

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Estudio de la actividad probiótica de *Lactobacillus gasseri*
frente a diferentes cepas de *Candida albicans* aisladas de la
microbiota vaginal
Proyecto de Investigación**

Dominique Esther Montalvo Vivero

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito para la obtención del título de
Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Quito, 10 de diciembre de 2018

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AMBIENTALES

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN

**Estudio de la actividad probiótica de *Lactobacillus gasseri* frente a
diferentes cepas de *Candida albicans* aisladas de la microbiota vaginal**

Dominique Esther Montalvo Vivero

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Antonio Machado, PhD.

Firma del profesor

Quito, 10 de diciembre de 2018

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Dominique Esther Montalvo Vivero

Código: 00116962

Cédula de Identidad: 1726021882

Lugar y fecha: Quito, 10 de diciembre de 2018

DEDICATORIA

Para la mayor gloria de Dios.

A mis padres, Moisés y Tonya, por nunca prohibirme nada y enseñarme a tomar mis propias decisiones.

A mis hermanas, María Sol y Valentina, por alegrarme la vida y quererme tal como soy.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque todo lo hago por Su gracia.

A mis padres. A mi papá por enseñarme a estar siempre alerta y que conversar es lo más importante. A mi mamá por enseñarme a soñar en grande pero con los pies firmes en el suelo.

A mis hermanas porque son las personas que mejor me conocen y en quienes más confío.

A Antonio Machado, por ser mi guía durante el desarrollo del presente trabajo.

Al Instituto de Microbiología.

A mi tía Magalith, mi tía Catalina, Lili.

A mis hermanos y mi comunidad.

A mis amigos.

RESUMEN

En la actualidad, la resistencia a antibióticos y antifúngicos por parte de varios patógenos asociados a seres humanos ha causado la persistencia de infecciones que cada vez tienen menos opciones de tratamiento. Esta situación contemporánea en los tratamientos clínicos frente a las enfermedades infecciosas ha llevado a la investigación de terapias alternativas. Una alternativa viable es el uso de probióticos, que se trata de microorganismos beneficiosos que son parte de la microbiota normal o sus productos biológicos que aumentan la protección o facilitan la respuesta inmunitaria de su huésped y ayudan a combatir las infecciones. El uso de probióticos ha sido estudiado contra diversos patógenos oportunistas, donde se ha comprobado su eficiencia protectora en la salud del huésped. *Candida* sp., es parte de la microbiota comensal de las mucosas epiteliales del ser humano pero se trata de un patógeno oportunista en determinadas condiciones que facilitan su proliferación en la mucosa epitelial, donde la especie más prevalente es *Candida albicans*. Una de las infecciones más comunes por *C. albicans* es en el epitelio vaginal, originando una vaginitis denominada candidiasis vulvovaginal. La candidiasis puede llegar a causar abortos espontáneos o complicaciones en el embarazo, además de que la candidiasis vulvovaginal afecta al 75% de mujeres en edad reproductiva y el 40% de las infecciones vaginales están asociadas a *Candida* sp. El principal mecanismo de virulencia de *Candida* sp. es la formación de biofilms, siendo detectado en alrededor de 65% de los casos de candidiasis. En cuanto a *Lactobacillus* sp., se trata de los principales microorganismos protectores del epitelio vaginal, debido a que cuentan con varios mecanismos que inhiben la actividad o la adhesión inicial de los patógenos. Este estudio surge del Proyecto de Secreción Vaginal, donde se obtuvo varias cepas de *L. gasseri* que fue la especie aislada más exitosa en sobrevivir en condiciones de cultivo fuera del epitelio vaginal. En este trabajo se analizó la actividad probiótica de varias cepas *L. gasseri* frente a varias cepas de *C. albicans*, aislados de mujeres ecuatorianas en edad reproductiva. Se realizó ensayos de adhesión inicial, en los cuáles se observó la capacidad de los microorganismos de adherirse inicialmente a una superficie abiótica, registrándose el desplazamiento de *L. gasseri* y la inhibición de la adhesión inicial por *C. albicans*. En resumen, los resultados preliminares obtenidos en este estudio demostraron que el porcentaje de adherencia de diferentes cepas de *C. albicans* no fue significativamente diferente entre sí, mientras que *L. gasseri* JCM1131 fue la cepa más exitosa en evitar su desplazamiento de la superficie abiótica por parte de *C. albicans*.

Palabras clave: probióticos, microbiota normal, *Candida albicans*, *Lactobacillus gasseri*, adhesión inicial, desplazamiento, inhibición.

ABSTRACT

Nowadays, many pathogens associated with humans have acquired resistance to antibiotic and antifungals, which has caused the persistence of infections that has fewer options of treatment. This actual situation in the clinical treatments facing infectious diseases has led to research of alternative therapies. One alternative is the use of probiotics, which are viable microorganisms that form part of the commensal microbiota or their biological products that increase and enable the immune response of the host to combat infections. The use of probiotics has been studied against many opportunist pathogens and its protective activities to the host have been proved in several published studies. *Candida* sp. is part of the commensal microbiota of the epithelial mucous membranes of humans, but it is also an opportunist pathogen, that under certain conditions can proliferate in the epithelium. The most relevant species is *Candida albicans*. One of the most prevalent infections caused by *C. albicans* is in the vaginal epithelium, which it is commonly denominated as vulvovaginal candidiasis. Candidiasis can cause spontaneous abortion and health complications during pregnancy. Also, vulvovaginal candidiasis affects 75% of women in reproductive age and 40% of vaginal infections are associated to *Candida* sp. The main mechanism of virulence for this genre is the biofilm formation detected in 65% of candidiasis cases. On the other hand, *Lactobacillus* sp. are part of the protective microorganisms of the vaginal epithelium and usually inhibit the activity or initial adhesion of pathogens. This study follows a preliminary vaginal microbiota study in Ecuadorian women through a research grant entitled "Proyecto de Secreción Vaginal". In this preliminary study, many strains of *L. gasseri* were successful isolated in culture conditions outside the vaginal epithelium samples. Therefore, the present study analyzed the probiotic activity of various strains of *L. gasseri* against different strains of *C. albicans* isolated of women in reproductive age with different clinical diagnostics. Initial adhesion assays were performed to evaluate the ability of *L. gasseri* to adhere to an abiotic surface, the displacement of *L. gasseri* and the initial adhesion inhibition of *C. albicans*. The preliminary results showed that the initial adherence of different strains of *C. albicans* were not significantly different, meanwhile *L. gasseri* JCM1131 was the most successful strain in avoiding its displacement of the abiotic surface by *C. albicans*.

Keywords: probiotics, normal microbiota, *Candida albicans*, *Lactobacillus gasseri*, initial adhesion, displacement, inhibition.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. Microbiota Humana	12
1.2. Microbiota vaginal.....	12
1.2.1. Lactobacillus sp.	14
1.2.2. Presencia de Candida sp. en el tracto vaginal	16
2. Objetivos	18
2.1. Objetivo general.....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
3. Área de estudio.....	19
4. Justificación.....	19
5. MATERIALES.....	20
5.1. Obtención de un cepario.....	20
5.2. Curvas de calibración	21
5.3. Ensayos de adhesión	21
5.3.1. Preparación de las cepas y condiciones de cultivo	21
5.3.2. Ensayos de adhesión inicial en una superficie abiótica	21
5.4. Contaje de células adheridas	22
5.4.1. Observación en el microscopio	22
5.4.2. Determinación de porcentajes de adherencia y desplazamiento.....	22
5.5. Análisis estadístico	22
6. MÉTODOS.....	22
6.1. Obtención de un cepario.....	22
6.2. Curvas de calibración	23
6.2.1. Medición de OD.....	23
6.2.2. Método de las tres gotas.....	24
6.2.3. Gráfica de la curva.....	25
6.3. Ensayos de adhesión	25

6.3.1.	Preparación de las cepas y condiciones de cultivo	25
6.3.2.	Ensayos de adhesión inicial en una superficie abiótica	26
6.4.	Contaje de células adheridas	27
6.4.1.	Observación en el microscopio	27
6.4.2.	Determinación de porcentajes de adherencia y desplazamiento.....	27
6.5.	Análisis estadístico	28
7.	RESULTADOS	28
7.1.	Curvas de calibración	28
7.2.	Ensayos de adhesión inicial.....	28
7.2.1.	L. gasseri IMAUFB014.....	30
7.2.2.	L. gasseri JCM1131	31
7.2.3.	L. gasseri H59.2.....	32
7.3.	Actividad probiótica de <i>L. gasseri</i>	33
8.	DISCUSIÓN.....	34
9.	CONCLUSIONES	42
10.	RECOMENDACIONES	43
11.	BIBLIOGRAFÍA	44
12.	TABLAS.....	54
13.	FIGURAS	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Curvas de calibración de las cepas utilizadas en los ensayos de adhesión.....	54
Tabla 2.	Adhesión de <i>C. albicans</i> vs <i>L. gasseri</i> IMAUFB014 (1E+09 UFC/mL).....	54
Tabla 3.	Adhesión de <i>C. albicans</i> vs <i>L. gasseri</i> IMAUFB014 (1E+07 UFC/mL).....	55
Tabla 4.	Adhesión de <i>C. albicans</i> vs <i>L. gasseri</i> IMAUFB014 (1E+03 UFC/mL).....	56
Tabla 5.	Adhesión de <i>L. gasseri</i> IMAUFB014 (1E+09 UFC/mL) vs <i>C. albicans</i>	57
Tabla 6.	Adhesión de <i>L. gasseri</i> IMAUFB014 (1E+07 UFC/mL) vs <i>C. albicans</i>	59
Tabla 7.	Adhesión de <i>L. gasseri</i> IMAUFB014 (1E+03 UFC/mL) vs <i>C. albicans</i>	60
Tabla 8.	Adhesión de <i>C. albicans</i> vs <i>L. gasseri</i> JCM1131 (1E+09 UFC/mL).....	61

Tabla 9. Adhesión de <i>C. albicans</i> vs <i>L. gasseri</i> JCM1131 (1E+07 UFC/mL).....	62
Tabla 10. Adhesión de <i>C. albicans</i> vs <i>L. gasseri</i> JCM1131 (1E+03 UFC/mL).....	63
Tabla 11. Adhesión de <i>L. gasseri</i> JCM1131 (1E+09 UFC/mL) vs <i>C. albicans</i>	64
Tabla 12. Adhesión de <i>L. gasseri</i> JCM1131 (1E+07 UFC/mL) vs <i>C. albicans</i>	65
Tabla 13. Adhesión de <i>L. gasseri</i> JCM1131 (1E+03 UFC/mL) vs <i>C. albicans</i>	66
Tabla 14. Adhesión de <i>C. albicans</i> vs <i>L. gasseri</i> H59.2 (1E+09 UFC/mL).....	67
Tabla 15. Adhesión de <i>C. albicans</i> vs <i>L. gasseri</i> H59.2 (1E+03 UFC/mL).....	68
Tabla 16. Adhesión de <i>L. gasseri</i> H59.2 (1E+09 UFC/mL) vs <i>C. albicans</i>	69
Tabla 17. Adhesión de <i>L. gasseri</i> H59.2 (1E+03 UFC/mL) vs <i>C. albicans</i>	70
Tabla 18. Método de agrupación de Tukey para <i>C. albicans</i> (1E+03 UFC/mL)	71
Tabla 19. Método de agrupación de Tukey para <i>C. albicans</i> (1E+09 UFC/mL)	71
Tabla 20. Estudios de actividad probiótica de <i>Lactobacillus</i> sp.	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Placas de seis pocillos utilizadas para los ensayos de adhesión.	74
Figura 2. Curva de calibración de <i>L. gasseri</i> JCM1131.	75
Figura 3. Curva de calibración de <i>L. gasseri</i> IMAUFB014.	75
Figura 4. Curva de calibración de <i>L. gasseri</i> H59.2.	76
Figura 5. Curva de calibración de <i>C. albicans</i> ATCC® 10231™.	76
Figura 6. Curva de calibración de <i>C. albicans</i> Infección.....	77
Figura 7. Curva de calibración de <i>C. albicans</i> Microbiota Normal.....	77
Figura 8. Porcentaje de Adhesión de <i>Candida albicans</i>	78
Figura 9. Comparación en el porcentaje de adhesión de <i>C. albicans</i>	78
Figura 10. Porcentaje de Adhesión de <i>L. gasseri</i>	79
Figura 11. Interval Plot de <i>L. gasseri</i> (1E+03UFC/mL).....	80
Figura 12. Interval Plot de <i>L. gasseri</i> (1E+09UFC/mL).....	80
Figura 13. Interval Plot de <i>L. gasseri</i> IMAUFB014.....	81
Figura 14. Interval Plot de <i>L. gasseri</i> JCM1131.....	82
Figura 15. Interval Plot de <i>L. gasseri</i> H59.2.....	82
Figura 16. Interval Plot de <i>C. albicans</i> vs <i>L. gasseri</i> IMAUFB014.....	83

Figura 17. Interval Plot de <i>C. albicans</i> vs <i>L. gasseri</i> JCM1131.	83
Figura 18. Interval Plot de <i>C. albicans</i> vs <i>L. gasseri</i> H59.2.	84
Figura 19. <i>C. albicans</i> infección (1E+03 UFC/mL).	85
Figura 20. <i>C. albicans</i> infección (1E+09 UFC/mL).	86
Figura 21. <i>L. gasseri</i> H59.2 (1E+03 UFC/mL).	87
Figura 22. <i>L. gasseri</i> IMAUFB014 (1E+09 UFC/mL).	88
Figura 22. <i>L. gasseri</i> JCM1131 (1E+03 UFC/mL) versus <i>C. albicans</i> microbiota normal (1E+03 UFC/mL).	89
Figura 23. <i>L. gasseri</i> JCM1131 (1E+09 UFC/mL) versus <i>C. albicans</i> infección (1E+09 UFC/mL).	90

1. INTRODUCCIÓN

El estudio de probióticos en humanos representa un amplio campo de estudio, el cual es importante tanto para la medicina como para la industria (Bermúdez-Humarán & Langella, 2012; Ghasemian et al., 2018; Oelschlaeger, 2010). En el área de la microbiología clínica se busca la comprensión de la microbiota humana y su interacción específica en los diferentes órganos. Además, se interesa en la comprensión de la actividad biológica que presentan los microorganismos caracterizados, de manera que su actividad probiótica pueda ser comprobada y fundamentada. La caracterización y la producción de probióticos en el área de la biotecnología se fundamenta en el estudio de microorganismos comensales y sus interacciones frente a diferentes patógenos (Amaretti et. al., 2012; Zhang et al., 2018).

1.1. Microbiota Humana

El cuerpo del ser humano está colonizado por un amplio rango de microorganismos, denominados microbiota humana (Petrova et al., 2015). Estos microorganismos presentan una serie de relaciones de mutualismo con el huésped, de manera que son específicos para las diferentes partes del cuerpo dependiendo de las condiciones y los factores de cada epitelio o mucosa en particular (Ravel et al., 2011). Además, la microbiota tiende a cambiar a lo largo del tiempo dentro del mismo individuo, e incluso puede evolucionar totalmente diferente entre varios individuos (Ravel et al., 2011).

1.2. Microbiota vaginal

La microbiota vaginal es considerada por muchos autores como una de las más complejas de la microbiota humana, siendo de gran importancia para evitar infecciones vaginales en mujeres en edad fértil y complicaciones durante el embarazo (Petrova et al., 2015). En el caso del tracto vaginal, hay estudios que reportan una relación entre la salud de

la persona y la microbiota presente (Hyman et al., 2016). Dentro de los microorganismos que conforman la microbiota vaginal, las diferentes especies del género *Lactobacillus* son los microorganismos dominantes en un epitelio vaginal saludable representando hasta el 70% de la microbiota vaginal y considerado como un agente probiótico o biosurfactante del epitelio vaginal (Martín & Suárez, 2010; Petrova et al., 2015; Zozaya-Hinchliffe et al., 2010).

Según diversos estudios, la mayoría de la microbiota vaginal se encuentra dominada por *L. iners* y *L. crispatus* (Machado, Jefferson, & Cerca, 2013; Petrova et al., 2015; Seneviratne et al., 2016), pero también se menciona la presencia de otras especies como *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. jensenii*, *L. vaginalis* (Martín & Suárez, 2010) y *L. gasseri* (Martín & Suárez, 2010; Petrova et al., 2015). Sin embargo, *L. gasseri* se reporta como menos frecuente en muestras de secreción vaginal (Borgdorff et al., 2014). Aunque existen estudios que analizan su actividad probiótica, sobre todo mediante la adhesión a diferentes tipos de microorganismos (Kassaa et al., 2015; Kobatake et al., 2017). Por eso es importante analizar la capacidad probiótica de varias cepas de esta especie que fueron anteriormente aisladas en muestras clínicas de mujeres en edad reproductiva en Ecuador. Las propiedades probióticas de la microbiota vaginal están asociadas a la inhibición de la adherencia de patógenos a las células epiteliales y/o la producción de compuestos antimicrobianos (Martín & Suárez, 2010). Los análisis preliminares de microorganismos probióticos normalmente empiezan por caracterizar su capacidad de inhibir la adhesión inicial de patógenos oportunistas y posteriormente evaluar su capacidad de producir productos antimicrobianos competitivos o inhibir la maduración de biofilms (Anahtar, Gootenberg, Mitchell, & Kwon, 2018; Bertuccini et al., 2018).

Otro microorganismo comensal que se puede encontrar en las muestras de secreción vaginal es el género *Candida*, pero en bajas concentraciones al largo del epitelio vaginal (Cassone & Sobel, 2016). Este tipo de hongo puede estar presente sin generar una infección sintomática, aunque también puede causar síntomas y producir una vaginitis denominada candidiasis (Cassone & Sobel, 2016). Entre las especies del género *Candida* que se han encontrado en pacientes con vulvovaginitis están *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei* (Achkar & Fries, 2010). Una de las principales causas de abortos o complicaciones en el embarazo es la vaginitis, donde la candidiasis vulvovaginal afecta hasta 75% de mujeres en edad reproductiva (Cassone & Sobel, 2016; Gandhi, Patel, & Jain, 2015). La candidiasis representa el 40% del total de las infecciones vaginales reportadas (Achkar & Fries, 2010; Gandhi et al., 2015). Por otro lado, es importante mencionar que *Candida* sp. forma parte también de la microbiota comensal de los tractos respiratorios superiores (boca y fosas nasales) y del tracto gastrointestinal (Gandhi et al., 2015).

1.2.1. *Lactobacillus* sp.

Por lo general, las especies de *Lactobacillus* en el epitelio vaginal previenen enfermedades infecciosas, como por ejemplo, la vaginosis bacteriana, infecciones por levaduras, infecciones de transmisión sexual, infecciones del tracto urinario e incluso VIH (Martín & Suárez, 2010; Ravel et al., 2011; Zozaya-Hinchliffe et al., 2010). Su actividad probiótica es atribuida en la mayoría a dos propiedades, específicamente, la inhibición de la adhesión inicial de otros microorganismos a las células del epitelio vaginal y liberación de compuestos competitivos antimicrobianos (Anahtar et al., 2018; Bertuccini et al., 2018). Las especies aisladas más frecuentemente son *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* y *L. iners* (Lee, Tsui, & Wang, 2016; Martín & Suárez, 2010), aunque en muchos casos se encuentra

también *L. acidophilus* y *L. fermentum* (Burton, Cadieux, & Reid, 2003; Martín & Suárez, 2010).

Además, existen también otros mecanismos que otorgan a los lactobacilos la capacidad de prevenir infecciones influenciando así también su actividad probiótica. En primer lugar se encuentran los factores de adaptación, que les permiten resistir el estrés al adaptarse al huésped y que varían entre las diferentes especies de lactobacilos, por lo cual es importante estudiarlas de manera individual (Lebeer, Vanderleyden, & De Keersmaecker, 2008). Hay indicadores de que ciertos lactobacilos probióticos interactúan con receptores de las células inmunes y modulan ciertas funciones de las células epiteliales (Lebeer et al., 2008).

Por otro lado, también es importante mencionar la actividad antifúngica y antimicrobiana de los compuestos antimicrobianos producidos por lactobacilos (Petrova et al., 2015; Seneviratne et al., 2016; Vilela et al., 2015). Dentro de este tema, uno de los compuestos competitivos antimicrobianos de los lactobacilos es el peróxido de hidrógeno, siendo un compuesto que opera mediante la oxidación de diferentes metabolitos, como el radical OH y produciendo daños en el ADN de la célula (Martín & Suárez, 2010). Esta actividad del peróxido de hidrógeno mimetiza el estrés oxidativo producido por la respuesta humoral innata (Abbas et al., 2015). Así, este efecto es notorio en el ambiente ácido del epitelio vaginal, debido a la presencia de myeloperoxidasa y halidos, cuya presencia es común en el moco uterino especialmente durante la ovulación (Martín & Suárez, 2010). Además, ciertas especies de lactobacilos son capaces de producir ácido láctico que contribuye para el ambiente ácido en el epitelio vaginal evitando la colonización por patógenos oportunistas. Sin embargo, este tipo de actividad bactericida varía entre las diferentes cepas de *Lactobacillus* sp., siendo *L. crispatus* un lactobacilo bien reconocido por su capacidad de producir ácido láctico. En añadidura, Borgforff et al. (2014) reportan la

menor prevalencia de HIV en mujeres que tienen una cantidad adecuada de *Lactobacillus crispatus* en su microbiota vaginal. Las capacidades probióticas de los lactobacilos son descritas en diversos estudios, las cuales inhiben la inflamación local (Borgdorff et al., 2014; Vilela et al., 2015) o antivirales (Petrova et al., 2015).

En cuanto a *L. gasseri*, se trata de un microorganismo con una capacidad de colonizar las mucosas del ser humano, debido a su tolerancia a ambientes con pH bajos, su capacidad de adherencia a las células epiteliales, actividad antimicrobiana e inmunomodulación de los sistemas innato y adaptativo (Selle & Klaenhammer, 2013). Se ha observado la actividad de *L. gasseri* CMUL57 contra HSV-2 (Herpes Simple Tipo 2) a través de un mecanismo de captura/unión por el contacto de las células bacterianas con la envoltura del virus que disminuye su actividad infectiva (Kassaa et al., 2015). De igual manera, *L. gasseri* 2055 fortalece el sistema de defensa frente al estrés oxidativo mediante la activación de señales que prenden rutas para la expresión de genes asociados con la producción de moléculas antioxidantes y la respuesta antioxidante de las células (Kobatake et al., 2017). Además, en un estudio realizado que juntaba *L. gasseri* con *L. crispatus* se observó su capacidad de inhibir la formación de biofilm de *C. albicans* mediante la regulación de genes positivamente expresados y relacionados a la adherencia inicial a células epiteliales y/o la formación de un biofilm (Matsuda, Cho, & Sugita, 2018).

1.2.2. Presencia de Candida sp. en el tracto vaginal

Actualmente, la presencia de *Candida* sp. en el epitelio vaginal es considerado parte de la microbiota normal en mujeres saludables. Sin embargo, la proliferación excesiva de *Candida* sp. en el epitelio vaginal en detrimento de la disminución de lactobacilos es asociada al establecimiento de una candidiasis (Kovachev, 2015; Mayer, Wilson, & Hube, 2013). Las condiciones que provocan la proliferación de *Candida* sp. están normalmente

asociadas con terapias prolongadas con antibióticos, el uso de anticonceptivos e inmunodepresores (Achkar & Fries, 2010; Gandhi et al., 2015). El uso de antibióticos genera la pérdida de microbiota normal en la mucosa epitelial, de manera que los patógenos oportunistas empiezan a ocupar sus nichos y a causar infecciones. Las especies de *Candida* son un ejemplo de estos patógenos oportunistas, sobre todo si se tiene en cuenta que los antibióticos no tienen ningún efecto en *Candida* sp. En el caso del uso de anticonceptivos, se refiere específicamente a aquellos que se ingiere por vía oral o a aquellos que generan desbalance hormonal (como el aumento en la cantidad de estrógenos), el cual está relacionado con la prevalencia de infecciones por *Candida* sp. durante la semana premenstrual (Achkar & Fries, 2010). El caso de los inmunodepresores no está directamente relacionado con la carga microbiana, pero sí con el estado general del sistema inmune de la persona. Cuando existe inmunodepresión, los patógenos oportunistas empiezan a proliferar en epitelios o mucosas de diversos órganos. Esta proliferación de patógenos oportunistas puede tener una mayor virulencia cuando alguno de estos patógenos oportunistas tiene la capacidad de adherirse a las células epiteliales y la posterior formación de un biofilm. Esta adhesión y posterior formación de biofilm normalmente no ocurre cuando el sistema inmune actúa de manera eficiente (Mayer et al., 2013).

Candida sp. es capaz de resistir la respuesta inmune normal, a través de posibles interacciones entre las células y proteínas del huésped (Faria et al., 2017; Farr et al., 2015; Mayer et al., 2013; Zanni et al., 2017). Alrededor del 65% de las candidiasis se relacionan también con la formación de biofilms, que permiten el desarrollo de una elevada resistencia a agentes antimicrobianos (Ibarra-Trujillo et al., 2012). Entre las especies de *Candida* que pueden formar biofilms está *Candida albicans* como la más frecuente en candidiasis y consecuentemente la especie más estudiada, sin embargo hay estudios que reportan

infecciones y biofilms con *C. parapsilopsis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* (Del Pozo 2016). Hay casos que reportan biofilms mixtos formados por *Candida* sp. junto con bacterias, como por ejemplo *Staphylococcus aureus* (Ibarra-Trujillo et al., 2012). Sin embargo, en otros estudios se encuentran biofilms formados por diferentes especies de *Candida* en superficies bióticas y abióticas (Del Pozo, 2016).

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Analizar la actividad probiótica de *Lactobacillus gasseri* en la adhesión inicial frente a *Candida albicans* aisladas del epitelio vaginal de mujeres saludables y con infecciones vaginales.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar ensayos de adhesión inicial con diferentes cepas de *Lactobacillus gasseri* y de *Candida albicans*.
- Evaluar estadísticamente la actividad probiótica de las diferentes cepas de *Lactobacillus gasseri*.
- Determinar el grado de inhibición en diferentes cepas de *Candida albicans* frente a *Lactobacillus gasseri*.
- Examinar la tasa de desplazamiento en diferentes cepas de *Lactobacillus gasseri* frente a *Candida albicans*.

3. Área de estudio

Se obtuvo las diferentes cepas de *Lactobacillus gasseri* y *Candida albicans* (excepto la cepa de referencia de *C. albicans* ATCC® 10231™) aisladas de muestras de secreción vaginal de mujeres en edad reproductiva a partir del Proyecto de Secreción Vaginal. Los ensayos de adhesión y el conteo en el microscopio se realizaron en la Universidad San Francisco de Quito, en el laboratorio de Bacteriología del Instituto de Microbiología.

4. Justificación

El uso progresivo de antibióticos y antifúngicos en población mundial ha generado un aumento de la resistencia antimicrobiana (Martín & Suárez, 2010; Petrova et al., 2015; Seneviratne et al., 2016; Vilela et al., 2015). Además, el uso excesivo de antibióticos lleva a la disminución o cambios de los microorganismos comensales de la microbiota normal. Esto genera un desbalance en la microbiota y permite que los patógenos puedan ocupar los nichos que no les corresponden y generar infecciones (Martín & Suárez, 2010; Petrova et al., 2015; Seneviratne et al., 2016; Vilela et al., 2015). Por esta razón, es necesario estudiar diferentes terapias clínicas que puedan disminuir o reemplazar el uso de antibióticos y antifúngicos en la población general. Una de las terapias alternativas al uso de antibióticos es el caso de los probióticos, que implica de la aplicación de microorganismos que normalmente forman parte de la microbiota comensal del ser humano para la prevención de infecciones con patógenos oportunistas y fortalecimiento de la protección inmunitaria de un individuo (Petrova et al., 2015).

Por otro lado, la microbiota varía de acuerdo a las diferentes regiones geográficas y la microbiota vaginal no es la excepción (Borgdorff et al., 2014). Por eso no se puede

extrapolar los estudios realizados en otros países y esperar que sus resultados sean igualmente efectivos. En Ecuador, se realizó el estudio del cual se deriva el presente proyecto, donde se analizó la microbiota vaginal de mujeres en edad reproductiva en la ciudad de Quito. Mediante este proyecto se corroboró la presencia de varias especies de lactobacilos detallados en la literatura. Una de las especies de lactobacilos más aislada en el estudio anteriormente citado fue *Lactobacillus gasseri*.

Existen varios estudios que analizan la actividad probiótica de varias especies de lactobacilos frente a patógenos oportunistas, tanto *in vitro* como *in vivo* (Borgdorff et al., 2014; Ribeiro et al., 2016; Vilela et al., 2015), pero pocos estudios han analizado diferentes cepas de *Lactobacillus gasseri*. Este estudio inicial tiene relevancia por ser realizado con cepas aisladas de mujeres saludables en Ecuador. Finalmente, este estudio desea evaluar la actividad antimicrobiana de diferentes cepas de *L. gasseri* frente a diferentes cepas de *Candida albicans* aisladas de mujeres saludables y con candidiasis.

5. MATERIALES

5.1. Obtención de un cepario

- BHI (Brain Heart Infusion) broth
- Glicerol
- *L. gasseri* H59.2
- L. gasseri* JCM1131
- L. gasseri* IMAUFB14
- C. albicans* aislada de una paciente que presentaba infección
- C. albicans* aislada de la microbiota normal
- Candida albicans* ATCC® 10231™

-Tubos Eppendorf de 2 mL

5.2. Curvas de calibración

-MRS (Man, Rogosa y Sharpe) agar

-Sabouraud agar

-Cajas para cultivo en ambiente microaerofílico

-Cajas petri

-Espectrofotómetro Ultrospec 2000

-Cubetas de cuarzo

-PBS estéril

-Hisopos estériles

5.3. Ensayos de adhesión

5.3.1. Preparación de las cepas y condiciones de cultivo

-MRS agar y MRS broth

-Sabouraud agar y Sabouraud broth

-Cajas para cultivo en ambiente microaerofílico

-Cajas petri

-Espectrofotómetro Ultrospec 2000

-Cubetas de cuarzo

-PBS estéril

-Hisopos estériles

-Tubos Falcon de 50 mL

-Vórtex

5.3.2. Ensayos de adhesión inicial en una superficie abiótica

-MRS broth

- Sabouraud broth
- Tubos Falcon de 50 mL
- Placas de 6 pocillos
- PBS estéril
- Porta y cubre objetos
- Cajas Petri
- Cristal violeta

5.4. Contaje de células adheridas

5.4.1. Observación en el microscopio

- Microscopio OLYMPUS CX22LED
- Cámara AmScope Digital Camera MU633-FL
- AmScope versión x64

5.4.2. Determinación de porcentajes de adherencia y desplazamiento

- Microsoft Excel

5.5. Análisis estadístico

- Software Estadístico Minitab 17

6. MÉTODOS

6.1. Obtención de un cepario

Se utilizó las muestras de secreción vaginal procesadas en el proyecto de Microbiota Vaginal. El total de voluntarias de este proyecto fue de 518, con la obtención de 438 muestras completas y validadas a partir de las cuales se aisló diferentes microorganismos. De dicho proyecto se utilizó las siguientes cepas de *Lactobacillus gasseri* previamente secuenciadas: *L. gasseri* H59.2, *L. gasseri* JCM1131, *L. gasseri* IMAUFB14; además de

dos cepas de *C. albicans*, una aislada de una paciente que presentaba infección y una aislada de la microbiota normal. También se utilizó una *Candida albicans* ATCC® 10231™, como referencia para el estudio. Una vez escogidas las diferentes cepas, se realizó crioviales en el medio BHI + glicerol 15% y se las almacenó a -80°C. De cada cepa se obtuvo 3 crioviales.

6.2. Curvas de calibración

Como paso previo para realizar los ensayos de adhesión que permiten observar la posible actividad probiótica de los lactobacilos, se realizó curvas de calibración. Esto fue con el objetivo de determinar la densidad óptica (OD) a la cual se obtenía un número determinado de UFC/mL, dado que este valor es comparable al que se encuentra presente en personas con una infección vaginal o en ausencia de la misma. Se realizó las curvas de cada cepa de *L. gasseri* y *C. albicans*.

6.2.1. Medición de OD

Para cada curva de calibración se cultivó una cepa de *Lactobacillus gasseri* durante 24h (36 o 48horas dependiendo de la cepa) en MRS agar a 37°C y en condiciones microaerófilas. En el caso de *Candida albicans* se cultivó 18h (24horas dependiendo de la cepa) en Sabouraud agar a 37°C y condiciones aerobias. Una vez transcurrido el tiempo de cultivo, se tomó con un hisopo estéril una cantidad de las colonias obtenidas en 1mL de PBS.

El tubo con una cantidad concentrada de microorganismos se denomina *solución madre*, a partir de la cual se realizó diluciones y se midió la absorbancia de cada una de ellas. Las mediciones utilizan como blanco PBS estéril, recién preparado y sin bacterias. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 600nm tanto para *Lactobacillus gasseri* como para *Candida albicans* (Ribeiro et. al, 2016), y se buscó obtener soluciones con

valores de OD de 0.100, 0.200, 0.300, 0.400, 0.500, 0.600, 0.700, 0.800, 0.900 (valores aproximados), debido a que la sensibilidad del espectrofotómetro es estable solamente en el rango de mediciones de 0.100-1.00.

Los valores de absorbancia se colocaron en el eje Y de la curva de calibración, mientras que para obtener los datos del eje X se sembró las diluciones con el fin de obtener valores de UFC/mL. Sin embargo, si se siembra directamente la solución se obtiene una cantidad de colonias incontable. Por eso se realizó diluciones sucesivas de 1:10 hasta llegar a 1:10E+09 de cada una y se las sembró mediante el método de tres gotas.

6.2.2. Método de las tres gotas

De cada dilución se colocó tres gotas (Machado et al., 2013; Mytilinaios et al., 2012; Naghili et al., 2013) (10µL en cada gota) en una placa de MRS agar en el caso de *L. gasseri* y Sabouraud en el caso de *C. albicans*. Después, se colocó la placa de forma vertical en un ángulo de 45° para permitir que las gotas se deslicen a lo largo del medio sin tocar las paredes, sin permitir que las gotas no se toquen entre sí o con las paredes de la placa. Se cultivó *L. gasseri* durante 36-48h dependiendo de la cepa en MRS agar, a 37°C y en condiciones microaerofílicas. En el caso de *C. albicans* se cultivó durante 24h en Sabouraud agar, a 37°C y en condiciones aerobias. Finalmente, se realizó un conteo del crecimiento de colonias en cada gota, el resultado se obtiene por un promedio y el valor de UFC/mL se determinó mediante la fórmula:

$$UFC/mL = \frac{\text{promedio 3 gotas} \times 100}{\text{dilución inversa}}$$

Para evitar errores, se tomó en cuenta el contaje de colonias de la solución diluida que presentase un número entre 10 a 100 de UFC en cada gota, debido a que números

mayores o menores a esto no son confiables. Este valor se colocó en el eje X de la curva de calibración.

6.2.3. Gráfica de la curva

Con los datos obtenidos se realizó la curva de calibración (mínimo con 3 a 5 puntos), con el número de UFC/mL en el eje x y la absorbancia (a longitud de onda: 600 nm para ambos microorganismos) en el eje y. Los ensayos de la curva de calibración fueron concluidos cuando se observó que el coeficiente de correlación (valor de R^2) fuera de 0,99 para verificar el ajuste del modelo. La ecuación obtenida se observa en forma de $y = mx+b$, donde se debe despejar x para conocer el número de UFC/mL de acuerdo a la absorbancia de una dilución. Se realizó los ensayos por triplicado para determinar la ecuación final de cada cepa que se utilizó posteriormente en los ensayos de adhesión.

6.3. Ensayos de adhesión

6.3.1. Preparación de las cepas y condiciones de cultivo

Previo a cada ensayo se cultivó *L. gasseri* en MRS agar en condiciones microaerófilas a 37°C por 36-48 horas dependiendo de la cepa; mientras que *C. albicans* se cultivó en Sabouraud agar en condiciones aerobias a 37°C por 24 horas (Ribeiro et al., 2016; Vilela et al., 2015). Una vez transcurrido este tiempo, se tomó las colonias de cada placa con un hisopo estéril, se suspendió en PBS estéril y se midió la absorbancia. Para ambos microorganismos se obtuvo tres soluciones con diferentes concentraciones: alta (1E+09 UFC/mL), intermedia (1E+07 UFC/mL), y baja (1E+03 UFC/mL) (Machado et al., 2013; Ribeiro et al., 2016; Seneviratne et al., 2016; Vilela et al., 2015; Ceresa et al., 2015; Matsubara et al., 2016). Se recolectó las bacterias por centrifugación a 2000g durante 10 minutos y se descartó el medio (Ribeiro et al., 2016; Seneviratne et al., 2016; Vilela et al.,

2015). Finalmente, se resuspendió el pellet en MRS broth en el caso de *L. gasseri* y en Sabouraud broth en el caso de *C. albicans*.

La concentración se determinó por espectrofotometría longitud de onda (λ) = 600nm para ambos microorganismos (Vilela et al., 2015). Y se ajustó la absorbancia de acuerdo a la curva de calibración para cada uno. En cada ensayo experimental, cada concentración en estudio se realizó en duplicado para cada microorganismo, y después los ensayos experimentales fueron realizados por triplicado. En todos los ensayos de adhesión inicial se utilizó controles de *L. gasseri* sin la presencia de *C. albicans* y de *C. albicans* sin la presencia de *L. gasseri*.

6.3.2. Ensayos de adhesión inicial en una superficie abiótica

Los microorganismos se colocaron en las placas de seis pocillos como se observa en la Figura 1. Se utilizó una superficie abiótica de vidrio estéril (cubreobjetos) para evaluar la adherencia de *L. gasseri* y de *C. albicans*, consecuentemente se colocó un cubreobjetos dentro de cada pocillo de la placa de 6 pocillos. Después se colocó 2mL de la suspensión de *L. gasseri* con la concentración deseada en cada pocillo. Se incubó a 37°C, 120rpm durante 4 horas (Machado et al., 2013; Nishiyama et al., 2014). Esto permitió la adherencia de los lactobacilos. En cada muestra se colocó una concentración de lactobacilos *versus* una concentración de levaduras, excepto para los controles.

Para determinar el desplazamiento de *L. gasseri* que provoca *C. albicans* y su inhibición en la adhesión inicial se descartó la suspensión previa de *L. gasseri* en la solución MRS de cada pocillo y se realizó gentilmente un lavado con 1mL de PBS (Chauvière et al., 1992). Posteriormente, se colocó 2mL de la suspensión de *C. albicans* en cada pocillo con las diferentes concentraciones preestablecidas y se incubó a 37°C, 120rpm

durante 30 minutos. Finalmente, se descartó nuevamente la suspensión de *C. albicans* presente en cada pocillo y realizó amablemente un último lavado con PBS. Se colocó los cubreobjetos sobre placas portaobjetos, se dejó secar y se realizó una tinción de los cubreobjetos con cristal violeta durante 1 minuto para su posterior contaje a través de la visualización microscópica (Weerasekera et al., 2016).

6.4. Contaje de células adheridas

6.4.1. Observación en el microscopio

De cada placa se observó en el microscopio OLYMPUS CX22LED 15 campos al azar (Chauvière et al., 1992; Machado et al., 2013). Se tomó una fotografía por cada campo, mediante la cámara AmScope Digital Camera MU633-FL en el programa AmScope versión x64, y se realizó el contaje de *L. gasseri* y *C. albicans*. Para obtener el número de células sobre el área total de la superficie abiótica, se tomó en cuenta el área de la fotografía ($12880\mu\text{m}^2$) y el área del cubreobjetos ($4.84\text{E}+08\mu\text{m}^2$ o 4.84cm^2). A partir de estos valores, se obtuvo el área real de cada contaje ($2.66\text{E}-05\mu\text{m}^2$).

6.4.2. Determinación de porcentajes de adherencia y desplazamiento

Una vez obtenidos los datos de cada campo, se realizó un promedio y se determinó la desviación estándar. De igual manera, para determinar el porcentaje de adherencia de cada cepa se tomó como 100% el valor obtenido de los controles (ver Figura 1 en anexos), tanto de *L. gasseri* como de *C. albicans*. En el caso del porcentaje de adherencia de *L. gasseri*, se restó el valor obtenido de cada muestra enfrentada a la presencia de *C. albicans* en diferentes concentraciones, mientras que el valor del porcentaje de desplazamiento se obtuvo de todo el resto de células que fueron desplazadas de la superficie a causa de la

presencia de la levadura. Se realizó el mismo proceso para obtener los porcentajes de adherencia de *C. albicans*.

6.5. Análisis estadístico

Se analizó los datos obtenidos mediante el programa Minitab 17 Statistical Software. Se comparó los datos mediante One-Way ANOVA para determinar si existía una diferencia significativa ($P < 0,05$) entre la adherencia de cada cepa de *L. gasseri* frente a las diferentes cepas de *C. albicans*. Después se complementó el análisis con el test de Tukey (95% de confianza), el cual permitió determinar cuál de las cepas *L. gasseri* era mejor al momento de evitar su desplazamiento de la superficie abiótica al enfrentarse a la presencia *C. albicans*.

7. RESULTADOS

7.1. Curvas de calibración

Las Figuras 2-7 muestran las rectas obtenidas de la curva de crecimiento para cada una de las cepas analizadas, tanto de *L. gasseri* como de *C. albicans*. De igual manera, la Tabla 1 muestra un resumen de las ecuaciones obtenidas y que fueron utilizadas para obtener las suspensiones de microorganismos utilizadas en los ensayos de adhesión inicial. Todas las ecuaciones se basan en experimentos triplicados con cada concentración en duplicado, siendo seleccionadas solo las rectas de la curva de crecimiento con un coeficiente de correlación (valor de R^2) superior a 0,99 (ver Tabla 1 en anexos).

7.2. Ensayos de adhesión inicial

Se inició los ensayos de adhesión con tres concentraciones o inóculos diferentes (alto: $1E+09$ UFC/mL, intermedio: $1E+07$ UFC/mL y bajo: $1E+03$ UFC/mL) para cada cepa analizada. Durante los ensayos preliminares (ver Tablas 2-7 en anexos), se realizó un One-

Way ANOVA ($P < 0,05$) y un test de Tukey entre los resultados obtenidos (#células/área) de las tres concentraciones de la cepa *L. gasseri* IMAUFB014 *versus* las tres concentraciones de cada cepa de *C. albicans* (*C. albicans* ATCC® 10231™; *C. albicans* candidiasis; *C. albicans* microbiota normal), determinándose que los inóculos intermedios no presentaban una adhesión inicial diferente a los inóculos bajos, en términos de significancia estadística con un valor $P = 0.789$ en el análisis de los valores obtenidos por los inóculos intermedio y bajo de *L. gasseri*. Por esta razón, para los siguientes ensayos se eliminó el inóculo intermedio y se realizó ensayos únicamente con los inóculos alto y bajo de las diferentes cepas de *L. gasseri* (*L. gasseri* JCM1131 y *L. gasseri* H59.2) frente a las diferentes cepas de *C. albicans*. De igual manera, el análisis de porcentaje de adherencia de los microorganismos se realizó teniendo en cuenta únicamente dichas concentraciones, debido a que no hubiera sido útil realizar también una comparación con el inóculo intermedio.

Las Tablas 2-17 muestran los resultados obtenidos en términos de número de células adheridas en un área y también lo que esto significa en cuanto al porcentaje de adherencia de *L. gasseri* y *C. albicans*. El porcentaje de adherencia de *L. gasseri* representa las células que permanecieron adheridas a la superficie abiótica una vez añadida la levadura al medio, por lo que el valor restante se denomina *desplazamiento* comparado con su respectivo control (adherencia total de *L. gasseri* sin la adición del inóculo de *C. albicans*). En cuanto al porcentaje de adherencia de *C. albicans*, se refiere a la cantidad de células que lograron adherirse a la superficie abiótica a pesar de la presencia previa de lactobacilos, por lo cual el valor restante (que no consiguió adherirse) se denomina *inhibición* comparado con su respectivo control (adherencia total de *C. albicans* sin la adición previa del inóculo de *L. gasseri*).

Los ensayos se realizaron con dos enfoques diferentes: la patogenicidad de las diferentes cepas de *C. albicans* reflejada en su capacidad de adherencia a una superficie abiótica y la actividad probiótica de las cepas de *L. gasseri* reflejada en la capacidad de inhibir la adherencia de *C. albicans* a la superficie abiótica. Por lo tanto, el análisis se muestra desde estos dos aspectos. En las figuras 19-23 se observan ejemplos de las fotografías tomadas de cada ensayo.

7.2.1. *L. gasseri* IMAUFB014

7.2.1.1. Inhibición de la adhesión de las cepas de C. albicans por L. gasseri IMAUFB014

Al comparar la inhibición de las cepas de *C. albicans* en su inóculo bajo (1E+03 UFC/mL), se observa que no existe diferencia significativa ($P > 0.05$), al igual que para el inóculo alto (1E+09 UFC/mL). Por otro lado, al comparar la inhibición de *C. albicans* entre los inóculos alto (1E+09 UFC/mL) y bajo (1E+03 UFC/mL) por medio de One-Way ANOVA se determinó que existía diferencia significativa ($P < 0.05$), por lo que se realizó el test de Tukey, el cual determinó que el inóculo alto presentaba una menor inhibición que el inóculo bajo frente a las diferentes cepas de *L. gasseri* (ver Figura 16).

7.2.1.2. Desplazamiento de L. gasseri IMAUFB014 por varias cepas de C. albicans

Al comparar el desplazamiento de *L. gasseri* IMAUFB014 en su inóculo bajo (1E+03 UFC/mL), se observa que no existe diferencia significativa ($P > 0.05$) entre las tres cepas de *C. albicans*. En cuanto al inóculo alto (1E+09 UFC/mL), de igual manera se observó que no existe diferencia significativa ($P > 0.05$) entre el desplazamiento de *L. gasseri* IMAUFB014 que generan las tres cepas de *C. albicans*. Por otro lado, al comparar el desplazamiento de *L. gasseri* IMAUFB014 entre los inóculos alto (1E+09 UFC/mL) y bajo

(1E+03 UFC/mL) por medio de One-Way ANOVA se determinó que existía diferencia significativa ($P < 0.05$), por lo que se realizó el test de Tukey, el cual determinó que el inóculo alto presentaba un menor desplazamiento de *L. gasseri* IMAUFB014 que el inóculo bajo (ver Figura 13).

7.2.2. *L. gasseri* JCM1131

7.2.2.1. Inhibición de la adhesión de las cepas de C. albicans por L. gasseri JCM1131

Al comparar la inhibición de las cepas de *C. albicans* en su inóculo bajo (1E+03 UFC/mL), se observa que no existe diferencia significativa ($P > 0.05$), al igual que para el inóculo alto (1E+09 UFC/mL). Por otro lado, al comparar la inhibición de *C. albicans* entre los inóculos alto (1E+09 UFC/mL) y bajo (1E+03 UFC/mL) por medio de One-Way ANOVA se determinó que existía diferencia significativa ($P < 0.05$), por lo que se realizó el test de Tukey, el cual determinó que el inóculo alto presentaba una menor inhibición que el inóculo bajo (ver Figura 17).

7.2.2.2. Desplazamiento de L. gasseri JCM1131 por varias cepas de C. albicans

Al comparar el desplazamiento de *L. gasseri* JCM1131 en su inóculo bajo (1E+03 UFC/mL), se observa que no existe diferencia significativa ($P > 0.05$) entre las tres cepas de *C. albicans*. En cuanto al inóculo alto (1E+09 UFC/mL), se observa un valor $P = 0.043$ al realizar un One-Way ANOVA. Este valor es ligeramente menor a 0.05, por lo que se realizó también un test de Tukey. La cepa de *C. albicans*, que desplazó en menor medida a *L. gasseri* JCM1131 fue la obtenida de la microbiota normal, mientras que la que causó mayor desplazamiento fue la aislada de una infección. Sin embargo, el test de Tukey

agrupó a todas las cepas en un solo grupo, por lo que no existe diferencia significativa entre el desplazamiento que causan las diferentes cepas.

Por otro lado, al comparar el desplazamiento de *L. gasseri* JCM1131 entre los inóculos alto (1E+09 UFC/mL) y bajo (1E+03 UFC/mL) por medio de One-Way ANOVA se determinó que existía diferencia significativa ($P < 0.05$), por lo que se realizó el test de Tukey, el cual determinó que el inóculo alto presentaba un menor desplazamiento que el inóculo bajo (ver Figura 14).

7.2.3. *L. gasseri* H59.2

7.2.3.1. Inhibición de la adhesión de las cepas de C. albicans por L. gasseri H59.2

Al comparar la inhibición de las cepas de *C. albicans* en su inóculo bajo (1E+03 UFC/mL), se observa que no existe diferencia significativa ($P > 0.05$), al igual que para el inóculo alto (1E+09 UFC/mL). Por otro lado, al comparar la inhibición de *C. albicans* entre los inóculos alto (1E+09 UFC/mL) y bajo (1E+03 UFC/mL) por medio de One-Way ANOVA se determinó que existía diferencia significativa ($P < 0.05$), por lo que se realizó el test de Tukey, el cual determinó que el inóculo alto presentaba una menor inhibición que el inóculo bajo (ver Figura 18).

7.2.3.2. Desplazamiento de L. gasseri H59.2 por varias cepas de C. albicans

Al comparar el desplazamiento de *L. gasseri* H59.2 en su inóculo bajo (1E+03 UFC/mL), se observa que no existe diferencia significativa ($P > 0.05$) entre las tres cepas de *C. albicans*. En cuanto al inóculo alto (1E+09 UFC/mL), de igual manera se observó que no existe diferencia significativa ($P > 0.05$) entre el desplazamiento que generan las tres cepas de *C. albicans*. Por otro lado, al comparar el desplazamiento de *L. gasseri* H59.2

entre los inóculos alto ($1E+09$ UFC/mL) y bajo ($1E+03$ UFC/mL) por medio de One-Way ANOVA se determinó que existía diferencia significativa ($P < 0.05$), por lo que se realizó el test de Tukey, el cual determinó que el inóculo alto presentaba un menor desplazamiento que el inóculo bajo (ver Figura 15).

7.3. Actividad probiótica de *L. gasseri*

El inóculo bajo ($1E+03$ UFC/mL) de *L. gasseri* presentó una gran variabilidad en la adherencia a la superficie abiótica, mientras que el inóculo alto ($1E+09$ UFC/mL) fue más estable. El análisis de la adherencia de *L. gasseri* permite determinar cuál cepa fue más exitosa en evitar su desplazamiento de la superficie a la que estaba adherida antes de que se añadiera *C. albicans* al ensayo de adhesión inicial. Esto indica únicamente la capacidad de *L. gasseri* de permanecer adheridos, pero no de inhibir la adherencia de *C. albicans*.

En la Figura 9 se muestra los porcentajes de adherencia de las diferentes cepas de *L. gasseri* frente a las cepas de *C. albicans*, donde se observa que los porcentajes no varían mucho cuando entre el porcentaje de desplazamiento ocasionado por un inóculo alto ($1E+09$ UFC/mL) de *C. albicans*. Esto indica que cuando *C. albicans* se encuentra en un número alrededor de $1E+09$ UFC/mL es exitosa en desplazar cualquier cepa estudiada de *L. gasseri* de su nicho, ya sea que este se encuentre en un inóculo alto ($1E+09$ UFC/mL) o bajo ($1E+03$ UFC/mL), ventaja que le permite causar infecciones en el epitelio vaginal.

El siguiente punto de análisis se refiere a determinar si existe una cepa de *L. gasseri* capaz de evitar su desplazamiento en mayor medida que las demás. Para esto, se realizó un One-Way ANOVA ($P < 0,05$) que estableció que no todas las medias eran estadísticamente iguales. Sin embargo, este análisis muestra que hay diferencias pero no señala en dónde, para lo cual se complementó con un test de Tukey. El test de Tukey agrupa los datos y muestra la diferencia significativa entre los mismos. Así, se observó que *L. gasseri*

IMAUFB014 y *L. gasseri* H59.2 no son significativamente diferentes, pero *L. gasseri* JCM1131 sí, tanto en el análisis del inóculo bajo ($1E+03$ UFC/mL) como del inóculo alto ($1E+09$ UFC/mL). En las Figuras 11 y 12 se observa que *L. gasseri* JCM1131 es la cepa más exitosa en evitar su desplazamiento de la superficie abiótica cuando se añade *C. albicans* al medio.

En cuanto a *C. albicans*, lo primero que se debe mencionar es que se utilizó una cepa *C. albicans* ATCC® 10231™ como referencia para el estudio, una *C. albicans* aislada de una paciente con vaginitis severa y una *C. albicans* aislada de la microbiota normal, para realizar comparaciones en términos de capacidad de adherencia y desplazamiento de *L. gasseri*. En la Figura 7 se observa como los porcentajes de adherencia de *C. albicans* de referencia y de infección siguen un patrón similar, mientras que los porcentajes de adherencia son menores para la cepa de *C. albicans* aislada de la microbiota normal.

Al igual que para *L. gasseri*, se realizó un One-Way ANOVA ($P < 0.05$) y un test de Tukey. Para el inóculo bajo ($1E+03$ UFC/mL), se observa que la cepa con mayor inhibición en la adherencia a la superficie abiótica fue la de *C. albicans* aislada de la microbiota normal (ver Tabla 18). Mientras que, para el inóculo alto ($1E+09$ UFC/mL), los valores se agrupan de manera aleatoria indicando que cuando *C. albicans* se encuentra en una concentración alta, incluso la cepa aislada de la microbiota normal es capaz de desplazar a *L. gasseri* (ver Tabla 19).

8. DISCUSIÓN

El análisis de los resultados se realiza desde dos perspectivas, al igual que la sección anterior, específicamente, la adhesión de *C. albicans* y la adhesión de *L. gasseri*. Para el caso de *C. albicans*, el primer punto de discusión es la similitud entre la cepa de *C.*

albicans de referencia y la cepa aislada de una paciente con infección. Se observa que el comportamiento de estas es similar entre si y diferente a la levadura aislada de la microbiota normal, excepto cuando se analiza el inóculo alto (1E+09 UFC/mL). Esto se debe a que *C. albicans* ATCC® 10231™ se trata de una cepa que se utiliza en estudios de formación de biofilms, resistencia a antifúngicos y patogenicidad (Andrade et al., 2013; Leal et al., 2015; Pawar, Kanyalkar, & Srivastava, 2010; Sangalli et al., 2018; Zore et al., 2011). Esta cepa fue aislada de una muestra de un hombre con broncomicosis (ATCC, 2016). Por lo tanto, cuenta con las características que se esperan de una cepa altamente virulenta, comparada a la cepa aislada de una muestra de secreción vaginal diagnosticada con infección.

Ahora, es importante recordar que normalmente *C. albicans* forma parte de la microbiota comensal de los seres humanos, sin embargo puede causar infecciones superficiales e incluso infecciones sistémicas (Mayer et al., 2013). Entonces, se debe discutir respecto a los mecanismos que hacen que una cepa deje de ser comensal y empiece a ser virulenta. Estos mecanismos pueden ser factores de virulencia como la transición morfológica entre levaduras y formación de hifas, expresión de adhesinas en la superficie celular, secreción de enzimas hidrolíticas, o atributos de fitness como adaptaciones a la fluctuación del pH del ambiente, flexibilidad metabólica, sistemas de adquisición de nutrientes fuertes y una maquinaria robusta para la respuesta frente al estrés (Mayer et al., 2013). Además, *C. albicans* tiene la capacidad de interactuar con otros patógenos oportunistas, lo cual le permite adherirse a superficies como primer paso para formar biofilms mono o polimicrobianos (Nett et al., 2015). En ese estudio se analizó la formación de biofilms debido a su importancia clínica, tanto por su capacidad de causar infecciones

especialmente en individuos inmunocomprometidos como por el incremento de reportes de implementos médicos colonizados por biofilms de *Candida* sp. (Zore et al., 2011).

La capacidad de formar biofilms en una superficie mucosa permite a *C. albicans* causar infecciones crónicas, debido a la baja susceptibilidad que las células dentro de un biofilm presentan frente a una respuesta inmunitaria celular y a los antifúngicos (De Freitas et al., 2018), además de que dichos biofilms pueden estar formados por más de una especie (Olson, Jayaraman, & Kao, 2018). El proceso de formación de biofilm se da tanto en superficies bióticas como abióticas, y empieza con la adherencia de las células en forma de levaduras al sustrato, continúa con su proliferación, luego la formación de hifas en la parte superior del biofilm, acumulación de material de la matriz extracelular y finalmente la dispersión de las células en forma de levaduras (Mayer et al., 2013). De esta manera, un inóculo bajo de *C. albicans* puede no contar con las características necesarias para empezar a formar un biofilm, pero si se aumenta su concentración y las levaduras encuentran una superficie a la que adherirse, se empieza su capacidad de formar biofilms en el dicho espacio.

La virulencia de *C. albicans* explicada en los párrafos anteriores concuerda con los resultados obtenidos, puesto que se observó la amplia capacidad de las diferentes cepas de *C. albicans* para adherirse a una superficie, en este caso abiótica (vidrio). Esto, aún con la presencia previa de *L. gasseri*, un microorganismo probiótico que tiene factores que en algunos casos puede inhibir la adherencia de *Candida* sp. De igual manera, dado que no hubo diferencia significativa entre las diferentes cepas de *C. albicans* al momento de adherirse a la superficie, se muestra como una cepa aislada de la microbiota normal puede empezar un proceso eficiente de adhesión inicial y simultáneamente desplazar un

lactobacilo probiótico, si se coloca en un inóculo alto, aunque no en la misma medida que una cepa de *C. albicans* virulenta.

Además de la adhesión inicial, existen otros factores que promueven la patogenicidad de *C. albicans* (Mayer et al., 2013), los cuales no fueron analizados en este estudio y se plantea como una proyección futura. En la mayoría de los casos la adherencia a superficies abióticas presenta una idea general de la forma en que se comportarían los microorganismos de estudio frente a una superficie biótica. Sin embargo, los ensayos de adhesión inicial plantean una buena base para el inicio de la investigación de la actividad probiótica de diferentes *Lactobacillus* sp. frente a *Candida* sp. La continuación del análisis sería en líneas celulares y luego en modelos animales. Alternativamente, la evaluación de productos antimicrobianos que pueden ser liberados por las respectivas especies de lactobacilos frente a diferentes patógenos oportunistas. Por último, dado que no se observó una diferencia significativa entre las diferentes cepas de *C. albicans* al mismo inóculo (UFC/mL) existen otros factores que pueden ser tomados en cuenta para el futuro.

A continuación se presenta el análisis desde la perspectiva probiótica de diferentes cepas de *L. gasseri*. Los inóculos utilizados se basan en que un número bajo de *Lactobacillus* sp. en el epitelio está directamente relacionado a una vaginitis, dado que el nicho de estas bacterias es paulatinamente remplazado por otras (Borgdorff et al., 2014; Martín & Suárez, 2010; Petrova et al., 2015). Mientras que, el inóculo elevado de *Lactobacillus* sp. simula el epitelio vaginal en condiciones saludables y apto para inhibir la adherencia inicial de *Candida* sp. A través del análisis microscópico de muestras vaginales se puede observar como el decrecimiento de la población de *Lactobacillus* sp. está relacionado con el desarrollo de una posible infección (Petrova et al., 2015).

El primer paso de *C. albicans* en la formación de biofilms es la adherencia a una superficie biótica o abiótica (Gulati & Nobile, 2016), por eso, se busca analizar la capacidad de *L. gasseri* de inhibir esta adhesión inicial para prevenir la posterior formación de biofilms. Los mecanismos que se relacionan a la colonización y adhesión en un epitelio son amplios en cuanto a patógenos (Leccese et al., 2014). Algunos de estos mecanismos son: mediante proteínas de superficie, una región terminal-C hidrofóbica o la presencia de pili; sin embargo, el estudio de dichos mecanismos en relación a microorganismos beneficiosos es menos amplio (Leccese et al., 2014). En *Lactobacillus* sp. la capacidad de proteger un epitelio se otorga a diferentes propiedades del mismo, como adhesión a la mucina que forma parte de la mucosidad que recubre el epitelio vaginal (Leccese et al., 2014). Además, existen estudios que buscan inducir la formación de biofilms en lactobacilos, los cuáles tengan propiedades inmunomoduladoras y puedan ser utilizados en la industria (Aoudia et al., 2015; Salas-Jara et al., 2016).

A pesar de que aún existe discrepancia en cuanto al criterio de la funcionalidad de los probióticos, basado en la capacidad de *Lactobacillus* sp. de colonizar el epitelio vaginal, existen estudios donde se observa la capacidad de algunas mezclas de lactobacilos permanecer adheridos al epitelio vaginal después de varias semanas de su aplicación (Strus et al., 2012), aunque esto también se ve implementado cuando se ayuda a controlar el pH del epitelio vaginal, de tal manera que se otorgue un ambiente adecuado para *Lactobacillus* sp. Se ha estudiado la capacidad de diferentes especies de *Lactobacillus* sp. para formar biofilms en diferentes superficies abióticas, esto es importante debido a que un biofilm permanece durante más tiempo adherido a las mucosas que las células platónicas y puede prevenir la adherencia de patógenos (Salas-Jara et al., 2016). Entre las especies que han demostrado ser capaces de formar biofilms se encuentran *L. plantarum*, *L. reuteri* y *L.*

fermentum (Salas-Jara et al., 2016). La inhibición de la adhesión inicial de patógenos no se puede extrapolar entre especies, por lo que es importante realizar estudios de cada lactobacilo para determinar su actividad probiótica intrínseca, primero en cuanto a la adherencia a superficies abióticas y luego en modelos *in vivo* (Salas-Jara et al., 2016).

Dado que *L. gasseri* no forma biofilms en el epitelio vaginal, su actividad probiótica se da mediante otros factores, como su rol de biosurfactante y la liberación de compuestos antimicrobianos. En un estudio se analizó los compuestos liberados y producidos por *L. gasseri* BC9 aislado de una mujer saludable y se determinó su rol en la dispersión de biofilms de *C. albicans* mediante la encapsulación de este compuesto y la posterior liberación paulatina del mismo durante un tiempo adecuado para que actúe contra el patógeno (Abruzzo et al., 2018). Por otro lado, la adherencia de *L. gasseri* al epitelio vaginal es una característica deseada cuando se habla de probióticos, pues esto impide la adherencia de patógenos (Sungur et al., 2017). *L. gasseri* produce un exopolisacárido en grandes cantidades, el cual le permite modular la respuesta inmune y además permite su adherencia a superficies (Sungur et al., 2017). Se trata de un heteropolisacárido formado por monosacáridos, principalmente glucosa pero también fructosa, manosa, arabinosa y maltosa, que permiten la adherencia de *L. gasseri* a las células y modula la respuesta inmune (Sungur et al., 2017). Así, la producción de algunos metabolitos también se agrega a la actividad probiótica de *L. gasseri*. Además, también se encuentra la producción de peróxido de hidrógeno (Selle & Klaenhammer, 2013). Sin embargo, su actividad antimicrobiana también se atribuye a la producción de ciertas bacteriocinas que forman poros en la membrana celular y causan la muerte de otras bacterias gram positivas, así como la generación de ácidos orgánicos que cuando se deprotonan contribuyen a la acidificación intracelular (Selle & Klaenhammer, 2013).

Se ha realizado estudios similares a este, en los que se observa la actividad probiótica de diferentes *Lactobacillus* sp. Por ejemplo, Vilela et al. (2015) realizaron un estudio donde se determinó que la inoculación de *L. acidophilus* ATCC 4356 *in vivo* en el modelo animal *Galleria mellonella*, previa a la infección por *C. albicans* aumenta la tasa de supervivencia de *G. mellonella*, en comparación con los individuos que no fueron inoculados con *L. acidophilus* y fueron infectados exitosamente con *C. albicans*. Esto se debe a que *L. acidophilus* inhibe la filamentación de *C. albicans* y disminuye así su actividad colonizadora e infectiva (Vilela et al., 2015). La cepa analizada en este estudio había sido probada para su actividad probiótica en productos alimenticios fermentados, pero en este caso se analiza la viabilidad de su uso para la inoculación terapéutica del probiótico (Vilela et al., 2015).

Un estudio similar fue realizado por Ribeiro et. al. (2017) donde se evaluó la actividad probiótica de *L. rhamnosus* y sus metabolitos en función de la inhibición de la formación de biofilms de *C. albicans* *in vitro* e *in vivo*. Se realizó RT-qPCR para la amplificación de genes relacionados con la adhesión (Ribeiro, et. al., 2016), dado que la adhesión es el primer paso cuando se trata de la formación de biofilms (Gulati & Nobile, 2016). Mediante la amplificación de los genes relacionados con la adhesión, se observó el decrecimiento en la expresión de estos genes en *C. albicans* cuando se encontraba en presencia del probiótico (Ribeiro et al., 2016). Los ensayos fueron corroborados en el modelo animal *Galleria mellonella*, donde se observó un aumento de la supervivencia de estas larvas cuando se inoculaba el probiótico (Ribeiro et al., 2016).

La Tabla 20 muestra un resumen de los diferentes estudios realizados en cuanto a la adherencia y actividad probiótica de otras especies de *Lactobacillus* sp. frente a diferentes patógenos. Estos estudios muestran los diferentes mecanismos relacionados con la

inhibición de la adhesión de patógenos. En el caso de *L. acidophilus*, se observó la producción de una bacteriocina que tiene efectos bacteriostáticos y bactericidas sobre las células plantónicas por lo que inhibe la formación de biofilms de *Bacillus subtilis* (Sarikhani et al., 2018), Por otro lado, debido a que los métodos anticonceptivos físicos pueden promover las infecciones recurrentes en el epitelio vaginal, se realizó un estudio de *L. acidophilus* y se observó que su actividad no logró inhibir la adherencia de *C. albicans* a un anillo anticonceptivo vaginal (Chassot et al., 2010), por lo que se requiere el estudio de otras cepas para este caso. Para *L. crispatus*, se ha realizado estudios en cuanto a la inhibición de *Gardnerella vaginalis*, determinando que la adherencia previa del lactobacilo a las células reduce la citotoxicidad causada por este patógeno (Castro et al., 2018); además, se ha observado también que la adherencia de *L. crispatus* a la superficie de las células es capaz de bloquear los receptores de Herpes Virus Simple tipo 2, lo cual previene los pasos previos de la infección (Mousavi et al., 2017). Para la inhibición de la adhesión de diferentes especies de *Candida*, se ha observado que *L. rhamnosus* GR-1, *L. reuteri* RC-14, *L. fermentum* MG901 y *L. plantarum* MG989 producen compuestos inhibitorios y sustancias antimicrobianas, además de que son capaces de adherirse a las células y evitar la adherencia de *Candida* sp (Chew et al., 2015; Kang et al., 2018).

En cuanto a *L. gasseri*, se observa su capacidad de adherencia a superficies bióticas como células Vero (Kassaa et al., 2015) o HeLa (Matsuda et al., 2018). La línea celular Vero fue aislada del tejido epitelial del riñón de un adulto saludable *Cercopithecus aethiops* en 1962 en Japón y se ha utilizado para estudios de infectividad, adherencia y actividad de virus (ATCC, 2016). Por otro lado, las células HeLa fueron aisladas del cérvix de una mujer de 31 años con adenocarcinoma, se trata de células epiteliales con la capacidad de ser utilizadas como huésped de transfección y se las ha realizado estudios sobre la infectividad

de virus, proliferación de cáncer e invasión por bacterias (ATCC, 2016). Además de la adherencia, se ha analizado la capacidad de *L. gasseri* para actuar como probiótico si se aplica junto con otras cepas de lactobacilos (Strus et al., 2012). En realidad, la actividad probiótica de este lactobacilo está reconocida por diferentes componentes, como su función de biosurfactante (Abruzzo et al., 2018), así como la producción de compuestos antimicrobianos como peróxido de hidrógeno, bacteriocinas (Selle & Klaenhammer, 2013) y exopolisacárido que le permite adherirse a las células epiteliales (Sungur et al., 2017). Así, para obtener una mejor proyección de la actividad que tendría *L. gasseri* en el epitelio vaginal, se debe hacer estudios más profundos y con un análisis de más parámetros además de las diferentes concentraciones de los inóculos. Y dado de *L. gasseri* JCM1131 fue el que mostró un menor porcentaje de desplazamiento, esta es la cepa para la cual que se debe continuar el estudio de propiedades probióticas contra patógenos oportunistas.

9. CONCLUSIONES

La cepa que presentó un mayor porcentaje de adherencia inicial y un menor desplazamiento frente a diferentes cepas de *C. albicans* fue *L. gasseri* JCM1131. Específicamente, esta cepa de *L. gasseri* alcanzó porcentajes de adhesión de 17% para *C. albicans* ATCC 10231, 86% para *C. albicans* aislada de infección y 16% para *C. albicans* aislada de la microbiota normal, en ensayos de adhesión con inóculo alto de *L. gasseri* y bajo de *C. albicans*. Mientras que, *L. gasseri* IMAUFB014 logró porcentajes de adhesión de 5% para *C. albicans* ATCC 10231, 27% para *C. albicans* aislada de infección y 7% para *C. albicans* aislada de la microbiota normal. Por último, *L. gasseri* H59.2 demostró porcentajes de adhesión de 10% para *C. albicans* ATCC 10231, 10% para *C. albicans* aislada de infección y 19% para *C. albicans* aislada de la microbiota normal. Estos valores

de adhesión inicial por *L. gasseri* IMAUFB014 y por *L. gasseri* H59.2 fueron también obtenidos en los ensayos de adhesión con inóculo alto de *L. gasseri* (1E+09 UFC/mL) y bajo de *C. albicans* (1E+03 UFC/mL), donde los valores obtenidos no fueron significativamente diferentes.

En el caso de las diferentes cepas de *C. albicans*, se observa que el porcentaje de adherencia es menor para la cepa aislada de la microbiota normal (33%) en comparación a la cepa aislada de infección (40%) y a la cepa de referencia ATCC (73%), cuando se trata del inóculo bajo de *C. albicans* (1E+03 UFC/mL) frente a *L. gasseri* JCM1131. En cambio, para los ensayos de adhesión con inóculo alto (1E+09 UFC/mL), el porcentaje de adherencia no fue estadísticamente diferente al enfrentarse a las diferentes cepas de *L. gasseri*. Estos resultados preliminares sugieren que cualquier cepa de *C. albicans* con una concentración elevada puede adherirse a una superficie a pesar de que se encuentre una cepa probiótica de *L. gasseri* previamente adherido.

Finalmente, este estudio marca un punto de partida para futuros análisis en cuanto a la actividad probiótica de *Lactobacillus* sp. aislados de la microbiota vaginal de mujeres ecuatorianas en edad reproductiva frente a diferentes patógenos. Así, en este estudio preliminar, la cepa *L. gasseri* que mostró mayor porcentaje de adherencia frente a *C. albicans* fue el *L. gasseri* JCM1131.

10. RECOMENDACIONES

-Continuar con el análisis de la actividad probiótica de *L. gasseri* JCM1131 mediante ensayos de adhesión *in vivo*.

- Considerar otros parámetros de análisis además del inóculo colocado, como variaciones en el pH, diferentes mecanismos de adherencia y nutrientes que pueden mimetizar el ambiente en el epitelio vaginal.
- Realizar análisis moleculares, como PCR cuantitativo (qPCR), que permitan detectar la expresión de genes relacionados con los mecanismos de colonización de los epitelios tanto para *L. gasseri* como para *C. lbicans*.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los compuestos producidos por las diferentes cepas de *L. gasseri* frente a los cultivos de diferentes patógenos.
- Volver a realizar un screening de los crioviales obtenidos del Proyecto de Secreción Vaginal, para estudiar otras especies de *Lactobacillus* y su actividad probiótica.
- Realizar otros ensayos de adhesión inicial frente a otras especies de *Candida*, como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. krusei*.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A., Lichtman, A. & Pillai, S. (2015). *Immunología celular y molecular*. Sexta Edición. Elsevier. Boston, USA.
- Abruzzo, A., Giordani, B., Parolin, C., Vitali, B., Protti, M., Mercolini, L., ... Luppi, B. (2018). Novel mixed vesicles containing lactobacilli biosurfactant for vaginal delivery of an anti-Candida agent. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 112, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.11.012>
- Achkar, J. M., & Fries, B. C. (2010). Candida infections of the genitourinary tract. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 253–273. <https://doi.org/10.1128/CMR.00076-09>
- Amaretti, A., Nunzio, M., Pompei, A., Raimondi, S., & Rossi, M. (2012). Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria : in vitro and in vivo activities. *Applied*

- Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4241-7>
- Anahtar, M. N., Gootenberg, D. B., Mitchell, C. M., & Kwon, D. S. (2018). Review Cervicovaginal Microbiota and Reproductive Health : The Virtue of Simplicity. *Cell Host and Microbe*, 23(2), 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.01.013>
- Andrade, P. B., Valentao, P., Pinto, E., & Lopes, G. (2013). Antifungal Activity of Phlorotannins against Dermatophytes and Yeasts : Approaches to the Mechanism of Action and Influence on Candida albicans Virulence Factor. *PLoS ONE*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072203>
- Aoudia, N., Rieu, A., Briandet, R., Deschamps, J., Chluba, J., Jegou, G., ... Guzzo, J. (2015). Biofilms of Lactobacillus plantarum and Lactobacillus fermentum: effect on stress responses, antagonistic effects on pathogen growth and immunomodulatory properties. *Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.04.009>
- ATCC. (2016). Products. Recuperado desde https://www.atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms.aspx
- Bermúdez-Humarán, L. G., & Langella, P. (2012). Importance of Commensal and Probiotic Bacteria in Human Health. *Current Immunology Reviews*, 248–253.
- Bertuccini, L., Russo, R., Iosi, F., & Superti, F. (2018). Lactobacilli and lactoferrin: Biotherapeutic effects for vaginal health. *Journal of Functional Foods*, 45, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.03.033>
- Borgdorff, H., Tsvitshivadze, E., Verhelst, R., Marzorati, M., Jurriaans, S., Ndayisaba, G. F., ... van de Wijgert, J. H. H. M. (2014). Lactobacillus-dominated cervicovaginal microbiota associated with reduced HIV/STI prevalence and genital HIV viral load in African women. *The ISME Journal*, 8(9), 1781–93. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.26>

- Burton, J. P., Cadieux, P. A., & Reid, G. (2003). Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic instillation. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(1), 97–101. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.97-101.2003>
- Cassone, A., & Sobel, J. D. (2016). Experimental models of vaginal candidiasis and their relevance to human candidiasis. *Infection and Immunity*, *84*(5), 1255–1261. <https://doi.org/10.1128/IAI.01544-15>
- Castro, J., Paula, A., Elisa, M., & Cerca, N. (2018). Anaerobe *Lactobacillus crispatus* represses vaginolysin expression by BV associated *Gardnerella vaginalis* and reduces cell cytotoxicity. *Anaerobe*, *50*, 60–63. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.01.014>
- Chassot, F., Camacho, D. P., Valéria, E., & Donatti, L. (2010). Can *Lactobacillus acidophilus* influence the adhesion capacity of *Candida albicans* on the combined contraceptive vaginal ring? *Contraception*, *81*(4), 331–335. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2009.12.011>
- Chauvière, G., Coconnier, M. H., Kernéis, S., Fourniat, J., & Servin, a L. (1992). Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Journal of General Microbiology*, *138 Pt 8*(1992), 1689–1696. <https://doi.org/10.1099/00221287-138-8-1689>
- Chew, S. Y., Cheah, Y. K., Seow, H. F., Sandai, D., Thian, L., & Than, L. (2015). In vitro Modulation of Probiotic Bacteria on the Biofilm of *Candida glabrata*. *Anaerobe*. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.05.009>
- De Freitas, L., Kaplum, V., Pereira, D., da Silva, L., Carvalho, M., Taborda, C., ... Ishida, K. (2018). Proanthocyanidin polymeric tannins from *Stryphnodendron adstringens* are effective against fluconazole-resistant *Candida* spp. and treat vaginal candidiasis.

Journal of Ethnopharmacology. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.01.008>

- Del Pozo, L. (2016). Candidiasis asociada a biopelículas | Revista Iberoamericana de Micología. *Revista Iberoamericana de Micología*, 33(3), 176–183. Retrieved from <http://www.elsevier.es/es-revista-revista-iberoamericana-micologia-290-linkresolver-candidiasis-asociada-biopeliculas-S1130140615000571>
- Faria, D. R., Sakita, K. M., Akimoto-gunther, L. S., & Kioshima, É. S. (2017). Cell damage caused by vaginal *Candida albicans* isolates from women with different symptomatology. *Journal of Medical Microbiology*, 66, 1225–1228. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000547>
- Farr, A., Kiss, H., Holzer, I., Husslein, P., Haggmann, M., & Petricevic, L. (2015). Effect of asymptomatic vaginal colonization with *Candida albicans* on pregnancy outcome. *ACTA Obstetrica et Gynecologica*, 94, 989–996. <https://doi.org/10.1111/aogs.12697>
- Gandhi, T. N., Patel, M. G., & Jain, M. R. (2015). Prospective Study of Vaginal Discharge and Prevalence of Vulvovaginal Candidiasis in a Tertiary Care Hospital. *IJCRR*, 7(1), 34–38.
- Ghasemian, A., Eslami, M., Shafiei, M., Najafipour, S., & Rajabi, A. (2018). Probiotics and their increasing importance in human health and infection control. *Reviews in Medical Microbiology*, (August), 1–6. <https://doi.org/10.1097/MRM.0000000000000147>
- Gulati, M., & Nobile, C. J. (2016). *Candida albicans* biofilms : development , regulation , and molecular mechanisms. *Microbes and Infection*, 18(5), 310–321. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.01.002>
- Hyman, R. W., Fukushima, M., Diamond, L., Kumm, J., Linda, C., Davis, R. W., ... Davis, R. W. (2016). Microbes on the human vaginal epithelium. *National Academy of Sciences*, 102(22), 7952–7957.

- Ibarra-Trujillo, C., Villar-Vidal, M., Gaitán-Cepeda, L. A., Pozos-Guillen, A., Mendoza-de Elias, R., & Sánchez-Vargas, L. O. (2012). Ensayo de formación y cuantificación de biopelículas mixtas de *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 29(4), 214–222.
<https://doi.org/10.1016/j.riam.2012.02.003>
- Kaewnopparat, S., Dangmanee, N., Kaewnopparat, N., & Srichana, T. (2013). Anaerobe In vitro probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman. *Anaerobe*, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.04.009>
- Kang, C., Kim, Y., Han, S. H., Kim, J., Paek, N., & So, J. (2018). In vitro probiotic properties of vaginal *Lactobacillus fermentum* MG901 and *Lactobacillus plantarum* MG989 against *Candida albicans*. *European Journal of Obstetrics and Gynecology*.
<https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2018.07.005>
- Kassaa, I. Al, Hober, D., Hamze, M., Caloone, D., Dewilde, A., Chihib, N., & Drider, D. (2015). Vaginal *Lactobacillus gasseri* CMUL57 can inhibit herpes simplex type 2 but not Coxsackievirus B4E2. *Archives of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1101-8>
- Kobatake, E., Nakagawa, H., Seki, T., & Miyazaki, T. (2017). Protective effects and functional mechanisms of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 against oxidative stress. *PLoS ONE*, 1, 1–17. <https://doi.org/doi.org/10.1371/journal.pone.0177106> May
- Kovachev, S. M. (2015). Local Probiotic Therapy for Vaginal *Candida albicans* Infections. *Probiotics & Antimicrobio*, 38–44. <https://doi.org/10.1007/s12602-014-9176-0>
- Leal, R., Luiz, F., Vieira, T., Vila, M., Carlos, J., Mello, P. De, ... Ishida, K. (2015). Proanthocyanidins polymeric tannin from *Stryphnodendron adstringens* are active against *Candida albicans* biofilms. *Complementary & Alternative Medicine*, 1–11.

<https://doi.org/10.1186/s12906-015-0597-4>

Lebeer, S., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. J. (2008). Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(4), 728–764. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00017-08>

Leccese, M., Mendoza, L., Juárez, M., Silva, C., & Nader, M. (2014). Phenotypic surface properties (aggregation , adhesion and biofilm formation) and presence of related genes in beneficial vaginal lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 1761–1772. <https://doi.org/10.1111/jam.12642>

Lee, W.-L., Tsui, K.-H., & Wang, P.-H. (2016). Lactobacillus and health. *Journal of the Chinese Medical Association*, 79(12), 639–641. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2016.05.002>

Machado, A., Jefferson, K. K. ay, & Cerca, N. (2013). Interactions between Lactobacillus crispatus and bacterial vaginosis (BV)-associated bacterial species in initial attachment and biofilm formation. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 12004–12012. <https://doi.org/10.3390/ijms140612004>

Martín, R., & Suárez, J. E. (2010). Biosynthesis and degradation of H₂O₂ by vaginal lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(2), 400–405. <https://doi.org/10.1128/AEM.01631-09>

Matsuda, Y., Cho, O., & Sugita, T. (2018). Culture Supernatants of Lactobacillus gasseri and L . crispatus Inhibit Candida albicans Biofilm Formation and Adhesion to HeLa Cells. *Mycopathologia*, (Vvc). <https://doi.org/10.1007/s11046-018-0259-4>

Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). Candida albicans pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 37–41. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>

Mousavi, E., Makvandi, M., Teimoori, A., Ataei, A., & Ghafari, S. (2017). ScienceDirect

Antiviral effects of *Lactobacillus crispatus* against HSV-2 in mammalian cell lines.

Journal of the Chinese Medical Association, 6, 8–13.

<https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.010>

Mytilinaios, I., Salih, M., Scho, H. K., & Lambert, R. J. W. (2012). Growth curve prediction from optical density data. *International Journal of Food Microbiology*, 154, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.035>

Naghili, H., Tajik, H., Mardani, K., Mehdi, S., Rouhani, R., Ehsani, A., & Zare, P. (2013). Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. *Veterinary Research Forum*, 4(3), 179–183.

Nett, J. E., Zarnowski, R., Cabezas-Olcoz, J., Brooks, E. G., Bernhardt, J., Marchillo, K., ... Andes, D. R. (2015). Host contributions to construction of three device-associated *Candida albicans* biofilms. *Infection and Immunity*, 83(12), 4630–4638. <https://doi.org/10.1128/IAI.00931-15>

Nishiyama, K., Seto, Y., Yoshioka, K., Kakuda, T., Takai, S., Yamamoto, Y., & Mukai, T. (2014). *Lactobacillus gasseri* sbt2055 reduces infection by and colonization of *Campylobacter jejuni*. *PLoS ONE*, 9(9), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108827>

Oelschlaeger, T. A. (2010). International Journal of Medical Microbiology Mechanisms of probiotic actions – A review. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(1), 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.08.005>

Olson, M., Jayaraman, A., & Kao, K. (2018). Relative abundance of *Candida albicans* and *Candida glabrata* in in vitro co-culture biofilms impacts biofilm structure and formation. *Applied and Environmental Microbiology*, (February). <https://doi.org/10.1128/AEM.02769-17>

- Pawar, B., Kanyalkar, M., & Srivastava, S. (2010). Biochimica et Biophysica Acta Search for novel antifungal agents by monitoring fungal metabolites in presence of synthetically designed fl uconazole derivatives using NMR spectroscopy. *BBA - Biomembranes*, 1798(11), 2067–2075. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.06.020>
- Petrova, M. I., Lievens, E., Malik, S., Imholz, N., & Lebeer, S. (2015). Lactobacillus species as biomarkers and agents that can promote various aspects of vaginal health. *Frontiers in Physiology*, 6(MAR), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00081>
- Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G. M., Koenig, S. S. K., McCulle, S. L., ... Forney, L. J. (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 4680–4687. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002611107>
- Ribeiro, F. C., de Barros, P. P., Rossoni, R. D., Junqueira, J. C., & Jorge, A. O. C. (2016). *Lactobacillus rhamnosus* inhibits *Candida albicans* virulence factors *in vitro* and modulates immune system in *Galleria mellonella*. *Journal of Applied Microbiology*, 1–11. <https://doi.org/10.1111/jam.13324>
- Salas-Jara, M., Ilabaca, A., Vega, M., & García, A. (2016). Biofilm Forming Lactobacillus: New Challenges for the Development of Probiotics. *Microorganisms*, 4(4), 35. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4030035>
- Sangalli, J., Gaetti, E., Júnior, J., Roberto, C., Bueno, E., Jacinto, R. C., ... Junior, E. D. (2018). Antimicrobial activity of *Psidium cattleianum* associated with calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*: an *in vitro* study. *Clinical Oral Investigations*, (January).
- Sarikhani, M., Kermanshahi, R. K., Ghadam, P., & Gharavi, S. (2018). The role of probiotic *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 bacteriocin on effect of HBsu on

- planktonic cells and biofilm formation of *Bacillus subtilis*. *Biological Macromolecules*, (2017). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.087>
- Selle, K., & Klaenhammer, T. R. (2013). Genomic and phenotypic evidence for probiotic influences of *Lactobacillus gasseri* on human health. *Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12021>
- Seneviratne, C. J., Samaranayake, L. P., Ohshima, T., Maeda, N., & Jin, L. J. (2016). Identification of antifungal molecules from novel probiotic *Lactobacillus* bacteria for control of *Candida* infection. *Research Fund for the Control of Infectious Diseases*, 22(6), 34–36.
- Strus, M., Chmielarczyk, A., Kochan, P., Adamski, P., Chelmicki, Z., Chelmicki, A., ... Heczko, P. B. (2012). European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology Studies on the effects of probiotic *Lactobacillus* mixture given orally on vaginal and rectal colonization and on parameters of vaginal health in women with intermediate vaginal flora. *European Journal of Obstetrics and Gynecology*, 163(2), 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2012.05.001>
- Sungur, T., Aslim, B., Karaaslan, C., & Aktas, B. (2017). Impact of Exopolysaccharides (EPSs) of *Lactobacillus gasseri* strains isolated from human vagina on cervical tumor cells (HeLa). *Anaerobe*, 47, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.05.013>
- Vilela, S. F. G., Barbosa, J. O., Rossoni, R. D., Santos, J. D., C A Prata, M., Anbider, A. L., ... Junqueira, J. C. (2015). *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 inhibits biofilm formation by *C. albicans* and attenuates the experimental candidiasis in *Galleria mellonella*. *Virulence*, 6(March 2015), 00–00. <https://doi.org/10.4161/21505594.2014.981486>
- Weerasekera, M. M., Wijesinghe, G. K., Jayarathna, T. A., Gunasekara, C. P., Fernando,

- N., Kottegoda, N., & Samaranayake, L. P. (2016). Culture media profoundly affect *Candida Albicans* and *Candida tropicalis* growth, adhesion and biofilm development. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *111*(11), 697–702.
<https://doi.org/10.1590/0074-02760160294>
- Zanni, P., de Souza, P., Negri, M., Nakamura, S. S., Estivalet, T., & Lopes, M. (2017). Virulence factors and genetic variability of vaginal *Candida albicans* isolates from HIV-infected women in the post-highly active antiretroviral era. *Journal of the Sao Paulo Institute of Tropical Medicine*. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1590/S1678-9946201759044> Virulence
- Zhang, Z., Lv, J., Pan, L., & Zhang, Y. (2018). Roles and applications of probiotic *Lactobacillus* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
<https://doi.org/doi.org/10.1007/s00253-018-9217-9>
- Zore, G. B., Thakre, A. D., Jadhav, S., Karuppayil, S. M., & Candida, A.-. (2011). Phytomedicine Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *European Journal of Integrative Medicine*, *18*(13), 1181–1190. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.03.008>
- Zozaya-Hinchliffe, M., Lillis, R., Martin, D. H., & Ferris, M. J. (2010). Quantitative PCR assessments of bacterial species in women with and without bacterial vaginosis. *Journal of Clinical Microbiology*, *48*(5), 1812–1819.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00851-09>

12.TABLAS

Tabla 1. Curvas de calibración de las cepas utilizadas en los ensayos de adhesión

Cepa	Ecuación	R2
<i>L. gasseri</i> JCM1131	$y = 9E-09x + 0.0755$	0.9979
<i>L. gasseri</i> IMAUFB14	$y = 6E-09x + 0.0787$	0.9941
<i>L. gasseri</i> H59.2	$y = 1E-07x + 0.0731$	0.9942
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	$y = 6E-08x + 0.0856$	0.9966
<i>C. albicans</i> Infección	$y = 3E-08x + 0.1858$	0.9913
<i>C. albicans</i> Microbiota Normal	$y = 7E-08x + 0.0521$	0.9993

L. gasseri IMAUFB014

Inhibición de la adhesión de las diferentes cepas de *C. albicans* por parte de *L. gasseri*

IMAUFB014

Tabla 2. Adhesión de *C. albicans* vs *L. gasseri* IMAUFB014 (1E+09 UFC/mL)

	N. células de <i>C. albicans</i> adheridas (control sin <i>L. gasseri</i>)	N. células de <i>C. albicans</i> aderidas	Porcentaje de <i>C. albicans</i> presentes con la adición de <i>L. gasseri</i>
Inóculo alto			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1.95E+06 (±1.86E+05)	1.03E+06 (±9.18E+04)	53% (±0.09)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	2.16E+06 (±1.84E+05)	8.83E+05 (±6.83E+04)	41% (±0.08)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	3.41E+06 (±2.99E+05)	6.86E+05 (5.28E+04)	20% (±0.08)
Inóculo intermedio			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	4.26E+05 (±4.28E+04)	1.32E+05 (±1.04E+04)	31% (±0.08)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	5.05E+05 (±5.20E+04)	9.02E+04 (±7.09E+03)	18% (±0.08)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	4.92E+05 (±4.85E+04)	1.72E+05 (±1.24E+04)	35% (±0.07)
Inóculo bajo			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1.60E+05 (±1.49E+04)	6.39E+04 (±5.31E+03)	40% (±0.08)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	2.30E+05 (±1.70E+04)	6.93E+04 (±1.45E+03)	30% (±0.02)

<i>C. albicans</i> microbiota normal	8.52E+04 (±7.60E+03)	1.92E+04 (±1.45E+03)	23% (±0.08)
---	-------------------------	-------------------------	-------------

La tabla presenta el número de células adheridas (a una superficie abiótica de vidrio) de *C. albicans* de diferentes procedencias sin *L. gasseri* IMAUFB014 y luego el número de células adheridas en presencia previa de *L. gasseri* IMAUFB014, y finalmente el porcentaje de adherencia de *C. albicans*. Se presentan los valores obtenidos al realizar el ensayo con los niveles altos de inóculo de *L. gasseri* IMAUFB014 (1E09 UFC/ml) versus inóculos alto (1E09 UFC/ml), intermedio (1E07 UFC/ml) y bajo (1E03 UFC/ml) de *C. albicans*. Los porcentajes de adherencia de *C. albicans*, se calcularon en función de la cantidad final de levaduras presentes en presencia de los lactobacilos en comparación con el conteo de UFC/ml del control de cada levadura sin la adición de lactobacilos. La desviación estándar se presenta junto a cada valor (±).

Tabla 3. Adhesión de *C. albicans* vs *L. gasseri* IMAUFB014 (1E+07 UFC/mL)

	N. células de <i>C. albicans</i> adheridas (control sin <i>L. gasseri</i>)	N. células de <i>C. albicans</i> adheridas	Porcentaje de <i>C. albicans</i> presentes con la adición de <i>L. gasseri</i>
Inóculo alto			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1.95E+06 (±1.86E+05)	1.12E+06 (±6.25E+04)	58% (±0.06)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	2.16E+06 (±1.84E+05)	1.11E+06 (±1.06E+04)	52% (±0.01)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	3.41E+06 (±2.99E+05)	6.79E+05 (±1.77E-08)	20% (±0.00)
Inóculo intermedio			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	4.26E+05 (±4.28E+04)	2.26E+05 (±1.51E+04)	53% (±0.07)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	5.05E+05 (±5.20E+04)	2.44E+05 (±2.19E+04)	48% (±0.09)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	4.92E+05 (±4.85E+04)	1.24E+05 (±1.26E+04)	25% (±0.10)
Inóculo bajo			

<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1.60E+05 (±1.49E+04)	5.76E+04 (±2.51E+03)	36% (±0.04)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	2.30E+05 (±1.70E+04)	6.18E+04 (±5.21E+03)	27% (±0.08)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	8.52E+04 (±7.60E+03)	6.14E+04 (±1.77E+03)	72% (±0.03)

La tabla presenta el número de células adheridas (a una superficie abiótica) de *C. albicans* de diferentes procedencias sin *L. gasseri* IMAUFB014 y luego el número de células adheridas en presencia previa de *L. gasseri* IMAUFB014, y finalmente el porcentaje de adherencia de *C. albicans*. Se presentan los valores obtenidos al realizar el ensayo con los niveles intermedios de inóculo de *L. gasseri* IMAUFB014 (1E07 UFC/ml), e inóculos alto (1E09 UFC/ml), intermedio (1E07 UFC/ml) y bajo (1E03 UFC/ml) de *C. albicans*. Los porcentajes de adherencia de *C. albicans*, se calcularon en función de la cantidad final de levaduras presentes en presencia de los lactobacilos en comparación con el conteo de UFC/ml de un control de cada levadura sin la adición de lactobacilos. La desviación estándar se presenta junto a cada valor (±).

Tabla 4. Adhesión de *C. albicans* vs *L. gasseri* IMAUFB014 (1E+03 UFC/mL)

	N. células de <i>C. albicans</i> adheridas (control sin <i>L. gasseri</i>)	N. células de <i>C. albicans</i> adheridas	Porcentaje de <i>C. albicans</i> presentes con la adición de <i>L. gasseri</i>
Inóculo alto			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1.95E+06 (±1.86E+05)	9.93E+06 (±6.10E+04)	51% (±0.06)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	2.16E+06 (±1.84E+05)	1.33E+06 (±7.32E+04)	62% (±0.06)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	3.41E+06 (±2.99E+05)	1.71E+06 (±1.40E+05)	50% (±0.08)
Inóculo intermedio			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	4.26E+05 (±4.28E+04)	2.51E+05 (±2.39E+04)	59% (±0.10)
<i>C. albicans</i>	5.05E+05	5.17E+05	102% (±0.06)

candidiasis total	(±5.20E+04)	(±3.01E+04)	
<i>C. albicans</i> microbiota normal	4.92E+05 (±4.85E+04)	4.41E+05 (±2.13E+04)	90% (±0.05)
Inóculo bajo			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1.60E+05 (±1.49E+04)	7.01E+04 (±5.01E+03)	44% (±0.07)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	2.30E+05 (±1.70E+04)	5.43E+04 (±5.21E+03)	24% (±0.10)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	8.52E+04 (±7.60E+03)	6.14E+04 (±1.77E+03)	72% (±0.03)

La tabla presenta el número de células adheridas (a una superficie abiótica) de *C. albicans* de diferentes procedencias sin *L. gasseri* IMAUFB014 y luego el número de células adheridas en presencia previa de *L. gasseri* IMAUFB014, y finalmente el porcentaje de adherencia de *C. albicans*. Se presentan los valores obtenidos al realizar el ensayo con los niveles bajos de inóculo de *L. gasseri* IMAUFB014 (1E03 UFC/ml), e inóculos alto (1E09 UFC/ml), intermedio (1E07 UFC/ml) y bajo (1E03 UFC/ml) de *C. albicans*. Los porcentajes de adherencia de *C. albicans*, se calcularon en función de la cantidad final de levaduras presentes en presencia de los lactobacilos en comparación con el conteo de UFC/ml de un control de cada levadura sin la adición de lactobacilos. La desviación estándar se presenta junto a cada valor (±).

Desplazamiento de *L. gasseri* IMAUFB014 por parte de las diferentes cepas de *C. albicans*

Tabla 5. Adhesión de *L. gasseri* IMAUFB014 (1E+09 UFC/mL) vs *C. albicans*

	N. células de <i>L. gasseri</i> adheridas (control sin <i>C. albicans</i>)	N. células de <i>L. gasseri</i> adheridas	Porcentaje de <i>L. gasseri</i> presentes con la adición de <i>C. albicans</i>
Inóculo alto			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1.34E+06 (±1.45E+05)	3.58E+05 (±3.19E+04)	27% (±0.09)

<i>C. albicans</i> candidiasis total	1.38E+06 (±1.27E+05)	1.39E+05 (±1.77E+03)	10% (±0.01)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	1.34E+06 (±1.45E+05)	2.13E+04 (±1.77E+03)	2% (±0.08)
Inóculo intermedio			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1.34E+06 (±1.45E+05)	4.12E+05 (±2.66E+04)	31% (±0.06)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	1.38E+06 (±1.27E+05)	1.74E+05 (±5.31E+03)	13% (±0.03)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	1.34E+06 (±1.45E+05)	5.59E+04 (±5.21E+03)	4% (±0.09)
Inóculo bajo			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1.34E+06 (±1.45E+05)	7.27E+04 (±4.34E+03)	5% (±0.06)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	1.38E+06 (±1.27E+05)	3.43E+05 (±5.01E+03)	25% (±0.01)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	1.34E+06 (±1.45E+05)	9.10E+04 (±7.65E+03)	7% (±0.08)

La tabla presenta el número de células adheridas (a una superficie abiótica) de *L. gasseri* IMAUFB014 sin la presencia de la levadura *C. albicans*, luego el número de células remanentes después de la adición de la levadura, y finalmente el porcentaje de adherencia de *L. gasseri* IMAUFB014. Se presentan los valores obtenidos al realizar el ensayo con los niveles altos de inóculo de *L. gasseri* (1E09 UFC/ml), e inóculos alto (1E09 UFC/ml), intermedio (1E07 UFC/ml) y bajo (1E03 UFC/ml) de *C. albicans*. Los porcentajes de adherencia de *L. gasseri* IMAUFB014, se calcularon en función de la cantidad final de lactobacilos presentes en presencia de las levaduras en comparación con el conteo de UFC/ml de un control de cada lactobacilo sin la adición de levaduras. La desviación estándar se presenta junto a cada valor (±).

Tabla 6. Adhesión de *L. gasseri* IMAUFB014 (1E+07 UFC/mL) vs *C. albicans*

	N. células de <i>L. gasseri</i> adheridas (control sin <i>C. albicans</i>)	N. células de <i>L. gasseri</i> adheridas	Porcentaje de <i>L. gasseri</i> presentes con la adición de <i>C. albicans</i>
Inóculo alto			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1.54E+05 (±1.50E+04)	1.25E+04 (±8.85E-11)	8% (±0.00)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	1.54.E+05 (±1.50E+04)	1.88E+04 (±1.45E+03)	12% (±0.08)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	1.54.E+05 (±1.50E+04)	4.63E+04 (±5.31E+03)	30% (±0.11)
Inóculo intermedio			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1.54E+05 (±1.50E+04)	2.51E+04 (±3.54E+03)	16% (±0.14)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	1.54.E+05 (±1.50E+04)	3.82E+04 (±3.76E+03)	25% (±0.10)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	1.54.E+05 (±1.50E+04)	4.09E+04 (±2.89E+03)	27% (±0.07)
Inóculo bajo			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1.54E+05 (±1.50E+04)	1.17E+0 (±1.45E+03)	8% (±0.12)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	1.54.E+05 (±1.50E+04)	3.01E+04 (±2.51E+03)	20% (±0.08)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	1.54.E+05 (±1.50E+04)	8.43E+04 (±7.65E+03)	55% (±0.09)

La tabla presenta el número de células adheridas (a una superficie abiótica) de *L. gasseri* IMAUFB014 sin la presencia de la levadura *C. albicans*, luego el número de células remanentes después de la adición de la levadura, y finalmente el porcentaje de adherencia de *L. gasseri* IMAUFB014. Se presentan los valores obtenidos al realizar el ensayo con los niveles intermedios de inóculo de *L. gasseri* (1E07 UFC/ml), e inóculos alto (1E09 UFC/ml), intermedio (1E07 UFC/ml) y bajo (1E03 UFC/ml) de *C. albicans*. Los porcentajes de adherencia de *L. gasseri* IMAUFB014, se calcularon en función de la cantidad final de lactobacilos presentes en presencia de las levaduras en comparación con el

conteo de UFC/ml de un control de cada lactobacilo sin la adición de levaduras. La desviación estándar se presenta junto a cada valor (\pm).

Tabla 7. Adhesión de *L. gasseri* IMAUFB014 (1E+03 UFC/mL) vs *C. albicans*

	N. células de <i>L. gasseri</i> adheridas (control sin <i>C. albicans</i>)	N. células de <i>L. gasseri</i> adheridas	Porcentaje de <i>L. gasseri</i> presentes con la adición de <i>C. albicans</i>
Inóculo alto			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1.48.E+05 ($\pm 1.48E+04$)	5.01E+03 ($\pm 8.85E-11$)	4% (± 0.00)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	1.48.E+05 ($\pm 1.48E+04$)	5.01E+03 ($\pm 7.23E-11$)	3% (± 0.00)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	1.48.E+05 ($\pm 1.48E+04$)	4.09E+04 ($\pm 1.45E+03$)	28% (± 0.04)
Inóculo intermedio			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1.48.E+05 ($\pm 1.48E+04$)	5.01E+03 ($\pm 1.77E-11$)	4% (± 0.00)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	1.48.E+05 ($\pm 1.48E+04$)	7.52E+03 ($\pm 1.28E-12$)	5% (± 0.00)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	1.48.E+05 ($\pm 1.48E+04$)	5.51E+04 ($\pm 3.54E+03$)	37% (± 0.06)
Inóculo bajo			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1.48.E+05 ($\pm 1.48E+04$)	2.25E+04 ($\pm 2.66E+00$)	16% (± 0.00)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	1.48.E+05 ($\pm 1.48E+04$)	8.35E+04 ($\pm 8.05E+03$)	56% (± 0.10)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	1.48.E+05 ($\pm 1.48E+04$)	6.60E+0 ($\pm 1.45E+03$)	45% (± 0.02)

La tabla presenta el número de células adheridas (a una superficie abiótica) de *L. gasseri* IMAUFB014 sin la presencia de la levadura *C. albicans*, luego el número de células remanentes después de la adición de la levadura, y finalmente el porcentaje de adherencia de *L. gasseri* IMAUFB014. Se presentan los valores obtenidos al realizar el ensayo con los niveles bajos de inóculo de *L. gasseri* (1E03 UFC/ml), e inóculos alto (1E09 UFC/ml), intermedio (1E07 UFC/ml) y bajo (1E03 UFC/ml) de *C. albicans*. Los porcentajes de

adherencia de *L. gasseri* IMAUFB014, se calcularon en función de la cantidad final de lactobacilos presentes en presencia de las levaduras en comparación con el conteo de UFC/ml de un control de cada lactobacilo sin la adición de levaduras. La desviación estándar se presenta junto a cada valor (\pm).

***L. gasseri* JCM1131**

Inhibición de la adhesión de las diferentes cepas de *C. albicans* por parte de *L. gasseri* JCM1131

Tabla 8. Adhesión de *C. albicans* vs *L. gasseri* JCM1131 (1E+09 UFC/mL)

	N. células de <i>C. albicans</i> adheridas (control sin <i>L. gasseri</i>)	N. células de <i>C. albicans</i> adheridas	Porcentaje de <i>C. albicans</i> presentes con la adición de <i>L. gasseri</i>
Inóculo alto			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1.95E+06 (\pm 1.86E+05)	5.89E+05 (\pm 2.65E+04)	30% (\pm 0.05)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	2.16E+06 (\pm 1.84E+05)	6.03E+05 (\pm 6.03E+04)	28% (\pm 0.10)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	3.41E+06 (\pm 2.99E+05)	1.67E+06 (\pm 7.13E+04)	30% (\pm 0.04)
Inóculo intermedio			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	4.26E+05 (\pm 4.28E+04)	4.26E+05 (\pm 2.89E+04)	100% (\pm 0.07)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	5.05E+05 (\pm 5.20E+04)	2.05E+05 (\pm 1.47E+04)	40% (\pm 0.07)
Inóculo bajo			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1.60E+05 (\pm 1.49E+04)	5.26E+04 (\pm 4.09E+03)	33% (\pm 0.08)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	2.30E+05 (\pm 1.70E+04)	3.38E+04 (\pm 1.77E+03)	15% (\pm 0.05)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	8.52E+04 (\pm 7.60E+03)	1.88E+04 (\pm 1.45E+03)	22% (\pm 0.08)

La tabla presenta el número de células adheridas (a una superficie abiótica de vidrio) de *C. albicans* de diferentes procedencias sin *L. gasseri* IMAUFB014 y luego el número de

células adheridas en presencia de *L. gasseri* IMAUFB014, y finalmente el porcentaje de adherencia de *C. albicans*. Se presentan los valores obtenidos al realizar el ensayo con los niveles altos de inóculo de *L. gasseri* IMAUFB014 (1E09 UFC/ml) *versus* inóculos alto (1E09 UFC/ml), intermedio (1E07 UFC/ml) y bajo (1E03 UFC/ml) de *C. albicans*. Los porcentajes de adherencia de *C. albicans*, se calcularon en función de la cantidad final de levaduras presentes en presencia de los lactobacilos en comparación con el conteo de UFC/ml del control de cada levadura sin la adición de lactobacilos. La desviación estándar se presenta junto a cada valor (\pm).

Tabla 9. Adhesión de *C. albicans* vs *L. gasseri* JCM1131 (1E+07 UFC/mL)

	N. células de <i>C. albicans</i> adheridas (control sin <i>L. gasseri</i>)	N. células de <i>C. albicans</i> adheridas	Porcentaje de <i>C. albicans</i> presentes con la adición de <i>L. gasseri</i>
Inóculo alto			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1.95E+06 (\pm 1.86E+05)	1.48E+06 (\pm 1.54E+05)	76% (\pm 0.10)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	2.16E+06 (\pm 1.84E+05)	1.18E+06 (\pm 6.00E+04)	55% (\pm 0.05)
Inóculo intermedio			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	4.26E+05 (\pm 4.28E+04)	2.52E+05 (\pm 1.90E+04)	59% (\pm 0.08)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	5.05E+05 (\pm 5.20E+04)	1.71E+05 (\pm 2.56E+04)	34% (\pm 0.15)
Inóculo bajo			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1.60E+05 (\pm 1.49E+04)	7.14E+04 (\pm 5.96E+03)	45% (\pm 0.08)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	2.30E+05 (\pm 1.70E+04)	9.39E+04 (\pm 8.80E+03)	41% (\pm 0.09)

La tabla presenta el número de células adheridas (a una superficie abiótica) de *C. albicans* de diferentes procedencias sin *L. gasseri* IMAUFB014 y luego el número de células adheridas en presencia de *L. gasseri* IMAUFB014, y finalmente el porcentaje de adherencia de *C. albicans*. Se presentan los valores obtenidos al realizar el ensayo con los niveles

intermedios de inóculo de *L. gasseri* IMAUFB014 (1E07 UFC/ml), e inóculos alto (1E09 UFC/ml), intermedio (1E07 UFC/ml) y bajo (1E03 UFC/ml) de *C. albicans*. Los porcentajes de adherencia de *C. albicans*, se calcularon en función de la cantidad final de levaduras presentes en presencia de los lactobacilos en comparación con el conteo de UFC/ml de un control de cada levadura sin la adición de lactobacilos. La desviación estándar se presenta junto a cada valor (\pm).

Tabla 10. Adhesión de *C. albicans* vs *L. gasseri* JCM1131 (1E+03 UFC/mL)

	N. células de <i>C. albicans</i> adheridas (control sin <i>L. gasseri</i>)	N. células de <i>C. albicans</i> adheridas	Porcentaje de <i>C. albicans</i> presentes con la adición de <i>L. gasseri</i>
Inóculo alto			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1.95E+06 (\pm 1.86E+05)	1.10E+06 (\pm 6.04E+04)	57% (\pm 0.05)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	2.16E+06 (\pm 1.84E+05)	1.46E+06 (\pm 1.17E+05)	68% (\pm 0.08)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	3.41E+06 (\pm 2.99E+05)	1.95E+06 (\pm 1.24E+05)	57% (\pm 0.06)
Inóculo intermedio			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	4.26E+05 (\pm 4.28E+04)	3.76E+05 (\pm 3.26E+04)	88% (\pm 0.09)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	5.05E+05 (\pm 5.20E+04)	1.70E+05 (\pm 1.56E+04)	34% (\pm 0.09)
Inóculo bajo			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1.60E+05 (\pm 1.49E+04)	1.16E+05 (\pm 8.05E+03)	73% (\pm 0.07)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	2.30E+05 (\pm 1.70E+04)	9.21E+04 (\pm 6.26E+03)	40% (\pm 0.07)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	8.52E+04 (\pm 7.60E+03)	2.81E+04 (\pm 2.10E+03)	33% (\pm 0.07)

La tabla presenta el número de células adheridas (a una superficie abiótica) de *C. albicans* de diferentes procedencias sin *L. gasseri* IMAUFB014 y luego el número de células adheridas en presencia de *L. gasseri* IMAUFB014, y finalmente el porcentaje de adherencia

de *C. albicans*. Se presentan los valores obtenidos al realizar el ensayo con los niveles bajos de inóculo de *L. gasseri* IMAUFB014 (1E03 UFC/ml), e inóculos alto (1E09 UFC/ml), intermedio (1E07 UFC/ml) y bajo (1E03 UFC/ml) de *C. albicans*. Los porcentajes de adherencia de *C. albicans*, se calcularon en función de la cantidad final de levaduras presentes en presencia de los lactobacilos en comparación con el conteo de UFC/ml de un control de cada levadura sin la adición de lactobacilos. La desviación estándar se presenta junto a cada valor (\pm).

Desplazamiento de *L. gasseri* JCM1131 por parte de las diferentes cepas de *C. albicans*

Tabla 11. Adhesión de *L. gasseri* JCM1131 (1E+09 UFC/mL) vs *C. albicans*

	N. células de <i>L. gasseri</i> adheridas (control sin <i>C. albicans</i>)	N. células de <i>L. gasseri</i> adheridas	Porcentaje de <i>L. gasseri</i> presentes con la adición de <i>C. albicans</i>
Inóculo alto			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	5.54E+06 (\pm 5.62E+05)	5.90E+05 (\pm 5.49E+04)	11% (\pm 0.09)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	5.54E+06 (\pm 5.62E+05)	1.94E+06 (\pm 1.57E+05)	35% (\pm 0.08)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	5.54E+06 (\pm 5.62E+05)	3.82E+05 (\pm 3.98E+04)	7% (\pm 0.10)
Inóculo intermedio			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	5.54E+06 (\pm 5.62E+05)	1.01E+06 (\pm 8.91E+04)	18% (\pm 0.09)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	5.54E+06 (\pm 5.62E+05)	1.20E+06 (\pm 5.81E+04)	22% (\pm 0.05)
Inóculo bajo			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	5.54E+06 (\pm 5.62E+05)	9.33E+05 (\pm 8.67E+04)	17% (\pm 0.09)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	5.54E+06 (\pm 5.62E+05)	4.69E+06 (\pm 4.32E+05)	85% (\pm 0.09)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	5.54E+06 (\pm 5.62E+05)	8.96E+05 (\pm 7.27E+04)	16% (\pm 0.08)

La tabla presenta el número de células adheridas (a una superficie abiótica) de *L. gasseri* JCM1131 sin la presencia de la levadura *C. albicans*, luego el número de células remanentes después de la adición de la levadura, y finalmente el porcentaje de adherencia de *L. gasseri* JCM1131. Se presentan los valores obtenidos al realizar el ensayo con los niveles altos de inóculo de *L. gasseri* (1E09 UFC/ml), e inóculos alto (1E09 UFC/ml), intermedio (1E07 UFC/ml) y bajo (1E03 UFC/ml) de *C. albicans*. Los porcentajes de adherencia de *L. gasseri* JCM1131, se calcularon en función de la cantidad final de lactobacilos presentes en presencia de las levaduras en comparación con el conteo de UFC/ml de un control de cada lactobacilo sin la adición de levaduras. La desviación estándar se presenta junto a cada valor (\pm).

Tabla 12. Adhesión de *L. gasseri* JCM1131 (1E+07 UFC/mL) vs *C. albicans*

	N. células de <i>L. gasseri</i> adheridas (control sin <i>C. albicans</i>)	N. células de <i>L. gasseri</i> adheridas	Porcentaje de <i>L. gasseri</i> presentes con la adición de <i>C. albicans</i>
Inóculo alto			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	5.13.E+05 ($\pm 3.94E+04$)	1.37E+05 ($\pm 8.79E+03$)	27% (± 0.06)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	5.13.E+05 ($\pm 3.94E+04$)	6.64E+04 ($\pm 8.86E+03$)	13% (± 0.13)
Inóculo intermedio			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	5.13.E+05 ($\pm 3.94E+04$)	1.56E+06 ($\pm 1.51E+04$)	30% (± 0.10)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	5.13.E+05 ($\pm 3.94E+04$)	3.87E+05 ($\pm 1.59E+04$)	75% (± 0.04)
Inóculo bajo			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	5.13.E+05 ($\pm 3.94E+04$)	3.30E+05 ($\pm 3.38E+04$)	64% (± 0.10)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	5.13.E+05 ($\pm 3.94E+04$)	4.23E+05 ($\pm 4.27E+04$)	82% (± 0.10)

La tabla presenta el número de células adheridas (a una superficie abiótica) de *L. gasseri* JCM1131 sin la presencia de la levadura *C. albicans*, luego el número de células

remanentes después de la adición de la levadura, y finalmente el porcentaje de adherencia de *L. gasseri* JCM1131. Se presentan los valores obtenidos al realizar el ensayo con los niveles intermedios de inóculo de *L. gasseri* (1E07 UFC/ml), e inóculos alto (1E09 UFC/ml), intermedio (1E07 UFC/ml) y bajo (1E03 UFC/ml) de *C. albicans*. Los porcentajes de adherencia de *L. gasseri* JCM1131, se calcularon en función de la cantidad final de lactobacilos presentes en presencia de las levaduras en comparación con el conteo de UFC/ml de un control de cada lactobacilo sin la adición de levaduras. La desviación estándar se presenta junto a cada valor (\pm).

Tabla 13. Adhesión de *L. gasseri* JCM1131 (1E+03 UFC/mL) vs *C. albicans*

	N. células de <i>L. gasseri</i> adheridas (control sin <i>C. albicans</i>)	N. células de <i>L. gasseri</i> aderidas	Porcentaje de <i>L. gasseri</i> presentes con la adición de <i>C. albicans</i>
Inóculo alto			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	3.27E+05 ($\pm 2.53E+04$)	6.01E+04 ($\pm 3.54E+03$)	18% (± 0.06)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	3.27E+05 ($\pm 2.53E+04$)	2.38E+04 ($\pm 1.77E+03$)	7% (± 0.07)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	3.27E+05 ($\pm 2.53E+04$)	6.14E+04 ($\pm 1.77E+03$)	19% (± 0.03)
Inóculo intermedio			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	3.27E+05 ($\pm 2.53E+04$)	1.61E+05 ($\pm 1.22E+04$)	49% (± 0.08)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	3.27E+05 ($\pm 2.53E+04$)	6.64E+04 ($\pm 5.31E+03$)	20% (± 0.08)
Inóculo bajo			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	3.27E+05 ($\pm 2.53E+04$)	1.27E+05 ($\pm 1.13E+04$)	39% (± 0.09)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	3.27E+05 ($\pm 2.53E+04$)	7.27E+0 ($\pm 3.54E+03$)	22% (± 0.05)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	3.27E+05 ($\pm 2.53E+04$)	6.93E+04 ($\pm 5.21E+03$)	21% (± 0.08)

La tabla presenta el número de células adheridas (a una superficie abiótica) de *L. gasseri* JCM1131 sin la presencia de la levadura *C. albicans*, luego el número de células remanentes después de la adición de la levadura, y finalmente el porcentaje de adherencia de *L. gasseri* JCM1131. Se presentan los valores obtenidos al realizar el ensayo con los niveles bajos de inóculo de *L. gasseri* (1E03 UFC/ml), e inóculos alto (1E09 UFC/ml), intermedio (1E07 UFC/ml) y bajo (1E03 UFC/ml) de *C. albicans*. Los porcentajes de adherencia de *L. gasseri* JCM1131, se calcularon en función de la cantidad final de lactobacilos presentes en presencia de las levaduras en comparación con el conteo de UFC/ml de un control de cada lactobacilo sin la adición de levaduras. La desviación estándar se presenta junto a cada valor (\pm).

L. gasseri H59.2

Inhibición de la adhesión de las diferentes cepas de *C. albicans* por parte de *L. gasseri* H59.2

Tabla 14. Adhesión de *C. albicans* vs *L. gasseri* H59.2 (1E+09 UFC/mL)

	N. células de <i>C. albicans</i> adheridas (control sin <i>L. gasseri</i>)	N. células de <i>C. albicans</i> adheridas	Porcentaje de <i>C. albicans</i> presentes con la adición de <i>L. gasseri</i>
Inóculo alto			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1.95E+06 (\pm 1.86E+05)	1.41E+06 (\pm 1.14E+05)	72% (\pm 0.08)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	2.16E+06 (\pm 1.84E+05)	1.36E+06 (\pm 4.87E+04)	63% (\pm 0.04)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	3.41E+06 (\pm 2.99E+05)	1.10E+06 (\pm 6.74E+04)	32% (\pm 0.06)
Inóculo bajo			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1.60E+05 (\pm 1.49E+04)	6.18E+04 (\pm 6.30E+03)	39% (\pm 0.10)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	2.30E+05 (\pm 1.70E+04)	2.55E+04 (\pm 2.23E+03)	11% (\pm 0.09)

<i>C. albicans</i> microbiota normal	8.52E+04 (±7.60E+03)	2.92E+04 (±2.89E+03)	34% (±0.10)
---	-------------------------	-------------------------	-------------

La tabla presenta el número de células adheridas (a una superficie abiótica de vidrio) de *C. albicans* de diferentes procedencias sin *L. gasseri* H59.2 y luego el número de células adheridas en presencia de *L. gasseri* H59.2, y finalmente el porcentaje de adherencia de *C. albicans*. Se presentan los valores obtenidos al realizar el ensayo con los niveles altos de inóculo de *L. gasseri* H59.2 (1E09 UFC/ml) versus inóculos alto (1E09 UFC/ml) y bajo (1E03 UFC/ml) de *C. albicans*. Los porcentajes de adherencia de *C. albicans*, se calcularon en función de la cantidad final de levaduras presentes en presencia de los lactobacilos en comparación con el conteo de UFC/ml del control de cada levadura sin la adición de lactobacilos. La desviación estándar se presenta junto a cada valor (±).

Tabla 15. Adhesión de *C. albicans* vs *L. gasseri* H59.2 (1E+03 UFC/mL)

	N. células de <i>C. albicans</i> adheridas (control sin <i>L. gasseri</i>)	N. células de <i>C. albicans</i> adheridas	Porcentaje de <i>C. albicans</i> presentes con la adición de <i>L. gasseri</i>
Inóculo alto			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1.95E+06 (±1.86E+05)	1.94E+06 (±8.40E+04)	99% (±0.04)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	2.16E+06 (±1.84E+05)	2.03E+06 (±1.95E+05)	94% (±0.10)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	3.41E+06 (±2.99E+05)	1.96E+06 (±1.04E+05)	57% (±0.05)
Inóculo bajo			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1.60E+05 (±1.49E+04)	4.34E+04 (±3.77E+03)	27% (±0.09)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	2.30E+05 (±1.70E+04)	5.18E+04 (±2.89E+03)	23% (±0.06)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	8.52E+04 (±7.60E+03)	3.84E+04 (±3.83E+03)	45% (±0.10)

La tabla presenta el número de células adheridas (a una superficie abiótica) de *C. albicans* de diferentes procedencias sin *L. gasseri* H59.2 y luego el número de células adheridas en presencia de *L. gasseri* H59.2, y finalmente el porcentaje de adherencia de *C. albicans*. Se presentan los valores obtenidos al realizar el ensayo con los niveles bajos de inóculo de *L. gasseri* H59.2 (1E03 UFC/ml), e inóculos alto (1E09 UFC/ml), intermedio (1E07 UFC/ml) y bajo (1E03 UFC/ml) de *C. albicans*. Los porcentajes de adherencia de *C. albicans*, se calcularon en función de la cantidad final de levaduras presentes en presencia de los lactobacilos en comparación con el conteo de UFC/ml de un control de cada levadura sin la adición de lactobacilos. La desviación estándar se presenta junto a cada valor (\pm).

Desplazamiento de *L. gasseri* H59.2 por parte de las diferentes cepas de *C. albicans*

Tabla 16. Adhesión de *L. gasseri* H59.2 (1E+09 UFC/mL) vs *C. albicans*

	N. células de <i>L. gasseri</i> adheridas (control sin <i>C. albicans</i>)	N. células de <i>L. gasseri</i> adheridas	Porcentaje de <i>L. gasseri</i> presentes con la adición de <i>C. albicans</i>
Inóculo alto			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	3.70E+06 ($\pm 3.51E+05$)	1.00E+05 ($\pm 4.34E+03$)	3% (± 0.04)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	3.70E+06 ($\pm 3.51E+05$)	2.58E+05 ($\pm 2.13E+04$)	7% (± 0.08)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	3.70E+06 ($\pm 3.51E+05$)	1.44E+05 ($\pm 1.77E+03$)	4% (± 0.01)
Inóculo bajo			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	3.70E+06 ($\pm 3.51E+05$)	3.73E+05 ($\pm 3.90E+04$)	10% (± 0.10)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	3.70E+06 ($\pm 3.51E+05$)	3.73E+05 ($\pm 2.71E+04$)	10% (± 0.07)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	3.70E+06 ($\pm 3.51E+05$)	6.91E+05 ($\pm 3.65E+04$)	19% (± 0.05)

La tabla presenta el número de células adheridas (a una superficie abiótica) de *L. gasseri* H59.2 sin la presencia de la levadura *C. albicans*, luego el número de células remanentes

después de la adición de la levadura, y finalmente el porcentaje de adherencia de *L. gasseri* H59.2. Se presentan los valores obtenidos al realizar el ensayo con los niveles altos de inóculo de *L. gasseri* (1E09 UFC/ml), e inóculos alto (1E09 UFC/ml), intermedio (1E07 UFC/ml) y bajo (1E03 UFC/ml) de *C. albicans*. Los porcentajes de adherencia de *L. gasseri* H59.2, se calcularon en función de la cantidad final de lactobacilos presentes en presencia de las levaduras en comparación con el conteo de UFC/ml de un control de cada lactobacilo sin la adición de levaduras. La desviación estándar se presenta junto a cada valor (\pm).

Tabla 17. Adhesión de *L. gasseri* H59.2 (1E+03 UFC/mL) vs *C. albicans*

	N. células de <i>L. gasseri</i> adheridas (control sin <i>C. albicans</i>)	N. células de <i>L. gasseri</i> adheridas	Porcentaje de <i>L. gasseri</i> presentes con la adición de <i>C. albicans</i>
Inóculo alto			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1.82E+05 ($\pm 1.87E+04$)	2.63E+04 ($\pm 1.77E+03$)	14% (± 0.07)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	1.82E+05 ($\pm 1.87E+04$)	2.51E+03 ($\pm 0.00E+00$)	1% (± 0.00)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	1.82E+05 ($\pm 1.87E+04$)	1.84E+04 ($\pm 1.45E+03$)	10% (± 0.08)
Inóculo bajo			
<i>C. albicans</i> ATCC® 10231™	1.82E+05 ($\pm 1.87E+04$)	3.01E+04 ($\pm 5.11E-12$)	17% (± 0.00)
<i>C. albicans</i> candidiasis total	1.82E+05 ($\pm 1.87E+04$)	1.54E+05 ($\pm 1.77E+03$)	85% (± 0.01)
<i>C. albicans</i> microbiota normal	1.82E+05 ($\pm 1.87E+04$)	1.44E+05 ($\pm 1.16E+04$)	79% (± 0.08)

La tabla presenta el número de células adheridas (a una superficie abiótica) de *L. gasseri* H59.2 sin la presencia de la levadura *C. albicans*, luego el número de células remanentes después de la adición de la levadura, y finalmente el porcentaje de adherencia de *L. gasseri* H59.2. Se presentan los valores obtenidos al realizar el ensayo con los niveles bajos de

inóculo de *L. gasseri* (1E03 UFC/ml), e inóculos alto (1E09 UFC/ml), intermedio (1E07 UFC/ml) y bajo (1E03 UFC/ml) de *C. albicans*. Los porcentajes de adherencia de *L. gasseri* H59.2, se calcularon en función de la cantidad final de lactobacilos presentes en presencia de las levaduras en comparación con el conteo de UFC/ml de un control de cada lactobacilo sin la adición de levaduras. La desviación estándar se presenta junto a cada valor (\pm).

Tabla 18. Método de agrupación de Tukey para *C. albicans* (1E+03 UFC/mL)

Factor	Media (UFC/mL)	Agrupación
C3CivsLJCM1131	136845	A
C3CivsLIMAUFB14	128933	AB
C3CivsLH59.2	125782	ABC
C3ATCCvsLIMAUFB014	112263	ABC
C3ATCCvsLJCM1131	112074	ABC
C3ATCCvsLH59.2	101828	ABCD
C3MNVsLIMAUFB14	62629	BCD
C3MNVsLH59.2	56366	CD
C3MNVsLJCM1131	42735	D

La tabla muestra la agrupación de Tukey con un 95% de confianza. Los factores que comparten una letra son estadísticamente iguales, mientras que los que tienen letras diferentes son significativamente diferentes.

Tabla 19. Método de agrupación de Tukey para *C. albicans* (1E+09 UFC/mL)

Factor	Media (UFC/mL)	Agrupación
C9MNVsLJCM1131	2670685	A
C9MNVsLH59.2	2442694	AB
C9MNVsLIMAUFB14	2205734	ABC
C9CivsLH59.2	2011656	ABCD
C9ATCCvsLH59.2	1850294	BCD
C9CivsLIMAUFB14	1576312	CD
C9CivsLJCM1131	1567544	CD
C9ATCCvsLJCM1131	1503821	CD
C9ATCCvsLIMAUFB014	1458126	D

La tabla muestra la agrupación de Tukey con un 95% de confianza. Los factores que comparten una letra son estadísticamente iguales, mientras que los que tienen letras diferentes son significativamente diferentes.

Tabla 20. Estudios de actividad probiótica de *Lactobacillus* sp.

<i>Lactobacillus</i> sp.	Patógeno	Conclusión
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>L. acidophilus</i> produce una bacteriocina con efectos bactericidas y bacteriostáticos que limitan la formación de biofilms por <i>B. subtilis</i> (Sarikhani et al., 2018).
<i>L. fermentum</i> SK5	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>L. fermentum</i> SK5 puede inhibir microorganismos patógenos a través de coagregación y de sustancias antimicrobianas. La adhesión de <i>L. fermentum</i> SK5 a células HeLa, HT-29 y Caco-2 inhibe la adherencia de <i>G. vaginalis</i> (Kaewnopparat et al., 2013).
<i>L. rhamnosus</i> GR-1 y <i>L. reuteri</i> RC-14	<i>Candida glabrata</i>	<i>L. rhamnosus</i> GR-1 y <i>L. reuteri</i> RC-14 inhiben la formación de biofilm de <i>C. glabrata</i> a través del impedimento de la adherencia de las células de la levadura y la producción de compuestos inhibitorios (Chew et al., 2015).
<i>L. fermentum</i> MG901 y <i>L. plantarum</i> MG989	<i>Candida albicans</i>	La adherencia de <i>L. fermentum</i> MG901 y <i>L. plantarum</i> MG989 a células HT-29 inhibe la adherencia de <i>C. albicans</i> (Kang et al., 2018).
<i>L. acidophilus</i>	<i>Candida albicans</i>	Los ensayos de adhesión muestran que la presencia de <i>L. acidophilus</i> no inhiben la adherencia de <i>C. albicans</i> al anillo vaginal anticonceptivo (Chassot et al., 2010).
<i>L. crispatus</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	La adherencia de <i>L. crispatus</i> a las células epiteliales HeLa reduce la citotoxicidad causada por <i>G. vaginalis</i> (Castro et al., 2018).
<i>L. crispatus</i>	HSV-2	La formación de microcolonias de <i>L. crispatus</i> en la superficie de las células bloquea los receptores de HSV-2 y previene los pasos iniciales de infección (Mousavi et al., 2017).
<i>L. gasseri</i> y <i>L. crispatus</i>	<i>Candida albicans</i>	El cultivo del sobrenadante de <i>L. gasseri</i> y <i>L. crispatus</i> inhibió la formación de biofilms y se observó una disminución en la expresión de los genes relacionados

		con adhesión y formación de biofilms (Matsuda et al., 2018).
<i>L. gasseri</i> CMUL57, <i>L. acidophilus</i> CMUL67 y <i>L. plantarum</i> CMUL140	HSV-2 y CVB4E2 (Coxsackievirus)	El conjunto de estos lactobacilos fue capaz de inhibir el efecto de HSV-2 pero no de CVB4E2, se atribuye a que los lactobacilos pueden atrapar a HSV-2 pero no a CVB4E2 al tratarse de un virus desnudo (Kassaa et al., 2015).

La tabla muestra un resumen de diferentes estudios de *Lactobacillus* sp. y su actividad probiótica o inhibición de los factores de virulencia de diferentes microorganismos.

13.FIGURAS

<i>L. gasseri</i> 1E+03	<i>L. gasseri</i> 1E+07	<i>L. gasseri</i> 1E+09
<i>L. gasseri</i> 1E+03	<i>L. gasseri</i> 1E+07	<i>L. gasseri</i> 1E+09
<i>C. albicans</i> 1E+03	<i>C. albicans</i> 1E+07	<i>C. albicans</i> 1E+09
<i>C. albicans</i> 1E+03	<i>C. albicans</i> 1E+07	<i>C. albicans</i> 1E+09
<i>L. gasseri</i> 1E+03 <i>C. albicans</i> 1E+03	<i>L. gasseri</i> 1E+07 <i>C. albicans</i> 1E+03	<i>L. gasseri</i> 1E+09 <i>C. albicans</i> 1E+03
<i>L. gasseri</i> 1E+03 <i>C. albicans</i> 1E+03	<i>L. gasseri</i> 1E+07 <i>C. albicans</i> 1E+03	<i>L. gasseri</i> 1E+09 <i>C. albicans</i> 1E+03
<i>L. gasseri</i> 1E+03 <i>C. albicans</i> 1E+07	<i>L. gasseri</i> 1E+07 <i>C. albicans</i> 1E+07	<i>L. gasseri</i> 1E+09 <i>C. albicans</i> 1E+07
<i>L. gasseri</i> 1E+03 <i>C. albicans</i> 1E+07	<i>L. gasseri</i> 1E+07 <i>C. albicans</i> 1E+07	<i>L. gasseri</i> 1E+09 <i>C. albicans</i> 1E+07
<i>L. gasseri</i> 1E+03 <i>C. albicans</i> 1E+09	<i>L. gasseri</i> 1E+07 <i>C. albicans</i> 1E+09	<i>L. gasseri</i> 1E+09 <i>C. albicans</i> 1E+09
<i>L. gasseri</i> 1E+03 <i>C. albicans</i> 1E+09	<i>L. gasseri</i> 1E+07 <i>C. albicans</i> 1E+09	<i>L. gasseri</i> 1E+09 <i>C. albicans</i> 1E+09

Figura 1. Placas de seis pocillos utilizadas para los ensayos de adhesión. En la figura se muestra la ubicación de las diferentes suspensiones de bacterias y levaduras utilizadas en cada ensayo. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada una de las cepas.

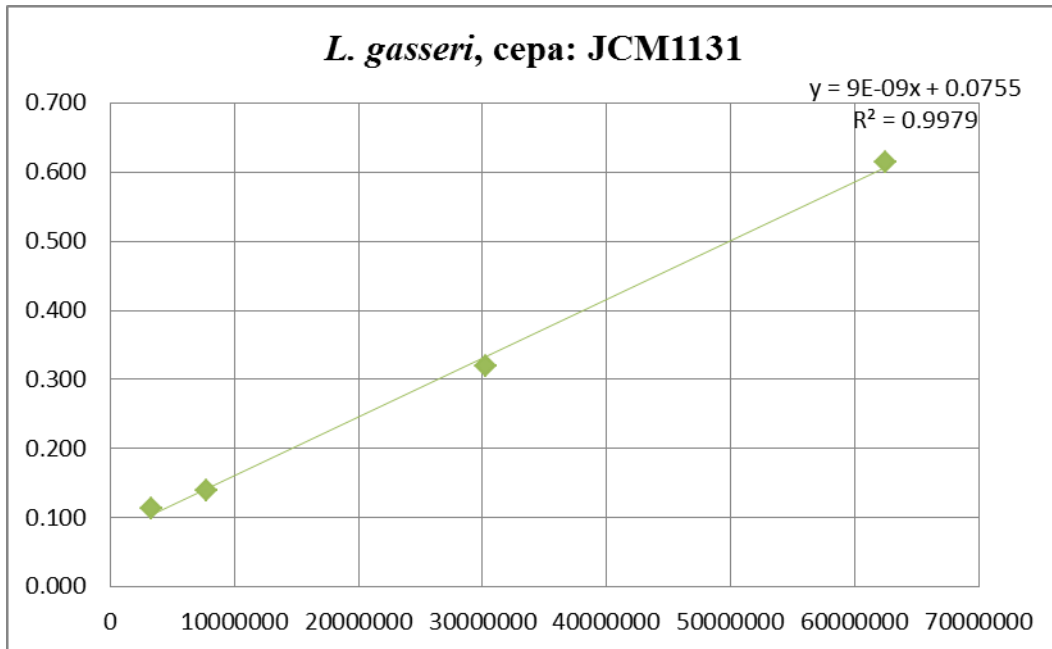


Figura 2. Curva de calibración de *L. gasseri* JCM1131. La figura muestra la curva de calibración con el valor de UFC/mL en el eje x y la absorbancia en el eje y.

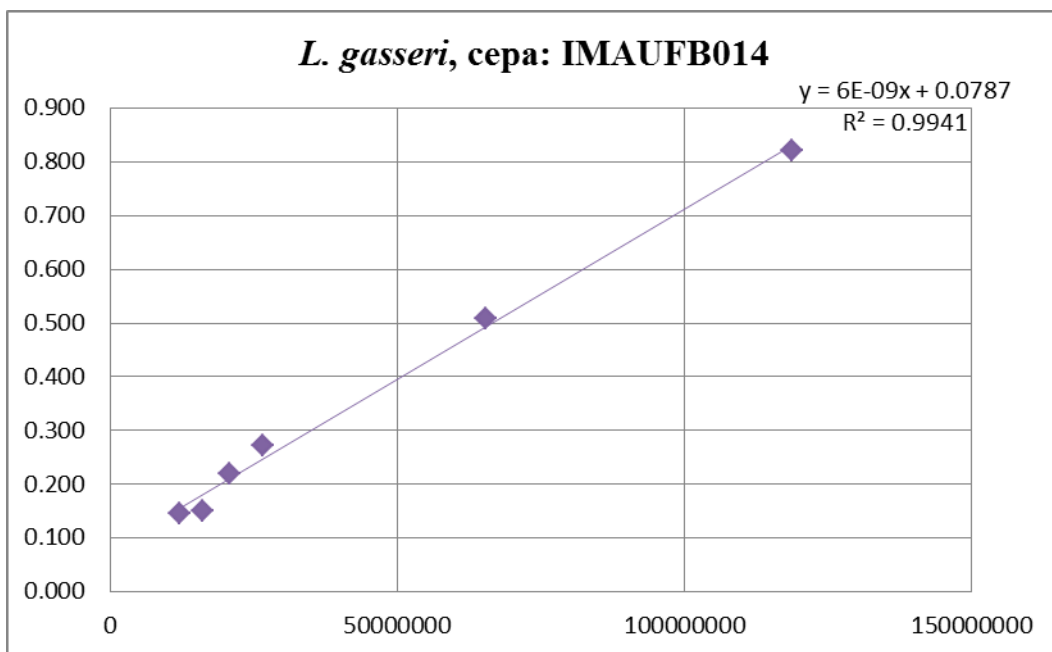


Figura 3. Curva de calibración de *L. gasseri* IMAUFB014. La figura muestra la curva de calibración con el valor de UFC/mL en el eje x y la absorbancia en el eje y.

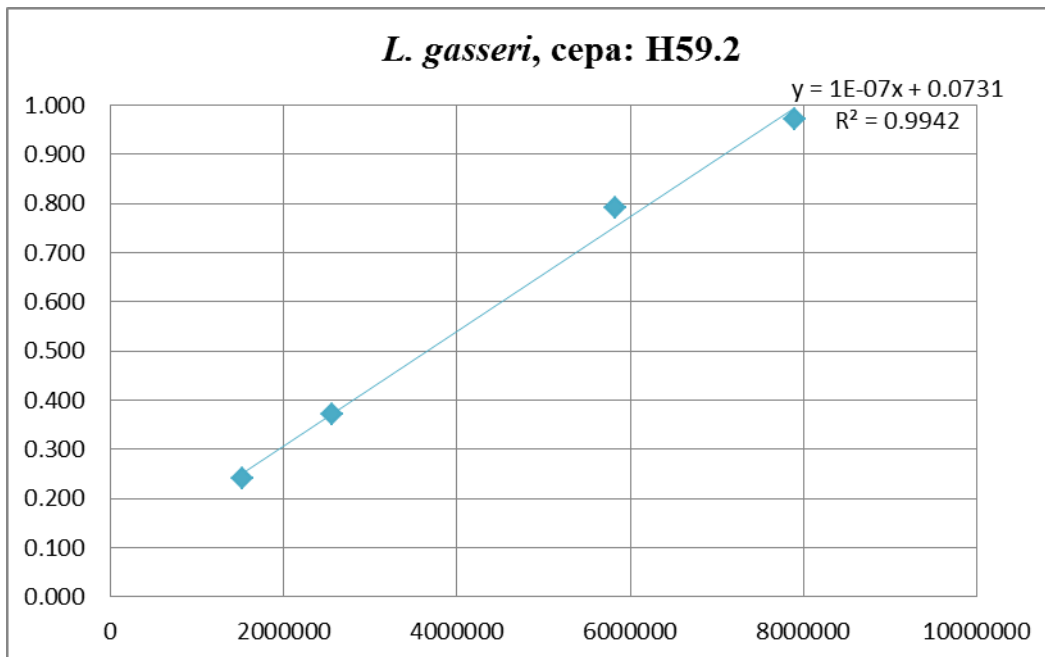


Figura 4. Curva de calibración de *L. gasseri* H59.2. La figura muestra la curva de calibración con el valor de UFC/mL en el eje x y la absorbancia en el eje y.

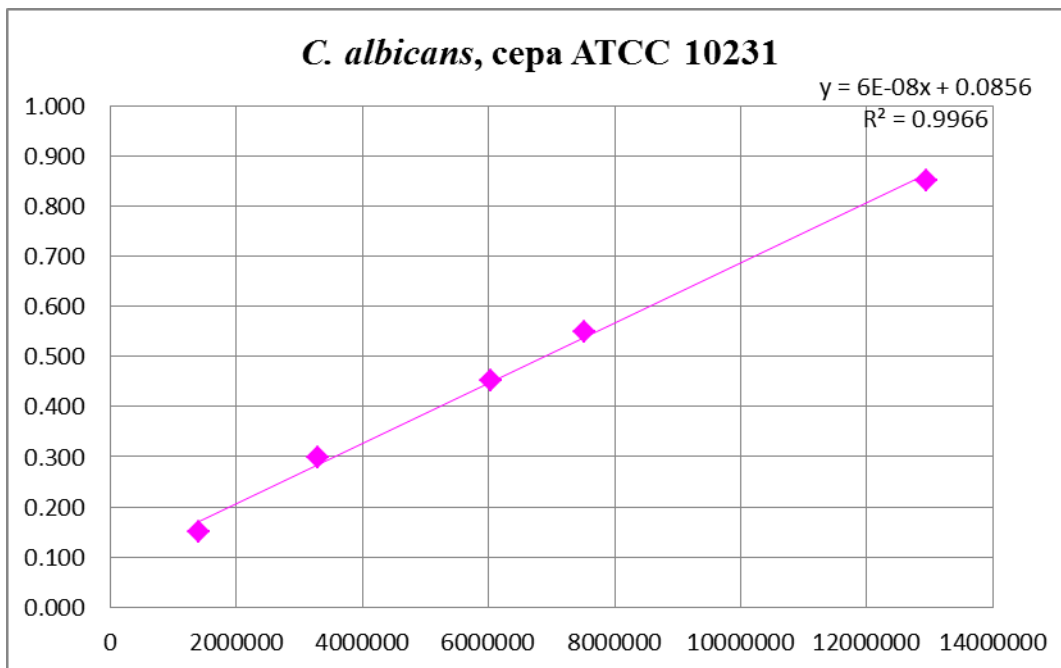


Figura 5. Curva de calibración de *C. albicans* ATCC® 10231™. La figura muestra la curva de calibración con el valor de UFC/mL en el eje x y la absorbancia en el eje y.

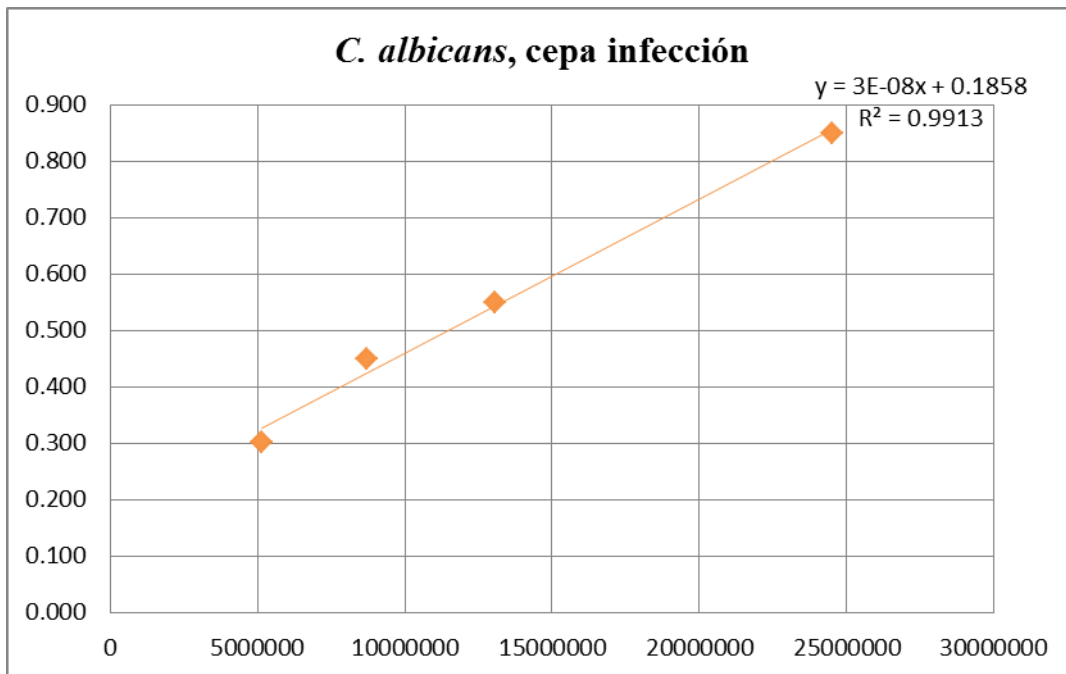


Figura 6. Curva de calibración de *C. albicans* Infección. La figura muestra la curva de calibración con el valor de UFC/mL en el eje x y la absorbancia en el eje y.

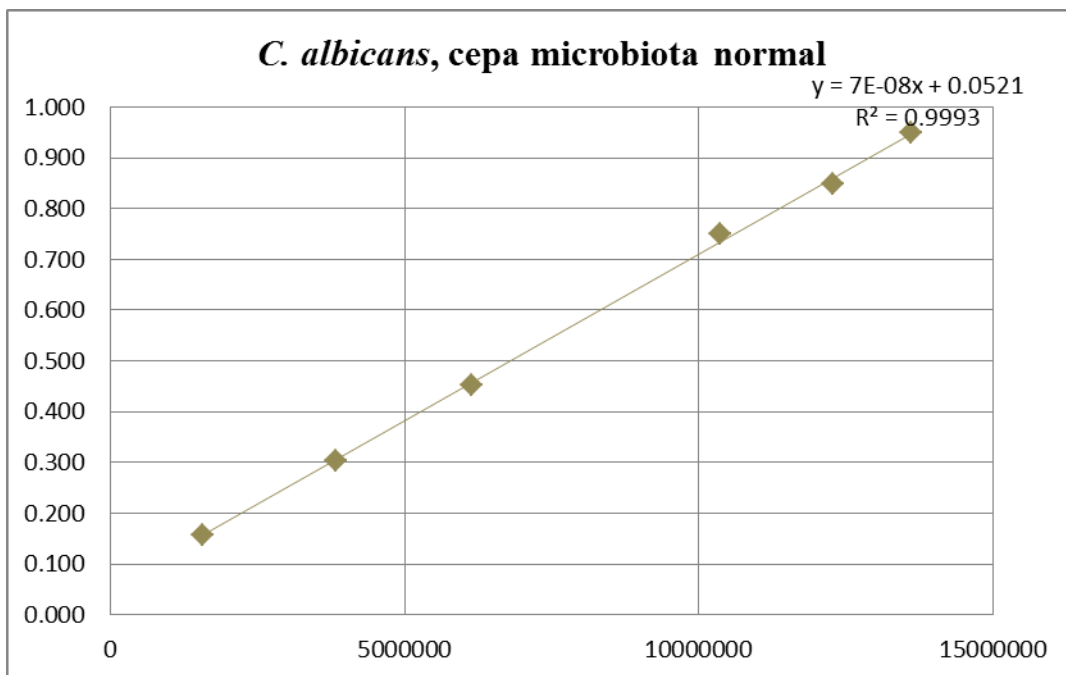


Figura 7. Curva de calibración de *C. albicans* Microbiota Normal. La figura muestra la curva de calibración con el valor de UFC/mL en el eje x y la absorbancia en el eje y.

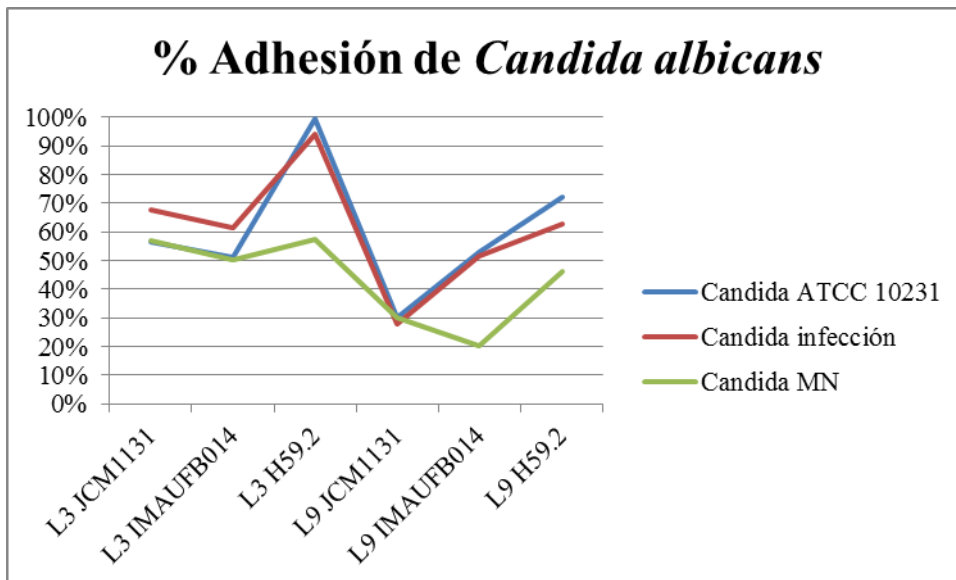


Figura 8. Porcentaje de Adhesión de *Candida albicans*. El gráfico muestra el porcentaje de adherencia de un inóculo alto ($1E+09$ UFC/mL) de *Candida albicans* de diferentes procedencias, frente a las diferentes cepas *Lactobacillus gasseri* en los inóculos alto ($1E+09$ UFC/mL) y bajo ($1E+03$ UFC/mL).

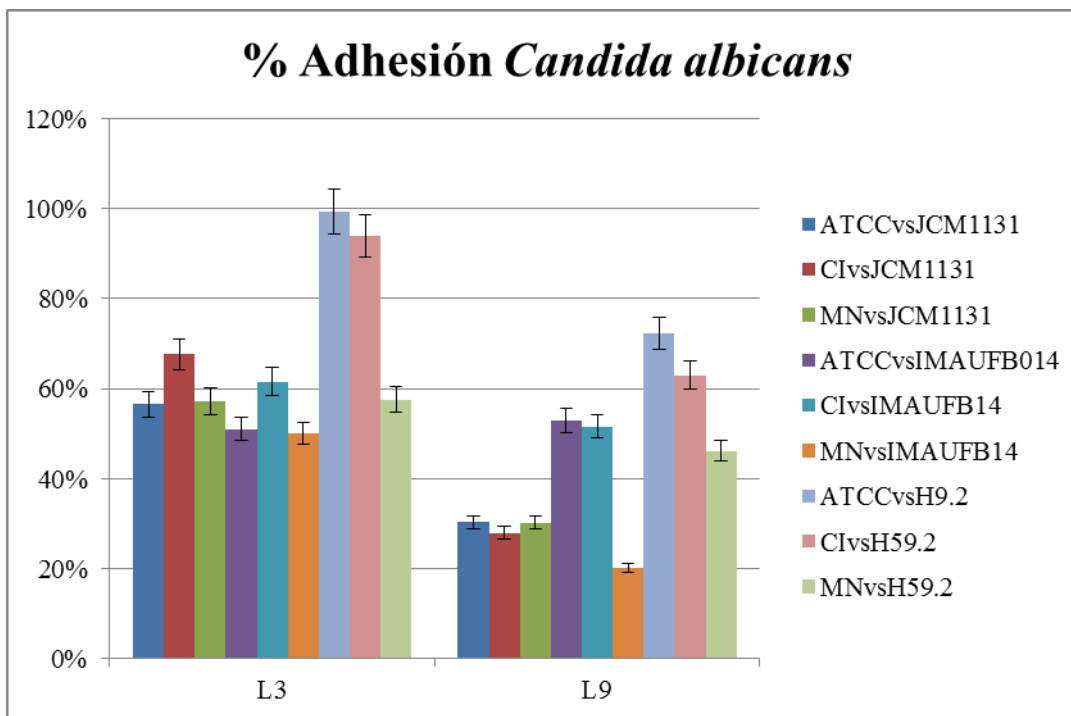


Figura 9. Comparación en el porcentaje de adhesión de *C. albicans*. El gráfico muestra el porcentaje de adherencia de un inóculo alto ($1E+09$ UFC/mL) de *Candida albicans* de diferentes procedencias, frente a inóculos alto ($1E+09$ UFC/mL) y bajo ($1E+03$ UFC/mL) de las diferentes cepas *Lactobacillus gasseri*.

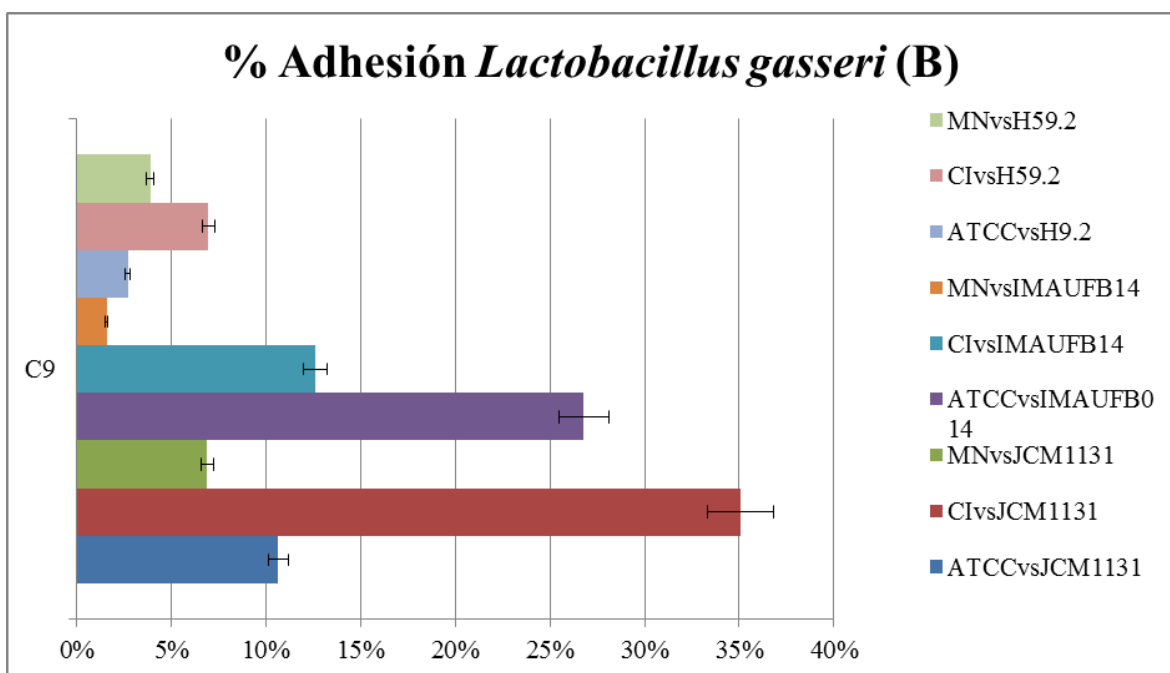
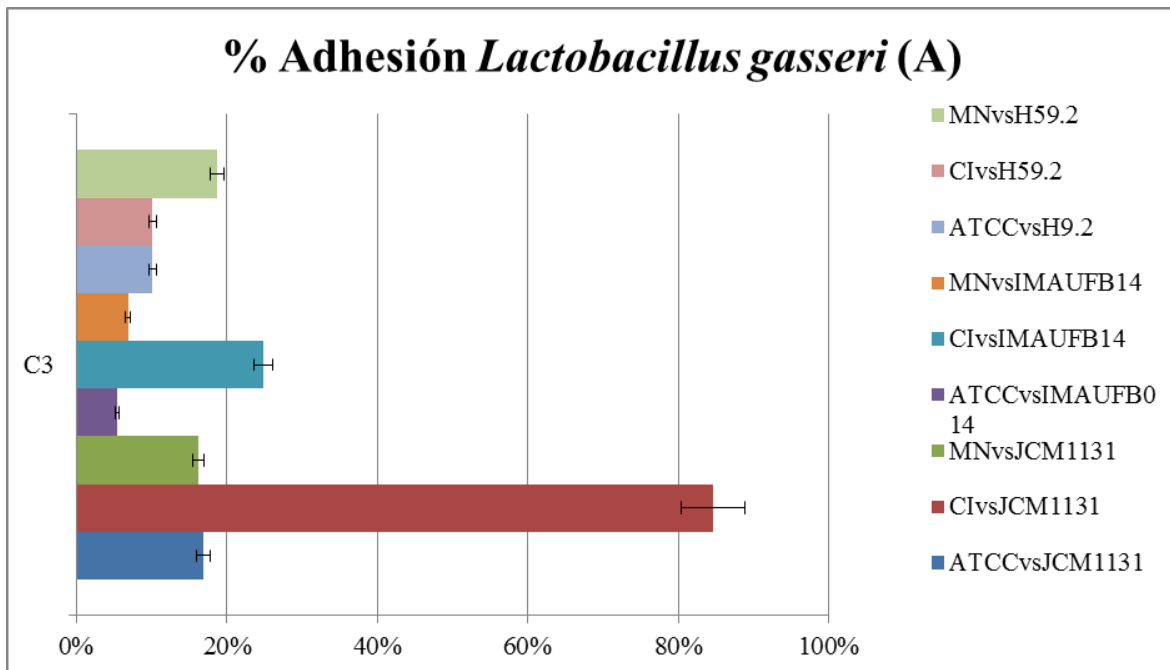


Figura 10. Porcentaje de Adhesión de *L. gasseri*. El gráfico muestra el porcentaje de adherencia de un inóculo alto ($1E+09$ UFC/mL) de las diferentes cepas *Lactobacillus gasseri*, frente a un inóculo alto ($1E+09$ UFC/mL), en la parte A, y bajo ($1E+03$ UFC/mL), en la parte B, de *Candida albicans* de diferentes procedencias.

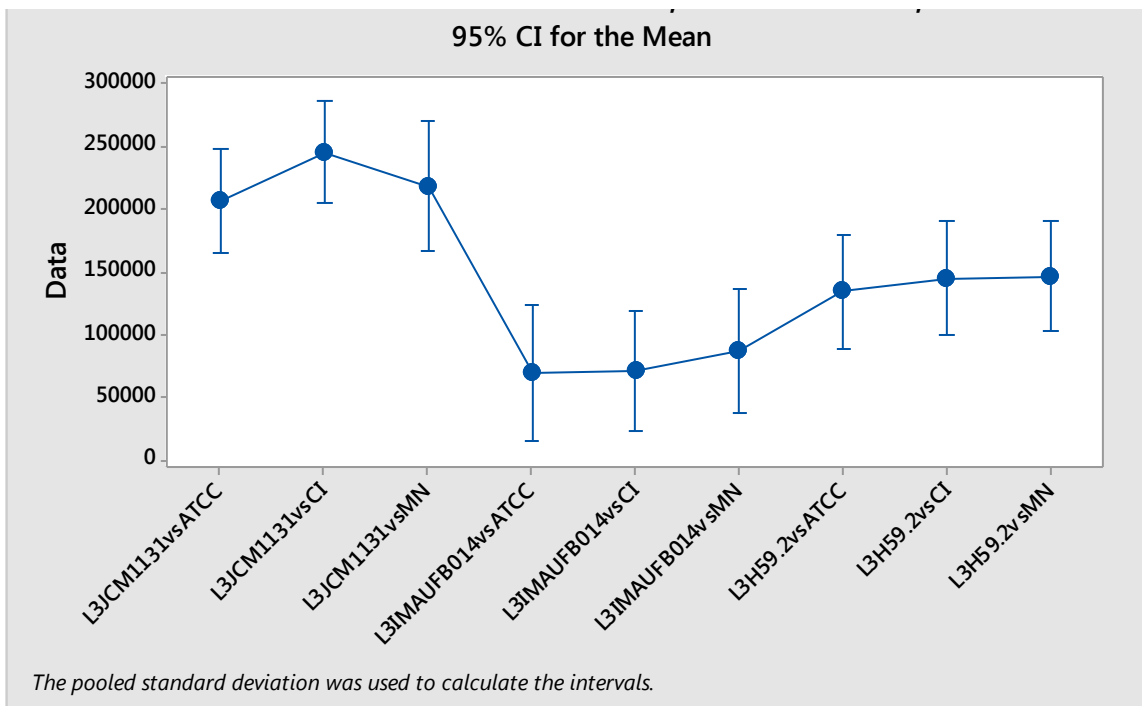


Figura 11. Interval Plot de *L. gasseri* ($1E+03$ UFC/mL). El gráfico muestra como la cepa más exitosa de *L. gasseri* en cuanto a la capacidad de adherencia en una superficie abiótica, además de su capacidad de permanecer en la superficie después de añadir *C. albicans*, fue JCM1131.

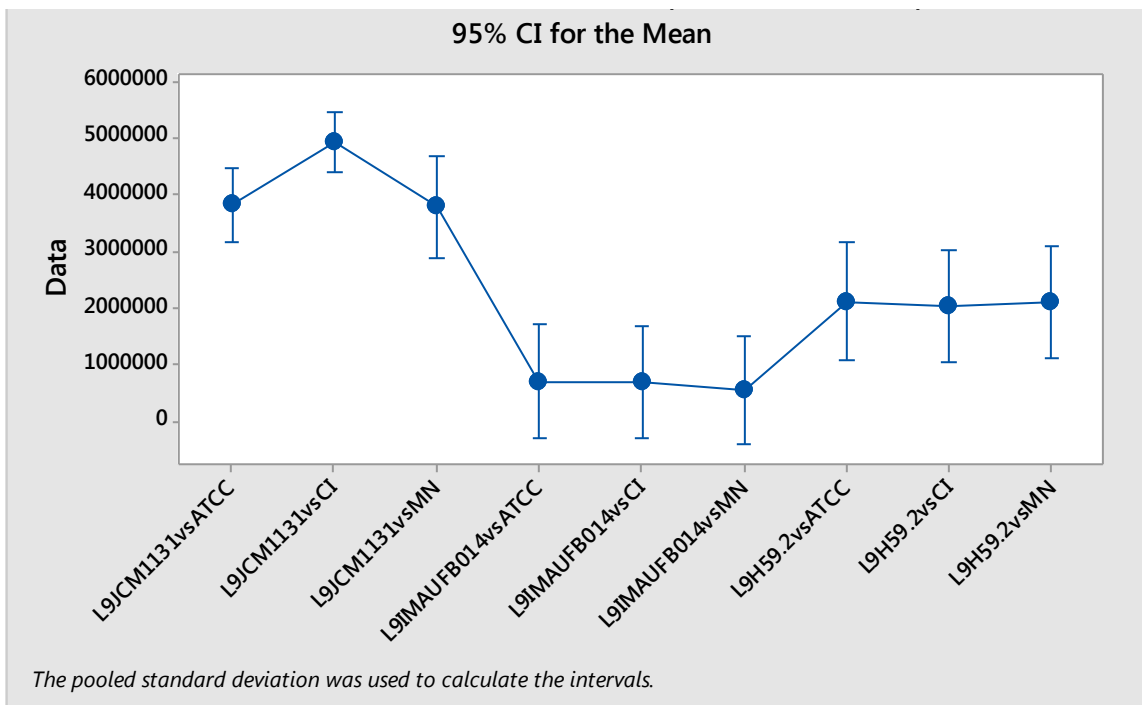


Figura 12. Interval Plot de *L. gasseri* ($1E+09$ UFC/mL). El gráfico muestra como la cepa más exitosa de *L. gasseri* en cuanto a la capacidad de adherencia en una superficie abiótica,

además de su capacidad de permanecer en la superficie después de añadir *C. albicans*, fue JCM1131.

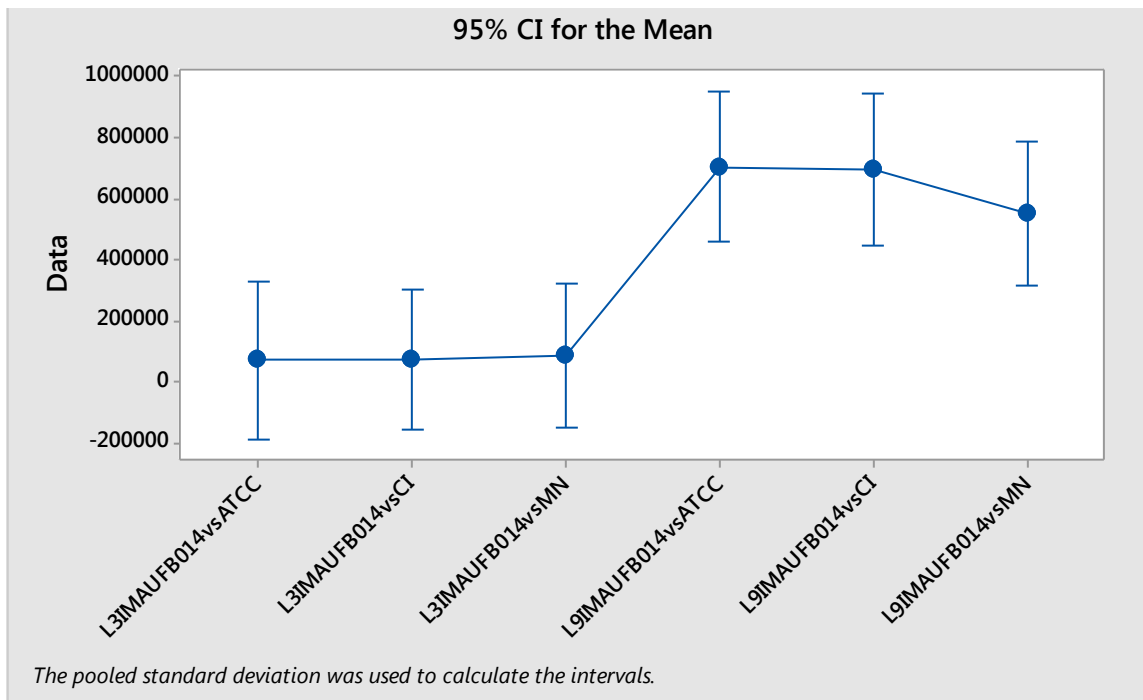


Figura 13. Interval Plot de *L. gasseri* IMAUFB014. El gráfico muestra la diferencia en la adherencia de *L. gasseri* IMAUFB014 entre el inóculo alto ($1E+09$ UFC/mL) y el inóculo bajo ($1E+03$ UFC/mL).

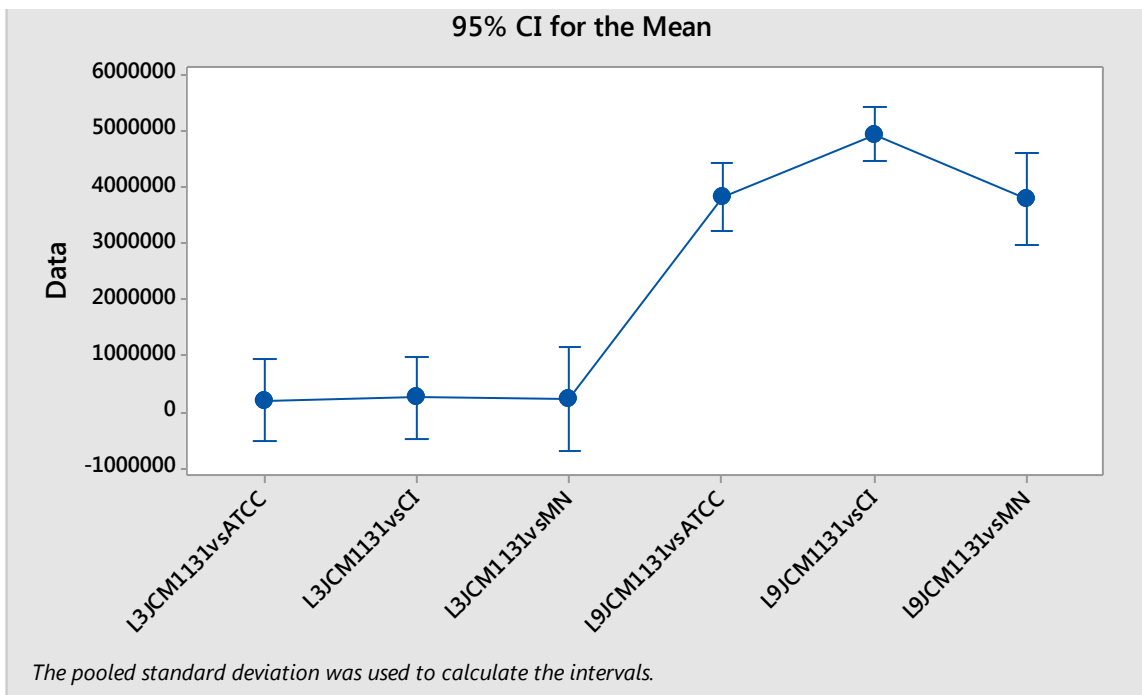


Figura 14. Interval Plot de *L. gasseri* JCM1131. El gráfico muestra la diferencia en la adherencia de *L. gasseri* JCM1131 entre el inóculo alto ($1E+09$ UFC/mL) y el inóculo bajo ($1E+03$ UFC/mL).

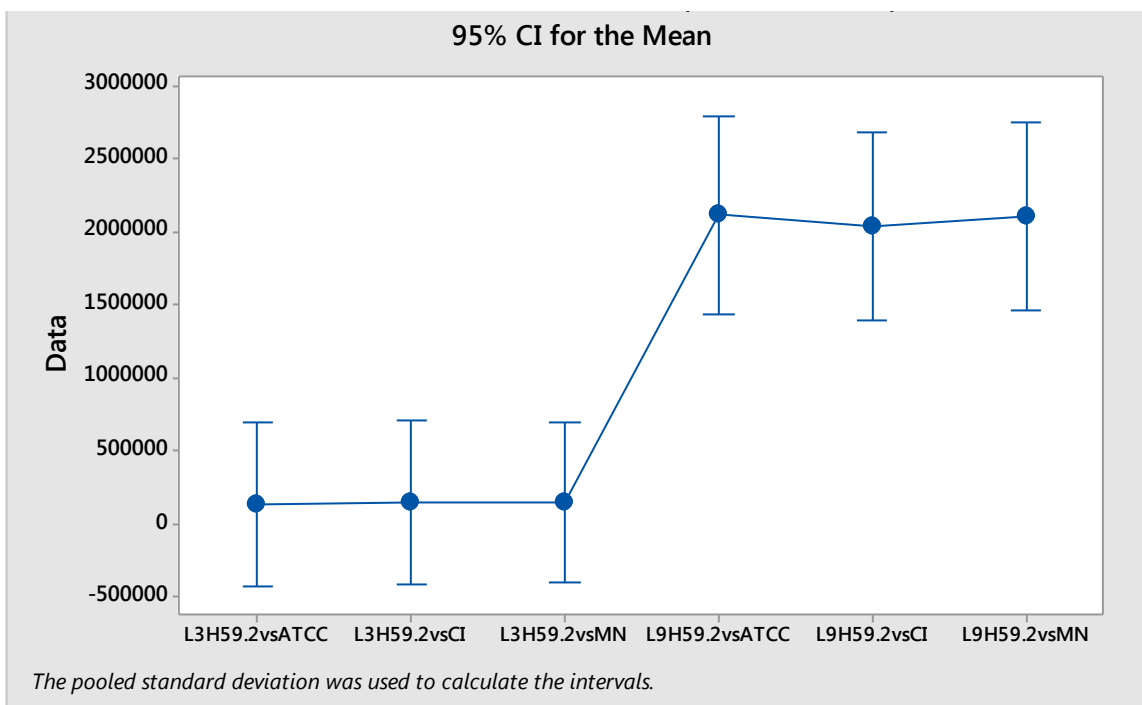


Figura 15. Interval Plot de *L. gasseri* H59.2. El gráfico muestra la diferencia en la adherencia de *L. gasseri* H59.2 entre el inóculo alto ($1E+09$ UFC/mL) y el inóculo bajo ($1E+03$ UFC/mL).

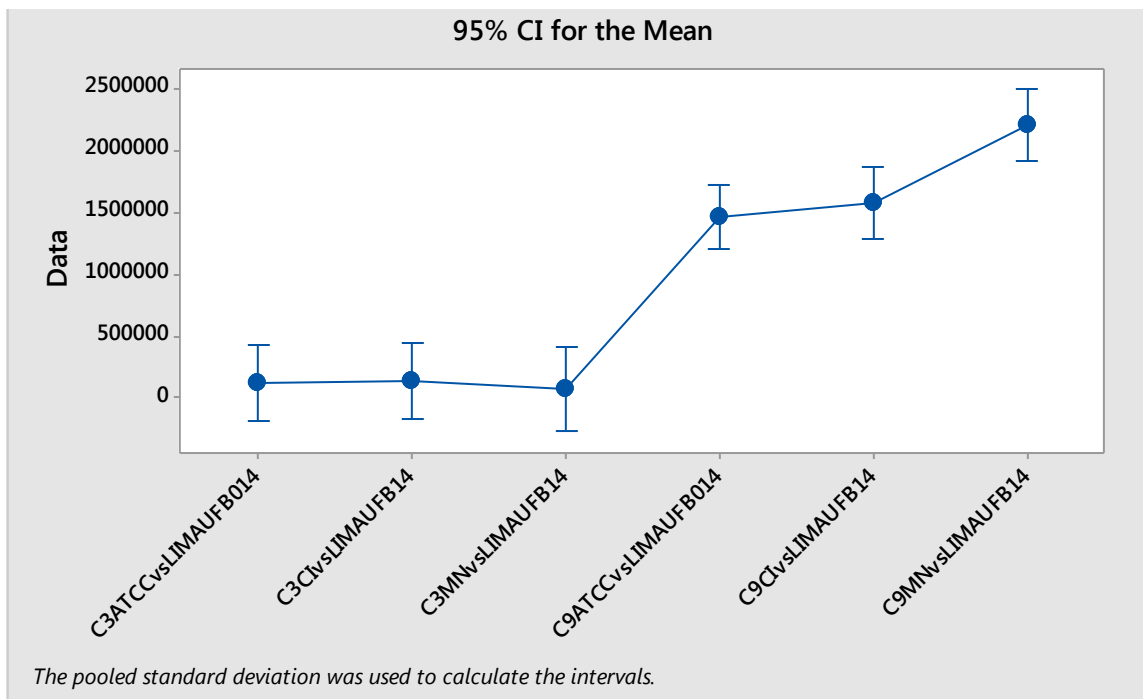


Figura 16. Interval Plot de *C. albicans* vs *L. gasseri* IMAUFB014. El gráfico muestra la diferencia en la adherencia de *C. albicans* entre el inóculo alto ($1E+09$ UFC/mL) y el inóculo bajo ($1E+03$ UFC/mL), frente a *L. gasseri* IMAUFB014.

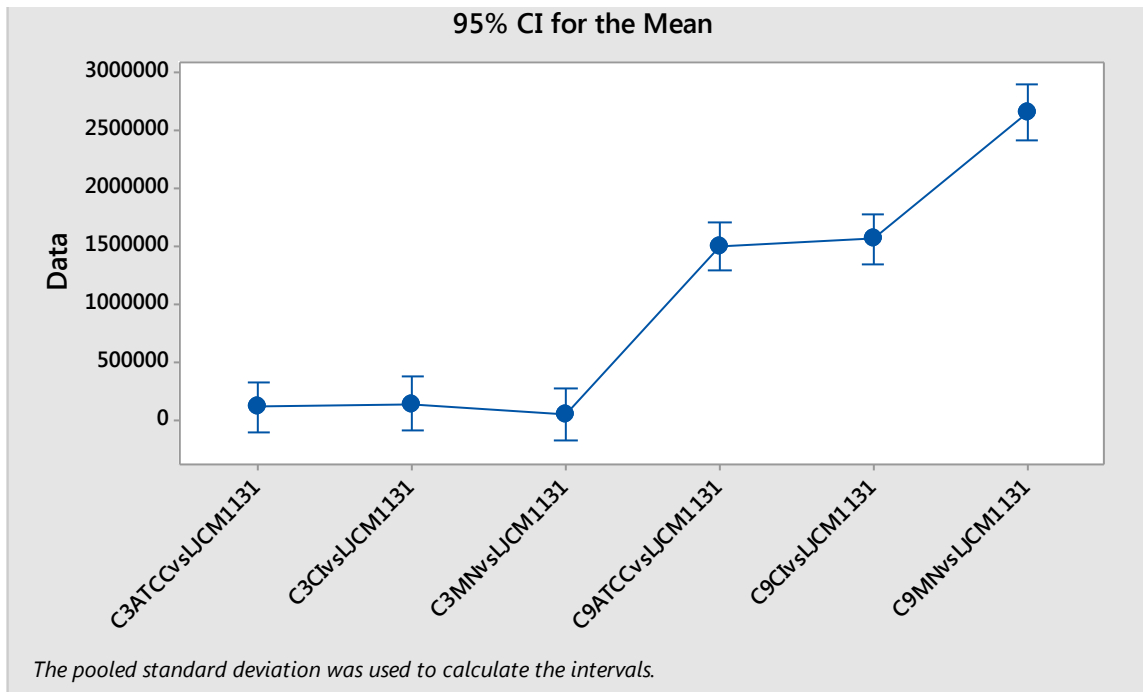


Figura 17. Interval Plot de *C. albicans* vs *L. gasseri* JCM1131. El gráfico muestra la diferencia en la adherencia de *C. albicans* entre el inóculo alto ($1E+09$ UFC/mL) y el inóculo bajo ($1E+03$ UFC/mL), frente a *L. gasseri* JCM1131.

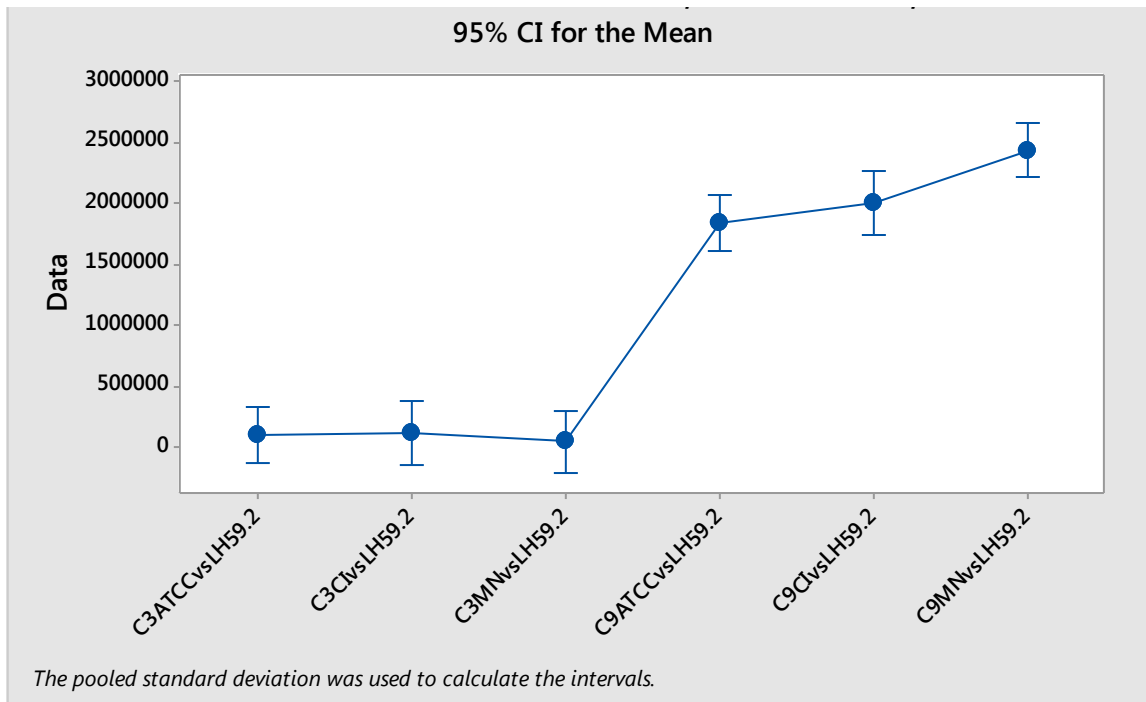


Figura 18. Interval Plot de *C. albicans* vs *L. gasseri* H59.2. El gráfico muestra la diferencia en la adherencia de *C. albicans* entre el inóculo alto ($1E+09$ UFC/mL) y el inóculo bajo ($1E+03$ UFC/mL), frente a *L. gasseri* H59.2.

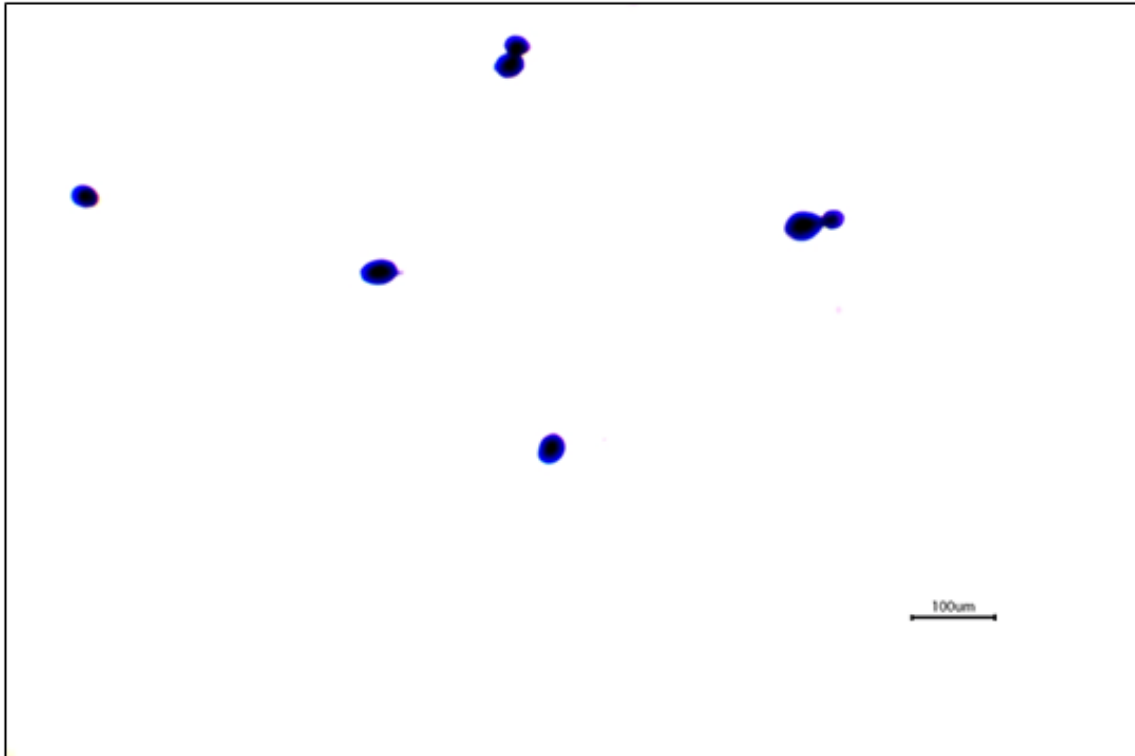


Figura 19. *C. albicans* infección ($1E+03$ UFC/mL). La figura muestra la imagen obtenida de una placa con *C. albicans* aislada de una muestra con infección y sin la presencia de *L. gasseri*. Se observa una regla de 100um.

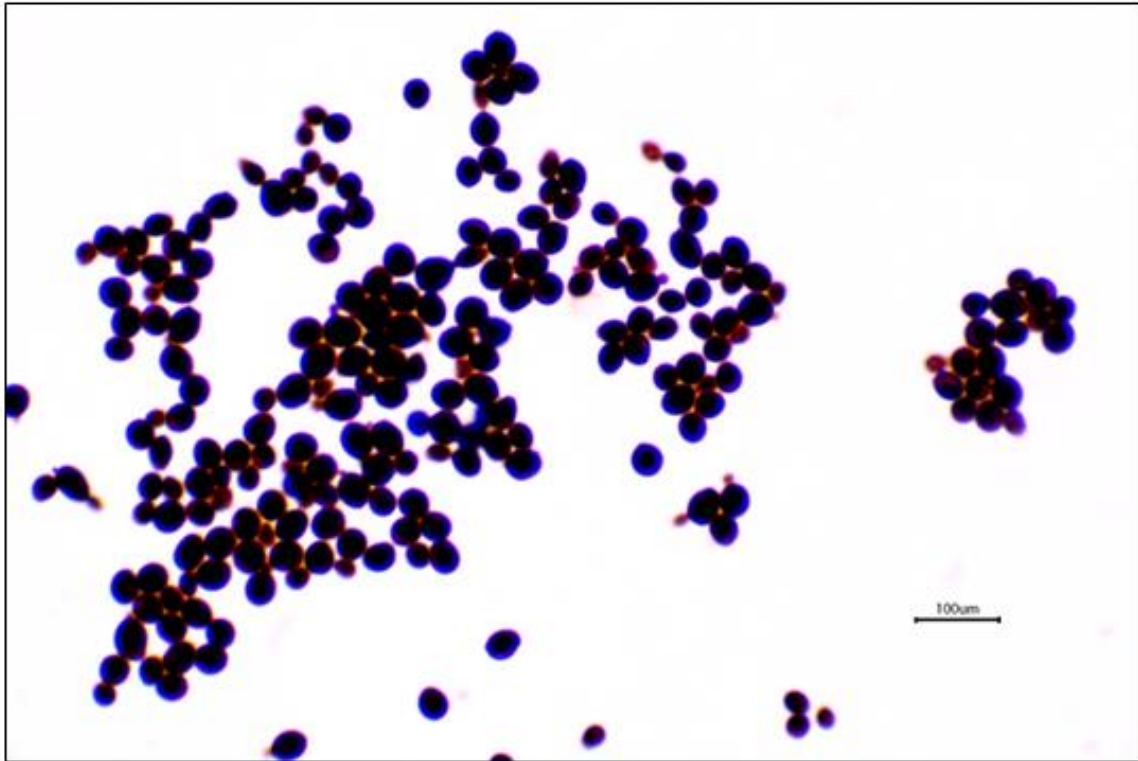


Figura 20. *C. albicans* infección ($1E+09$ UFC/mL). La figura muestra la imagen obtenida de una placa con *C. albicans* aislada de una muestra con infección y sin la presencia de *L. gasseri*. Se observa una regla de 100um.

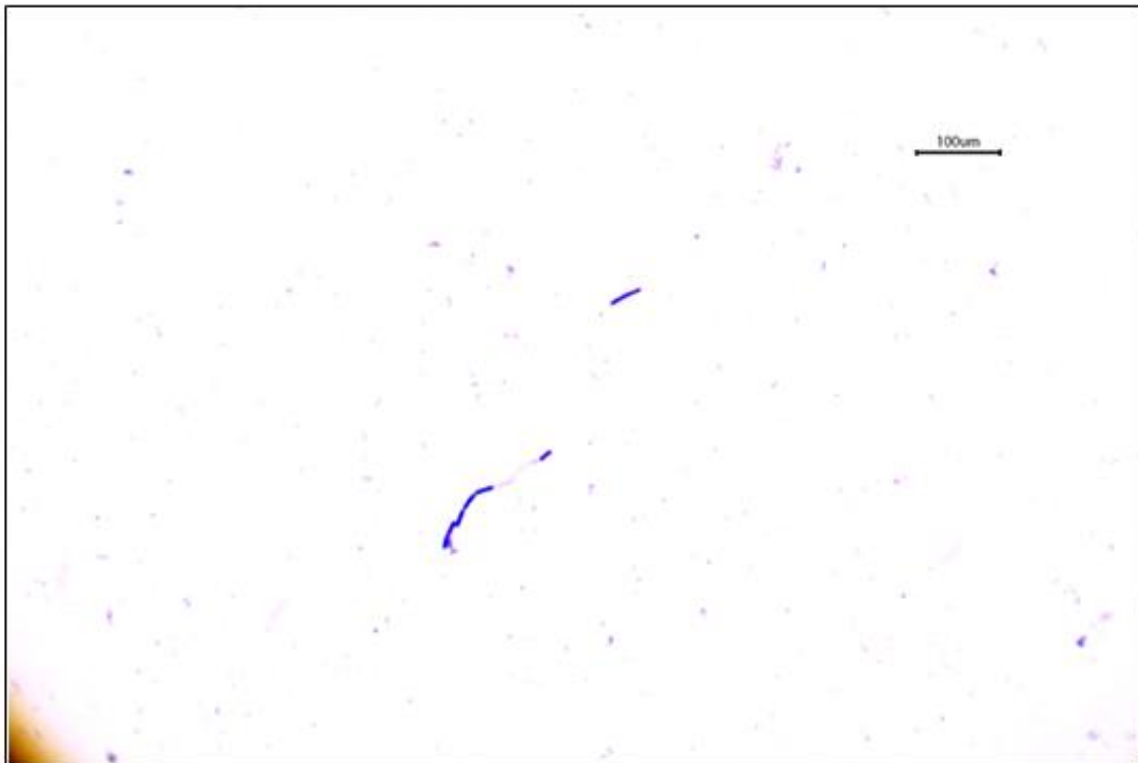


Figura 21. *L. gasseri* H59.2 (1E+03 UFC/mL). La figura muestra la imagen obtenida de una placa con *L. gasseri* H59.2 y sin la presencia de *C. albicans*. Se observa una regla de 100um.



Figura 22. *L. gasseri* IMAUFB014 ($1E+09$ UFC/mL). La figura muestra la imagen obtenida de una placa con *L. gasseri* IMAUFB014 y sin la presencia de *C. albicans*. Se observa una regla de 100um.

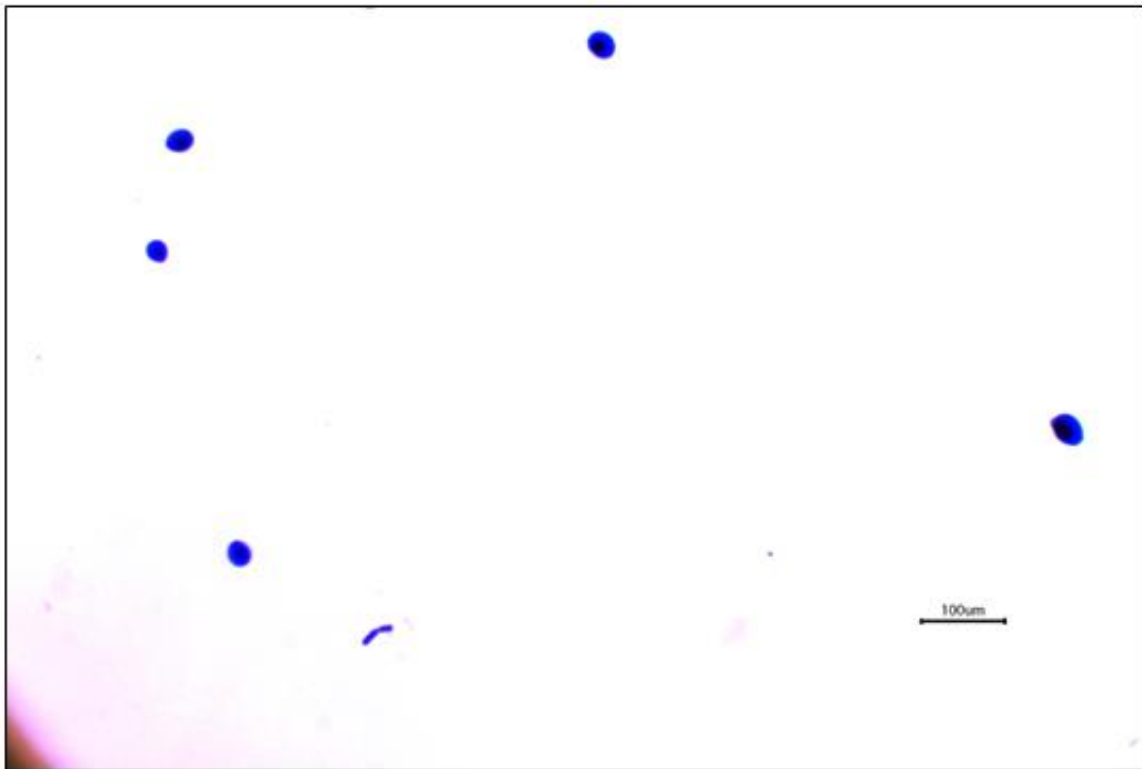


Figura 22. *L. gasseri* JCM1131 (1E+03 UFC/mL) versus *C. albicans* microbiota normal (1E+03 UFC/mL). La figura muestra la imagen obtenida de una placa con *L. gasseri* JCM1131 previamente adherido antes de agregar *C. albicans* aislada de una muestra de microbiota normal. Se observa una regla de 100µm.

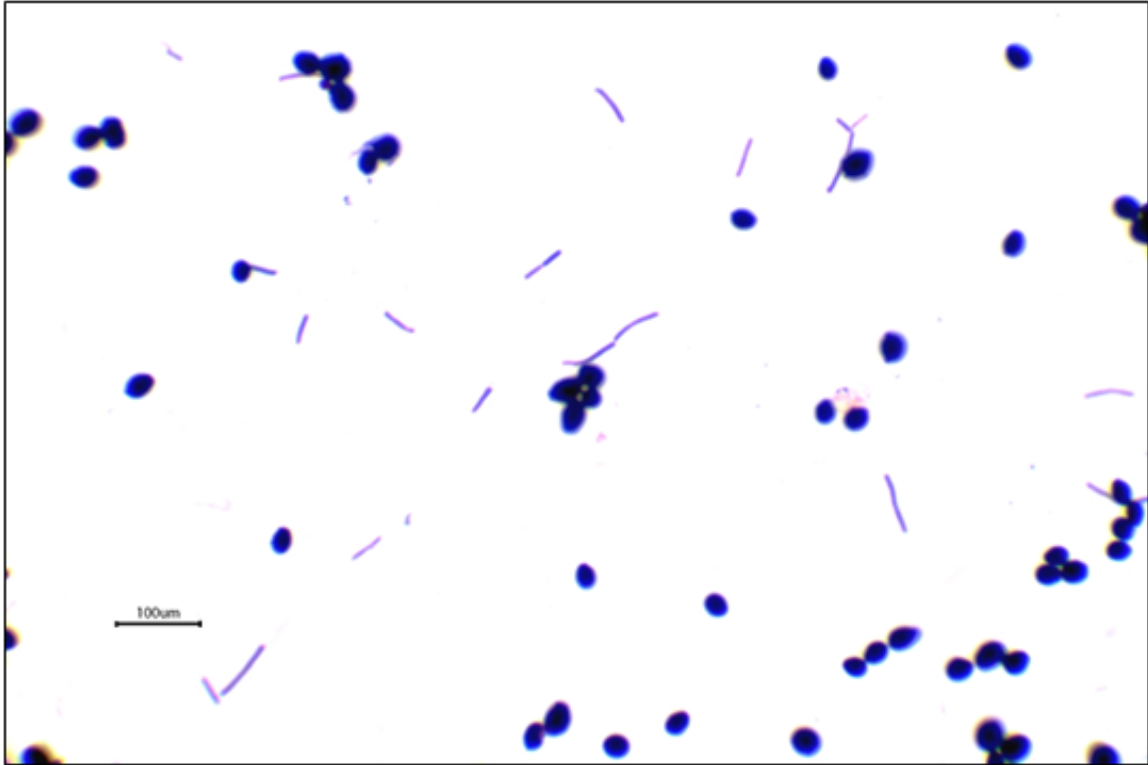


Figura 23. *L. gasseri* JCM1131 ($1E+09$ UFC/mL) versus *C. albicans* infección ($1E+09$ UFC/mL). La figura muestra la imagen obtenida de una placa con *L. gasseri* JCM1131 previamente adherido antes de agregar *C. albicans* aislada de una muestra de infección. Se observa una regla de 100 μ m.