

MARIELLA VIEIRA PEREIRA LEÃO¹
CÉLIA REGINA GONÇALVES E SILVA¹
SILVANA SOLÉO FERREIRA DOS SANTOS¹
POLIANA GASPARIN CORREA LEITE²

Lactobacillus rhamnosus pode alterar a virulência de *Candida albicans*

Lactobacillus rhamnosus may change the virulence of *Candida albicans*

Artigo Original

Palavras-chave

Lactobacillus
Candida
Técnicas *in vitro*
Candidíase

Keywords

Lactobacillus
Candida
Probiotic
In vitro techniques
Candidiasis

Resumo

OBJETIVO: Avaliar a influência de *Lactobacillus rhamnosus* na expressão dos fatores de virulência de *Candida albicans in vitro*. **MÉTODOS:** Uma suspensão de *L. rhamnosus* foi inicialmente cultivada em ágar MRS. No dia seguinte, foi adicionado ágar Sabouraud dextrose sobre o crescimento dos lactobacilos e *C. albicans* foi cultivada, por 24, 48 e 72 horas. As cepas de *Candida* foram então isoladas para investigação da capacidade de formação de biofilme, por meio do cultivo em placas de 96 poços e leitura das densidades ópticas e contagem de unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL). Também se investigou a capacidade de formação de tubo germinativo, após incubação em soro de cavalo e contagem em 200 células. Os resultados foram comparados aos observados nas cepas de *Candida* cultivadas na ausência de *L. rhamnosus*, utilizando o teste *t* de Student para análise estatística. **RESULTADOS:** Observou-se uma redução significativa no crescimento de *C. albicans* na presença de lactobacilos após 24, 48 ou 72 horas. Também foi observada redução significativa na formação de tubo germinativo após a interação por 48 ou 72 horas. Quanto à formação de biofilme, não foi observada diferença significativa entre as cepas de *Candida* cultivadas na presença ou na ausência de lactobacilos. **CONCLUSÃO:** Os resultados sugerem que *L. rhamnosus* é capaz de influenciar significativamente o crescimento e a expressão de fatores de virulência de *C. albicans in vitro*, podendo interferir na patogenicidade desses micro-organismos.

Abstract

PURPOSE: To investigate the influence of *Lactobacillus rhamnosus* in the expression of virulence factors of *Candida albicans in vitro*. **METHODS:** A suspension of *L. rhamnosus* was initially grown in MRS agar. The other day, Sabouraud dextrose agar was added on the growth of lactobacilli and *C. albicans* was seeded for 24, 48 and 72 hours. *Candida* strains were then isolated for investigation of the ability of biofilm formation, by means of cultivation into 96 wells plaque, and reading the optical densities and counting colony forming units per mL. Also the ability of germ tube formation was investigated, after incubation in horse serum and counting of 200 cells. The results were compared to *Candida* strains grown in the absence of *L. rhamnosus*, using Student's *t* test for statistical analysis. **RESULTS:** there was a significant reduction in the growth of *C. albicans* in the presence of lactobacilli after 24, 48 or 72 hours. Significant reduction was also observed in germ tube formation after interaction for 48 or 72 hours. For biofilm formation, no statistically significant difference was observed between the *Candida* strains grown in the presence or absence of lactobacilli. **CONCLUSION:** The results suggest that *L. rhamnosus* is able to influence significantly the growth and expression of virulence factors of *C. albicans in vitro*, and may interfere with pathogenicity of these micro-organisms.

Correspondência

Mariella Vieira Pereira Leão
Avenida Tiradentes, 500 – Centro
CEP: 12030-180
Taubaté (SP), Brasil

Recebido

09/11/2014

Aceito com modificações

03/07/2015

DOI: 10.1590/S0100-720320150005217

Instituto Básico de Biociências da Universidade de Taubaté – UNITAU – Taubaté (SP), Brasil.

¹Instituto Básico de Biociências, Universidade de Taubaté – UNITAU – Taubaté (SP), Brasil.

²Curso de Graduação em Medicina, Universidade de Taubaté – UNITAU – Taubaté (SP), Brasil.

Conflito de interesses: não há.

Introdução

A candidíase ou candidose vulvovaginal atinge, pelo menos uma vez, aproximadamente 75% das mulheres sexualmente ativas, sendo que, destas, metade desenvolverá um segundo episódio e 5% terão vulvovaginite recorrente (mais de 4 episódios por ano)¹⁻⁴. Observa-se uma associação entre a presença de lactobacilos na vagina e a redução do desenvolvimento de candidíase vulvovaginal. Uma avaliação de como os probióticos lactobacilos afetavam a resposta epitelial defensiva sugere que os lactobacilos suprimem a expressão de genes inflamatórios induzidos por *Candida albicans*, modulando a resposta imunológica do hospedeiro⁵.

Foram identificados probióticos com propriedades adesivas e resistentes ao metronidazol e sua utilização tem sido considerada em produtos voltados ao tratamento e à prevenção da vaginose bacteriana⁶, já que eles exercem um efeito biostático sobre o crescimento das leveduras⁷. Os probióticos *L. rhamnosus* e *L. reuteri* foram capazes de suprimir o crescimento de *C. albicans* e até mesmo demonstraram um efeito fungicida. Foram eficazes em níveis baixos de pH, semelhantes aos encontrados em um ambiente vaginal saudável⁸.

Certas cepas de lactobacilos, além de inibirem o crescimento de *Candida*, parecem dificultar sua aderência às células epiteliais⁹. A aderência da *Candida albicans* aos tecidos e às superfícies é favorecida pela formação de tubos germinativos¹⁰, pequenos prolongamentos filamentosos que provêm (em forma de levedura) da célula, que podem ser observados ao se inocular *C. albicans* em soro de seres humanos ou outros animais¹¹. Além disso, a aderência da *Candida* pode ser favorecida pela capacidade de formar biofilme, definido como uma comunidade microbiana estruturada, “embebida” em uma matriz, que se forma sobre superfícies sólidas e que proporciona maior resistência aos micro-organismos¹².

Uma vez que os probióticos parecem interferir no desenvolvimento de doenças causadas por *Candida* e a compreensão dos mecanismos envolvidos nesse processo possibilitaria uma melhor utilização terapêutica desses produtos, o presente estudo avaliou, *in vitro*, se *L. rhamnosus* é capaz de alterar a virulência de *C. albicans*, por meio da investigação da capacidade de formação de tubo germinativo e biofilme.

Métodos

Produção de suspensão de *Candida albicans* e de *Lactobacillus rhamnosus*

A partir da semeadura de cepa padrão de *Candida albicans* (ATCC18804) em placa de ágar Sabouraud dextrose, a 37°C por 24 horas e em aerobiose, foram adicionadas alíquotas do crescimento em 5 mL de solução

salina tamponada (PBS), esterilizada, até que se obtivesse uma suspensão contendo 10⁶ células/mL, padronizada em espectrofotômetro a 530 nm.

A partir da semeadura de cepa padrão de *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC1465) em ágar Man-Rogosa-Shape e cultivo a 37°C por 48 horas, foram adicionadas alíquotas do crescimento em 5 mL de solução salina tamponada (PBS), esterilizada, até que se obtivesse uma suspensão contendo 10⁷ células/mL, padronizada em espectrofotômetro a 530 nm.

A suspensão de *Lactobacillus* foi semeada na superfície de placas de Petri contendo 15 mL de ágar MRS. As placas foram incubadas a 37°C em estufa de CO₂ durante 24 horas. No dia seguinte, foram adicionados 15 mL de ágar Sabouraud dextrose sobre meio MRS com crescimento de *Lactobacillus*. Após o endurecimento do meio, 0,1 mL da suspensão de *Candida* foi semeado e as placas foram novamente incubadas a 37°C durante 24, 48 e 72 horas em aerobiose e em microaerofilia. Após cada um desses períodos, alíquotas das colônias de *Candida* foram isoladas para investigação dos fatores de virulência. Também foi realizado crescimento controle de *Candida* (na ausência de lactobacilos), com utilização de soro fisiológico no lugar da suspensão de *Lactobacillus*. Foram realizados três ensaios independentes para cada condição.

Análise da formação de tubo germinativo de biofilme

Foi adicionada uma alíquota de cada suspensão da levedura obtida a partir das culturas controle, e de 24, 48 e 72 horas de incubação na presença de lactobacilos, em tubo de ensaio contendo 0,5 mL de soro de cavalo. Os tubos permaneceram em banho-maria a 37°C por 2,5 horas. A formação do tubo germinativo foi observada em microscopia de luz e quantificada por meio da contagem de tubos germinativos formados para cada 200 células de *Candida*.

Para a formação do biofilme, foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços. As diferentes suspensões de *Candida* (obtidas a partir das culturas controle e de 24, 48 e 72 horas de incubação na presença de lactobacilos) foram pipetadas, no volume de 100 µL, nos poços das placas, e 100 µL de meio enriquecido (BHI), concentrado duas vezes, foram adicionados. Para cada suspensão, foram utilizados dez poços diferentes. As placas foram incubadas em agitação a 37°C por 90 minutos para a fase inicial de adesão. Decorrido esse período, os volumes dos poços foram removidos e 200 µL de PBS foram acrescentados para a remoção das células não aderidas. O volume foi novamente removido, 200 µL de meio foram acrescentados e as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas em agitação.

Após esse período, os volumes dos poços foram removidos e 200 µL de PBS foram acrescentados para a remoção das células não aderidas. O volume foi novamente removido e

200 µL de PBS foram acrescentados. As densidades ópticas dos poços foram verificadas em leitor de microplacas a 530 nm. Posteriormente, com o auxílio de palitos esterilizados, o fundo de cada orifício foi raspado, com movimentos em várias direções, por 30 segundos. Depois disso, os volumes dos poços foram transferidos para tubos de ensaio, foi acrescentado 1,8 mL de PBS estéril em cada tubo e as suspensões foram homogeneizadas por 5 minutos para desprendimento dos biofilmes. Essas soluções foram consideradas como fator de diluição 10^{-1} , a partir das quais foram feitas diluições seriadas. Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foram semeadas em placas de ágar Sabouraud dextrose e incubadas a 37°C por 48 horas. Dado o período de incubação, foram determinadas as unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) de cada orifício.

Os resultados obtidos foram analisados utilizando o teste *t* de Student, usando o programa *Graph Pad Prisma* versão 3.0 (*Graph Pad Software Inc.*).

Resultados

Após 24, 48 ou 72 horas de incubação, observou-se uma redução significativa do crescimento de *C. albicans* na presença de lactobacilos, quando comparado ao crescimento na ausência desses micro-organismos, tanto em aerobiose quanto em microaerofilia. Esses resultados dificultaram inúmeras vezes a recuperação de *Candida* para os ensaios posteriores de investigação dos fatores de virulência.

Formação de tubo germinativo e biofilme

Após 24 horas de crescimento na presença de *L. rhamnosus*, observou-se um aumento de 9,1% na formação de tubos germinativos por *C. albicans*, comparando-se às leveduras cultivadas na ausência de lactobacilos. Já após 48 horas de crescimento na presença de *L. rhamnosus* observou-se que as células de *Candida* apresentavam-se morfológicamente menores e não formavam tubos germinativos (redução de 100%). Após 72 horas, as células de *Candida* ainda apresentavam uma morfologia menor; entretanto, em alguns ensaios, foi possível a observação de tubos germinativos em algumas células, embora em número estatisticamente menor (redução de 75,4%) (Tabela 1).

Após 24, 48 ou 72 horas de incubação, foi analisada a formação de biofilme por *C. albicans*. Após a leitura das densidades ópticas ou as contagens de UFC/mL dos biofilmes formados, observou-se que não houve diferença significante entre as cepas de *Candida* isoladas a partir do cultivo na presença ou na ausência de *L. rhamnosus*, em qualquer um dos períodos de incubação estudados. Os resultados das contagens das UFC/mL dos biofilmes formados variaram da seguinte forma: observou-se aumento de 1,3% nas contagens de *Candida* isoladas dos biofilmes provenientes das culturas de 24 horas na presença

Tabela 1. Média do número de tubos germinativos observados em 200 células de *Candida albicans* e média do número de unidades formadoras de colônia de *Candida albicans* após incubação de 24, 48 e 72 horas, em aerobiose e microaerofilia, na presença ou na ausência de *Lactobacillus rhamnosus*

	Tubos germinativos			UFC/mL		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Com <i>Lactobacillus</i>	97,5	0	9,7	122,5x10 ⁵	74,5x10 ⁵	57,0x10 ⁵
Controle	89,3	69,0	39,5	121x10 ⁵	92,3x10 ⁵	54,6x10 ⁵

UFC: unidades formadoras de colônia. Controle: *Candida* na ausência de *L. rhamnosus*, com *Lactobacillus*: *Candida* na presença de *L. rhamnosus*

de *L. rhamnosus*; diminuição de 19,3% nos biofilmes das culturas de 48 horas; aumento de 4,4% nas de 72 horas, comparando-se às contagens de leveduras do grupo controle (na ausência de lactobacilos) (Tabela 1).

Discussão

Estudos prévios têm demonstrado que o consumo de alimentos probióticos pode reduzir a quantidade de *Candida* na microbiota normal dos seres humanos, podendo auxiliar no controle da candidíase^{13,14}. Mostrou-se também que o tratamento com fluconazol associado ao *Lactobacillus rhamnosus* e ao *Lactobacillus reuteri*, via oral, diminuiu, em quatro semanas, os sintomas relacionados à vulvovaginite por *Candida albicans*, além de diminuir o crescimento da levedura em cultura⁴.

O presente trabalho avaliou os efeitos de *L. rhamnosus* sobre a expressão de fatores de virulência de *Candida albicans*, especialmente importantes na adesão destas leveduras aos tecidos e às superfícies. Em relação à formação de tubo germinativo por *Candida*, observamos redução significativa na sua formação após a interação por 48 ou 72 horas com *L. rhamnosus*. Uma vez que a formação de tubo germinativo favorece a adesão e a invasão de *Candida* nos tecidos do hospedeiro, os resultados sugerem que a convivência com lactobacilos poderia evitar esses fenômenos, contribuindo para a diminuição da patogenicidade do micro-organismo e para o controle do desenvolvimento da candidíase. Os diferentes resultados observados após diferentes períodos de cocultura demonstram a importância do tempo de interação com os lactobacilos para que os mesmos possam exercer essa influência sobre *Candida*. O período de 48 horas promoveu a interferência mais efetiva. Outros trabalhos que tenham investigado esse efeito de *L. rhamnosus* sobre *Candida* não foram encontrados na literatura. Aqueles que investigaram a interferência dos micro-organismos probióticos na adesão de leveduras utilizaram espécies e métodos diferentes¹⁵⁻¹⁷.

No presente trabalho não foi observada diferença significativa quanto à capacidade de formar biofilme pelas células de *Candida* estudadas. Redução na formação de biofilme por *C. albicans* na presença de micro-organismos com propriedades probióticas foi demonstrada por outros autores, entretanto utilizando cepas e metodologias

diferentes^{15,18,19}. Nesses estudos os autores adicionavam as cepas ou os produtos microbianos diretamente nas placas para formação de biofilme, sendo que no presente trabalho a interação era prévia e, posteriormente, as leveduras eram cultivadas separadamente. Assim, a ausência do contato com *Lactobacillus* nas etapas posteriores à interação pode ter permitido a recuperação da capacidade de formar o biofilme pelas células de *Candida*. Ainda, a utilização de cepas probióticas diferentes pode ter produzido os resultados distintos, e até mesmo contrários.

Embora a influência de *L. rhamnosus* sobre o crescimento de *Candida* não tenha sido o objetivo deste trabalho, esse efeito foi significativo e evidente, e em grande parte da pesquisa o tempo de interação foi fundamental. Nossos resultados sugerem que *L. rhamnosus* seria capaz de produzir substâncias com atividade antifúngica ou de modificar o ambiente, prejudicando o crescimento das leveduras. O fato de não ter havido interação direta entre os micro-organismos estudados

sugere que a influência tenha ocorrido pela difusão de seus metabólitos.

É importante destacar que se trata de um estudo *in vitro*, com somente duas espécies microbianas, em condições relativamente estáveis e específicas de crescimento. Diferente das condições *in vivo*, nas quais existe a participação de várias outras espécies, interagindo diretamente e/ou indiretamente, além das células eucarióticas epiteliais e dos componentes do sistema imunológico, caracterizando um quadro extremamente mais complexo. Assim, estudos clínicos devem ser também realizados para confirmação dos reais efeitos de lactobacilos sobre a virulência de *C. albicans* e a ocorrência de candidíase.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela concessão de bolsa de iniciação científica (processo IBB_14_2013)

Referências

- Ferrer J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. *Int J Gynaecol Obstet*. 2000;71(Suppl 1):S21-7.
- Eckert LO, Hawes SE, Stevens CE, Koutsky LA, Eschenbach DA, Holmes KK. Vulvovaginal candidiasis: clinical manifestations, risk factors, management algorithm. *Obstet Gynecol*. 1998;92(5):757-65.
- Paulitsch A, Weger W, Ginter-Hanselmayer G, Marth E, Buzina W. A 5-year (2000-2004) epidemiological survey of *Candida* and non-*Candida* yeast species causing vulvovaginal candidiasis in Graz, Austria. *Mycoses*. 2006;49(6):471-5.
- Martinez RC, Franceschini SA, Patta MC, Quintana SM, Candido RC, Ferreira JC, et al. Improved treatment of vulvovaginal candidiasis with fluconazole plus probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14. *Let Appl Microbiol*. 2009;48(3):269-74.
- Wagner RD, Johnson SJ. Probiotic *Lactobacillus* and estrogen effects on vaginal epithelial gene expression responses to *Candida albicans*. *J Biomed Sci*. 2012;19(1):58.
- Saduakhasova S, Kushugulova A, Shakhbayeva G, Kozhakhmetov S, Khasenbekova Z, Tynybayeva I, et al. *Lactobacillus* for vaginal microflora correction [abstract]. *CAJGH*. 2014;3 Suppl:1.
- Denkova R, Yanakieva V, Denkova Z, Nikolova V, Radeva V. *In vitro* inhibitory activity of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains against *Candida albicans*. *BJVM*. 2013;16(3):186-97.
- Kohler GA, Assefa S, Reid G. Probiotic interference of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 with the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2012;2012:636474.
- Falagas ME, Betsi GI, Athanasiou S. Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58(2):266-72.
- Jorge AOC. *Microbiologia e imunologia oral*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.
- Duarte A, Márquez A, Araujo C, Pérez C. Modalidades de la prueba del tubo germinal. *Rev Soc Ven Microbiol*. 2009;29(1):66-8.
- Cavalcanti IM, Silva WJ, Lucena SC, Pousa CC, Del Bel Cury AA. Influence of substratum position and acquired pellicle on *Candida albicans* biofilm. *Braz Oral Res*. 2013;27(4):369-75.
- Santos AL, Jorge AOC, Santos SSF, Silva CRG, Leão MVP. Influence of probiotics on *Candida* presence and IgA anti-*Candida* in the oral cavity. *Braz J Microbiol*. 2009;40(4):960-4.
- Mendonça FHB, Santos SSF, Faria IS, Silva CRG, Jorge AOC, Leão MVP. Effects of probiotic bacteria on *Candida* presence and IgA anti-*Candida* in the oral cavity of elderly. *Braz Dent J*. 2012;23(5):534-8.
- Murzyn A, Krasowska A, Stefanowicz P, Dziadkowiec D, Lukaszewicz M. Capric acid secreted by *S. boulardii* inhibits *C. albicans* filamentous growth, adhesion and biofilm formation. *PLoS One*. 2010;5(8):e12050.
- Etgeton SA, Chassot F, Boer CG, Donatti L, Svidzinski TIE, Consolaro MEL. Influência da co-agregação entre *Candida albicans* e *Lactobacillus acidophilus* na capacidade de adesão destes microrganismos às células epiteliais vaginais humanas (CEVH). *Acta Sci Health Sci*. 2011;33(1):1-8.
- Nair RG, Anil S, Samaranyake LP. The effect of oral bacteria on *Candida albicans* germ-tube formation. *APMIS*. 2001;109(2):147-54.
- Vilela SF, Barbosa JO, Rossoni RD, Santos JD, Prata MC, Anbinder AL, et al. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 inhibits biofilm formation by *C. albicans* and attenuates the experimental candidiasis in *Galleria mellonella*. *Virulence*. 2015;6(1):29-39.
- Shinde RB, Raut JS, Chauhan NM, Karuppaiyl SM. Chloroquine sensitizes biofilms of *Candida albicans* to antifungal azoles. *Braz J Infect Dis*. 2013;17(4):395-400.