

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DE SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**



**PEDRO RICARDO GONÇALVES AZEVEDO**

**Efeito do sobrenadante de *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus rhamnosus* sobre  
crescimento de leveduras de *Candida* spp..**

**Brasília - DF**

**2022**

**PEDRO RICARDO GONÇALVES AZEVEDO**

**Efeito do sobrenadante de *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus rhamnosus* sobre  
crescimento de leveduras de *Candida spp.***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Bacharel em Farmácia.

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabiana Brandão Alves Silva.

**Brasília — DF  
2022.**

**Pedro Ricardo Gonçalves Azevedo**

**Efeito do sobrenadante de *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus rhamnosus* sobre crescimento de leveduras de *Candida spp.***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Bacharel em Farmácia.

**Aprovado em \_\_13\_\_ de \_\_maio\_\_\_\_ de 2022.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Fabiana Brandão Alves Silva (UnB) - Presidente

---

Profa. Dra. Tanise Vendruscolo Dalmolin (UnB)

## SUMÁRIO

<b>RESUMO:</b>	5
<b>INTRODUÇÃO:</b>	6
1.2 Candida sp. - de comensal à patógeno.	7
1.3 Mecanismos de resistência fúngica	8
1.4 Pré-bióticos e probióticos	10
1.4.1 Butirato de Sódio	11
1.4.2 Lactobacillus spp.	12
<b>METODOLOGIA:</b>	14
2.1 Linhagens de microrganismos:	14
2.2 Meios de cultura:	14
2.3 Estoque e inóculos:	15
2.4 Preparo das soluções:	15
2.4 Curvas de crescimento:	16
2.5 Sinergismo:	18
2.6 Tratamento Estatístico:	18
<b>RESULTADOS &amp; DISCUSSÃO:</b>	19
3.1 Avaliação do NaBut sobre o crescimento de Candida spp.:	21
Os resultados para avaliação do NaBut no crescimento das <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i> , figuras 2 e 3, respectivamente, demonstram maior inibição do NaBut sobre a <i>C. albicans</i> quando comparadas a <i>C. glabrata</i> . Porém, para a <i>C. glabrata</i> quando comparada a inibição do NaBut com a inibição do triazólico, o NaBut se mostra com potencial inibitório maior, mesmo utilizando-se da concentração inibitória mínima do antifúngico preconizada no BrCAST (16µg/mL).	22
3.2 Avaliação do extrato filtrado do sobrenadante de <i>L. reuteri</i> no crescimento de <i>Candida</i> spp.	23
3.3 Avaliação do extrato filtrado do sobrenadante de <i>L. rhamnosus</i> no crescimento de <i>Candida</i> spp.	26
3.4 Avaliação do sinergismo entre NaBut + fluconazol + extrato filtrado do sobrenadante de <i>L. reuteri</i> no crescimento de <i>Candida</i> spp.	30
3.5 Avaliação do sinergismo entre NaBut + fluconazol + extrato filtrado do sobrenadante de <i>L. rhamnosus</i> no crescimento de <i>Candida</i> spp.	33
<b>CONCLUSÃO</b>	38
<b>REFERÊNCIAS</b>	39

## **RESUMO:**

O gênero *Candida* compreende diferentes espécies fúngicas, dentre essas destacam-se as espécies *C. albicans* e *C. glabrata*, preocupantes nos sistemas de saúde por gerarem elevados índices de infecções e, particularmente a *C. glabrata* por apresentar resistência ao tratamento padrão. *C. glabrata* é intrínseca resistente aos triazólicos, o que demanda novas estratégias para o combate a este patógeno, empregando abordagens alternativas. Assim, foi realizado ensaios *in vitro* de microdiluição com cepas ATCC das espécies fúngicas supracitadas para testar o potencial do Butirato de Sódio (um conhecido inibidor de histona desacetilase) atuando como possível pré-biótico associado à sobrenadantes filtrados de *Lactobacillus reuteri* ou *L. rhamnosus* (excretas metabólicas de bactérias presentes na microbiota humana). Os testes foram realizados empregando os substratos isoladamente ou na hipótese de testar sinergismo entre esses. A pergunta norteadora foi fundamenta se haveria um potencial inibitório das substâncias envolvidas sobre o crescimento de leveduras de *Candida* spp., além de comparar os resultados ao padrão farmacológico clínico, o fluconazol. As atividades antifúngicas avaliadas neste estudo demonstram redução significativa sobre o s crescimento das leveduras *in vitro*, sobretudo para o controle de crescimento de *C. glabrata*, sendo uma promissora abordagem terapêutica suplementar ao tratamento dessas infecções, ainda mais quando associando à moduladores epigenéticos e substâncias naturais como tentativa de “driblar” a resistência fúngica.

**Palavras-chave:** *Candida* spp.; Sobrenadante de *Lactobacillus* spp; Butirato de Sódio..

## 1. INTRODUÇÃO:

### 1.1 Infecções fúngicas.

Os fungos têm papel fundamental na homeostase do organismo dos seres humanos, dado que são componentes importantes da microbiota de diferentes tecidos, como: pele, trato gastrointestinal e mucosas. Por exemplo, o fungo *Candida albicans* pode ser encontrado como integrante da microbiota humana, ou seja, na relação ecológica de comensalismo com o hospedeiro. Apesar de em algumas circunstâncias a sua presença se tornar patogênica e resultar em infecção, como no caso de candidíases e candidemias (infecção sistêmica) (Soll, 2002)

Os principais indivíduos que desenvolvem quadros graves de infecções fúngicas são os imunocomprometidos e aqueles que apresentam uma “porta de entrada” como o uso de cateter (sobretudo o venoso/arterial). Dentre as características dos fungos patogênicos tidos como “ameaças” bem adaptadas à saúde humana e animal vale destacar a habilidade em conviver em comunidades bem estruturadas, capazes de produzir estruturas tridimensionais com ampla resistência a ambientes inóspitos, como a produção de biofilme (Atiencia-Carrera et al., 2022; W.-L. Liu et al., 2019; Monfredini et al., 2018; Sherry et al., 2014; Thein et al., 2007; Tumbarello et al., 2007; Vitális et al., 2020).

Ainda, há evidências de que uso prévio de antimicrobianos tem relação causal com infecções por *Candida* spp., inclusive de espécies menos comuns na prática clínica. Outros fatores de risco relatados são idade avançada e algumas das comorbidades associadas aos pacientes infectados, como: hipertensão, diabetes e coinfeções (por exemplo, pelo HIV) (Atiencia-Carrera et al., 2022; W.-L. Liu et al., 2019; Monfredini et al., 2018; Sherry et al., 2014; Thein et al., 2007; Tumbarello et al., 2007; Vitális et al., 2020).

Nos quadros de candidíase (forma não sistêmica da infecção), os dados epidemiológicos demonstram maior acometimento de mulheres, pela proximidade entre o ânus e a uretra/vagina. Já em relação aos hospitalizados, a discrepância de infecção urinária por *Candida* spp. se torna mais homogênea entre homens e mulheres, sobretudo quando o paciente recorre à sonda uretral. Em casos como este, o quadro de saúde do indivíduo pode se agravar levando a uma sepse (Fisher et al., 2011; Jain et al., 2011; Tomczak et al., 2014). O polimorfismo que os fungos do gênero *Candida* apresentam também podem influenciar no desenvolvimento da infecção. *C. albicans*, principal causador de infecção em humanos, pode se apresentar em forma de hifa, pseudo-hifa ou levedura, diferenciando a resposta do

hospedeiro, além de influenciar na patogenicidade e evasão da resposta imune, a depender do fenótipo do fungo. Na espécie humana, o soro sanguíneo é um sinal para o fungo sair de sua forma de levedura para sua forma de hifa, sendo esta última forma do polimorfismo fúngico encontrado nos locais de início da infecção sistêmica (Bahn et al., 2007; Gow et al., 2002, 2011; Odds, 1997; Romani et al., 2003).

## **1.2 *Candida* sp. - de comensal à patógeno.**

A *C. albicans*, amais conhecida representante do gênero *Candida*, não apenas nos estudos e produção de conhecimento, mas também como a principal causadora de infecção, dentre as espécies do seu gênero taxonômico. Como supracitado, a *C. albicans* pode conviver em simbiose com o ser humano ou ser patogênica e isso se dá por modificações morfológicas, metabólicas e/ou ambientais. Como, por exemplo: a regulação, via histidina quinase, que estimula a virulência em resposta ao estresse hiperosmótico. Além de haver a modulação por fatores nutricionais e de temperatura, que alteram a morfologia do fungo via nucleotídeos cíclicos (cAMP e cGMP) ou até pelas polimerases ativas no microrganismo (Klein & Tebbets, 2007; San-Blas & San-Blas, 1984; Yamada-Okabe et al., 1999).

O polimorfismo da *C. albicans* é determinante para a evasão do sistema imune, maior capacidade de gerar infecções e na formação de biofilme, essa espécie é extremamente preocupante na prática clínica. Quando em simbiose, é encontrada na microbiota de mucosas do trato gastrointestinal. Para se tornar patogênica, a *C. albicans* passa por três estágios onde ocorrem modificações transcricionais específicas para propiciar: adesão ao epitélio (por meio da expressão de adesinas) e início da formação da hifa para chegar à fase de invasão (com a hifa formada, há início da secreção de proteases, fosfolipases) e, por fim, ocorre a produção e liberação de hidrolases no meio intraepitelial, levando ao dano tecidual no hospedeiro (Dalle et al., 2010; Harriott et al., 2010; Y. Liu & Filler, 2011; Pristov & Ghannoum, 2019; Wächtler et al., 2011; Zordan & Cormack, 2014).

Por ter seu ciclo de vida no trato gastrointestinal, a *C. albicans* infecta em maiores proporções mulheres, causando candidíase vulvovaginal, que se caracteriza por diversos sintomas como: irritação da região afetada, dor ao urinar, desconforto vulvar e corrimento. Vale ressaltar que os sintomas não são exclusivos da infecção por *C. albicans* (as infecções por outras espécies de *Candida* apresentam a mesma sintomatologia, diferenciando apenas na resposta ao tratamento, como, por exemplo algumas espécies que são resistentes

intrinsecamente ao tratamento de primeira linha). Outro fator relevante é que nem toda candidíase é sintomática (Kuebrich, 2004; Mashburn, 2006).

*Candida glabrata*, assim como *C. albicans*, pode coexistir em simbiose com o ser humano, bem como pode se tornar patogênica. Quando patogênica, essa espécie habita predominantemente na cavidade oral (também predominam as patogênicas na cavidade oral: *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*) e infecta principalmente idosos (quando comparado às candidíases em neonatos e crianças). Sua reprodução é assexuada por brotamento, obtendo energia principalmente da glicose. Isso se dá porque o patógeno oportunista, ao longo de sua evolução, teve deleção de genes relacionados ao metabolismo de alguns carboidratos, nitrogênio e fosfatos (Barns et al., 1991; Bialková & Subík, 2006; Dujon et al., 2004; Hazen, 1995; Silva et al., 2012).

A organização gênica é dada por DNA cromossomal e mitocondrial. Outro fator interessante para ressaltar, é a incapacidade de polimorfismo (Bialková & Subík, 2006).

Epidemiologicamente, esta espécie fúngica está entre as mais preocupantes nas Américas e Europa. Sendo sua prevalência geralmente associada pelo uso empírico ou profilático de antimicrobianos e antifúngicos, sobretudo os triazólicos. Sua disseminação está associada à resistência intrínseca à classe de antifúngicos citada, mas também pode adquirir mecanismos de resistência adicionais (Perlroth et al., 2007).

### **1.3 Mecanismos de resistência fúngica**

Como estratégias de tratamento, têm-se no mercado atualmente as seguintes classes de antifúngicos: azólicos, polienos, equinocandinas e nucleosídeos. De forma geral, os azólicos são os mais utilizados, para os pacientes com infecção urinária causada por *Candida* spp., porém deve-se ter atenção aos pacientes com problemas renais graves e grávidas, uma vez que boa parte dos antifúngicos apresentam alta toxicidade, como no caso do fluconazol que pode ser embriotóxico em altas doses de administração oral. Ainda será abordado acerca da resistência microbiana, que é um fator relevante para a continuidade do tratamento e para os índices de reinfecção por microrganismos resistentes (Moudgal & Sobel, 2003; Tomczak et al., 2014).

Em 1994, a resistência de espécies de *Candida* sp. com antifúngicos, como o fluconazol, já era debatida na comunidade científica como um fator preocupante para a saúde pública. Além de ser extremamente disseminada, quando a candidíase atinge níveis sistêmicos



de infecção (candidemia), há um significativo aumento mortalidade devido à resistência microbiana ao tratamento (Kirkpatrick, 1994; Perloth et al., 2007).

Desde o início dos anos 2000, hipóteses têm sido formuladas acerca da resistência da *C. glabrata* diante do fluconazol (antifúngico triazólico). Nessa linha de raciocínio, Nakayama et al. propuseram que a *C. glabrata* segue vias de síntese alternativas para o ergosterol de sua membrana plasmática, dessa forma apesar dos antifúngicos azólicos atuarem inibindo o principal precursor do ergosterol, o fungo consegue produzi-lo. Outro estudo realizado demonstrou que os antifúngicos tetrazólicos apresentaram atividade semelhante aos triazólicos, quando administrados para o tratamento de infecções geradas pela *C. glabrata* (Nakayama et al., 2000; Nishimoto et al., 2019).

Um dos fatores de resistência microbiana relacionado à candidíase é o biofilme que, além da resistência aos antimicrobianos, também é uma forma de reservatório para o fungo. Para a *C. albicans*, a formação do biofilme ocorre em quatro etapas (de forma concomitante com as modificações citadas para que a levedura se torne hifa), sendo elas: adesão, iniciação, maturação e dispersão. (Mathé & Van Dijck, 2013; Mitchell et al., 2016; Nobile & Johnson, 2015; Polke et al., 2018; Taff et al., 2013; Tournu & Van Dijck, 2012; Tsui et al., 2016).

*C. glabrata* também tem a capacidade de formação de biofilme, mas de forma diferente da *C. albicans*, visto que a *C. glabrata* não apresenta polimorfismo. Neste caso, para a formação da matriz extracelular é secretado polissacarídeos (que é produzido para composição da parede celular) e proteínas que servem como barreira física e química contra antifúngicos (d'Enfert & Janbon, 2016; Lal et al., 2010; Rodrigues et al., 2017).

Vale ressaltar que a formação de biofilme não ocorre apenas entre leveduras de *C. albicans*, mas elas podem ocorrer concomitante com formação de biofilme de outros fungos e até de bactérias. Outro ponto importante, é que o biofilme está intimamente ligado às infecções mais graves e mais fatais de candidíase e candidemia (Al-Fattani & Douglas, 2006; Ghannoum et al., 2015; Rajendran et al., 2016; Tumbarello et al., 2012).

Outros mecanismos de resistência comuns que as *C. albicans* e *C. glabrata* apresentam são o aumento na expressão de bombas de efluxo, que têm como principal função prevenir o acúmulo de substâncias tóxicas para as células (incluindo os antifúngicos utilizados no tratamento). Inclusive, uma das vias da resistência intrínseca da *C. glabrata* com os azólicos se dá devido à superexpressão das bombas de efluxo. Além das bombas de efluxo, também pode ocorrer a modificação na expressão gênica dos alvos dos medicamentos, como acontece com os polissacarídeos da parede celular, alvo das equinocandinas (como a caspofungina, por exemplo). No caso dos polissacarídeos da parede, ocorre uma mutação no gene responsável

por codificá-lo (o gene FKS1, FKS2 individual ou simultaneamente), fazendo com que os polissacarídeos expressos não sejam alvo das equinocandinas (Alexander et al., 2013; Mathé & Van Dijck, 2013; Persyn et al., 2019; Sanguinetti et al., 2015; Shields et al., 2015; Spampinato & Leonardi, 2013; Walker et al., 2010).

*A. C. glabrata*, portanto, torna-se especialmente preocupante. Ora, visto que já tem a resistência intrínseca aos azólicos e também pode desenvolver resistência às equinocandinas, gerando uma cepa multirresistente ao tratamento. Consequentemente o tratamento torna-se muito mais difícil, aumentando a quantidade de complicações e de óbitos advindas dessa multirresistência (Pristov & Ghannoum, 2019).

#### **1.4 Pré-bióticos e probióticos**

A Associação Científica Internacional para Probióticos e Pré-bióticos (ISAPP) sugeriu em 2016 um consenso acerca da definição de pré-bióticos como “substrato utilizado por microrganismos do hospedeiro que confere algum benefício à saúde”. Tendo em vista tal definição, devemos levar em consideração fatores como a substância-alvo, modificação mediada por microrganismo e, por fim, o efeito benéfico que essa modificação gera. Alguns exemplos de pré-bióticos são polifenóis e ácidos graxos poli-insaturados. (<https://isappscience.org/for-scientists/resources/prebiotics/>)(Gibson et al., 2017).

Alguns dos produtos metabólicos relacionados à ingestão de carboidratos (como fibras alimentares), são o butirato, o acetato e o propionato. O butirato, um ácido graxo de cadeia curta, produzido por integrantes da microbiota intestinal, tem relação com a prevenção de câncer colorretal, visto que modula a proliferação e apoptose por influenciar na expressão gênica das células intestinais (Flint et al., 2008; Fogliano et al., 2011; McIntyre et al., 1993).

Os probióticos, no que lhe concerne, tiveram sua definição uniformizada em 2013 pela Associação Científica Internacional para Probióticos e Pré-bióticos (ISAPP) como “microrganismos vivos, que quando administrados em doses adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro”. No Brasil, a regulamentação dos probióticos é do escopo da Gerência Geral de Alimentos, da Segunda Diretoria da ANVISA e, atualmente, é regida pela Resolução da Diretoria Colegiada, RDC nº 241/2018, que dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos <sup>1,2</sup>.

---

<sup>1</sup> Disponível em: <<https://isappscience.org/for-scientists/resources/probiotics/>> Acessado em 07/05/202.

<sup>2</sup> Disponível em: <<http://antigo.anvisa.gov.br/legislacao/#/visualizar/378665>> Acessado em: 25/04/2022

Dessa forma, a manipulação para administração de micro-organismos em determinados casos pode ser uma possibilidade de prevenção ou tratamento em potencial, visto que os probióticos já tiveram comprovadas algumas funções, como: modulação da resposta imune humoral e celular (ativando atividade fagocítica de células dendríticas ou aumentando a produção/liberação de anticorpos contra patógenos), interação com a microbiota intestinal (com a produção, inclusive, de compostos antimicrobianos, regulando a presença de patógenos intestinais), aumento de barreiras naturais (com as ligações intercelulares, por meio de proteínas de adesão de *Lactobacillus* spp., por exemplo) e até na produção e liberação de moléculas com atividades diversas para o hospedeiro (produção de exopolissacarídeos como barreira de mucosas, produção de enzimas como a lactase e até de ácidos orgânicos como o butirato). Todas essas atividades atribuídas aos probióticos foram revisadas e discutidas por Sanders e colaboradores (Sanders et al., 2019).

Um estudo de Dani et al., de 2002, demonstrou que administração oral de *Lactobacillus rhamnosus* concomitante à alimentação de neonatos, favoreceu com que fossem menos afetados pela enterocolite necrosante. Outro estudo, este realizado por Manzoni et al., em 2006, comprovou que o tratamento medicamentoso associado à suplementação oral de probióticos em neonatos pode ser benéfico em casos de infecção por *Candida* spp., a ponto de ter reduzido a concentração do medicamento utilizado e diminuindo os custos do tratamento (Dani et al., 2002; Manzoni et al., 2006).

Roy e colaboradores também demonstraram a influência dos probióticos em neonatos com colonização intestinal por *Candida* spp.. Tais evidências suportam a segurança e efetividade do uso de microrganismos como probióticos e adjuvantes de tratamento (Roy et al., 2014).

Quando há a utilização de pré-bióticos e probióticos, com objetivo sinérgico, a associação é denominada simbiótica. Tratamento simbiótico já teve teste clínico randomizado para reduzir sepse em crianças e teve resultados promissores. Os simbióticos também tiveram sua relevância revisados para a prevenção e tratamentos de infecções vaginais, como nos casos de vaginose bacteriana e candidíase vulvovaginal (Mizgier et al., 2020; Panigrahi et al., 2017).

#### **1.4.1 Butirato de Sódio**

O butirato, um pré-biótico, consegue inibir histonas desacetilases (iHDAC) com maior seletividade para HDAC1 e HDAC3. Essa capacidade inibitória atua na formação de Linfócitos Treg no intestino, devido à acetilação da histona H3, por exemplo. Algumas outras atividades

metabólicas já foram reportadas, como na regulação endócrina da insulina e do glucagon (Arpaia et al., 2013; Furusawa et al., 2013; Kasubuchi et al., 2015).

O butirato (tanto na sua forma de sal, butirato de sódio (NaBut), como na sua forma ácida, o ácido butírico), tem sido testado em diferentes aplicações, algumas citadas anteriormente. No tocante à saúde humana, estudos investigam seu potencial terapêutico em diferentes aplicações, mas todas objetivando a melhoria do quadro clínico do paciente, como estudos depositados no *Clinical Trial* para diabetes e esquizofrenia (Kernel Networks Inc., 2019; *Sodium Butyrate For Improving Cognitive Function In Schizophrenia*, n.d.), bem como seu papel anti-inflamatório (Nițescu et al., 2021; Stachowska et al., 2021).

Recentemente foi comprovado, por pesquisas *in vitro*, que o butirato de sódio consegue modular a resposta de macrófagos de galinha contra *Salmonella enteritidis* aumentando a expressão de proteínas relacionadas às mudanças no citoesqueleto celular, permeabilidade de membrana e até nas proteínas envolvidas no combate à infecção pela bactéria.

Outro estudo investigou o potencial fungistático de ácidos orgânicos fracos, dentre esses o ácido butírico, em infecção por *Candida* spp. e o referido ácido teve melhores resultados na inibição do crescimento das leveduras (Cottier et al., 2015; Gupta et al., 2021).

Alguns estudos realizados com leveduras patogênicas de *Cryptococcus neoformans* demonstraram o efeito de NaBut na inibição do crescimento do fungo (F. A. Brandão et al., 2015) e, ainda, abordaram o potencial efeito benéfico no tratamento da infecção fúngica com a associação de um iHDAC aos antifúngicos disponíveis no mercado atualmente (Ranjan et al., 2021). Dado que as HDACs estão associadas a diversas funções essenciais à sobrevivência e à patogenicidade desses micro-organismos (F. Brandão et al., 2018; F. A. Brandão et al., 2015).

#### **1.4.2 *Lactobacillus* spp.**

Este gênero de bactérias tem características morfológicas de bastonete gram-positivo, anaeróbio facultativo, com crescimento ótimo na faixa de temperatura entre 35-38°C e em pH levemente ácido. Essas bactérias podem ser encontradas em relações ecológicas de simbiose em uma diversidade de animais, incluindo o humano, em regiões como o trato gastrointestinal e a mucosa vaginal (Sanders et al., 2019).

Lactobacilos são considerados probióticos e atuam como adjuvantes no tratamento de algumas doenças, como infecções vaginais e urinárias (Dani et al., 2002). Foi observado que há alteração na microbiota vaginal em casos de doenças infecciosas na região, diminuindo a

quantidade de bactérias desse gênero. Seu papel na mucosa vaginal tem sido largamente pesquisado sendo sabido da produção de moléculas essenciais para a proteção do seu hospedeiro, como a produção de peróxido de hidrogênio, bacteriocinas, ácido lático e butirato, além da formação de biofilme (Kandler et al., 1980; Paniágua et al., 2021; Sanders et al., 2019). A produção dos compostos acima apresentados é de extrema importância no auxílio do controle de crescimento de micro-organismos patogênicos, prevenindo vaginose bacteriana e candidíase (Kim & Park, 2017; Manzoni et al., 2006; Paniágua et al., 2021).

Algumas espécies do gênero *Lactobacillus* apresentam dados promissores como adjuvantes da homeostasia intestinal, como a espécie *Lactobacillus rhamnosus*, a terceira maior espécie de *Lactobacillus* spp. encontrado na microbiota vaginal e isso tem levantado hipóteses acerca do seu papel quanto probiótico. Foi demonstrado efeito positivo na administração oral dessa espécie (associada ao *Lactobacillus plantarum* ou *Lactobacillus fermentum*), resultando em melhoras significativas de quadros de doenças urogenitais. Não apenas melhoria na microbiota vaginal, mas também foram levantadas evidências de melhora na microbiota intestinal, inclusive com impactos na imunidade humoral e celular do intestino (Fuochi et al., 2019; Reid et al., 2002, 2003).

Outra espécie do gênero pesquisada como potencial probiótico é o *Lactobacillus reuteri*, originalmente encontrada no intestino, essa espécie consegue produzir vitaminas (como B12 e B9, vitaminas essenciais), consegue converter L-histidina em histamina (que atua como anti-inflamatório no intestino), além de formar biofilme a partir da produção de exopolissacarídeos (bloqueando adesão de patógenos à superfície intestinal e suprimindo a produção de citocinas pró-inflamatórias estimuladas por tais patógenos). Ainda, a administração oral do *L. reuteri* como probiótico foi capaz de reestabelecer a microbiota vaginal de mulheres pós-menopausa. Bem como a administração local de *L. reuteri* em associação com *L. rhamnosus* teve efeitos semelhantes na recomposição da microbiota vaginal de mulheres pós-menopausa. Apesar dos benefícios citados, é interessante levantar o fato de que a administração oral do *L. reuteri* (pelo dobro do tempo utilizado nas mulheres pós-menopausa) não foi suficiente para o reestabelecimento da microbiota vaginal de mulheres grávidas (Bisanz et al., 2014; Gao et al., 2015; Gille et al., 2016; Mu et al., 2018; Petricevic et al., 2008; Santos et al., 2008; Taranto et al., 2003).

Uma vez que há evidências que suportam o uso de probióticos e de suas excretas metabólicas para o combate de diferentes patologias, incluindo as infecções, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a Concentração Inibitória Mínima, por meio da técnica de microdiluição, do extrato estéril filtrado do sobrenadante de *Lactobacillus reuteri* e

*Lactobacillus rhamnosus*, associados ou não ao Butirato de sódio, em culturas de *Candida albicans* e *Candida glabrata*.

## **2. METODOLOGIA:**

### **2.1 Linhagens de microrganismos:**

Foram utilizadas linhagens *American Type Culture Collection* (ATCC), onde as cepas de *Candida albicans* ATCC90028 e *Candida glabrata* ATCC90030 foram cedidas pelo Laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital Universitário de Brasília (HUB/UnB). Já as cepas de *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus rhamnosus*, foram doadas pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Yanna Nóbrega, chefe do Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Farmácia (ULEG/FS-UnB).

### **2.2 Meios de cultura:**

Para os experimentos, foram utilizados: Meio de Cultura Sabouraud Dextrose (composição: 5% do hidrolisado pancreático de caseína, 5% do hidrolisado péptico de tecido animal e 40% de dextrose), indicado para a identificação de *C. albicans*. O Meio Sabouraud foi escolhido por ser um meio rico em nutrientes e ideal para iniciar o crescimento das cepas de *C. albicans* e *C. glabrata* para posterior microdiluição.

O Meio de Cultura YPD (1% de extrato de levedura, 2% de dextrose e peptona a 2%) foi utilizado nas microdiluições, para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), devido sua capacidade de nutrir as leveduras nele semeadas.

Por fim, o Meio de Cultura MRS (constituído de: enzima digestiva de tecido animal 1%, extrato de carne 1%, extrato de levedura 0,5%, dextrose 2%, acetato de sódio 0,5%, polissorbato %, fosfato de dissódio 0,2%, citrato de amônio 0,234%, sulfato de magnésio 0,01% e sulfato de manganês 0,005%), seletivo para cultivo de *Lactobacillus* spp. em laboratório, onde foram semeadas as cepas de *L. reuteri* e *L. rhamnosus*.

Os Caldos de Meio Sabouraud e de Meio MRS foram preparados conforme orientações do fabricante (Kasvi<sup>®</sup>, Laboratórios Conda S.A.), ressuspendendo o meio em água destilada e alíquotando-os em tubos de ensaio com tampa rosqueável (cerca de 2mL/tubo). Com as alíquotas prontas, foi aplicado tratamento térmico à vapor por 15 min, a 121°C em Autoclave Vertical Analógica 30L (STERMAX<sup>®</sup>).

O YPD, por sua vez, foi doado na sua forma pronta para uso, inclusive autoclavado. O seu armazenamento (o único armazenado em balão volumétrico), assim como os demais Meios de Cultura utilizados no presente experimento, foi sob refrigeração (2 - 8°C).

### **2.3 Estoque e inóculos:**

Os estoques fúngicos e bacterianos foram mantidos a -20°C em microtubos com meio de cultura e glicerol a 30% v/v.

Foram retiradas 15µL das cepas de *C. albicans* e *C. glabrata* e inoculadas inicialmente em Meio Sabouraud para crescimento substancial das amostras a serem testadas. O inóculo ficou em estufa (Fanem LTDA.) a 37°C, sem agitação, por 72h.

O inóculo dos *L. reuteri* e *L. rhamnosus* foi realizado com 15µL da suspensão-estoque, semeados em caldo MRS e inoculados por 48h em estufa a 37°C, também sem agitação.

As suspensões-estoque foram armazenadas (em microtubos) novamente sob refrigeração a -20°C e os inóculos (em tubos de ensaio com sistema de rosqueamento da tampa) foram utilizados logo após os tempos de crescimento em estufa.

### **2.4 Preparo das soluções:**

A solução de NaBut (Cayman Chemical®) foi diluída em água para injetáveis estéril na concentração estoque de 500mM. A solução estoque foi mantida sob proteção da luz e refrigerada a -20°C. Para os testes em microplaca foram empregados 150µL de NaBut para os testes (concentração final equivalente a 75mM).

Para preparar o fluconazol a ser utilizado, foram realizadas diluições em solução salina 0,9% estéril. O fluconazol de estoque foi disponibilizado na concentração 128µg/mL e a partir desta, prosseguiu-se com as diluições com solução salina 0,9% para obtenção do fluconazol nas concentrações de 4µg/mL, 8µg/mL, 16µg/mL e 32 µg/mL. A solução-estoque e suas diluições foram mantidas sob refrigeração a -20°C.

As cepas de *L. reuteri* e *L. rhamnosus* serviram para a obtenção do extrato do sobrenadante, após 48h de crescimento das bactérias em estufa a 37°C, como descrito em **1.3. Estoque e inóculos**. Após o crescimento, os referidos tubos foram centrifugados (TDL80-2B, Arcano®) a 2000 RPM por 10 minutos, logo após, foi realizada filtração com seringa e filtro poroso (0,22µm) estéreis. Após o preparo do extrato do sobrenadante das culturas dos *Lactobacillus* spp., o armazenamento foi feito sob refrigeração (2-8°C).

## 2.4 Curvas de crescimento:

As curvas de crescimento foram realizadas para avaliar o potencial inibitório do butirato de sódio e das cepas de *Lactobacilli* no ciclo de crescimento das linhagens de *Candida* spp.. Foi empregada a metodologia baseada no proposto pelo *Brazilian Committee on antimicrobial Susceptibility Test* (BrCAST), em 2018: “Método para determinação de concentração inibitória mínima em caldo dos agentes antifúngicos para leveduras”, onde foi utilizada microplaca de 96 poços de fundo chato (K12-096, Kasvi®) no ensaio de microdiluição, com volume total de 200µL e 10<sup>5</sup> levedura/poço. Cada placa é uma replicata do experimento, realizado em triplicata biológica, e apresenta **grupos Controle** (positivo e negativo) e **grupo Teste**.

O desenho esquemático da placa atribui às colunas: o grupo Controle ou Teste; e às linhas: a diluição seriada, sendo mais concentrados acima e menos concentrados abaixo. As colunas da placa correspondem aos números (1-12) e as linhas são representadas em ordem alfabética de cima para baixo (A-H).

As linhagens de *Candida* foram inoculadas em caldo Sabouraud, como descrito em **1.3. Estoque e inóculos**, e após o crescimento, foi realizada leitura em espectrofotômetro BTS 310 (BioSystems® 23, Barcelona, Espanha) em comprimento de onda igual a 600 nm para leitura da Densidade Óptica (OD), para ajuste do número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) a serem adicionadas no ensaio de microdiluição.

As ODs foram ajustadas, tendo como solução padrão para a espectrofotometria a solução salina 0,9%. Para cada espécie de *Candida* avaliada no presente estudo, foi ajustada a OD para a faixa entre 0,070 e 0,085, equivalente a 10<sup>6</sup> microrganismos/mL. Ajustadas as ODs, foi realizada outra diluição 1:10 para a obtenção de 10<sup>5</sup> microrganismos/mL e semeadas em caldo de YPD para realização da microdiluição.

Após prontas, as placas seguiram para estufa a 37°C por 24h. Sendo encaminhadas ao Laboratório de Produtos Naturais da FS/UnB, onde a leitora de microplacas (EnSpire Multimode Plate Reader, PerkinElmer Inc.®) evidenciou, à 600 nm, os resultados obtidos neste estudo. Para melhor visualização a olho nu, foi adicionado às placas 10µL de Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC)/poço e reincubadas por mais 24h. O TTC é um corante incolor, na sua forma oxidada, que pode ser reduzido, tornando-se vermelho pela formação de formazano (intracelularmente, a atividade metabólica do microrganismo é capaz de reduzi-lo, deixando o **formazano** dentro de vesículas celulares. Passadas as 24h de incubação com TTC, as placas foram retiradas da estufa e fotografadas para composição dos **Resultados**.



Como supracitado, algumas colunas representam os Controles, as colunas 1 e 7, sendo eles:

- Controle positivo para o Butirato: Realizado com as leveduras inoculadas em meio YPD (Poços A1 e A2 realizados com *C. albicans*; e poços A7 e B7 realizados com *C. glabrata*);
- Para os testes relacionados ao extrato filtrado: Composto por crescimento das leveduras inoculadas apenas com meio MRS (Poços C1 e D1 para *C. albicans*; e poços C7 e D7 para *C. glabrata*);
- Os controles negativos foram realizado com meio de cultura YPD e MRS sem qualquer inóculo microbiológico (Poços E1, F1, E7 e F7 com YPD; e poços G1, H1, G7 e H7 com MRS);
- O fluconazol, utilizado como controle de inibição, foi utilizado em suas concentrações inibitórias mínimas para *C. albicans* (Coluna 5, com 8µg/mL inicialmente) e para *C. glabrata* (Coluna 11, com 32µg/mL, inicialmente).

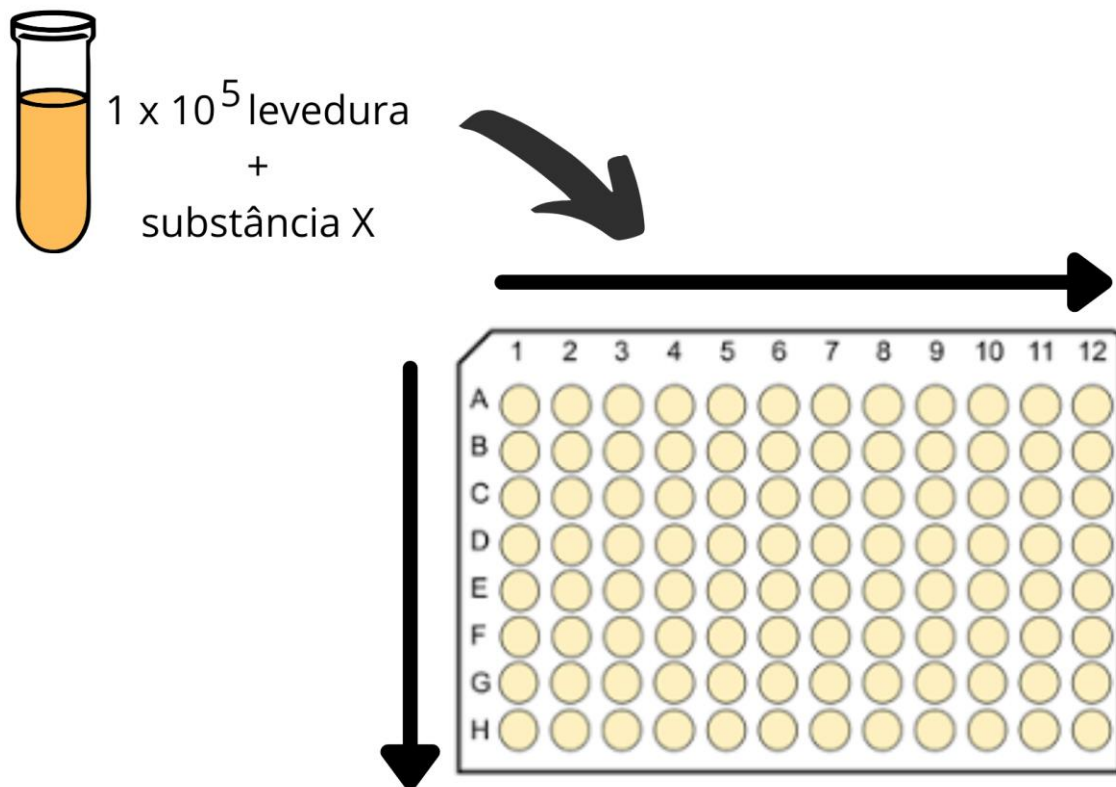
Já as concentrações dos grupos Teste sucedeu-se em microdiluição da seguinte forma:

- Concentração do NaBut:  
Linha 1: [75mM]; Linha 2: [37,5mM]; Linha 3: [18,7mM]; Linha 4: [9,4mM]; Linha 5: [4,7mM]; Linha 6: [2,3mM]; Linha 7: [1,2mM]; e Linha 8: [0,6mM].
- Concentração do sobrenadante filtrado de cada *Lactobacillus* testado:  
Linha 1: [50% v/v]; Linha 2: [25% v/v]; Linha 3: [12,5% v/v]; Linha 4: [6,2% v/v]; Linha 5: [3,1% v/v]; Linha 6: [1,6% v/v]; Linha 7: [0,8% v/v]; e Linha 8: [0,4% v/v].
- Concentração do fluconazol utilizado para *C. albicans*:  
Linha 1: [4µg/mL]; Linha 2: [2µg/mL]; Linha 3: [1µg/mL]; Linha 4: [0,5µg/mL]; Linha 5: [0,2µg/mL]; Linha 6: [0,1µg/mL]; Linha 7: [0,06µg/mL]; e Linha 8: [0,03µg/mL].
- Concentração do fluconazol utilizado para *C. glabrata*:  
Linha 1: [16µg/mL]; Linha 2: [8µg/mL]; Linha 3: [4µg/mL]; Linha 4: [2µg/mL]; Linha 5: [1µg/mL]; Linha 6: [0,5µg/mL]; Linha 7: [0,2µg/mL]; e Linha 8: [0,1µg/mL].

## 2.5 Sinergismo:

Para além da análise do extrato filtrado dos sobrenadantes dos *Lactobacillus* testados, foi pensado também na sua aplicação sinérgica ao tratamento com fluconazol. Dessa forma foi preparada uma solução contendo: 50% do sobrenadante filtrado, 20% de solução salina 0,9%, 15% de NaBut e 15% de fluconazol (para *C. albicans* foi utilizado fluconazol [8 µg/mL] e para *C. glabrata*, [16µg/mL]).

A figura 1, representa a microplaca utilizada para os ensaios, bem como a concentração de leveduras utilizadas.



**Figura 1** — Representação da microplaca de 96 poços de fundo chato, onde os poços foram preenchidos da seguinte forma: Teste de inibição de *C. albicans* utilizando extrato filtrado do sobrenadante de *L. reuteri* (posições A6, B6 e C6); Teste de inibição de *C. albicans* utilizando extrato filtrado do sobrenadante de *L. rhamnosus* (posições F6, G6 e H6); Teste de inibição de *C. glabrata* utilizando extrato filtrado do sobrenadante de *L. reuteri* (posições A12, B12 e C12); Teste de inibição de *C. glabrata* utilizando extrato filtrado do sobrenadante de *L. rhamnosus* (posições F12, G12 e H12).

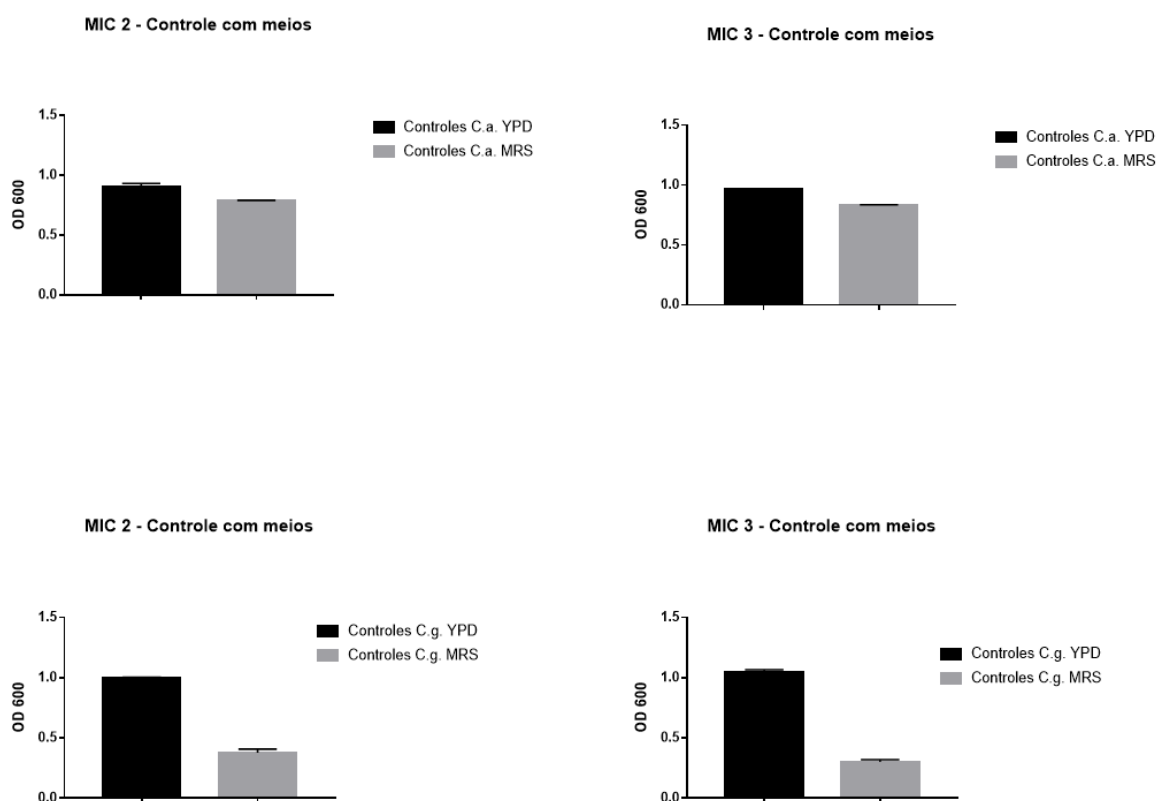
## 2.6 Tratamento Estatístico:

O programa *GraphPad Prism* (versão 7 para Windows) foi utilizado para inserção dos dados obtidos no experimento, onde o eixo X são as concentrações utilizadas (dose-resposta) e a densidade ótica (OD=600nm) está representada no eixo Y, compondo o gráfico de linha resultante. O teste paramétrico *One-way ANOVA* com pós-teste de Tukey's para múltiplas

comparações foi realizado para avaliar as estatísticas do sinergismo. O padrão de todas as análises estatísticas assumindo intervalo de confiança a 95% e  $p < 0,005$ .

### 3. RESULTADOS & DISCUSSÃO:

Inicialmente, foi avaliado a curva de crescimento das leveduras de *C. albicans* e *C. glabrata* em meio YPD comparado ao YPD acrescido de 50% do meio MRS. Tal racional se deu a fim de evitar vieses de algum efeito do meio MRS sobre o crescimento das leveduras, o que poderia interferir na análise real do sobrenadante, visto que, para estas análises é necessário adicionar o sobrenadante de culturas dos lactobacilos previamente cultivados no MRS.



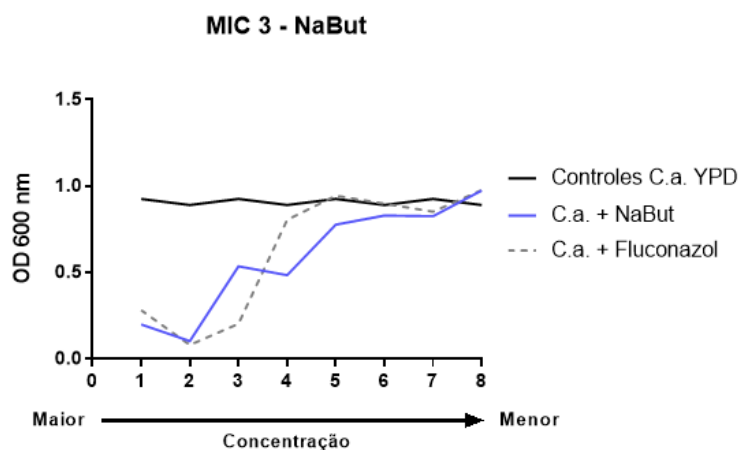
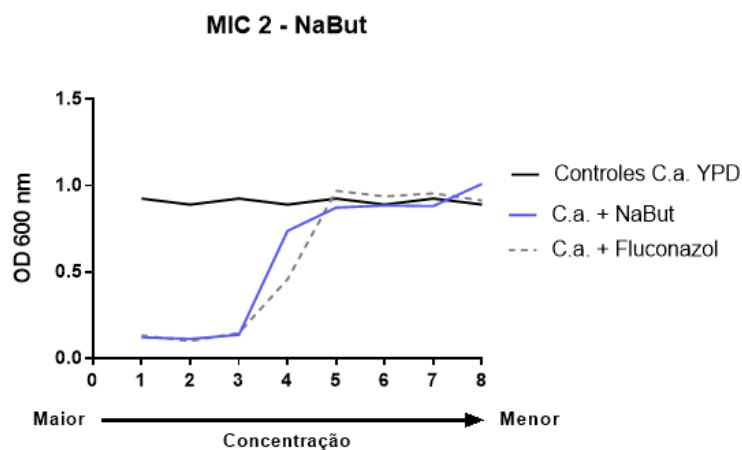
**Figura 2** — Crescimento controle de leveduras de *Candida* em YPD versus YPD acrescido de MRS. A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm). Na cor preta há o controle positivo, em que há apenas as leveduras de *Candida* e o meio de cultura, na cor cinza o grupo controle em YPD+MRS 50%. MIC 1 e MIC2 se refere, respectivamente, a réplica biológica do teste 2 e 3.

Os dados da figura 2 sugerem que a espécie *C. albicans* não sofre alteração significativa no crescimento entre os grupos controles YPD e YPD+MRS. Por outro lado, as leveduras de *C. glabrata* cresceram expressivamente menos na presença do meio MRS.

É provável que *C. glabrata* seja mais susceptível às alterações de meio e pH, visto que nitidamente seu crescimento foi reduzido na mistura dos meios. Enquanto *C. albicans* apresenta-se sem alterações. Tal observação talvez suporte o fato de *C. albicans* ser mais adaptada a diferentes tecidos, o que a torna mais prevalente e ubíqua que as demais *Candidas* spp. (Guo et al., 2013; Odds, 1997).

Com base nestes achados, as análises subsequentes empregam como controle de crescimento, para os testes do sobrenadante de lactobacilos, leveduras crescidas em YPD+MRS.

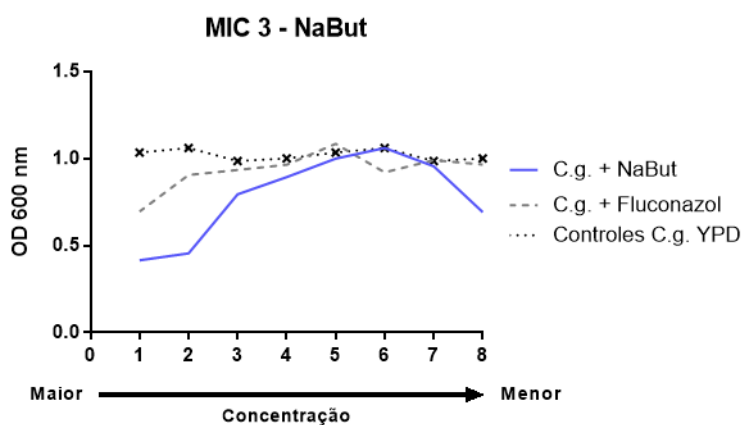
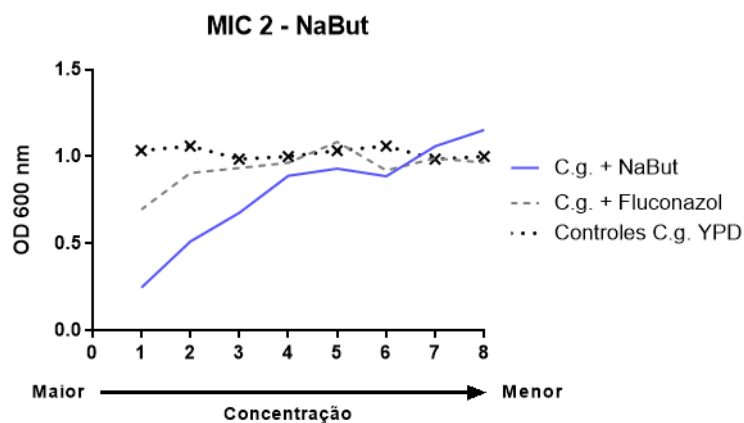
### 3.1 Avaliação do NaBut sobre o crescimento de *Candida* spp.:



**Legenda Eixo X - Concentrações:**

**NaBut** - 1=[75 mM]; 2=[37.5mM]; 3=[18.75mM]; 4=[9.37mM]; 5=[4.68mM]; 6=[2.34mM]; 7=[1.17mM]; 8=[0.58mM]  
**Fluconazol** - 1=[8µg/mL]; 2=[4µg/mL]; 3=[2µg/mL]; 4=[1µg/mL]; 5=[0.5µg/mL]; 6=[0.25µg/mL]; 7=[0.125µg/mL]; 8=[0.0625µg/mL].

**Figura 3: Avaliação do NaBut sobre o crescimento de *C. albicans*.** NaBut: Butirato de sódio. MIC 2 e MIC3 se refere, respectivamente, a réplica biológica dos testes.



Legenda Eixo X - Concentrações:	
NaBut - 1=	[75 mM]; 2=[37.5mM]; 3=[18.75mM]; 4=[9.37mM]; 5=[4.68mM]; 6=[2.34mM]; 7=[1.17mM]; 8=[0.58mM]
Fluco - 1=	[32µg]; 2=[16µg]; 3=[8µg]; 4=[4µg]; 5=[2µg]; 6=[1µg]; 7=[0.5µg]; 8=[0.25µg].

**Figura 4: Avaliação do NaBut sobre o crescimento de *C. glabrata*.** NaBut: Butirato de sódio. MIC 2 e MIC3 se refere, respectivamente, a réplica biológica dos testes.

Os resultados para avaliação do NaBut no crescimento das *C. albicans* e *C. glabrata*, figuras 3 e 4, respectivamente, demonstram maior inibição do NaBut sobre a *C. albicans* quando comparadas a *C. glabrata*. Porém, para a *C. glabrata* quando comparada a inibição do NaBut com a inibição do triazólico, o NaBut se mostra com potencial inibitório maior, mesmo utilizando-se da concentração inibitória mínima do antifúngico preconizada no BrCAST (16µg/mL).

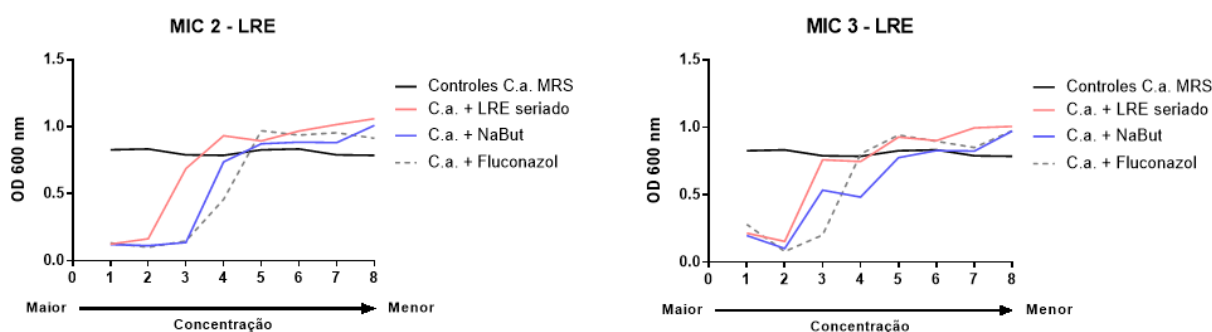
Dessa forma, para a *C. albicans*, o efeito inibitório foi similar nas duas primeiras concentrações do triazólico e do NaBut. Quando analisado para a *C. glabrata*, o foi NaBut nas concentrações de 75mM e 37,5mM conseguem inibir o crescimento fúngico com maior eficácia

quando comparado ao tratamento com fluconazol nas concentrações de 16µg e 8µg. Já em menores concentrações, o efeito inibitório mantém similar entre as duas variáveis analisadas.

### 3.2 Avaliação do extrato filtrado do sobrenadante de *L. reuteri* no crescimento de *Candida spp.*

São crescentes os estudos que apontam os lactobacilos como alternativas contra processos inflamatórios da microbiota intestinal e “parceiros” no combate a candidíase; contudo, são escassos trabalhos com enfoque em avaliar os produtos metabólicos dessas bactérias, em lugar de seu uso.

Deste modo, foi inicialmente avaliado o efeito das excretas metabólicas dos lactobacilos separadamente sobre o crescimento das leveduras de *Candida spp.*.



Legenda Eixo X - Concentrações:	
%MRS controle +	1=[50%]; 2=[25%]; 3=[12.5%]; 4=[6.25%]; 5=[3.12%]; 6=[1.56%]; 7=[0.78%]; 8=[0.39%].
%LAC (v/v)	1=[50%]; 2=[25%]; 3=[12.5%]; 4=[6.25%]; 5=[3.12%]; 6=[1.56%]; 7=[0.78%]; 8=[0.39%].
NaBut	1=[75 mM]; 2=[37.5mM]; 3=[18.75mM]; 4=[9.37mM]; 5=[4.68mM]; 6=[2.34mM]; 7=[1.17mM]; 8=[0.58mM]
Fluconazol	1=[4µg/mL]; 2=[2µg/mL]; 3=[1µg/mL]; 4=[0.5µg/mL]; 5=[0.25µg/mL]; 6=[0.125µg/mL]; 7=[0.062µg/mL]; 8=[0.031µg/mL].

**Figura 5 - Efeito dose-dependente de sobrenadante de *L. reuteri* sobre o crescimento de leveduras de *C. albicans*.** A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica a concentrações seriadas dos compostos analisados. Na linha **preta** há o controle positivo, em que há apenas a *C. albicans* no meio de YPD+MRS. Na linha de cor **laranja** há a análise de *C. albicans* e concentrações seriadas de sobrenadante de *L. reuteri*. Na linha na cor **azul** há a análise de *C. albicans* e concentrações seriadas de NaBut. A linha tracejada em **cinza** representa concentrações seriadas de Fluconazol, na faixa de tratamento. A seta no eixo X indica o sentido de concentração dos compostos testados (da maior a menor concentração). Os valores de 1-8 representam diluição seriada dos compostos analisados. O gráfico é a representação de duplicata biológica com dados similares. **LRE:** *Lactobacillus reuteri*. **NaBut:** Butirato de sódio. **MIC 2 e MIC3** se refere, respectivamente, a réplica biológica dos testes.

Estudos realizados por Martinez e colaboradores., demonstraram *upregulation* da citocina pró-inflamatória IL-8, bem como o seu poder inibitório, contra a *C. albicans*,

suportando a hipótese de que o crescimento do *L. reuteri* compete por nutrientes quando em presença da *C. albicans*, por meio da produção de compostos anti-Candida. Köhler e colaboradores, descreveram também o poder inibitório do *L. reuteri* frente à *C. albicans*, porém em menores proporções do que o *L. rhamnosus*, abordado no item **3.3 Avaliação do extrato filtrado do sobrenadante de *L. rhamnosus* no crescimento de *Candida* spp.** (Köhler et al., 2012; Martinez et al., 2009).

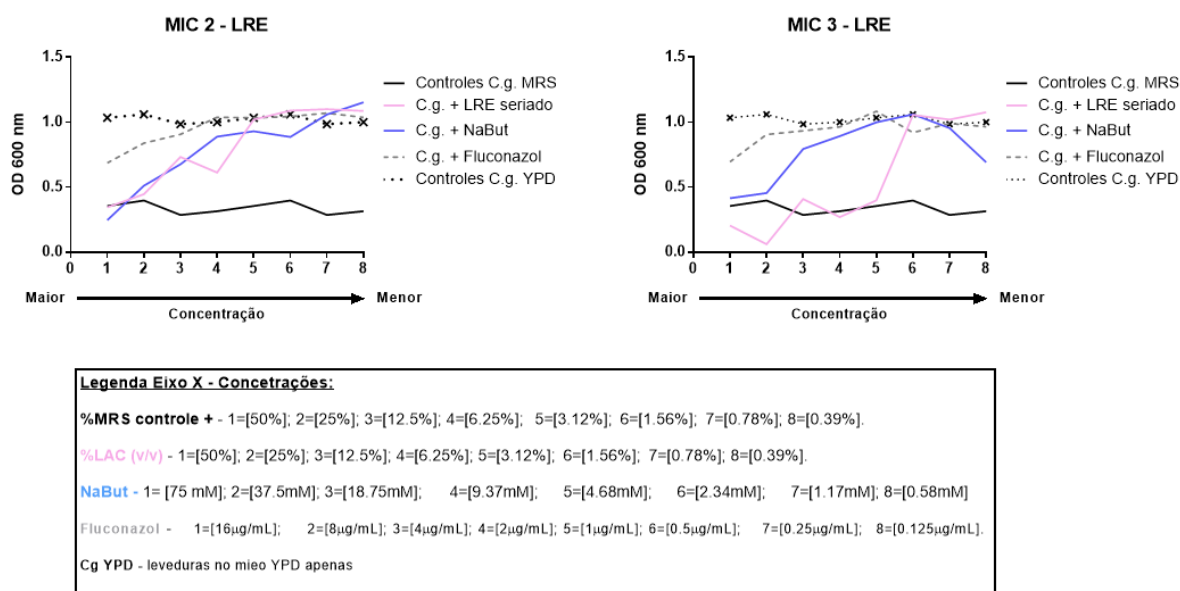
Baseado na figura 5, pode-se perceber provável inibição da *C. albicans*, pelo *L. reuteri* nas concentrações 50% e 25%, de forma semelhante à inibição provocada pelo NaBut, o que corrobora a atividade do prebiótico quando utilizado as concentrações de 75mM e 37,5mM. Sendo os compostos pesquisados com atividade semelhante ao fluconazol nas concentrações 4µg/mL e 2µg/mL.

Quando analisado apenas o fluconazol, as concentrações inibitórias se estendem até a terceira diluição seriada, sendo portanto passível de inibição da *C. albicans* nas concentrações 4µg/mL, 2µg/mL e 1µg/mL. Suportando o predito no item **1.2 *Candida* sp. - de comensal à patógeno**, acerca da maior sensibilidade dessa espécie fúngica ao antifúngico triazólico.

A inibição de crescimento causada pelo caldo de MRS teve índices iguais aos testes (NaBut e sobrenadante filtrado do *L. reuteri*) em concentrações próximas à terceira diluição dos compostos testes, nas concentrações de 18,75mM e 12,5%, para o NaBut e sobrenadante de *L. reuteri* respectivamente.

A figura 6 a seguir apresenta os dados do efeito do sobrenadante de *L. reuteri* sobre o crescimento de leveduras de *C. glabrata*. De modo a enriquecer a análise e devido ao efeito do meio MRS em reduzir o crescimento de leveduras de *C. glabrata* em placa (Fig. 3), um controle adicional (leveduras em YPD apenas), apenas para comparação dos grupos testes, foi adicionado em conjunto com o controle padrão (YPD+MRS).





**Figura 6 - Efeito dose-dependente de sobrenadante de *L. reuteri* sobre o crescimento de leveduras de *C. glabrata*.** A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica a concentrações seriadas dos compostos analisados. Na linha **preta** há o controle positivo, em que há apenas a *C. glabrata* no meio de YPD+MRS. Na linha de cor **rosa** há a análise de *C. glabrata* e concentrações seriadas de sobrenadante de *L. reuteri*. Na linha na cor **azul** há a análise de *C. glabrata* e concentrações seriadas de NaBut. A linha pontilhada em **preto** apresenta crescimento das leveduras somente em meio YPD. A linha tracejada em **cinza** representa concentrações seriadas de Fluconazol, na faixa de tratamento. A seta no eixo X indica o sentido de concentração dos compostos testados (da maior a menor concentração). Os valores de 1-8 representam diluição seriada dos compostos analisados. O gráfico é a representação de duplicata biológica com dados similares. **LRE:** *Lactobacillus reuteri*. **NaBut:** Butirato de sódio. **MIC 2 e MIC2** se refere, respectivamente, a réplica biológica dos testes.

A análise dos gráficos acima permite observar que somente a presença do MRS 50% v/v acrescido ao meio YPD de crescimento de *C. glabrata*, foi suficiente para reduzir o crescimento das leveduras. No entanto, nos pontos 1 e 2 de maior concentração do sobrenadante de *L. reuteri* é possível observar redução do crescimento similar à encontrada apenas pela presença do meio MRS.

É possível inferir pelos dados que a medida que as concentrações diminuem no poço serialmente, o crescimento das leveduras é inversamente proporcional, aumentando até o limiar da fase exponencial da curva de crescimento, como pode ser observado em ambas as duplicatas nos pontos 5 e 6 respectivamente.

O fluconazol apresentou um efeito redutor sobre o crescimento de *C. glabrata* somente nos dois primeiros poços (concentrações mais elevadas). Contudo, um efeito “menor” que os observados nos grupos sobrenadante e NaBut nos mesmos pontos. É amplamente discutido a resistência intrínseca de *C. glabrata* ao fluconazol, demandando concentrações mais elevadas

estabelecida pelo EUCAST (Hitchcock et al., 1993; Osmaniye et al., 2018). Interessantemente, o NaBut conseguiu reduzir o crescimento destas leveduras similar ao grupo sobrenadante, porém, sem nenhum viés de meio, visto que NaBut foi preparado em solução de água para injetáveis. O potencial de redução se mostrou ainda melhor que o fluconazol em sua dose máxima (Fig. 6).

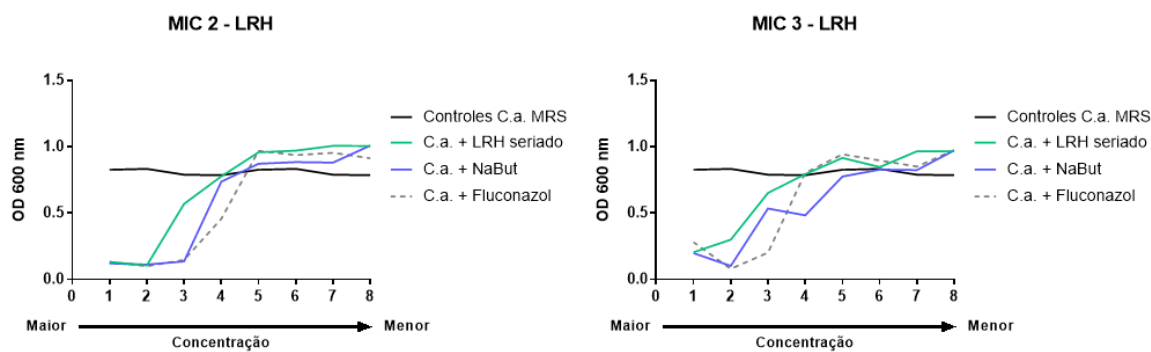
Em relação à inibição de crescimento da *C. glabrata*, foi proposto por Chew et al., que o *L. reuteri* tem a capacidade de inibição devido à sua produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, apesar dessa levedura ser mais tolerante às espécies reativas de oxigênio do que a *Saccharomyces cerevisiae*, como demonstrado por Cuéllar-Cruz et al. (Chew et al., 2015a e 10.1128/EC.00011-08) Em outro estudo, Chew et al. demonstraram o efeito inibitório do sobrenadante do *L. reuteri* sobre o desenvolvimento do biofilme de *C. glabrata*, tendo seu efeito atribuído aos produtos metabólicos bacterianos. (Chew et al., 2015b) Ainda, Kraft-Bodi e colaboradores testaram *in vivo*, a administração de comprimidos contendo *L. reuteri* em idosos (60-102 anos) e concluíram que o uso diário desses comprimidos por idosos pode reduzir a prevalência de candidíase oral e que a suplementação probiótica pode ser benéfico para pacientes com alto risco de contrair tal infecção. (Kraft-Bodi et al., 2015)

Essas evidências corroboram que a inibição fúngica causada pelo *L. reuteri* não é apenas um dado isolado e que seu sobrenadante filtrado possui substâncias promissoras para o uso terapêutico contra uma espécie de *Candida* intrinsecamente resistente a um dos tratamentos de primeira escolha disponíveis atualmente.

### **3.3 Avaliação do extrato filtrado do sobrenadante de *L. rhamnosus* no crescimento de *Candida* spp.**

Seguindo o racional proposto para análise do extrato filtrado de *L. reuteri*, prosseguiu-se com o experimento, de forma a avaliar se há inibição da *Candida* spp. a partir do extrato filtrado do *L. rhamnosus* e correlacionar os dados obtidos com os contidos na literatura. Dessa forma, objetivou-se avaliar os sobrenadantes filtrados do *L. rhamnosus* nas *C. albicans* e *C. glabrata*, separadamente, e os dados obtidos foram avaliados a seguir.

A figura 7 apresenta o controle de crescimento da *C. albicans* no meio MRS, onde há crescimento do fungo em todos os pontos do gráfico, visto que para o Caldo de MRS não foi realizada diluição seriada. O controle de inibição do crescimento foi realizado com o fluconazol a 4µg/mL, realizada a diluição seriada para este controle. A partir da terceira diluição do fluconazol, 1µg/mL foi observado início do crescimento fúngico.



Legenda Eixo X - Concentrações:	
%MRS controle +	- 1=[50%]; 2=[25%]; 3=[12.5%]; 4=[6.25%]; 5=[3.12%]; 6=[1.56%]; 7=[0.78%]; 8=[0.39%].
%LAC (v/v)	- 1=[50%]; 2=[25%]; 3=[12.5%]; 4=[6.25%]; 5=[3.12%]; 6=[1.56%]; 7=[0.78%]; 8=[0.39%].
NaBut	- 1=[75 mM]; 2=[37.5mM]; 3=[18.75mM]; 4=[9.37mM]; 5=[4.68mM]; 6=[2.34mM]; 7=[1.17mM]; 8=[0.58mM]
Fluconazol	- 1=[4µg/mL]; 2=[2µg/mL]; 3=[1µg/mL]; 4=[0.5µg/mL]; 5=[0.25µg/mL]; 6=[0.125µg/mL]; 7=[0.062µg/mL]; 8=[0.031µg/mL].

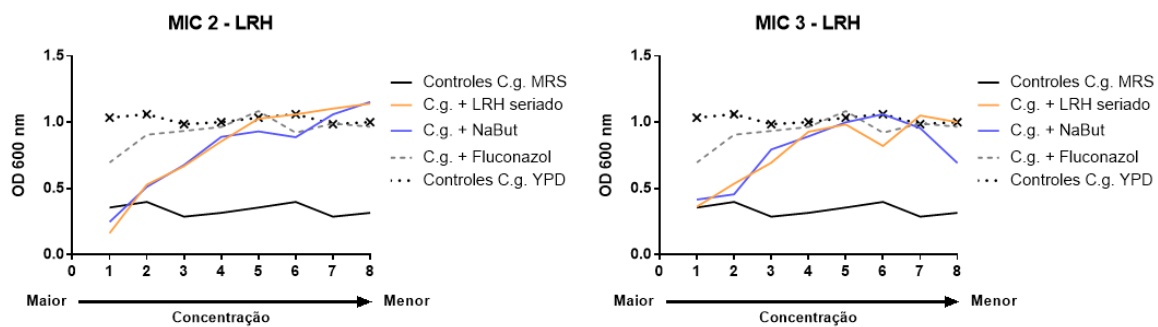
**Figura 7 - Efeito dose-dependente de sobrenadante de *L. rhamnosus* sobre o crescimento de leveduras de *C. albicans*.** A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O **eixo Y** indica a densidade óptica (600 nm), o **eixo X** indica a concentrações seriadas dos compostos analisados. Na linha **preta** há o controle positivo, em que há apenas a *C. albicans* no meio de YPD+MRS. Na linha de cor **verde** há a análise de *C. albicans* e concentrações seriadas de sobrenadante de *L. rhamnosus*. Na linha na cor **azul** há a análise de *C. albicans* e concentrações seriadas de NaBut. A linha tracejada em **cinza** representa concentrações seriadas de Fluconazol, na faixa de tratamento. A seta no eixo X indica o sentido de concentração dos compostos testados (da maior a menor concentração). Os valores de 1-8 representam diluição seriada dos compostos analisados. O gráfico é a representação de duplicata biológica com dados similares. **LRH:** *Lactobacillus rhamnosus*. **NaBut:** Butirato de sódio. **MIC 1 e MIC2** se refere, respectivamente, a réplica biológica dos testes.

A partir da observação da figura 7, podemos inferir que o crescimento da *C. albicans*, quando cultivada na presença do sobrenadante do *L. rhamnosus*, teve seu crescimento inibido até a concentração de 25% v/v, retornando ao crescimento exponencial após a terceira concentração do extrato bacteriano filtrado. Quando analisada a inibição promovida pelo NaBut, se estendeu até a terceira diluição, onde continha 18,75mM do prebiótico.

Na presença do *L. rhamnosus*, Köhler et al. comprovaram a inibição expressiva do crescimento de *C. albicans*. Sendo esta inibição, ainda maior do que a apresentada para o *L. reuteri*, espécie também pesquisada durante o estudo desses pesquisadores. Para corroborar a hipótese aqui relatada, o sobrenadante filtrado demonstrou que o *L. rhamnosus* utilizado em microambiente contendo *C. albicans*, o sobrenadante foi capaz de induzir a secreção de quimiocina sinalizadora para macrófagos, a IP-10, o que nos permite inferir que, casos *in vivo*, a bactéria consegue atrair células imunológicas para o sítio de infecção. Foi demonstrado

também que o *L. rhamnosus* é capaz de inibir a formação de biofilme, em provável *downregulation* de genes envolvidos no polimorfismo. (Köhler et al., 2012; Martinez et al., 2009).

A figura 8 representa graficamente a curva de crescimento da *C. glabrata* quando cultivada com o sobrenadante de *L. rhamnosus*. O controle de YPD foi adicionado para fins comparativos de crescimento fúngico no meio adequado para seu crescimento. O fluconazol, assim como quando realizado a *C. glabrata* com o *L. reuteri*, demonstrou baixa inibição de crescimento desde sua diluição mais concentrada, 16µg/mL no primeiro ponto do eixo x do gráfico e o controle de MRS demonstrou inibição substancial do crescimento fúngico. Tal inibição pode ter ocorrido devido a maior sensibilidade ao pH do Caldo YPD misturado com o MRS (50% v/v de cada meio).



Legenda Eixo X - Concentrações:	
%MRS controle +	1=[50%]; 2=[25%]; 3=[12.5%]; 4=[6.25%]; 5=[3.12%]; 6=[1.56%]; 7=[0.78%]; 8=[0.39%].
%LAC (v/v)	1=[50%]; 2=[25%]; 3=[12.5%]; 4=[6.25%]; 5=[3.12%]; 6=[1.56%]; 7=[0.78%]; 8=[0.39%].
NaBut	1= [75 mM]; 2=[37.5mM]; 3=[18.75mM]; 4=[9.37mM]; 5=[4.68mM]; 6=[2.34mM]; 7=[1.17mM]; 8=[0.58mM]
Fluconazol	1=[16µg/mL]; 2=[8µg/mL]; 3=[4µg/mL]; 4=[2µg/mL]; 5=[1µg/mL]; 6=[0.5µg/mL]; 7=[0.25µg/mL]; 8=[0.125µg/mL].
Cg YPD	- leveduras no meio YPD apenas

**Figura 8 - Efeito dose-dependente de sobrenadante de *L. rhamnosus* sobre o crescimento de leveduras de *C. glabrata*.** A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica a concentrações seriadas dos compostos analisados. Na linha **preta** há o controle positivo, em que há apenas a *C. albicans* no meio de YPD+MRS. Na linha de cor **laranja** há a análise de *C. glabrata* e concentrações seriadas de sobrenadante de *L. rhamnosus*. Na linha na cor **azul** há a análise de *C. glabrata* e concentrações seriadas de NaBut. A linha pontilhada em **preto** apresenta crescimento das leveduras somente em meio YPD. A linha tracejada em **cinza** representa concentrações seriadas de Fluconazol, na faixa de tratamento. A seta no eixo X indica o sentido de concentração dos compostos testados (da maior a menor concentração). Os valores de 1-8 representam diluição seriada dos compostos analisados. O gráfico é a representação de duplicata biológica com dados similares. **LRH:** *Lactobacillus rhamnosus*. **NaBut:** Butirato de sódio. **MIC 1 e MIC2** se refere, respectivamente, a réplica biológica dos testes.

Nas análises de crescimento dos poços seriados com NaBut e sobrenadante filtrado de *L. rhamnosus* foi observado menor taxa de crescimento nas duas primeiras concentrações, de cada composto, sendo referente às concentrações de 75mM e 37mM de NaBut e 50% e 25% de *L. rhamnosus*. Nos demais pontos de concentração do gráfico, o crescimento fúngico mostrou-se evidente, não sofrendo interferência dos compostos analisados. Outro ponto relevante para ser destacado são as curvas de crescimento relacionadas às substâncias testadas, em que as curvas de crescimento da *C. glabrata* manteve comportamento similar, tanto para a curva de NaBut, como para a do sobrenadante do *L. rhamnosus*.

Chew et al. conseguiram inibir *C. glabrata* com uso probiótico do *L. rhamnosus*, de forma que com o MRS tamponado, a pH neutro, teve menor inibição do que quando utilizado o MRS não-tamponado, pH levemente ácido. Além da inibição com o uso dos probióticos, que ocorreu em ambos os meios citados, os autores sugeriram uma maior inibição para o MRS não-tamponado à relação inversamente proporcional entre o crescimento da *C. glabrata* com o pH do meio, inclusive pela sabida produção de ácidos orgânicos que as espécies bacterianas secretam no meio. (Chew et al., 2015a) Dessa forma, a relação entre o NaBut com o sobrenadante filtrado proposto no presente artigo pode ter ação sinérgica, principalmente se utilizado na inibição da *C. glabrata*.

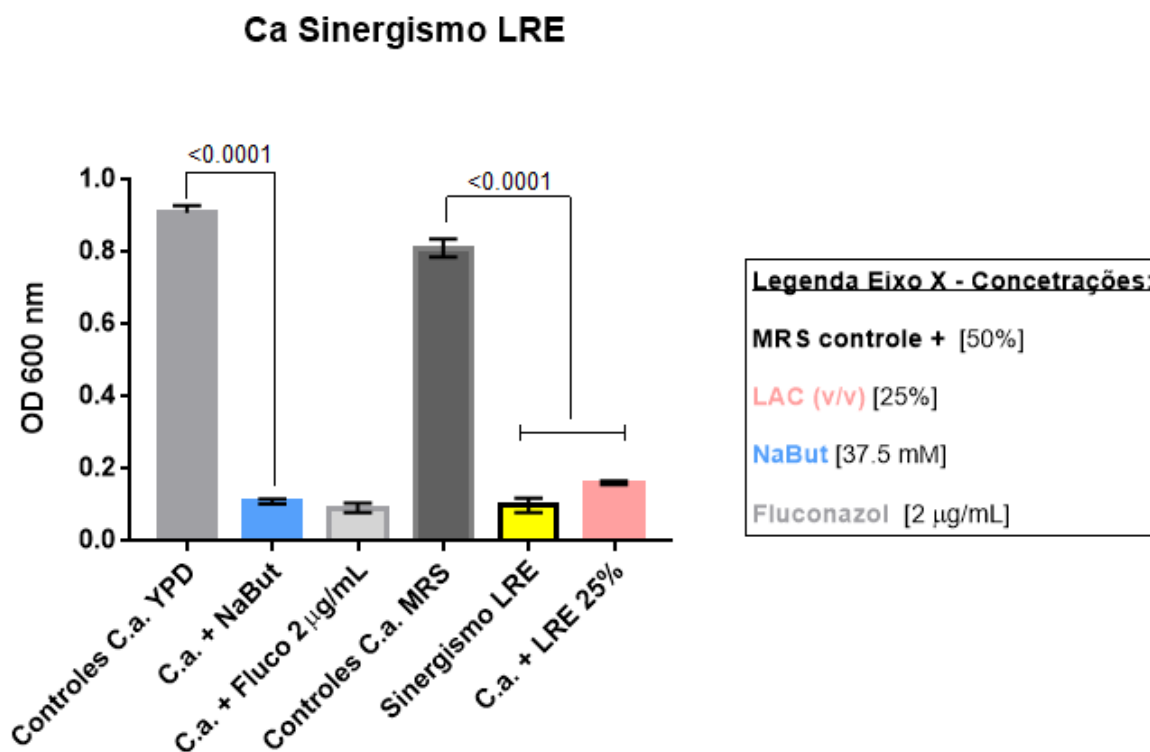
Chew et al. também conseguiram demonstrar o efeito dose-dependente do extrato filtrado da bactéria sobre a formação de biofilme da *C. glabrata*, sendo ele totalmente inibido em 100% do sobrenadante filtrado em questão. Sendo proposto que o sobrenadante filtrado poderia modificar epigeneticamente a expressão de genes relacionados à expressão do biofilme. (Chew et al., 2015b) O que pode corroborar com a hipótese do uso do NaBut associado ao sobrenadante filtrado de *L. rhamnosus* como novos agentes potenciais de tratamento ou como agentes adjuvantes ao tratamento padrão já estabelecido.

Dessa forma, visando avaliar o uso do NaBut com os sobrenadantes bacterianos filtrados, foram realizados os sinergismos entre NaBut + sobrenadante filtrado do *L. reuteri*, bem como entre o NaBut + sobrenadante filtrado do *L. rhamnosus*. Uma vez que possivelmente o uso de iHDAC + produtos fermentativos dos probióticos encontrados na própria microbiota dos indivíduos podem servir como tratamento frente à infecções resistentes a alguns antifúngicos atuais presentes no mercado ou, pelo menos, como adjuvantes a esses antifúngicos, tornando os fungos sensíveis ao tratamento padrão atual.

### 3.4 Avaliação do sinergismo entre NaBut + fluconazol + extrato filtrado do sobrenadante de *L. reuteri* no crescimento de *Candida* spp.

A figura 9 apresenta os controles positivos, de crescimento da *C. albicans* em meio de cultura nutritivo para leveduras (YPD) e do crescimento da *C. albicans* com 50% v/v no meio nutritivo para leveduras (YPD) acrescido de 50% v/v do meio nutritivo para crescimento de lactobacilos (MRS), de forma que foi demonstrado uma sutil diminuição do crescimento fúngico no meio YPD+MRS, mas ainda com expressivo crescimento.

Para o controle positivo de inibição do crescimento fúngico, foi testado o crescimento de *C. albicans* em YPD acrescido de 2 µg/mL de fluconazol, o equivalente à segunda diluição seriada (a partir da concentração inibitória mínima) do antifúngico, uma vez que na solução de sinergismo foi utilizada essa concentração do triazólico.



**Figura 9: Avaliação da interação sinérgica entre fluconazol, NaBut e sobrenadante de *L. reuteri* sobre crescimentos de leveduras de *C. albicans*.** A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica as concentrações do reagente analisado. Sendo analisadas *C. albicans* com o meio de cultivo padrão (controle positivo), *C. albicans* com NaBut 37,5mM, *C. albicans* com fluconazol 2 µg/mL, *C. albicans* com sobrenadante de *L. reuteri* 25% (v/v), *C. albicans* com 50% v/v do meio de cultura padrão (YPD) e 50% v/v do meio de cultivo de lactobacilos (MRS) (controle positivo para sobrenadante de *L. reuteri*), *C. albicans* com o sobrenadante de *L. reuteri* 25% v/v e fluconazol 2 µg/mL e NaBut 37,5mM (interação sinérgica). Análise estatística: *One-way* Anova e pós-teste de Tukeys múltiplas comparações.

Intervalo de confiança de 95%. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da amostra. **LRE:** *Lactobacillus reuteri*. **NaBut:** Butirato de sódio. **Ca:** *C. albicans*. **LAC:** sobrenadante do lactobacilos.

---

Tendo os controles positivos apresentados, com a análise das substâncias testadas, pode-se inferir que o NaBut 37,5mM teve inibição do crescimento de forma expressiva quando comparados ao crescimento da *C. albicans* em Caldo de YPD. Já o sobrenadante filtrado de *L. reuteri* 25% v/v quando crescimento da *C. albicans* em 50% v/v de Caldo YPD acrescido de 50% v/v de Caldo MRS, mostrou que o sobrenadante filtrado inibiu mais o crescimento da *C. albicans*, utilizando-se das análises estatísticas. Quando comparados o NaBut 37,5mM e o sobrenadante filtrado de *L. reuteri* 25% v/v com o fluconazol 2µg/mL, o NaBut 37,5% obteve melhores resultados, sendo os resultados extremamente semelhantes ao antifúngico disponível no mercado.

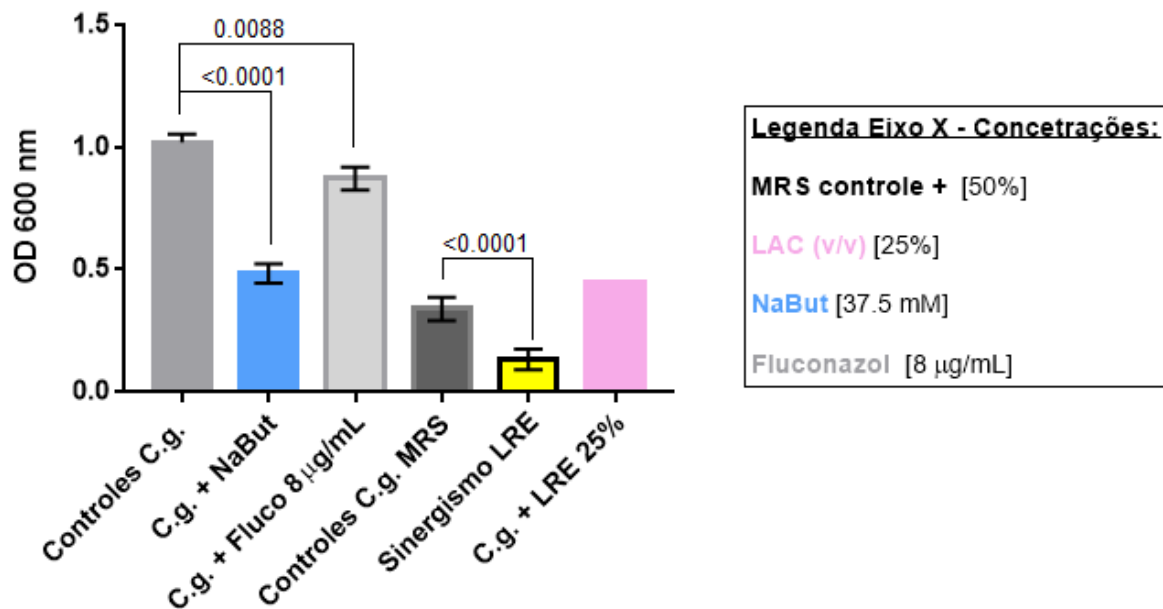
Da solução de sinergismo (50% do sobrenadante filtrado, 20% de solução salina 0,9%, 15% de NaBut e 15% de fluconazol 2µg/mL) foi adicionada 50% do volume final do poço (volume total do poço = 200µL) e o volume foi completado com Caldo YPD e adicionadas as leveduras. Após incubação de 24h, foi possível notar a diferença estatística entre o sobrenadante filtrado em questão e a solução de sinergismo, sendo o sinergismo mais inibitório do que o sobrenadante filtrado isoladamente. Já em relação ao NaBut e ao fluconazol 2µg/mL, a solução de sinergismo mostrou-se com capacidade inibitória similar.

A figura 10, por sua vez, apresenta os controles positivos, de crescimento da *C. glabrata* em meio de cultura nutritivo para leveduras (YPD) e do crescimento da *C. glabrata* com 50% v/v no meio nutritivo para leveduras (YPD) acrescido de 50% v/v do meio nutritivo para crescimento de lactobacilos (MRS), de forma que foi demonstrado uma diminuição do crescimento fúngico no meio YPD+MRS, inibindo mais de 50% o crescimento da *C. glabrata*, como discutido no item **3.3 Avaliação do extrato filtrado do sobrenadante de *L. rhamnosus* no crescimento de *Candida* spp.**, essa maior inibição pode estar relacionada pela *C. glabrata* ser mais sensível à variação de pH do Caldo MRS, uma vez que o crescimento dos lactobacilos necessita de um pH mais ácido.

Para o controle positivo de inibição do crescimento fúngico, foi testado o crescimento de *C. glabrata* em YPD acrescido de 8µg/mL de fluconazol, o equivalente à segunda diluição seriada (a partir da concentração inibitória mínima) do antifúngico, uma vez que na solução de sinergismo foi utilizada essa concentração do triazólico. A percepção em relação à inibição gerada pelo antifúngico é que ele inibe, com relevância estatística (p=0,0088), porém não

consegue inibir 50% do crescimento, em relação ao controle positivo (Caldo de YPD) e que o Caldo MRS é capaz de inibir mais o crescimento do que o tratamento disponível no mercado.

### Cg Sinergismo LRE



**Figura 10: Avaliação da interação sinérgica entre fluconazol, NaBut e sobrenadante de *L. reuteri* sobre crescimentos de leveduras de *C. glabrata*.** A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica a concentrações seriadas do reagente analisado. Sendo analisadas *C. glabrata* com o meio de cultivo padrão (controle positivo), *C. glabrata* com NaBut 37,5 mM, *C. glabrata* com Fluconazol 8 µg/mL, *C. glabrata* com sobrenadante de *L. reuteri* 25% (v/v), *C. glabrata* com 50% v/v do meio de cultura padrão (YPD) e 50% v/v do meio de cultivo de lactobacilos (MRS) (controle positivo para sobrenadante de *L. reuteri*), *C. glabrata* com o sobrenadante de *L. reuteri* 25% v/v e fluconazol 8 µg/mL e NaBut 37,5mM (interação sinérgica). Análise estatística: *One-way* Anova e pós-teste de Tukeys múltiplas comparações. Intervalo de confiança de 95%. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da amostra. **LRE:** *Lactobacillus reuteri*. **NaBut:** Butirato de sódio. **Cg:** *C. glabrata*. **LAC:** sobrenadante do lactobacilos.

Para as substâncias testadas, foram obtidos resultados melhores que o fluconazol na concentração 8µg/mL. De forma que o NaBut 37,5mM inibiu cerca de 50% o crescimento fúngico, quando comparado ao crescimento do Caldo de YPD ( $p < 0,0001$ ). Ainda, o NaBut 37,5mM inibiu mais o crescimento do que o fluconazol 8µg/mL. Já em relação ao crescimento da *C. glabrata* em 50% v/v de Caldo YPD acrescido de 50% v/v de Caldo MRS teve maior papel inibitório fúngico, quando comparado à inibição obtida com o NaBut 37,5mM.



Sobre a capacidade de inibição do sobrenadante filtrado de *L. reuteri* 25% v/v, não foi constatado resultados melhores do que o Controle da *C. glabrata* em 50% v/v de Caldo YPD acrescido de 50% v/v de Caldo MRS, porém se observado pelo ponto de vista da solução de sinergismo (50% do sobrenadante filtrado, 20% de solução salina 0,9%, 15% de NaBut e 15% de fluconazol 8µg/mL), em que foi adicionada 50% do volume final do poço (volume total do poço = 200µL) e o volume foi completado com Caldo YPD, foi constatado maior inibição do que qualquer controle ou teste utilizado no experimento envolvendo o *L. reuteri* e a *C. glabrata*, de forma que a inibição gerada pela solução de sinergismo teve efeitos melhores do que a inibição gerada pelo meio MRS (por meio do Controle da *C. glabrata* em 50% v/v de Caldo YPD acrescido de 50% v/v de Caldo MRS). Dessa forma, pode-se inferir que a solução de sinergismo envolvendo o *L. reuteri* teve maiores efeitos inibitórios para *C. glabrata*, um fungo sabidamente resistente ao tratamento usual (fluconazol).

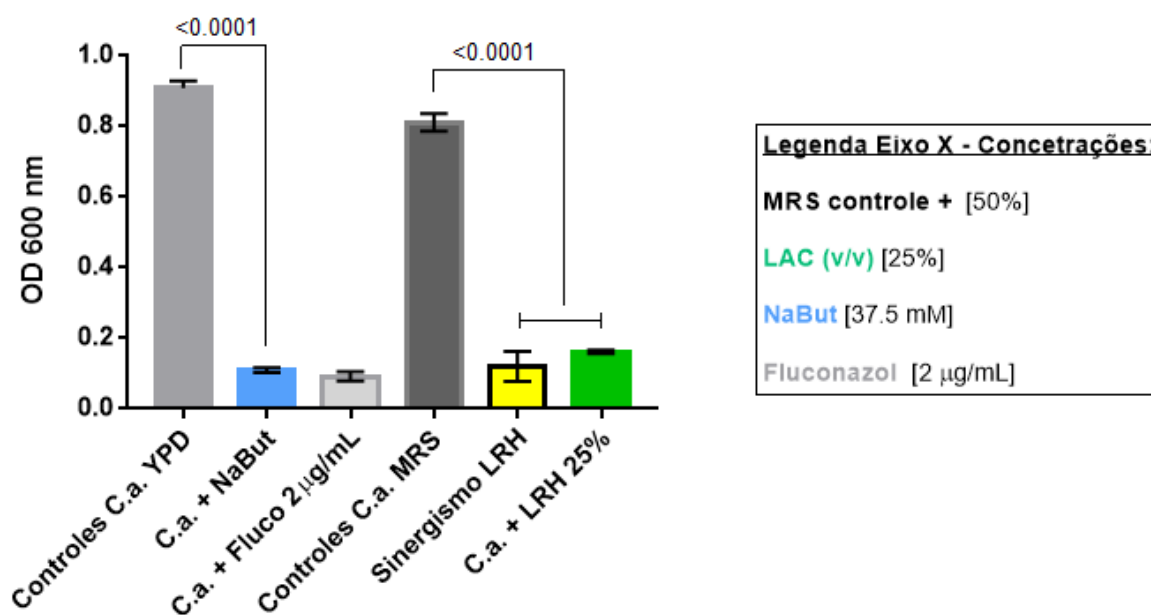
### **3.5 Avaliação do sinergismo entre NaBut + fluconazol + extrato filtrado do sobrenadante de *L. rhamnosus* no crescimento de *Candida* spp.**

Aproveitando a oportunidade, foi realizado o experimento do sinergismo utilizando o sobrenadante do *L. rhamnosus*, para avaliar a sua capacidade de inibição, assim como realizado com o sobrenadante do *L. reuteri*.

Dessa forma, a figura 11 apresenta os resultados obtidos no experimento de sinergismo do sobrenadante filtrado do *L. rhamnosus* almejando avaliar a inibição da *C. albicans*. O controle de crescimento da *C. glabrata* foi realizado semeando a levedura em Caldo de YPD e o controle de crescimento com MRS foi realizado para comprovar o crescimento da levedura no meio de cultura para lactobacilos, sendo o crescimento nesse último um pouco menor do que o crescimento de crescimento próprio para leveduras.

Para o controle de inibição, foi realizado o teste semeando a *C. albicans* no Caldo de YPD acrescido de fluconazol 2µg/mL, concentração utilizada na solução de sinergismo. Diminuindo o crescimento fúngico em mais de 50%.

## Ca Sinergismo LRH



**Figura 11: Avaliação da interação sinérgica entre NaBut e sobrenadante de *L. rhamnosus* sobre crescimentos de leveduras de *C. albicans*.** A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica a concentrações seriadas do reagente analisado. Sendo analisadas *C. albicans* com o meio de cultivo padrão (controle positivo), *C. albicans* com NaBut 37,5 mM, *C. albicans* com Fluconazol 2 µg/mL, *C. albicans* com sobrenadante de *L. rhamnosus* 25% (v/v), *C. albicans* com 50% v/v do meio de cultura padrão (YPD) e 50% v/v do meio de cultivo de lactobacilos (MRS) (controle positivo para sobrenadante de *L. rhamnosus*), *C. albicans* com o sobrenadante de *L. rhamnosus* 25% v/v e Fluconazol 2 µg/mL e NaBut 37,5mM (interação sinérgica). Análise estatística: *One-way* Anova e pós-teste de Tukeys múltiplas comparações. Intervalo de confiança de 95%. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da amostra. **LRH:** *Lactobacillus rhamnosus*. **NaBut:** Butirato de sódio. **Ca:** *C. albicans*. **LAC:** sobrenadante do lactobacilos.

Quando testado, o NaBut 37,5mM apresentou redução do crescimento em mais de 50%, quando comparado ao controle de crescimento em YPD ( $p < 0,0001$ ). A inibição de crescimento com o NaBut mostrou-se tão eficaz quanto o controle de inibição, com fluconazol 2µg/mL, tratamento de escolha para candidíase.

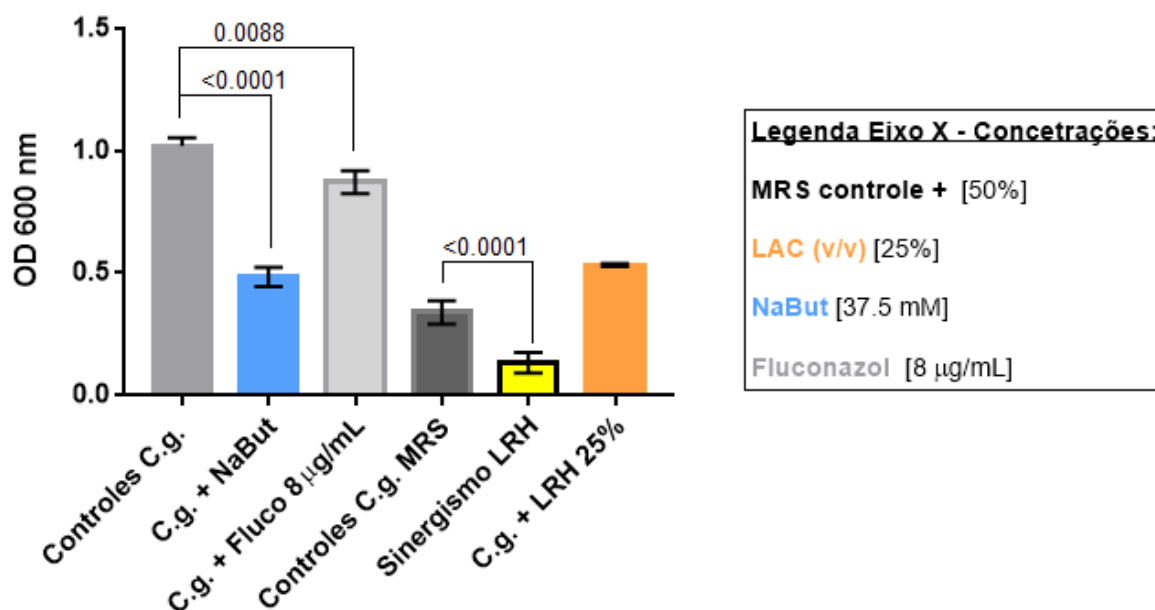
A inibição da *C. albicans* atrelada ao extrato filtrado de *L. rhamnosus* 25% foi comprovadamente eficaz, quando comparado ao Caldo MRS ( $p < 0,0001$ ), porém foi menos eficaz quando comparada às inibições produzidas pelo NaBut 37,5mM e ao fluconazol 2µg/mL. Ainda, seu poder inibitório pode ter sido gerado pela presença dos ácidos orgânicos fracos, como já discutido no item **1.4.1 Butirato de Sódio**, como acetatos, propionatos e butiratos. (Cottier et al., 2015; Gupta et al., 2021)

Em relação à solução de sinergismo (25% do sobrenadante filtrado, 37,5 mM de NaBut 37,5mM e fluconazol 2 µg/mL), teve bons efeitos inibitórios quando comparados ao controle de crescimento tanto em YPD, como em MRS. Os efeitos inibitórios do sinergismo foram tão eficazes quanto o controle de inibição (fluconazol 2 µg/mL), como o promovido pelo NaBut 37,5 mM. Já quando comparado ao sobrenadante filtrado 25% isoladamente, o sinergismo mostrou-se estatisticamente mais eficaz.

Para a figura 12, foi testado o sinergismo utilizando-se o sobrenadante filtrado de *L. rhamnosus* para avaliar sua capacidade inibitória da *C. glabrata*. De forma que o controle de crescimento da *C. glabrata* foi realizado semeando a levedura em Caldo de YPD e em 50% do Caldo de MRS adicionados a 50% do Caldo de YPD.

Já o controle para inibição de crescimento foi realizado com o fluconazol na dose submáxima da sua concentração inibitória mínima, 8µg/mL. Vale ressaltar que, assim como os demais resultados envolvendo a *C. glabrata* e o fluconazol nessa concentração, a *C. glabrata* mostra certa resistência ao tratamento de 24h, mas ainda tem inibição sutil do crescimento ( $p=0,0088$ ), porém não é menor do que a inibição gerada por 50% Caldo MRS + 50% Caldo YPD. Novamente a inibição gerada pelo YPD pode estar relacionado ao pH de crescimento dos lactobacilos.

## Cg Sinergismo LRH



**Figura 12: Avaliação da interação sinérgica entre NaBut e sobrenadante de *L. rhamnosus* sobre crescimentos de leveduras de *C. glabrata*.** A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica a concentrações seriadas do reagente analisado. Sendo analisadas *C. glabrata* com o meio de cultivo padrão (controle positivo), *C. glabrata* com NaBut 37,5mM, *C. glabrata* com Fluconazol 8 µg/mL, *C. glabrata* com sobrenadante de *L. rhamnosus* 25% (v/v), *C. glabrata* com 50% v/v do meio de cultura padrão (YPD) e 50% v/v do meio de cultivo de lactobacilos (MRS) (controle positivo para sobrenadante de *L. rhamnosus*), *C. glabrata* com o sobrenadante de *L. rhamnosus* 25% v/v e Fluconazol 8 µg/mL e NaBut 37,5mM (interação sinérgica). Análise estatística: *One-way* Anova e pós-teste de Tukeys múltiplas comparações. Intervalo de confiança de 95%. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da amostra. **LRH:** *Lactobacillus rhamnosus*. **NaBut:** Butirato de sódio. **Cg:** *C. glabrata*. **LAC:** sobrenadante de lactobacilos.

Para as substâncias testadas, iniciando pelo NaBut 37,5%, o qual teve inibição expressiva do crescimento fúngico, quando comparado ao controle de crescimento com YPD ( $p < 0,0001$ ). Para o butirato 37,5mM, quando comparado ao controle de crescimento com MRS, teve resultados inibitórios semelhantes, porém relacionando as inibições geradas pelo NaBut 37,5mM e o fluconazol 8µg/mL, o NaBut 37,5mM mostrou inibição de quase 50%, indicando que o NaBut 37,5mM pode ter maior capacidade inibitória que o fluconazol 8µg/mL.

Quando analisado o sobrenadante filtrado de *L. rhamnosus* 25%, pode-se inferir que tem papel inibitório, por comparação com o crescimento fúngico com YPD. Já quando comparado ao crescimento em MRS, o extrato filtrado 25% não mostrou resultados inibitórios quanto o MRS, sendo uma inibição próxima à gerada pelo NaBut 37,5mM. Seguindo a mesma

linha de comparações, agora com o tratamento usual, fluconazol 8µg/mL, o filtrado de sobrenadante 25% mostrou-se mais eficaz na inibição do crescimento fúngico.

Partindo para última inferência feita a partir dos resultados da figura 11, a solução de sinergismo (25% do sobrenadante filtrado, 37,5 mM de NaBut e fluconazol 4 µg/mL) na proposta de inibição do crescimento da *C. glabrata*, foi observado que a capacidade inibitória da solução de sinergismo demonstrou ótimas propriedades, de forma que quando comparada ao controle de crescimento em YPD e à incubação com fluconazol 8 µg/mL, o sinergismo conseguiu diminuir em mais de 50% do crescimento. Já para o NaBut 37,5mM e o sobrenadante filtrado de *L. rhamnosus* 25%, a solução de sinergismo também apresentou maior capacidade inibitória. De mesmo modo, a incubação com meio MRS teve maior crescimento fúngico do que a solução sinérgica proposta ( $p < 0,0001$ ).

Com base nas análises realizadas sobre o potencial inibitório do sinergismo, nos itens **3.4 Avaliação do sinergismo entre NaBut + fluconazol + extrato filtrado do sobrenadante de *L. reuteri* no crescimento de *Candida* spp.** e **3.5 Avaliação do sinergismo entre NaBut + fluconazol + extrato filtrado do sobrenadante de *L. rhamnosus* no crescimento de *Candida* spp.**, é possível observar que para a *C. albicans* a inclusão do sinergismo em protocolos clínicos seria estrategicamente viável quando a linhagem de *C. albicans* for resistente ao fluconazol, uma vez que a susceptibilidade da cepa ATCC 90028 a este fármaco é satisfatória à subdose da concentração inibitória mínima (2µg/mL). Apesar de não ocorrer antagonismo, a combinação aqui investigada apresenta eficácia similar ao tratamento padrão.

Porém, quando a cepa testada foi *C. glabrata* ATCC 90030, o sinergismo proposto mostrou-se de extremo interesse terapêutico, dado que na subdose da concentração inibitória mínima preconizada pelo BRCAS (8 µg/mL), as leveduras demonstraram certa resistência. Resistência esta não observada nos testes de sinergismo, visto que em combinação utilizou não apenas 8µg/mL, mas foi adicionado iHDAC e excretas metabólicas ou de *L. rhamnosus*, ou de *L. reuteri* (que mesmo isoladamente demonstraram resultados semelhantes), que possivelmente apresenta ácidos orgânicos fracos.

Importante ressaltar que o sinergismo proposto neste estudo não resulta em uma pressão seletiva como os antifúngicos tradicionais, deste modo, não ocasionariam seleção de linhagens resistentes ou, se causar, as vias de desenvolvimento de resistência pelo fungo sob este tratamento necessitariam de maior tempo para surgirem.

Apesar dos experimentos não terem seguido rigidamente o protocolo do BrCAST para microdiluição, que preconizava o crescimento fúngico na microdiluição em meio RPMI, os

dados aqui apresentados indubitavelmente relevantes no contexto de doenças infecciosas fúngicas e abordagens terapêuticas, ainda mais porque o meio YPD é um meio de cultivo rico em nutrientes e empregado quando se necessita de crescimento substancial dos fungos.

É necessário, ainda, mais estudos para elucidações pontuais acerca de quais componentes das excretas metabólicas dos lactobacilos apresentam efeito antifúngico (seja fungistático ou fungicida), para que futuramente um produto farmacêutico, com menores riscos de efeitos adversos e geração de resistência microbiana, possa ser disponibilizado no mercado.

#### 4. CONCLUSÃO

Faz-se mister que novas abordagens terapêuticas são necessárias, seja para auxiliar ou mesmo substituir protocolos em uso clínicos com taxa de sucesso insuficiente para tratamento. Neste sentido, estudos que visam ampliar conhecimento acerca de abordagens terapêuticas naturais, com menor chance de seleção de microrganismos resistentes, tornam-se uma promessa assertiva no combate às infecções fúngicas endêmicas e emergentes.

Os dados aqui apresentados corroboraram achados anteriores do grupo sobre o potencial inibitório de excretas metabólicas de *Lactobacillus* spp. sobre crescimento de leveduras patogênicas e resistentes a azóis de *Candida* sp. Embora haja informações crescentes sobre o potencial dos lactobacillus na proteção da microbiota intestinal e vaginal, poucos ou escassos são os dados sobre o uso terapêutico das excretas metabólicas dessas bactérias.

Outra vertente que torna os dados aqui inovadores é a combinação dessas excretas com ácidos graxos de cadeia curta, como o butirato de sódio. A combinação de doses submáximas de NaBut e Sobrenadante de espécies diferentes de lactobacilos se mostrou eficaz e sem efeito antagônico. Os dados do efeito do butirato de sódio sobre crescimento das leveduras de *C. albicans* e *C. glabrata* são particularmente promissores. Especialmente no tocante a *C. glabrata* que são intrinsecamente resistentes ao fluconazol, contudo, demonstraram significativa redução na presença de NaBut.

De forma inovadora, a pesquisa aqui realizada um novo “olhar” no tocante a abordagem terapêutica contra candidíase vaginal, empregando formulações a base de sal de butirato associados ao sobrenadante bacteriano liofilizado em formas farmacêuticas próprias para uso vaginal, como, por exemplo os óvulos vaginais.

Por fim, vale pontuar que este é mais um estudo do grupo de Microbiologia e Imunologia Clínica da Universidade de Brasília que elucida informações relevantes sobre o

uso de lactobacilos e pré-bióticos, descrevendo seus papéis isoladamente ou em conjunto, no combate a infecções fúngicas.

## 5. REFERÊNCIAS

- Alexander, B. D., Johnson, M. D., Pfeiffer, C. D., Jiménez-Ortigosa, C., Catania, J., Booker, R., Castanheira, M., Messer, S. A., Perlin, D. S., & Pfaller, M. A. (2013). Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *56*(12), 1724–1732.  
<https://doi.org/10.1093/cid/cit136>
- Al-Fattani, M. A., & Douglas, L. J. (2006). Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *Journal of Medical Microbiology*, *55*(Pt 8), 999–1008. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46569-0>
- Arpaia, N., Campbell, C., Fan, X., Dikiy, S., van der Veecken, J., deRoos, P., Liu, H., Cross, J. R., Pfeffer, K., Coffey, P. J., & Rudensky, A. Y. (2013). Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*, *504*(7480), 451–455.  
<https://doi.org/10.1038/nature12726>
- Atienza-Carrera, M. B., Cabezas-Mera, F. S., Tejera, E., & Machado, A. (2022). Prevalence of biofilms in *Candida* spp. bloodstream infections: A meta-analysis. *PloS One*, *17*(2), e0263522.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0263522>
- Bahn, Y.-S., Xue, C., Idnurm, A., Rutherford, J. C., Heitman, J., & Cardenas, M. E. (2007). Sensing the environment: lessons from fungi. *Nature Reviews. Microbiology*, *5*(1), 57–69.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1578>
- Barns, S. M., Lane, D. J., Sogin, M. L., Bibeau, C., & Weisburg, W. G. (1991). Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. *Journal of Bacteriology*, *173*(7), 2250–2255. <https://doi.org/10.1128/jb.173.7.2250-2255.1991>

- Bialková, A., & Subík, J. (2006). Biology of the pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Folia Microbiologica*, 51(1), 3–20. <https://doi.org/10.1007/BF02931443>
- Bisanz, J. E., Seney, S., McMillan, A., Vongsa, R., Koenig, D., Wong, L., Dvoracek, B., Gloor, G. B., Sumarah, M., Ford, B., Herman, D., Burton, J. P., & Reid, G. (2014). A systems biology approach investigating the effect of probiotics on the vaginal microbiome and host responses in a double blind, placebo-controlled clinical trial of post-menopausal women. *PloS One*, 9(8), e104511. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104511>
- Brandão, F. A., Derengowski, L. S., Albuquerque, P., Nicola, A. M., Silva-Pereira, I., & Poças-Fonseca, M. J. (2015). Histone deacetylases inhibitors effects on *Cryptococcus neoformans* major virulence phenotypes. *Virulence*, 6(6), 618–630. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1038014>
- Brandão, F., Esher, S. K., Ost, K. S., Pianalto, K., Nichols, C. B., Fernandes, L., Bocca, A. L., Poças-Fonseca, M. J., & Alspaugh, J. A. (2018). HDAC genes play distinct and redundant roles in *Cryptococcus neoformans* virulence. *Scientific Reports*, 8(1), 5209. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21965-y>
- Chew, S. Y., Cheah, Y. K., Seow, H. F., Sandai, D., & Than, L. T. L. (2015a). Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 exhibit strong antifungal effects against vulvovaginal candidiasis-causing *Candida glabrata* isolates. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 118, Issue 5, pp. 1180–1190). <https://doi.org/10.1111/jam.12772>
- Chew, S. Y., Cheah, Y. K., Seow, H. F., Sandai, D., & Than, L. T. L. (2015b). In vitro modulation of probiotic bacteria on the biofilm of *Candida glabrata*. *Anaerobe*, 34, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.05.009>
- Cottier, F., Tan, A. S. M., Xu, X., Wang, Y., & Pavelka, N. (2015). MIG1 Regulates Resistance of *Candida albicans* against the Fungistatic Effect of Weak Organic Acids. *Eukaryotic Cell*, 14(10), 1054–1061. <https://doi.org/10.1128/EC.00129-15>
- Dalle, F., Wächtler, B., L'Ollivier, C., Holland, G., Bannert, N., Wilson, D., Labruère, C., Bonnin, A., & Hube, B. (2010). Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cellular Microbiology*, 12(2), 248–271. <https://doi.org/10.1111/j.1462->



5822.2009.01394.x

- Dani, C., Biadaioli, R., Bertini, G., Martelli, E., & Rubaltelli, F. F. (2002). Probiotics feeding in prevention of urinary tract infection, bacterial sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants. A prospective double-blind study. *Biology of the Neonate*, *82*(2), 103–108.  
<https://doi.org/10.1159/000063096>
- d'Enfert, C., & Janbon, G. (2016). Biofilm formation in *Candida glabrata*: What have we learnt from functional genomics approaches? *FEMS Yeast Research*, *16*(1), fov111.  
<https://doi.org/10.1093/femsyr/fov111>
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., De Montigny, J., Marck, C., Neuvéglise, C., Talla, E., Goffard, N., Frangeul, L., Aigle, M., Anthouard, V., Babour, A., Barbe, V., Barnay, S., Blanchin, S., Beckerich, J.-M., ... Souciet, J.-L. (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature*, *430*(6995), 35–44. <https://doi.org/10.1038/nature02579>
- Fisher, J. F., Kavanagh, K., Sobel, J. D., Kauffman, C. A., & Newman, C. A. (2011). *Candida* urinary tract infection: pathogenesis. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *52* Suppl 6, S437–S451.  
<https://doi.org/10.1093/cid/cir110>
- Flint, H. J., Bayer, E. A., Rincon, M. T., Lamed, R., & White, B. A. (2008). Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nature Reviews. Microbiology*, *6*(2), 121–131. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1817>
- Fogliano, V., Corollaro, M. L., Vitaglione, P., Napolitano, A., Ferracane, R., Travaglia, F., Arlorio, M., Costabile, A., Klinder, A., & Gibson, G. (2011). In vitro bioaccessibility and gut biotransformation of polyphenols present in the water-insoluble cocoa fraction. *Molecular Nutrition & Food Research*, *55* Suppl 1, S44–S55. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000360>
- Fuochi, V., Cardile, V., Petronio Petronio, G., & Furneri, P. M. (2019). Biological properties and production of bacteriocins-like-inhibitory substances by *Lactobacillus* sp. strains from human vagina. *Journal of Applied Microbiology*, *126*(5), 1541–1550. <https://doi.org/10.1111/jam.14164>
- Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, T. A., Nakato, G., Takahashi, D., Nakanishi, Y., Uetake, C., Kato, K., Kato, T., Takahashi, M., Fukuda, N. N., Murakami, S., Miyauchi, E., Hino, S.,

- Atarashi, K., Onawa, S., Fujimura, Y., Lockett, T., ... Ohno, H. (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, *504*(7480), 446–450. <https://doi.org/10.1038/nature12721>
- Gao, C., Major, A., Rendon, D., Lugo, M., Jackson, V., Shi, Z., Mori-Akiyama, Y., & Versalovic, J. (2015). Histamine H2 Receptor-Mediated Suppression of Intestinal Inflammation by Probiotic *Lactobacillus reuteri*. *mBio*, *6*(6), e01358–15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01358-15>
- Ghannoum, M., Roilides, E., Katragkou, A., Petraitis, V., & Walsh, T. J. (2015). The Role of Echinocandins in Candida Biofilm-Related Vascular Catheter Infections: In Vitro and In Vivo Model Systems. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *61 Suppl 6*, S618–S621. <https://doi.org/10.1093/cid/civ815>
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, *14*(8), 491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Gille, C., Böer, B., Marschal, M., Urschitz, M. S., Heinecke, V., Hund, V., Speidel, S., Tarnow, I., Mylonas, I., Franz, A., Engel, C., & Poets, C. F. (2016). Effect of probiotics on vaginal health in pregnancy. EFFPRO, a randomized controlled trial. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *215*(5), 608.e1–e608.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.06.021>
- Gow, N. A. R., Brown, A. J. P., & Odds, F. C. (2002). Fungal morphogenesis and host invasion. *Current Opinion in Microbiology*, *5*(4), 366–371. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(02\)00338-7](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(02)00338-7)
- Gow, N. A. R., van de Veerdonk, F. L., Brown, A. J. P., & Netea, M. G. (2011). *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature Reviews. Microbiology*, *10*(2), 112–122. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2711>
- Guo, F., Yang, Y., Kang, Y., Zang, B., Cui, W., Qin, B., Qin, Y., Fang, Q., Qin, T., Jiang, D., Li, W., Gu, Q., Zhao, H., Liu, D., Guan, X., Li, J., Ma, X., Yu, K., Chan, D., ... China-SCAN Team. (2013). Invasive candidiasis in intensive care units in China: a multicentre prospective

- observational study. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(7), 1660–1668.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkt083>
- Gupta, A., Bansal, M., Liyanage, R., Upadhyay, A., Rath, N., Donoghue, A., & Sun, X. (2021). Sodium butyrate modulates chicken macrophage proteins essential for Salmonella Enteritidis invasion. *PloS One*, 16(4), e0250296. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250296>
- Harriott, M. M., Lilly, E. A., Rodriguez, T. E., Fidel, P. L., & Noverr, M. C. (2010). Candida albicans forms biofilms on the vaginal mucosa. *Microbiology*, 156(Pt 12), 3635–3644.  
<https://doi.org/10.1099/mic.0.039354-0>
- Hazen, K. C. (1995). New and emerging yeast pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(4), 462–478. <https://doi.org/10.1128/CMR.8.4.462>
- Hitchcock, C. A., Pye, G. W., Troke, P. F., Johnson, E. M., & Warnock, D. W. (1993). Fluconazole resistance in Candida glabrata. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(9), 1962–1965.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.37.9.1962>
- Jain, M., Dogra, V., Mishra, B., Thakur, A., Loomba, P. S., & Bhargava, A. (2011). Candiduria in catheterized intensive care unit patients: emerging microbiological trends. *Indian Journal of Pathology & Microbiology*, 54(3), 552–555. <https://doi.org/10.4103/0377-4929.85091>
- Kandler, O., Stetter, K.-O., & Köhl, R. (1980). Lactobacillus reuteri sp. nov., a New Species of Heterofermentative Lactobacilli. *Zentralblatt Für Bakteriologie: I. Abt. Originale C: Allgemeine, Angewandte Und ökologische Mikrobiologie*, 1(3), 264–269. [https://doi.org/10.1016/S0172-5564\(80\)80007-8](https://doi.org/10.1016/S0172-5564(80)80007-8)
- Kasubuchi, M., Hasegawa, S., Hiramatsu, T., Ichimura, A., & Kimura, I. (2015). Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation. *Nutrients*, 7(4), 2839–2849. <https://doi.org/10.3390/nu7042839>
- Kernel Networks Inc. (2019). Effect of butyrate on inflammation and albuminuria in patients with albuminuria, type 1 diabetes and intestinal inflammation. *Case Medical Research*.  
<https://doi.org/10.31525/ct1-nct04073927>
- Kim, J.-M., & Park, Y. J. (2017). Probiotics in the Prevention and Treatment of Postmenopausal Vaginal Infections: Review Article. *Journal of Menopausal Medicine*, 23(3), 139–145.

<https://doi.org/10.6118/jmm.2017.23.3.139>

- Kirkpatrick, C. H. (1994). Chronic mucocutaneous candidiasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 31(3 Pt 2), S14–S17. [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(08\)81260-1](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(08)81260-1)
- Klein, B. S., & Tebbets, B. (2007). Dimorphism and virulence in fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 10(4), 314–319. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.04.002>
- Köhler, G. A., Assefa, S., & Reid, G. (2012). Probiotic interference of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 with the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 2012, 636474. <https://doi.org/10.1155/2012/636474>
- Kraft-Bodi, E., Jørgensen, M. R., Keller, M. K., Kragelund, C., & Twetman, S. (2015). Effect of Probiotic Bacteria on Oral *Candida* in Frail Elderly. *Journal of Dental Research*, 94(9 Suppl), 181S – 6S. <https://doi.org/10.1177/0022034515595950>
- Kuebrich, C. T. (2004). Chronic vulvovaginal candidiasis [Review of *Chronic vulvovaginal candidiasis*]. *The New England Journal of Medicine*, 351(24), 2554–2556; author reply 2554–2556. <https://doi.org/10.1056/NEJM200412093512419>
- Lal, P., Sharma, D., Pruthi, P., & Pruthi, V. (2010). Exopolysaccharide analysis of biofilm-forming *Candida albicans*. *Journal of Applied Microbiology*, 109(1), 128–136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04634.x>
- Liu, W.-L., Lai, C.-C., Li, M.-C., Wu, C.-J., Ko, W.-C., Hung, Y.-L., Tang, H.-J., & Hsueh, P.-R. (2019). Clinical manifestations of candidemia caused by uncommon *Candida* species and antifungal susceptibility of the isolates in a regional hospital in Taiwan, 2007-2014. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*, 52(4), 612–619. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2017.08.007>
- Liu, Y., & Filler, S. G. (2011). *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. *Eukaryotic Cell*, 10(2), 168–173. <https://doi.org/10.1128/EC.00279-10>
- Manzoni, P., Mostert, M., Leonessa, M. L., Priolo, C., Farina, D., Monetti, C., Latino, M. A., & Gomirato, G. (2006). Oral supplementation with *Lactobacillus casei* subspecies *rhamnosus* prevents enteric colonization by *Candida* species in preterm neonates: a randomized study.

- Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 42(12), 1735–1742. <https://doi.org/10.1086/504324>
- Martinez, R. C. R., Seney, S. L., Summers, K. L., Nomizo, A., De Martinis, E. C. P., & Reid, G. (2009). Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 on the ability of *Candida albicans* to infect cells and induce inflammation. *Microbiology and Immunology*, 53(9), 487–495. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2009.00154.x>
- Mashburn, J. (2006). Etiology, diagnosis, and management of vaginitis. *Journal of Midwifery & Women's Health*, 51(6), 423–430. <https://doi.org/10.1016/j.jmwh.2006.07.005>
- Mathé, L., & Van Dijck, P. (2013). Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Current Genetics*, 59(4), 251–264. <https://doi.org/10.1007/s00294-013-0400-3>
- McIntyre, A., Gibson, P. R., & Young, G. P. (1993). Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model. *Gut*, 34(3), 386–391. <https://doi.org/10.1136/gut.34.3.386>
- Mitchell, K. F., Zarnowski, R., & Andes, D. R. (2016). Fungal Super Glue: The Biofilm Matrix and Its Composition, Assembly, and Functions. *PLoS Pathogens*, 12(9), e1005828. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005828>
- Mizgier, M., Jarzabek-Bielecka, G., Mruczyk, K., & Kedzia, W. (2020). The role of diet and probiotics in prevention and treatment of bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis in adolescent girls and non-pregnant women. *Ginekologia Polska*, 91(7), 412–416. <https://doi.org/10.5603/GP.2020.0070>
- Monfredini, P. M., Souza, A. C. R., Cavalheiro, R. P., Siqueira, R. A., & Colombo, A. L. (2018). Clinical impact of *Candida* spp. biofilm production in a cohort of patients with candidemia. *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, 56(7), 803–808. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx133>
- Moudgal, V. V., & Sobel, J. D. (2003). Antifungal drugs in pregnancy: a review. *Expert Opinion on Drug Safety*, 2(5), 475–483. <https://doi.org/10.1517/14740338.2.5.475>
- Mu, Q., Tavella, V. J., & Luo, X. M. (2018). Role of *Lactobacillus reuteri* in Human Health and Diseases. *Frontiers in Microbiology*, 9, 757. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00757>

- Nakayama, H., Izuta, M., Nakayama, N., Arisawa, M., & Aoki, Y. (2000). Depletion of the squalene synthase (ERG9) gene does not impair growth of *Candida glabrata* in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *44*(9), 2411–2418. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.9.2411-2418.2000>
- Nishimoto, A. T., Whaley, S. G., Wiederhold, N. P., Zhang, Q., Yates, C. M., Hoekstra, W. J., Schotzinger, R. J., Garvey, E. P., & Rogers, P. D. (2019). Impact of the Major *Candida glabrata* Triazole Resistance Determinants on the Activity of the Novel Investigational Tetrazoles VT-1598 and VT-1161. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *63*(10). <https://doi.org/10.1128/AAC.01304-19>
- Nițescu, D. A.-M., Mușetescu, A., Nițescu, M., Costescu, M., & Coman, O.-A. (2021). Experimental research in topical psoriasis therapy (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, *22*(3), 971. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10403>
- Nobile, C. J., & Johnson, A. D. (2015). *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annual Review of Microbiology*, *69*, 71–92. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104330>
- Odds, E. C. (1997). Switch of phenotype as an escape mechanism of the intruder. *Mycoses*, *40 Suppl* 2, 9–12. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1997.tb00556.x>
- Osmaniye, D., Kaya Çavuşoğlu, B., Sağlık, B. N., Levent, S., Acar Çevik, U., Atlı, Ö., Özkay, Y., & Kaplancıklı, Z. A. (2018). Synthesis and Anticandidal Activity of New Imidazole-Chalcones. *Molecules*, *23*(4). <https://doi.org/10.3390/molecules23040831>
- Paniágua, A. L., Correia, A. F., Pereira, L. C., de Alencar, B. M., Silva, F. B. A., Almeida, R. M., & de Medeiros Nóbrega, Y. K. (2021). Inhibitory effects of *Lactobacillus casei* Shirota against both *Candida auris* and *Candida* spp. isolates that cause vulvovaginal candidiasis and are resistant to antifungals. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, *21*(1), 237. <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03405-z>
- Panigrahi, P., Parida, S., Nanda, N. C., Satpathy, R., Pradhan, L., Chandel, D. S., Baccaglini, L., Mohapatra, A., Mohapatra, S. S., Misra, P. R., Chaudhry, R., Chen, H. H., Johnson, J. A., Morris, J. G., Paneth, N., & Gewolb, I. H. (2017). A randomized synbiotic trial to prevent sepsis among infants in rural India. *Nature*, *548*(7668), 407–412. <https://doi.org/10.1038/nature23480>
- Perlroth, J., Choi, B., & Spellberg, B. (2007). Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis,

- and treatment. *Medical Mycology: Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, 45(4), 321–346. <https://doi.org/10.1080/13693780701218689>
- Persyn, A., Rogiers, O., Brock, M., Vande Velde, G., Lamkanfi, M., Jacobsen, I. D., Himmelreich, U., Lagrou, K., Van Dijck, P., & Kucharíková, S. (2019). Monitoring of Fluconazole and Caspofungin Activity against In Vivo *Candida glabrata* Biofilms by Bioluminescence Imaging. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(2). <https://doi.org/10.1128/AAC.01555-18>
- Petricevic, L., Unger, F. M., Viernstein, H., & Kiss, H. (2008). Randomized, double-blind, placebo-controlled study of oral lactobacilli to improve the vaginal flora of postmenopausal women. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 141(1), 54–57. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2008.06.003>
- Polke, M., Leonhardt, I., Kurzai, O., & Jacobsen, I. D. (2018). Farnesol signalling in *Candida albicans* - more than just communication. *Critical Reviews in Microbiology*, 44(2), 230–243. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1337711>
- Pristov, K. E., & Ghannoum, M. A. (2019). Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 25(7), 792–798. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.028>
- Rajendran, R., Sherry, L., Nile, C. J., Sherriff, A., Johnson, E. M., Hanson, M. F., Williams, C., Munro, C. A., Jones, B. J., & Ramage, G. (2016). Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* bloodstream infection-Scotland, 2012-2013. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 22(1), 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.09.018>
- Ranjan, K., Brandão, F., Morais, J. A. V., Muehlmann, L. A., Silva-Pereira, I., Bocca, A. L., Matos, L. F., & Poças-Fonseca, M. J. (2021). The role of *Cryptococcus neoformans* histone deacetylase genes in the response to antifungal drugs, epigenetic modulators and to photodynamic therapy mediated by an aluminium phthalocyanine chloride nanoemulsion in vitro. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 216, 112131. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112131>

- Reid, G., Charbonneau, D., Erb, J., Kochanowski, B., Beuerman, D., Poehner, R., & Bruce, A. W. (2003). Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, *35*(2), 131–134. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(02\)00465-0](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(02)00465-0)
- Reid, G., Charbonneau, D., Gonzalez, S., Gardiner, G., Erb, J., Poehner, R., & Bruce, A. W. (2002). Ability of *Lactobacillus* GR - 1 and RC - 14 to Stimulate Host Defences and Reduce Gut Translocation and Infectivity of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Food Science and Nutrition*, *7*(2), 168–173. <https://doi.org/10.3746/jfn.2002.7.2.168>
- Rodrigues, C. F., Rodrigues, M. E., Silva, S., & Henriques, M. (2017). *Candida glabrata* Biofilms: How Far Have We Come? *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, *3*(1). <https://doi.org/10.3390/jof3010011>
- Romani, L., Bistoni, F., & Puccetti, P. (2003). Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. *Current Opinion in Microbiology*, *6*(4), 338–343. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(03\)00081-x](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(03)00081-x)
- Roy, A., Chaudhuri, J., Sarkar, D., Ghosh, P., & Chakraborty, S. (2014). Role of Enteric Supplementation of Probiotics on Late-onset Sepsis by *Candida* species in Preterm Low Birth Weight Neonates: A Randomized, Double Blind, Placebo-controlled Trial. *North American Journal of Medical Sciences*, *6*(1), 50–57. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.125870>
- San-Blas, G., & San-Blas, F. (1984). Molecular aspects of fungal dimorphism. *Critical Reviews in Microbiology*, *11*(2), 101–127. <https://doi.org/10.3109/10408418409105474>
- Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, *16*(10), 605–616. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3>
- Sanguinetti, M., Posteraro, B., & Lass-Flörl, C. (2015). Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses*, *58 Suppl 2*, 2–13. <https://doi.org/10.1111/myc.12330>
- Santos, F., Wegkamp, A., de Vos, W. M., Smid, E. J., & Hugenholtz, J. (2008). High-Level folate production in fermented foods by the B12 producer *Lactobacillus reuteri* JCM1112. *Applied and*



- Environmental Microbiology*, 74(10), 3291–3294. <https://doi.org/10.1128/AEM.02719-07>
- Sherry, L., Rajendran, R., Lappin, D. F., Borghi, E., Perdoni, F., Falleni, M., Tosi, D., Smith, K., Williams, C., Jones, B., Nile, C. J., & Ramage, G. (2014). Biofilms formed by *Candida albicans* bloodstream isolates display phenotypic and transcriptional heterogeneity that are associated with resistance and pathogenicity. *BMC Microbiology*, 14, 182. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-182>
- Shields, R. K., Nguyen, M. H., & Clancy, C. J. (2015). Clinical perspectives on echinocandin resistance among *Candida* species. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 28(6), 514–522. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000215>
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), 288–305. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x>
- Sodium Butyrate For Improving Cognitive Function In Schizophrenia*. (n.d.). Retrieved May 7, 2022, from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02654405>
- Soll, D. R. (2002). *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Tropica*, 81(2), 101–110. [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(01\)00200-5](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(01)00200-5)
- Spampinato, C., & Leonardi, D. (2013). *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *BioMed Research International*, 2013, 204237. <https://doi.org/10.1155/2013/204237>
- Stachowska, E., Wiśniewska, M., Dzieżyc, A., & Bohatyrewicz, A. (2021). Could the use of butyric acid have a positive effect on microbiota and treatment of type 2 diabetes? *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 25(13), 4570–4578. [https://doi.org/10.26355/eurrev\\_202107\\_26250](https://doi.org/10.26355/eurrev_202107_26250)
- Taff, H. T., Mitchell, K. F., Edward, J. A., & Andes, D. R. (2013). Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiology*, 8(10), 1325–1337. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.101>
- Taranto, M. P., Vera, J. L., Hugenholtz, J., De Valdez, G. F., & Sesma, F. (2003). *Lactobacillus reuteri* CRL1098 produces cobalamin. *Journal of Bacteriology*, 185(18), 5643–5647.

<https://doi.org/10.1128/JB.185.18.5643-5647.2003>

- Thein, Z. M., Samaranyake, Y. H., & Samaranyake, L. P. (2007). In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Archives of Oral Biology*, 52(8), 761–767. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.01.009>
- Tomczak, H., Szalek, E., & Grześkowiak, E. (2014). The problems of urinary tract infections with *Candida* spp. aetiology in women. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej*, 68, 1036–1039. <https://doi.org/10.5604/17322693.1118989>
- Tournu, H., & Van Dijck, P. (2012). *Candida* biofilms and the host: models and new concepts for eradication. *International Journal of Microbiology*, 2012, 845352. <https://doi.org/10.1155/2012/845352>
- Tsui, C., Kong, E. F., & Jabra-Rizk, M. A. (2016). Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathogens and Disease*, 74(4), ftw018. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw018>
- Tumbarello, M., Fiori, B., Trecarichi, E. M., Posteraro, P., Losito, A. R., De Luca, A., Sanguinetti, M., Fadda, G., Cauda, R., & Posteraro, B. (2012). Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. *PloS One*, 7(3), e33705. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033705>
- Tumbarello, M., Posteraro, B., Trecarichi, E. M., Fiori, B., Rossi, M., Porta, R., de Gaetano Donati, K., La Sorda, M., Spanu, T., Fadda, G., Cauda, R., & Sanguinetti, M. (2007). Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(6), 1843–1850. <https://doi.org/10.1128/JCM.00131-07>
- Vitális, E., Nagy, F., Tóth, Z., Forgács, L., Bozó, A., Kardos, G., Majoros, L., & Kovács, R. (2020). *Candida* biofilm production is associated with higher mortality in patients with candidaemia. *Mycoses*, 63(4), 352–360. <https://doi.org/10.1111/myc.13049>
- Wächtler, B., Wilson, D., Haedicke, K., Dalle, F., & Hube, B. (2011). From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. *PloS One*, 6(2), e17046. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017046>
- Walker, L. A., Gow, N. A. R., & Munro, C. A. (2010). Fungal echinocandin resistance. *Fungal*

*Genetics and Biology: FG & B*, 47(2), 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2009.09.003>

Yamada-Okabe, T., Mio, T., Ono, N., Kashima, Y., Matsui, M., Arisawa, M., & Yamada-Okabe, H.

(1999). Roles of three histidine kinase genes in hyphal development and virulence of the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*, 181(23), 7243–7247.

<https://doi.org/10.1128/JB.181.23.7243-7247.1999>

Zordan, R., & Cormack, B. (2014). Adhesins in opportunistic fungal pathogens. In *Candida and*

*Candidiasis* (pp. 243–P2). ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555817176.ch16>