA-BAPTISTA, P.; TAVARES, S. Vaginose citolítica: uma entidade subdiagnosticada que mimetiza a candidíase vaginal. Coimbra: **Acta Obstet Ginecol Port**, 2017.

SOBEL, J. D. Recurrent vulvovaginal candidiasis. [S.l.]: **Amer J Obstetric and Ginecol**, 2016.

SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. [S.l.]: **Lancet**, 2007.

SOBEL, J. D. et al. Maintenance Fluconazole therapy for recurrent vulvovaginal candidiasis. [S.l.]: **N Engl J Med**, 2004.

SOBEL, J. D. et al. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. A[S.l.]: **J Obstet Gynecol**, 1998.

SOBEL, J. D. Vaginitis. [S.l.]: **New Eng J Med**, 1997.

SOBEL, J. D. Candidal vulvovaginitis. [S.l.]: **Clin Obstet Gynecol**, 1993.

SOBEL, J. D. Vaginal infections in adult women. [S.l.]: **Med Clin North Am**, 1990.

SOLL, D. R. Mating-type locus homozygosis, phenotypic switching and mating: a unique sequence of dependencies in *Candida albicans*. [S.l.]: **BioEssays**, 2004.

SONG, Y.L. et al. Identification of and hydrogen peroxide production by fecal and vaginal *lactobacilli* isolated from Japanese women and newborn infants. [S.l.]: **J Clin Microbiol**, 1999.

SPURBECK, R. R.; ARVIDSON, C. G. Lactobacilli at the front line of defense against vaginally acquired infections. [S.l.]: **Fut Microbiol**, 2011.

STOYANCHEVA, G. et al Bacteriocin production and gene sequencing analysis from vaginal *Lactobacillus* strains. [S.l.]: **Arch Microbiol**, 2014.

- SUR, D. et al. Role of probiotic in preventing acute diarrhoea in children: a community-based, randomized, double-blind placebocontrolled field trial in an urban slum. [S.l.]: **Epidemiol infect**, 2011.
- SUTULA, J. et al. The effect of a comercial probiotic drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on oral health in healthy dentate people. [S.l.]: **Microb Ecol Health Dis**, 2013.
- SUTULA, J. et al. The effect of a comercial probiotic drink on oral microbiota in healthy complete denture wears. [S.l.]: **Microb Ecol Health Dis**, 2012.
- TACHEDJIAN, G. et al. The role of lactic acid production by probiotic *Lactobacillus* species in vaginal health. [S.l.]: **Res Microbiol**, 2017.
- TAKADA, M., et al. Probiotic *Lactobacillus casei* strain *Shirota* relieves stress-associated symptoms by modulating the gut-brain interaction in human and animal models. [S.l.]: **Neurogast Motil**, 2016.
- THEIN Z. M. et al. Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. [S.l.]: **Mycoses**, 2009.
- TOI, M. et al. Probiotic beverage with soy isoflavone consumption for breast cancer prevention: A case-control study. [S.l.]: **Curr Nutr Food Sci**, 2013.
- TUMBARELLO, M. B. et al. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. [S.l.]: **J Clin Microbiol**, 2007.
- TURAN, H., DEMIRBILEK, M. Biofilm-forming capacity of blood-borne *Candida albicans* strains and effects of antifungal agents. [S.l.]: **Rev Argent Microbiol**, 2018.
- TURNIDGE, J.; PATERSON, D. L. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. [S.l.]: **Clin Microbiol Rev**, 2007.
- VALDERRAMA, S. O., et al. Micosis sistémicas en pacientes no inmunocomprometidos. [S.l.]: **Medicine**, 2018.
- VARANO, N. et al. Infecções por *Candida* spp em pacientes imunodeprimidos. [S.l.]: **J Infec Cont**, 2019.
- VÁSQUEZ, A. et al. DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of *Lactobacillus casei/paracasei* and related species. [S.l.]: **Syst Appl Microbiol**, 2005.
- VENDERNELLI, M. C. Evaluation of antipathogenic activity and adherence properties of human *Lactobacillus* straisn for vaginal formulations. **J Appl Microbiol**, [S.l.]: 2014.
- WEBB, B. J. Epidemiology and Clinical Features of Invasive Fungal Infection in a US Health Care Network. [S.l.]: **IFI in a US Health Network**, 2018.

WENZEL, R. P. Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. [S.l.]: **Clin Infect Diseases**, 1995.

WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN, R. A. Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. [S.l.]: **Amer Soc Microb**, 1998.

WITKIN, S. S. et al. Influence of vaginal bacteria and D- and L-lactic acid isomers on vaginal extracellular matrix metalloproteinase inducer: implications for protection against upper genital tract infections. [S.l.]: **Mbio**, 2013.

WORD HEALTH ORGANIZATION. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. [S.l.]: **WHO**, 2013.

XIE, J. L. et al. Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. [S.l.]: **Future Microbiol**, 2014.

YAMAZAKI, S. et al. Protective effect of *Bifidobacterium*-monoassociation against lethal activity of *Escherichia coli*. [S.l.]: **Bifidobacter & Microflor**, 1982.

YEH, Y. C. et al. *Candida albicans* Aro1 affects cell wall integrity, biofilm formation and virulence. Taiwan: **J Microbiol Immunol Infect**, 2020.

ZAKARIA, G. E. Antimicrobial and anti-adhesive properties of biosurfactant produced by lactobacilli isolates, biofilme formation and aggregation ability. [S.l.]: **J Gen Appl Microbiol**, 2013.

ZARNOWSKI, R. et al. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. [S.l.]: **MBio**, 2014.

ZIARRUSTA, G. B. Vulvovaginitis candidiásica. [S.l.]: **Rev Iberoam Micol**, 2002.

## APÊNDICE

## APÊNDICE A - Tabela CFU

CFU			CFU		
<i>Candida</i> spp.	<i>Candida</i>	<i>Candida</i> / Cocultivo	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i> / Cocultivo
<b><i>C. albicans</i></b>					
ATCC 90023	195	148	<i>L. acidophilus</i>	365	311
		14	<i>L. casei</i>	284	229
		38	<i>L. casei shirota</i>	232	185
		12	<i>L. crispatus</i>	301	276
		41	<i>L. johnsonii</i>	327	243
		89	<i>L. paracasei</i>	225	219
		14	<i>L. rhamnosus</i>	288	306
IC 216	163	59	<i>L. acidophilus</i>	365	564
		12	<i>L. casei</i>	284	189
		27	<i>L. casei shirota</i>	232	168
		21	<i>L. crispatus</i>	301	247
		55	<i>L. johnsonii</i>	327	238
		36	<i>L. paracasei</i>	225	169
		11	<i>L. rhamnosus</i>	288	301
<b><i>C. glabrata</i></b>					
ATCC 90030	151	115	<i>L. acidophilus</i>	365	421
		12	<i>L. casei</i>	284	235
		142	<i>L. casei shirota</i>	232	149
		12	<i>L. crispatus</i>	301	253
		13	<i>L. johnsonii</i>	327	162
		137	<i>L. paracasei</i>	225	186
		56	<i>L. rhamnosus</i>	288	312
IC 15	40	29	<i>L. acidophilus</i>	365	389
		9	<i>L. casei</i>	284	267
		33	<i>L. casei shirota</i>	232	165
		15	<i>L. crispatus</i>	301	221
		28	<i>L. johnsonii</i>	327	195
		35	<i>L. paracasei</i>	225	154
		16	<i>L. rhamnosus</i>	288	298