

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Flaviano dos Santos Martins

**Efeito de dois probióticos, *Saccharomyces
boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* linhagem
UFMG 905, na resposta inflamatória induzida
por *Salmonella enterica* subsp. *enterica*
sorovar. Typhimurium**

Belo Horizonte

2008



Flaviano dos Santos Martins

Tese

**Efeito de dois probióticos, *Saccharomyces boulardii* e
Saccharomyces cerevisiae linhagem UFMG 905, na
resposta inflamatória induzida por *Salmonella enterica*
subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador:

Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG)

Co-orientadores:

Dra. Dorota Czerucka (Faculté de Médecine, Université de Nice-Sophia Antipolis, Nice/France)

Prof. Dr. Francisco José Penna (Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina/UFMG)

Belo Horizonte

2008

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente

Reitor: Prof. Ronaldo Tadêu Pena

Vice-Reitora: Profa. Heloisa Maria Murgel Starling

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Jaime Arturo Ramirez

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Carlos Alberto Pereira Tavares

Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Francisco José Penna

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Carlos Faria Santos Amaral

Subcoordenador do Centro de Pós-Graduação: João Lúcio dos Santos Jr.

Chefe do Departamento de Pediatria: Profa. Cleonice de Carvalho Coelho Mota

**Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de
Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente:**

Coordenador: Prof. Joel Alves Lamounier

Sub-coordenador: Prof. Eduardo Araújo de Oliveira

Prof^a Ana Cristina Simões e Silva

Prof. Francisco José Penna

Prof^a Ivani Novato Silva

Prof. Lincoln Marcelo Silveira Freire

Prof. Marco Antônio Duarte

Prof^a Regina Lunardi Rocha

Ludmila Teixeira Fazito (Rep. Disc. Titular)

Dorotéia Starling Malheiros (Rep. Disc. Suplente)



**FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 7009
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3248.9641 FAX: (31) 3248.9640



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores Doutores: Jacques Robert Nicoli, Dorota Czerucka, Francisco José Penna, Ieso de Miranda Castro, Vera Lúcia Sdepanian, Maria Auxiliadora Roque de Carvalho e Márcia Regina Fantoni Torres, aprovou a defesa de tese intitulada: **“EFEITO DE DOIS PROBIÓTICOS À BASE DE LEVEDURAS (*Saccharomyces Boulardii* e *Saccharomyces Cerevisiae* linhagem UFMG 905) NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR *Salmonella* Entérica SUBSP. ENTERICA SOROVAR. TYPHIMURIUM”**, apresentada pelo doutorando **FLAVIANO DOS SANTOS MARTINS** para obtenção do título de doutor em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 20 de fevereiro de 2008.

Prof. Jacques Robert Nicoli
Orientador

Prof. Dorota Czerucka
Co-orientadora

Prof. Francisco José Penna
Co-orientador

Prof. Ieso de Miranda Castro

Prof. Vera Lúcia Sdepanian

Prof. Maria Auxiliadora Roque de Carvalho

Prof. Márcia Regina Fantoni Torres



UFMG

FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 7009
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031)3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



ATA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO de **FLAVIANO DOS SANTOS MARTINS**, nº de registro 2004220460. Às nove horas do dia vinte do mês de fevereiro de dois mil e oito, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG a Comissão Examinadora de tese indicada pelo Colegiado do Programa para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **"EFEITO DE DOIS PROBIÓTICOS À BASE DE LEVEDURAS (*Saccharomyces Boulardii* e *Saccharomyces Cerevisiae* linhagem UFMG 905) NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR *Salmonella* Entérica SUBSP. ENTERICA SOROVAR. TYPHIMURIUM"** requisito final para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Jacques Robert Nicoli, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho final passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público para julgamento e expedição do resultado definitivo. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Jacques Robert Nicoli/orientador	Instituição: UFMG
Prof. Dorota Czerucka/co-orientadora	Instituição: Université de Nice
Prof. Francisco José Penna/co-orientador	Instituição: UFMG
Prof. Ieso de Miranda Castro	Instituição: UFOP
Prof. Vera Lúcia Sdepanian	Instituição: UNIFESP
Prof. Maria Auxiliadora Roque de Carvalho	Instituição: UFMG
Prof. Márcia Regina Fantoni Torres	Instituição: UFMG

Indicação: Aprovado
Indicação: Aprovado
Indicação: Aprovado
Indicação: APROVADO
Indicação: Aprovado
Indicação: Aprovado

Pelas indicações, o candidato foi considerado Aprovado.
O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo presidente da comissão. Nada mais havendo a tratar o presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA que será assinada por todos os membros participantes da comissão examinadora. Belo Horizonte, 20 de fevereiro de 2008.

Prof. Jacques Robert Nicoli/orientador _____

Prof. Dorota Czerucka/co-orientadora _____

Prof. Francisco José Penna/co-orientador _____

Prof. Ieso de Miranda Castro _____

Prof. Vera Lúcia Sdepanian _____

Prof. Maria Auxiliadora Roque de Carvalho _____

Prof. Márcia regina Fantoni Torres _____

Prof. Joel Alves Lamounier/Coordenador _____

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Dedico este trabalho a meus pais, Geraldo e Neuza, pelo apoio sempre constante e pela contribuição para o meu crescimento pessoal e profissional. Aos meus orientadores Jacques Robert Nicoli, Dorota Czerucka e Francisco José Penna.

“A confiança é a forma mais elevada de motivação humana. Ela traz à tona o que há de melhor nos seres humanos. Mas exige tempo e paciência, e não elimina a necessidade de treinar e aprimorar as pessoas, de forma que sua competência possa fazer jus à confiança depositada”. Stephen R. Covey.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli, que me recebeu em seu laboratório e, desde 2002, vem me orientando, sempre mostrando o melhor caminho a seguir, pela confiança depositada no meu trabalho, pela incontestável orientação ao longo de todo este trabalho e pela presença sempre constante. Pela grande pessoa e pesquisador que é, e por depositar em mim a confiança de uma parceria com um dos principais nomes na área de mecanismos de ação de probióticos, a Dra. Dorota Czerucka, e, também por sua presença e ajuda constantes, mesmo durante a realização do estágio de doutorado no exterior.

À minha co-orientadora, Dra. Dorota Czerucka, que me recebeu em seu laboratório, mesmo sem me conhecer, atendendo a um pedido do meu orientador. Também pela presença constante durante toda a realização dos experimentos e pelo acompanhamento pessoal e profissional durante minha estada na França. Enfim, por ter sido minha orientadora, amiga e parte da minha família no exterior. Por toda ajuda e conselhos, mesmo nos momentos mais complicados. Também pela confiança sempre depositada em mim e no meu trabalho.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Francisco José Penna, pelo convite em realizar essa tese pela Faculdade de Medicina. Também pelos conselhos, sugestões e toda ajuda ao longo deste trabalho e pela confiança depositada. E que este trabalho seja apenas o início de futuras colaborações.

À Profa. Dra. Regina Maria Nardi Drummond, do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, pela colaboração e ajuda prestada ao longo deste trabalho e pela sua disponibilidade em partilhar sua experiência profissional.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa, do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras, por gentilmente ceder a levedura *Saccharomyces cerevisiae* linhagem UFMG 905, utilizada neste trabalho.

À Profa. Dra. Rosa Maria Esteves Arantes, do Laboratório de Neuro-Imunopatologia Experimental, que executou todos os exames histológicos deste trabalho, pelas sugestões e sua disponibilidade, experiência e paciência na execução do mesmo.

À Profa. Dra. Ana Cristina Persichini Rodrigues, da Faculdade de Medicina da UNIFENAS, pelo auxílio durante a realização dos experimentos de translocação e de dosagem de imunoglobulinas, além de todas as sugestões e pela paciência e disponibilidade em sempre ajudar.

À Dra. Maria José Neves, do Laboratório de Radiobiologia (CNEN/CDTN) que vem me acompanhando desde a graduação e por ter me iniciado nesta área de pesquisa. Também pela confiança sempre depositada em mim e no meu trabalho, e por sempre disponibilizar seu laboratório.

Ao Dr. Emmanuel Lemichez, chefe do INSERM U627 Toxines Bactériennes dans la relation hôte pathogènes, Faculté de Médecine, Université de Nice-Sophia Antipolis, Nice, France, e seus colaboradores, em especial Anne Doye e Marc Lemonnier, pelo auxílio e incontestável experiência na área de proteínas Rho e microscopia confocal. E, também, por facilitarem a utilização de técnicas de microscopia eletrônica do Centro de Microscopia da Université de Nice-Sophia Antipolis.

Aos Drs. Jean-François Peyron (chefe da equipe), Veronique Imbert e Patricia Lagadec, do INSERM U526 Activation des Cellules Hématopoïétiques, IFR50, Faculté de Médecine, Université de Nice-Sophia Antipolis, Nice, France, e seus colaboradores, pela facilidade e disponibilidade do laboratório em realizar todos os experimentos de fatores de transcrição. Também, pelas discussões e sugestões realizadas nos seminários semanais do laboratório.

Ao Guillaume Dalmaso, aluno de doutorado da Dra. Dorota Czerucka, à época do meu estágio no exterior, por todo o auxílio nos experimentos, todas as sugestões, pela amizade, companhia e presença constantes.

Aos amigos do Laboratoire de Gastroentérologie et Nutrition, IFR50, Faculté de Médecine, Université de Nice-Sophia Antipolis, Nice, France, Prof. Dr. Jean-Claude Poirée (diretor do laboratório), Mme. Françoise Balas, Virginie, Nathalie, Celine e Rodolphe.

A Virginie por toda a sua amizade e companhia dentro e fora do local de trabalho, durante minha estadia na França.

A Maria Gorete Barbosa Ribas, que além de toda a ajuda técnica, nos acompanhou com sua agradável presença, amizade e alegria constante.

A Maria Helena Alves de Oliveira, Antônio Mesquita Vaz e Bernardo Barbosa, pelo inestimável auxílio técnico.

À banca do exame de qualificação, professores Ieso de Miranda Castro, Maria Auxiliadora Roque de Carvalho e Márcia Regina Fantoni Torres, pelas correções e sugestões.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos: Ariane, Bernardo, Cristiane, Danielle, Fabiana, Fábio, Felipe, Flávia, Flávio, Luiz, Gil, Glauciane, Ilana, Kátia, Leandro, Lorena, Luciano, Nely, Tainá, Tássia, Samir, Silvana, Sílvia, Vânia, e, também, àqueles que não estão mais no laboratório, mas que acompanharam parte dessa tese: Aline, Ana Carolina, Ana Helena, Luciana, Rinaldo e Simone.

À professora Sílvia Beleza de Moura, pelas sugestões, pelas conversas e pela companhia.

Ao professor Luiz Simeão do Carmo.

A Fabiana, que me acompanhou e ajudou na execução de uma parte dos experimentos.

Ao Luciano, pelo auxílio na parte experimental do trabalho realizado para a MERCK.

Aos amigos do CDTN/CNEN: Maria José, Raquel, Antero, Luciana, Frederico, Marcela, Estefânia, Marina e Tanius Mansur.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia e da Faculdade de Medicina, pelos valiosos ensinamentos.

Aos órgãos financiadores deste trabalho: CAPES, CNPq, FAPEMIG, MERCK S.A., Laboratoires Biocodex (Paris, França), Région Provence-Alpes Côte d'Azur, Conseil Général des Alpes Maritimes, Faculté de Médecine de l'Université de Nice-Sophia Antipolis, e Centre Hospitalier Regional de Nice.

Aos meus pais.

A todos os amigos que sempre me apoiaram.

A todos os meus colegas de curso.

A todos aqueles que não citei mas que, direta e indiretamente, sempre me apoiaram.

Finalmente, agradeço a Deus.

SUMÁRIO

SUMÁRIO**p**

Lista de figuras.....	xix
Lista de tabelas.....	xxv
Lista de abreviaturas.....	xxvi
Resumo.....	xxx
Abstract.....	xxxiii
I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	001
I.1 Epitélio intestinal.....	002
I.2 Microbiota gastrintestinal.....	005
I.3 Probióticos.....	008
I.3.1 Efeitos benéficos dos probióticos.....	011
I.3.2 Probióticos na dieta animal.....	012
I.3.3 Probióticos na dieta humana.....	013
I.3.4 Mecanismos de ação dos probióticos.....	014
I.3.5 A levedura <i>Saccharomyces boulardii</i>	015
I.3.5.1 Usos da levedura <i>S. boulardii</i> na medicina humana.....	017
I.3.5.2 Mecanismos de ação da levedura <i>S. boulardii</i>	018
I.3.5.2.1 Ações no nível celular.....	018
I.3.5.2.2 Ações no nível bacteriano.....	019
I.3.5.2.3 Efeito anti-inflamatório.....	022
I.3.5.2.4 Outros efeitos.....	023
I.3.5.3 Vantagens e desvantagens da utilização da levedura.....	023
I.3.6 A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem UFMG 905.....	024
I.3.7 Utilização de outras leveduras como probióticos.....	029
I.4 Diarréias.....	029
I.5 O gênero <i>Salmonella</i>	031
I.6 Probióticos e <i>Salmonella</i>	041
I.7 As vias de sinalização celular.....	043
I.7.1 O fator de transcrição NF- κ B.....	043
I.7.2 As MAP quinases.....	046

I.7.2.1 ERK.....	048
I.7.2.2 p38.....	048
I.7.2.3 JNK.....	049
I.8 Interleucina-8.....	050
I.9 O modelo animal gnotobiótico.....	053
I.10 O modelo de células T84.....	055
II - RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	057
III - OBJETIVOS.....	061
III.1 Objetivo geral.....	062
III.2 Objetivos específicos.....	062
IV - MATERIAIS E MÉTODOS.....	064
Parte I: Efeitos de <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 no sistema imune de camundongos NIH, isentos de germes e convencionais.....	065
IV.1 Animais.....	065
IV.1.1 Animais isentos de germes (IG).....	065
IV.1.2 Animais convencionais (CV).....	065
IV.1.3 Manejo dos animais.....	065
IV.2. Microrganismos.....	066
IV.2.1 Linhagens bacterianas.....	066
IV.2.2 Leveduras.....	066
IV.3 Tratamento e desafio dos animais.....	067
IV.3.1 Tratamento.....	067
IV.3.2 Desafio.....	068
IV.4 Determinação da translocação de <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 para as placas de Peyer (PP), linfonodos mesentéricos (LM), baço e fígado de camundongos gnotobióticos e convencionais.....	068
IV.5 Determinação do efeito de <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 na translocação de <i>Salm. Typhimurium</i> em camundongos gnotobióticos e convencionais.....	069
IV.6 Efeito de <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 na quantidade de células de Küpffer em camundongos gnotobióticos.....	069

IV.7	Determinação do efeito de <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 no clareamento de <i>E. coli</i> B ₄₁ em camundongos gnotobióticos.....	070
IV.8	Determinação do efeito de <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 no nível de imunoglobulina secretada do tipo A (sIgA) total no conteúdo intestinal de camundongos gnotobióticos e convencionais.....	070
IV.9	Determinação do efeito de <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 nos níveis de IgA, IgG e IgM totais no conteúdo intestinal e no soro de camundongos gnotobióticos e convencionais.....	071
IV.10	Exame anatomopatológico.....	072
Parte II: Efeitos de <i>S. boulardii</i> e <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 na sinalização celular induzida, em células T84, após infecção pelo enteropatógeno <i>Salm. Typhimurium</i> 14028.....		
IV.11	Culturas celulares.....	072
IV.12	Tratamento das monocamadas de células T84 com as leveduras <i>S. boulardii</i> ou <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 e infecção com <i>Salm. Typhimurium</i> 14028..	073
IV.13	Medidas da resistência elétrica transepitelial (RTE), em células T84, infectadas com <i>Salm. Typhimurium</i> 14028, pré- e co-incubadas (ou não), com <i>S. boulardii</i> ou <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905.....	073
IV.14	Efeito de <i>S. boulardii</i> ou <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 na resposta inflamatória, em células T84, após infecção por <i>Salm. Typhimurium</i> 14028.....	074
IV.14.1	Dosagem de IL-8.....	074
IV.14.2	Expressão de IL-8 por PCR em tempo real (“real time PCR”).....	074
IV.15	Efeito de <i>S. boulardii</i> e <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 nas vias de sinalização celular induzidas, em células T84, infectadas por <i>Salm. Typhimurium</i> 14028.....	075
IV.16	Efeito de <i>S. boulardii</i> e <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 na ativação de NF-κB, induzido por <i>Salm. Typhimurium</i> 14028.....	076
IV.17	Efeito de <i>S. boulardii</i> e <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 no crescimento, adesão e invasão celular induzidos, em células T84, infectadas por <i>Salm. Typhimurium</i> 14028.....	077
IV.18	Efeito de <i>S. boulardii</i> e <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 nas vias Rac e Cdc42 induzidas, em células T84, infectadas por <i>Salm. Typhimurium</i> 14028.....	078
IV.19	Análise da capacidade de <i>Salm. Typhimurium</i> 14028 de se ligar às células de <i>S. boulardii</i> e <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905.....	079

IV.20	Análise estatística.....	080
V	- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	081
Parte I: Efeitos de <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 no sistema imune de camundongos NIH isentos de germes e convencionais.....		
		082
V.1	Determinação da translocação da levedura <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 para as placas de Peyer, linfonodos mesentéricos, fígado e baço de camundongos NIH, gnotobióticos e convencionais.....	082
V.2	Determinação da translocação de <i>Salm. Typhimurium</i> para os linfonodos mesentéricos, fígado e baço de camundongos NIH, gnotobióticos e convencionais, na presença e na ausência da levedura <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905.....	085
V.3	Efeito da levedura <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905, nas células de Küpffer, em animais gnotobióticos.....	089
V.4	Efeito da levedura <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 no sistema fagocítico de camundongos NIH gnotobióticos, controles e experimentais, quando do desafio endovenoso com <i>E. coli</i> B ₄₁	092
V.5	Níveis de imunoglobulinas secretadas do tipo A (sIgA), IgG e IgM no conteúdo intestinal e no soro de camundongos NIH, gnotobióticos e convencionais, controles e experimentais, monoassociados ou tratados com a levedura <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905, respectivamente.....	094
Parte II: Efeitos de <i>S. boulardii</i> e <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 na sinalização celular induzida, em células T84, após infecção pelo enteropatógeno <i>Salm. Typhimurium</i> 14028.....		
		100
V.6	Efeito de <i>S. boulardii</i> e <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 na integridade epitelial de células T84, após infecção por <i>Salm. Typhimurium</i> 14028.....	100
V.7	Efeito de <i>S. boulardii</i> e <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 na resposta inflamatória, em células T84, após infecção por <i>Salm. Typhimurium</i> 14028.....	104
V.8	Efeito de <i>S. boulardii</i> e <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 nas vias de sinalização celular, induzidas em células T84, por <i>Salm. Typhimurium</i> 14028.....	110
V.9	Efeito de <i>S. boulardii</i> e <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 na invasão celular, em células T84, infectadas por <i>Salm. Typhimurium</i> 14028.....	127
VI	- SÍNTESE DOS RESULTADOS.....	141

VII - CONCLUSÕES.....	144
VIII - PERSPECTIVAS.....	146
IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	148
X - ANEXOS.....	211
X.1 Artigos publicados.....	212
X.2 Artigos aceitos para publicação.....	213
X.3 Artigos a publicar.....	214
X.4 Participação em eventos.....	215
X.5 Trabalhos apresentados em eventos.....	216
X.6 Prêmios recebidos.....	220
X.7 Autorização do Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG).....	221
X.8 Certificado de realização de estágio na Université de Nice, França.....	222

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Sobrevivência de camundongos NIH convencionais tratados (□) ou não (■) com *S. cerevisiae* UFMG 905 e desafiados com 10^4 células de *Salm. Typhimurium* no tempo 1. N = 20 (em cada grupo). * Estatisticamente diferente, segundo o teste Mann-Whitney Rank, (P = 0,00326). (MARTINS, 2004)..... 025
- Figura 2.** Aspecto histológico do cólon (A e C) e do ceco (B e D) de camundongos NIH gnotobióticos monoassociados (C e D) ou não (A e B) com a levedura *S. cerevisiae* UFMG 905 durante dez dias e desafiados com 10^4 células de *C. difficile* durante 6 dias. Coloração H-E (40X). As setas mostram as áreas de edema. (MARTINS, 2004)..... 026
- Figura 3.** Aspecto histológico do fígado de camundongos NIH convencionais controle (A) ou tratados com a levedura *S. cerevisiae* UFMG 905 durante dez dias (B) e desafiados com 10^4 células de *Salm. Typhimurium* por 28 dias. Coloração H-E (100X). As setas indicam as áreas de focos inflamatórios. (MARTINS, 2004)..... 027
- Figura 4.** Sinalização celular induzida pela *Salmonella* logo após o seu reconhecimento pelos receptores TLR-4 e TLR-5. (SALEZ & MALO, 2004)..... 037
- Figura 5.** Interação da *Salmonella* com as células epiteliais. (a) Em contato com a célula hospedeira, a *Salmonella* libera várias proteínas efetoras que manipulam o citoesqueleto celular e induz a entrada da bactéria. SopE, SopE2 e SopB ativam Cdc42 e Rac, levando ao remodelamento do citoesqueleto. SipA e SipC estabilizam a actina e induzem nucleação e polimerização da actina. (b) Após a internalização da bactéria, SptP reverte a função de SopE, SopE2 e SopB. (c) Após a internalização, o SCV interage, seletivamente, com a maquinaria endocítica do hospedeiro. (d) Assim que a infecção progride, SPI2-TTSS libera outras proteínas efetoras e a replicação bacteriana é iniciada. (PATEL *et al.*, 2005)..... 040
- Figura 6.** Ativação do fator de transcrição NF-κB. O NF-κB é mantido no citoplasma pelas proteínas inibidoras IκBs. Sob determinados estímulos, IκB é fosforilado, ubiquitinado e degradado, e o NF-κB fica livre para migrar para o núcleo, onde induz a transcrição de diversos genes dependentes de κB. NF-κB é, depois, inativado por novas proteínas IκBs sintetizadas. (JOBIN & SARTOR, 2000)..... 045

Figura 7. Esquema mostrando a sinalização celular via cascata das MAP quinases ERK, JNK e p38. (KATSOULIDIS <i>et al.</i> , 2005).....	047
Figura 8. Esquema mostrando as vias de transdução do sinal essenciais para a regulação do gene para IL-8. Após ativadas por diversos estímulos, as proteínas adaptadoras, TRAF 6 e TRAF 2, ativam as vias das MAPKs, assim como fosforila IκB. O NF-κB transloca-se para o núcleo onde, junto com a proteína AP-1, ativada pela MAPK JNK, ativam a transcrição do gene para IL-8. O mRNA sintetizado é rapidamente estabilizado pela MAPK p38. (HOFFMANN <i>et al.</i> , 2002).....	052
Figura 9. Translocação de <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 para o fígado, baço, linfonodos mesentéricos (LM) e placas de Peyer (PP) em animais monoassociados (A) e convencionais (B). N = 5.....	084
Figura 10. Translocação de <i>Salm. Typhimurium</i> , para o fígado, baço e linfonodos mesentéricos (LM), em camundongos gnotobióticos, previamente monoassociados com <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 (experimental), ou não (controle). N = 5.....	087
Figura 11. Translocação de <i>Salm. Typhimurium</i> , para o fígado, baço e linfonodos mesentéricos (LM), em camundongos convencionais, previamente tratados com <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 (experimental), ou não (controle), após 5 (A) e 10 (B) dias de desafio. N = 5.....	088
Figure 12. Aspecto histológico do fígado de camundongos corados por HE, mostrando o número de células de Küpffer em animais isentos de germes (A) e animais monoassociados com a levedura (B). Observe o aumento do número de células de Küpffer (setas) no fígado de animais monoassociados com <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905. Aumento: objetiva de 20X.....	090
Figura 13. Clareamento de <i>E. coli</i> B ₄₁ do sangue de camundongos isentos de germes (●) ou monoassociados com <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 (○). Os resultados são expressos como porcentagem de bactérias viáveis em relação ao tempo 0 (100%) por ml de sangue. Cada ponto representa a média de 11 animais, de dois experimentos independentes. As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. *Indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e experimental, avaliados pelo teste <i>t</i> de Student ($P < 0,05$).....	093
Figura 14. Níveis de IgA (A), sIgA (B), IgG (C-D) e IgM (E-F) produzidas no conteúdo intestinal (B, D e F) e soro (A, C e E) de camundongos isentos de germes (controle) e camundongos monoassociados com <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905	

(experimental). Os resultados estão expressos como média das concentrações de imunoglobulinas ($\eta\text{g g}^{-1}$ de conteúdo intestinal ou ml^{-1} de soro. As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. *Indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e experimental, avaliados pelo teste *t* de Student ($P < 0,05$). N = 5..... 098

Figura 15. Níveis de IgG (A) e IgM (B) produzidos no conteúdo intestinal de camundongos convencionais tratados (experimental) ou não (controle) com a levedura *S. cerevisiae* UFMG 905. Os resultados são expressos como média da concentração de imunoglobulinas ($\eta\text{g g}^{-1}$ no conteúdo intestinal. As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. Não houve diferença entre os outros grupos. N = 5..... 099

Figura 16. Efeito de *S. boulardii* (Sb) na diminuição da Resistência Trans-Epitelial (RTE) induzida por *Salm. Typhimurium* 14028 (ST), em células T84. A RTE diminui progressivamente em células infectadas com *Salm. Typhimurium* 14028 (\blacktriangle), quando comparadas com o controle (\blacksquare) ou em células infectadas na presença simultânea de *S. boulardii* (\triangle), ou em células pré-incubadas com *S. boulardii* e infectadas com *Salm. Typhimurium* 14028 (\bullet). A presença de *S. boulardii*, apenas, não interfere na RTE (\square). ON, “overnight”..... 102

Figura 17. Efeito de *S. cerevisiae* UFMG 905 (905) na diminuição da Resistência Trans-Epitelial (RTE) induzida por *Salm. Typhimurium* 14028 (ST), em células T84. A RTE diminui progressivamente em células infectadas com *Salm. Typhimurium* 14028 (\blacktriangle), quando comparadas com o controle (\blacksquare) ou em células infectadas na presença simultânea de *S. cerevisiae* UFMG 905 (\triangle), ou em células pré-incubadas com *S. cerevisiae* UFMG 905 e infectadas com *Salm. Typhimurium* 14028 (\bullet). A presença de *S. cerevisiae* UFMG 905, apenas, não interfere na RTE (\square). ON, “overnight”..... 103

Figura 18. Efeito de *S. boulardii* (Sb) nos níveis de IL-8, induzidos por *Salm. Typhimurium* 14028 (ST), em células T84. A IL-8 foi analisada no sobrenadante de células T84, por ELISA, após 3 horas de infecção com *Salm. Typhimurium* 14028, na presença de *S. boulardii* pré- ou co-incubada. *Diferença estatisticamente significativa entre as células infectadas por *Salm. Typhimurium* 14028 e células infectadas por *Salm. Typhimurium* 14028, na presença de *S. boulardii*. **Diferença estatisticamente significativa entre as células infectadas

por *Salm. Typhimurium* 14028 e o controle ($P < 0,05$, $n = 8$). C, controle; ON, “overnight”..... 107

Figura 19. Efeito de *S. boulardii* (Sb) nos níveis de IL-8 mRNA, induzidos por *Salm. Typhimurium* 14028 (ST), em células T84. IL-8 mRNA foi analisado nas células T84, por PCR quantitativo após 1h, 2h e 3h de infecção com *Salm. Typhimurium* 14028, na presença de *S. boulardii* pré- ou co-incubada. *Diferença estatisticamente significativa entre as células infectadas por *Salm. Typhimurium* 14028 e células infectadas por *Salm. Typhimurium* 14028, na presença de *S. boulardii*. ($P < 0,05$, $n = 6$). C, controle; ON, “overnight”..... 108

Figura 20. Efeito de *S. cerevisiae* UFMG 905 (Sc-905), nos níveis de IL-8, induzidos por *Salm. Typhimurium* 14028 (ST), em células T84. IL-8 foi analisado no sobrenadante de células T84, por ELISA, após 3 horas de infecção com *Salm. Typhimurium* 14028, na presença de *S. cerevisiae* UFMG 905 pré- ou co-incubada. *Diferença estatisticamente significativa entre as células infectadas por *Salm. Typhimurium* 14028 e células infectadas por *Salm. Typhimurium* 14028, na presença de *S. cerevisiae* UFMG 905. **Diferença estatisticamente significativa entre as células infectadas por *Salm. Typhimurium* 14028 e o controle ($P < 0,05$, $n = 8$). C, controle; ON, “overnight”..... 109

Figura 21. Efeito de *S. boulardii* (Sb) na indução da fosforilação de MAP quinases (p38, ERK1/2 e JNK) pela *Salm. Typhimurium* 14028 (ST), em células T84. As células foram lisadas após 1h, 2h e 3h de infecção com *Salm. Typhimurium* 14028 e as amostras foram corridas em SDS-PAGE e analisadas, por “imunoblotting”, com anticorpos anti-fosfo-p38 (A), anti-fosfo-ERK1/2 (B) ou anti-fosfo-JNK (C). C, controle; ON, “overnight”..... 118

Figura 22. Efeito de *S. cerevisiae* UFMG 905 (905) na indução da fosforilação de MAP quinases (p38, ERK1/2 e JNK) pela *Salm. Typhimurium* 14028 (ST), em células T84. As células foram lisadas após 1h, 2h e 3h de infecção com *Salm. Typhimurium* 14028 e as amostras foram corridas em SDS-PAGE e analisadas, por “imunoblotting”, com anticorpos anti-fosfo-p38 (A), anti-fosfo-ERK1/2 (B) ou anti-fosfo-JNK (C). C, controle; ON, “overnight”..... 119

Figura 23. *Saccharomyces cerevisiae* W303 (W303) não diminui a fosforilação de MAP quinases (p38 e ERK1/2), induzidas por *Salm. Typhimurium* 14028 (ST), em células T84. As células foram lisadas após 1h, 2h e 3h de infecção com *Salm.*

- Typhimurium 14028 e as amostras foram corridas em SDS-PAGE e analisadas, por “imunoblotting”, com anticorpos anti-fosfo-p38 (A) ou anti-fosfo-ERK1/2 (B). C, controle; ON, “overnight” 120
- Figura 24.** *Salmonella* Typhimurium 14028 (ST), na presença ou ausência de *S. boulardii* (Sb), não ativa a apoptose em células T84. As células foram lisadas após 1h, 2h e 3h de infecção com *Salm.* Typhimurium 14028 e as amostras foram corridas em SDS-PAGE e analisadas, por “imunoblotting” com anticorpo anti-caspase-3. C, controle; ON, “overnight” 121
- Figura 25.** *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (ST), na presença ou ausência de *S. cerevisiae* UFMG 905 (905), não ativa a apoptose em células T84. As células foram lisadas após 1h, 2h e 3h de infecção com *Salm.* Typhimurium 14028 e as amostras foram corridas em SDS-PAGE e analisadas, por “imunoblotting” com anticorpo anti-caspase-3. C, controle; ON, “overnight” 122
- Figura 26.** Efeito de *S. boulardii* (Sb) na fosforilação de I κ B- α (A) e na ativação do fator NF- κ B (B), induzidas por *Salm.* Typhimurium 14028 (ST), em células T84. As células foram lisadas após 1h, 2h e 3h de infecção com *Salm.* Typhimurium 14028 e as amostras foram corridas em SDS-PAGE e analisadas, por “imunoblotting”, com anticorpo anti-fosfo-I κ B- α . A ligação do fator NF- κ B ao DNA foi examinada pela técnica de EMSA. C, controle; TNF- α (controle positivo); ON, “overnight” 123
- Figura 27.** Efeito de *S. cerevisiae* UFMG 905 (905) na fosforilação de I κ B- α (A) e na ativação do fator NF- κ B (B), induzidas por *Salm.* Typhimurium 14028 (ST), em células T84. As células foram lisadas após 1h, 2h e 3h de infecção com *Salm.* Typhimurium 14028 e as amostras foram corridas em SDS-PAGE e analisadas, por “imunoblotting”, com anticorpo anti-fosfo-I κ B- α . A ligação do fator NF- κ B ao DNA foi examinada pela técnica de EMSA. C, controle; TNF- α (controle positivo); ON, “overnight” 124
- Figura 28.** Efeito de *S. boulardii* (Sb) e do sobrenadante de *S. boulardii* (SbS) na indução da fosforilação de MAP quinases (p38 e ERK1/2) pela *Salm.* Typhimurium 14028 (ST), em células T84. As células foram lisadas após 3h de infecção com *Salm.* Typhimurium 14028 e as amostras foram corridas em SDS-PAGE e analisadas, por “imunoblotting”, com anticorpos anti-fosfo-p38 (A) e anti-fosfo-ERK1/2 (B) 125

- Figura 29.** Efeito de *S. cerevisiae* UFMG 905 (905) e do sobrenadante de *S. cerevisiae* UFMG 905 (905S) na indução da fosforilação de MAP quinases (p38 e ERK1/2) pela *Salm. Typhimurium* 14028 (ST), em células T84. As células foram lisadas após 3h de infecção com *Salm. Typhimurium* 14028 e as amostras foram corridas em SDS-PAGE e analisadas, por “imunoblotting”, com anticorpos anti-fosfo-p38 (A) e anti-fosfo-ERK1/2 (B)..... 126
- Figura 30.** Efeito de *S. boulardii* (Sb) na ativação das vias Rac e Cdc42 induzidas pela *Salm. Typhimurium* 14028 (ST), em células T84. As células foram lisadas, após 3h de infecção com *Salm. Typhimurium* 14028, e as amostras foram corridas em SDS-PAGE e analisadas, por “imunoblotting” com anticorpos anti-Rac (A) ou anti-Cdc42 (B). ON, “overnight”..... 135
- Figura 31.** Microscopia eletrônica de varredura mostrando a ligação de *Salm. Typhimurium* 14028 em células de *S. boulardii*. (A) Controle (apenas células T84); (B) Células contendo apenas *S. boulardii*; (C) Células contendo *Salm. Typhimurium* 14028; (D, E, F) Células mostrando ligação de *Salm. Typhimurium* 14028 em *S. boulardii*..... 136
- Figura 32.** Microscopia eletrônica de varredura mostrando a ligação de *Salm. Typhimurium* 14028 em células de *S. cerevisiae* UFMG 905. (A) Controle (apenas células T84); (B) Células contendo apenas *S. cerevisiae* UFMG 905; (C) Células contendo *Salm. Typhimurium* 14028; (D, E, F) Células mostrando ligação de *Salm. Typhimurium* 14028 em *S. cerevisiae* UFMG 905..... 137
- Figura 33.** Microscopia confocal mostrando a ligação de *Salm. Typhimurium* 14028 (vermelho) em células de *S. boulardii* (azul)..... 138
- Figura 34.** Efeito de *S. boulardii* (Sb), na indução da via PI3K-Akt (phosphatidylinositol-3-kinase) pela *Salm. Typhimurium* 14028 (ST), em células T84. As células foram lisadas após 1h, 2h e 3h de infecção com *Salm. Typhimurium* 14028 e as amostras foram corridas em SDS-PAGE e analisadas, por “imunoblotting” com anticorpo anti-fosfo-Akt. C, controle; ON, “overnight”..... 139
- Figura 35.** Efeito de *S. cerevisiae* UFMG 905 (905) , na indução da via PI3K-Akt (phosphatidylinositol-3-kinase) pela *Salm. Typhimurium* 14028 (ST), em células T84. As células foram lisadas após 1h, 2h e 3h de infecção com *Salm. Typhimurium* 14028 e as amostras foram corridas em SDS-PAGE e analisadas, por “imunoblotting” com anticorpo anti-fosfo-Akt. C, controle; ON, “overnight”... 140

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de focos inflamatórios por unidades de área presentes nos fígados de camundongos NIH convencionais tratados ou não com a levedura <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 durante dez dias, e desafiados com 10^4 células de <i>Salm. Typhimurium</i> , por 28 dias. (MARTINS, 2004).....	028
Tabela 2. Número de células de Küpffer (por 100 hepatócitos) em camundongos sem germes (controle) e camundongos monoassociados, durante 10 dias, com a levedura <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 (experimental). ($P = 0,013$; $N = 12$).....	091
Tabela 3. Efeito de <i>S. boulardii</i> na adesão e invasão de <i>Salm. Typhimurium</i> 14028, em células T84.....	133
Tabela 4. Efeito de <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 na adesão e invasão de <i>Salm. Typhimurium</i> 14028, em células T84.....	134

LISTA DE ABREVIATURAS

AEBSF = 4-(2-aminoetil) benzenosulfonil fluoreto hidróclorido

AMPc = adenosina monofosfato cíclica

AP-1 = proteína adaptadora 1

ARE = elementos *cis* ricos em AU

ATCC = coleção americana de culturas típicas

BAL = bactérias do ácido láctico

BHI = infuso de cérebro e coração

BSA = soro albumina bovina

C/EBP β = proteína β ligadora da região “CCAAT/enhancer”

Cadeia J = cadeia “joining”

CV = convencional

DMEM-F12 = “Dulbecco-Vogt modified Eagle” e “Ham’s F-12”

DSS = dextran sulfato de sódio

EGF = fator de crescimento epidérmico

EHEC = *E. coli* enterohemorrágica

EMSA = ensaio de mudança de mobilidade eletroforética

EPEC = *E. coli* enteropatogênica

ERK1/2 = quinase regulada por sinal extracelular 1/2

FAO/WHO = “Food and Agricultural Organization / World Health Organization”

FDA = “Food and Drug Administration”

FOS = frutooligossacarídeos

GAP = proteína ativadora de GTPase

GCK = quinase centro germinal

GF = “germ-free”

GM-CSF = fator estimulante de colônias de macrófagos e monócitos

GN = gnotobiótico

GPI = fosfolípidio-fosfatidil-inositol

GTPases = guanidina tri-fosfatases

HDL = lipoproteínas de alta densidade

HE = hematoxilina-eosina

HSP = proteína de choque térmico

I κ B = proteína inibidora κ B

IFN- β = interferon β

Ig = imunoglobulina

IG = isento de germes

IgA = imunoglobulina do tipo A

IgG = imunoglobulina do tipo G

IgM = imunoglobulina do tipo M

IKK =quinase inibidora de κ B

IL = interleucina

INCQS = Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IP-10 = proteína 10 induzida por interferon

IRAK4 = quinase associada ao receptor para interleucina 1

IRF-3 =fator 3 regulador de interferon

JNK = quinase c-Jun NH₂ terminal

kDa = quilo Dalton

LB = Luria Bertani

LBP = proteína de ligação ao LPS

LDL = lipoproteínas de baixa densidade

Lgps = glicoproteínas lisossômicas

LM = linfonodos mesentéricos

LPS = lipopolissacáride

MAP = proteína ativada por mitógeno

MAPK = proteína quinase ativada por mitógeno

MAPKAP-K2 = proteína quinase 2 ativada por MAPK

MAPKK = MAP quinase quinase

MAPKKK = MAP quinase quinase quinase

MCP-1 = proteína 1 quimioatrativa de monócitos

MIP1 α = proteína 1 α inflamatória de macrófagos

MLC = cadeia leve da miosina

MLCK = MLC quinase

MyD88 = fator 88 de diferenciação mielóide

NADL = “National Animal Disease Laboratory”

NEMO = modificador essencial do fator nuclear κ B

NF- κ B = fator nuclear kappa B
NIH = “National Institute of Health”
NLRs = receptores “parecidos” com o domínio de oligomerização ligado ao nucleotídeo
NOD = domínio de oligomerização ligado ao nucleotídeo
NOS2 = óxido nítrico sintase 2
NRF = fator de repressão do NF- κ B
OMS = Organização Mundial de Saúde
ON = “overnight”
PAF = fator ativador de plaquetas
PAMP = motivos moleculares associados a patógenos
PBS = tampão fosfato
PCR = reação em cadeia da polimerase
PEEC = quimioatrativo epitelial extraído de patógeno
PFGE eletroforese em gel de campo pulsado
PI3K-AKT = fosfatidil-inositol-3-quinase
PKC = proteína quinase C
PMN = leucócitos polimorfonucleares
PP = placas de Peyer
PPAR-gamma = receptor gama ativado pelo proliferador de peroxisomo
PtdIns(4,5)P₂ = fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
RAPD-PCR = Amplificação aleatória de genomas polimórficos pela reação em cadeia da polimerase
RES = sistema reticulo-endotelial
RFLP análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição
Rpm = rotações por minuto
RTE = resistência trans-epitelial
SAPK = proteína quinase ativada por estresse
Sb = *Saccharomyces boulardii*
SbS = sobrenadante de *S. boulardii*
SC = componente secretado
Sc 905 = *Saccharomyces cerevisiae* linhagem UFMG 905
SCID = imunodeficiência combinada com imunoincompetência singênica grave
SCV = vacúolo contendo a *Salmonella*
SDS-PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio

Sifs = filamentos induzidos pela *Salmonella*

sIgA = imunoglobulina do tipo A secretada

SPI = ilha de patogenicidade de *Salmonella*

ST = *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium

TAB1 = proteína ligadora à proteína quinase ativada por fator de crescimento e diferenciação β

TAK1 = quinase associada a fator de crescimento e diferenciação β

TGF- β = fator de crescimento e diferenciação β

TIRAP = proteína adaptadora contendo o domínio do receptor toll para interleucina 1

TLR = receptores semelhantes ao toll

TNF- α = fator de necrose tumoral- α

TRAF6 = fator associado ao receptor de fator de necrose tumoral

TRAM = molécula adaptadora relacionada à TRIF

TRIF = proteína adaptadora indutora de interferon β contendo o domínio do receptor toll para interleucina 1

TTSS = sistema de secreção do tipo três

UFC = unidade formadora de colônia

YPG = extrato de levedura, peptona e glicose

ZO = “zonula occludens”

Probióticos são definidos como microrganismos viáveis que exibem um efeito benéfico na saúde do hospedeiro, quando ingeridos em quantidades suficientes. Muitas espécies de bactérias são usadas para esse fim e a única levedura utilizada como probióticos em seres humanos é *Saccharomyces boulardii*. Resultados anteriores obtidos em nosso laboratório mostraram que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* linhagem UFMG 905, isolada da produção de cachaça, foi capaz de colonizar e sobreviver no trato gastrintestinal de camundongos, isentos de germes e convencionais, respectivamente, além de proteger esses animais contra um desafio oral com *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium e *Clostridium difficile*. Na primeira parte desse trabalho, os efeitos de *S. cerevisiae* UFMG 905 na translocação de *Salm.* Typhimurium para os linfonodos mesentéricos, placas de Peyer, baço e fígado, assim como o efeito no sistema imune, pela contagem de células de Küpffer, produção de imunoglobulinas e clareamento de *Escherichia coli* B₄₁ da corrente sanguínea, foram avaliados em camundongos gnotobióticos e/ou convencionais. O tratamento com a levedura reduziu significativamente a translocação de *Salm.* Typhimurium para o fígado de animais gnotobióticos e, para todos os órgãos testados, em animais convencionais. O número de células de Küpffer (por 100 hepatócitos) foi significativamente maior ($P < 0,05$) em camundongos monoassociados com a levedura ($52,9 \pm 15,7$) que em camundongos isentos de germes ($38,1 \pm 9,0$). Provavelmente, como uma consequência do aumento do número de células de Küpffer, o clareamento de *E. coli* B₄₁ da corrente sanguínea foi mais eficiente nos animais monoassociados com a levedura, quando comparado com os animais controle isentos de germes. Foram observados maiores níveis de sIgA no conteúdo intestinal e de IgA e IgM no soro ($P < 0,05$) nos camundongos monoassociados com a levedura que no grupo isento de germes. Concluindo, a proteção observada contra a bactéria enteropatogênica em nosso estudo anterior foi, provavelmente, devida à modulação local e sistêmica do sistema imune de camundongos tratados com *S. cerevisiae* UFMG 905.

Na segunda parte desse trabalho, estudou-se os efeitos de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 na inflamação e na sinalização celular induzidos pela *Salm.* Typhimurium 14028, em células T84. Observou-se que os dois probióticos mantiveram a resistência elétrica transepitelial e diminuíram, significativamente, a secreção de IL-8 em células T84 infectadas por *Salm.* Typhimurium 14028 ($P < 0,05$). *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 e *S. boulardii* diminuíram, significativamente, os níveis de invasão pela *Salm.* Typhimurium 14028 ($P < 0,05$), mas nenhum efeito das leveduras no

crescimento ou adesão bacteriana em células T84 foi observado. Diferentemente de *S. boulardii*, *S. cerevisiae* UFMG 905 não foi capaz de diminuir a ativação de Rac1 e Cdc42 em células infectadas por *Salm. Typhimurium* 14028. Essas duas proteínas são Rho-GTPases ativadas pela bactéria e estão envolvidas na internalização de bactérias invasivas. A ligação de *Salm. Typhimurium* 14028 à superfície de *S. cerevisiae* UFMG 905 e *S. boulardii*, e não às células epiteliais do intestino, pode ser responsável pela diminuição da invasão e ativação de MAPKs (mitogen-activated protein kinases) e, conseqüentemente, pela diminuição dos níveis de IL-8, uma vez que esse processo diminui o número de bactérias ligadas às células T84. Entretanto, a diminuição dos níveis de IL-8 também pode ser explicada por uma imunomodulação, via secreção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, mas essa hipótese não foi testada nesse trabalho. A presença das leveduras em células infectadas com *Salm. Typhimurium* 14028 também reduziu e/ou inibiu a fosforilação das MAPKs ERK1/2, p38 e JNK, mas não diminuiu a ligação do fator de transcrição para IL-8 (NF- κ B) ao DNA, sugerindo que a diminuição dos níveis de IL-8 não foi devido à inibição do fator de transcrição para IL-8, mas, provavelmente, ao efeito das leveduras na inibição da MAPK p38, que é a proteína responsável pela estabilização do mRNA para IL-8. Uma outra explicação é o fato de as duas leveduras inibirem a MAPK JNK, uma vez que AP-1 (outro fator de transcrição para IL-8) é dependente da fosforilação dessa proteína. Finalmente, *S. cerevisiae* UFMG 905 e *S. boulardii* inibem, também, a ativação de mecanismos anti-inflamatórios (a via PI3K/Akt) induzidos por *Salm. Typhimurium* 14028 em células T84. Concluindo, *S. cerevisiae* UFMG 905 e *S. boulardii* apresentaram um efeito protetor e modulador na função de barreira e na sinalização celular induzida em células T84 pela *Salm. Typhimurium* 14028.

ABSTRACT

Probiotics are defined as viable microorganisms that exhibit a beneficial effect on the host health when ingested in adequate amounts. Many species of bacteria are used for this purpose and the only one yeast used as probiotic in humans is *Saccharomyces boulardii*. Previous results in our laboratory showed that *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905, isolated from “cachaça” production, was able to colonize and survive in the gastrointestinal tract of germ-free and conventional mice, respectively, and to protect these animals against oral challenge with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium and *Clostridium difficile*. In the first part of this work, the effects of *S. cerevisiae* UFMG 905 on the translocation of *Salm.* Typhimurium to mesenteric lymph nodes, Peyer’s patches, spleen and liver, as well as on the immune system by number of Küpffer cells, immunoglobulin production and clearance of *Escherichia coli* B₄₁, were evaluated in gnotobiotic and/or conventional mice. The treatment with the yeast reduced significantly the translocation of *Salm.* Typhimurium to liver in gnotobiotic animals and to all the organs tested in conventional mice. The number of Küpffer cells per 100 hepatocytes in liver was significantly higher ($P < 0.05$) in yeast mono-associated mice (52.9 ± 15.7) than in germ-free controls (38.1 ± 9.0). Probably, as a consequence, clearance of *E. coli* B₄₁ from the bloodstream was more efficient in yeast mono-associated animals when compared to germ-free mice. Higher levels ($P < 0.05$) of sIgA in intestinal content and of IgA and IgM in serum were observed in yeast mono-associated mice when compared to germ-free group. Concluding, the protection against pathogenic bacteria observed in a previous study was probably due to a modulation of both local and systemic immunity of mice treated with *S. cerevisiae* UFMG 905.

In a second part of this work, we have studied the effects of *S. boulardii* and *S. cerevisiae* UFMG 905 on the inflammation and signal transduction induced by *Salm.* Typhimurium ATCC 14028 in T84 cells. We have observed that both probiotics maintained the transmonolayer electrical resistance and significantly diminished IL-8 secretion in *Salm.* Typhimurium 14028-infected T84 cells ($P < 0.05$). *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 and *S. boulardii* also decreased significantly the levels of *Salm.* Typhimurium 14028 invasion ($P < 0.05$), but had no effect on *Salm.* Typhimurium 14028 growth or adhesion to T84 cells. Differently from *S. boulardii*, *S. cerevisiae* UFMG 905 was not implicated in the diminution of the activation of Rac1 and Cdc42 in *Salm.* Typhimurium 14028-infected cells, which are Rho-GTPases activated by the bacteria involved in the internalization of invasive bacteria. The binding of *Salm.*

Typhimurium 14028 to *S. cerevisiae* UFMG 905 and *S. boulardii* surface instead of T84 cells may be responsible for the diminution of invasion and activation of MAPKs (mitogen-activated protein kinases) and consequently by the diminution of IL-8 levels, since this process diminishes the number of bacteria bound to T84 cells. However, the diminution of IL-8 may also be explained by an immunomodulation through secretion of anti-inflammatory cytokines, such as IL-10, but this hypothesis was not tested in this work. The presence of the yeasts in *Salm.* Typhimurium 14028-infected cells also reduced and/or inhibited the phosphorylation of ERK1/2, p38 and JNK MAPKs, but did not inhibit NF- κ B DNA binding activity, suggesting that the diminution of IL-8 levels was not due to inhibition of the IL-8 transcription factor but more probably to the effects of the yeasts on the p38 MAPK inhibition, which is responsible for the stabilization of IL-8 mRNA. The inhibition of JNK by the yeasts may be another explanation, once AP-1, another IL-8 transcription factor, is dependent on the phosphorylation of this protein. Finally, *S. cerevisiae* UFMG 905 and *S. boulardii* inhibited the activation of anti-inflammatory mechanism (PI3K/Akt pathway) induced by *Salm.* Typhimurium 14028 in T84 cells. Concluding, *S. cerevisiae* UFMG 905 and *S. boulardii* showed a protective and modulating effect on barrier function and signal transduction pathway in T84 cells when infected by *Salm.* Typhimurium 14028.

I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I.1 Epitélio intestinal

A superfície mucosa do trato gastrointestinal é a maior superfície corporal em contato com o meio externo (200 a 300 m²). Ela representa um ecossistema complexo que combina epitélio gastrointestinal, células imunes e microbiota residente (MCCRACKEN & LORENZ, 2001). A mucosa do trato intestinal está constantemente exposta a vários microrganismos patogênicos, e uma barreira física e química contra esses patógenos é criada pelo epitélio intestinal (LIEVIN-LE MOAL & SERVIN, 2006). A superfície do intestino é delineada por um epitélio simples colunar que forma diversas invaginações, ou criptas, que são embebidas no tecido conectivo. As células epiteliais intestinais formam uma barreira física que protege o hospedeiro contra uma infecção patogênica (LOUVARD *et al.*, 1992; KEDINGER *et al.*, 1998; MONTGOMERY *et al.*, 1999). O epitélio intestinal representa um modelo de renovação tissular, uma vez que as células intestinais são constantemente geradas de células tronco multipotentes localizadas nas criptas de Lieberkühn, o que gera novas células precursoras permitindo uma alta taxa de renovação (“turnover”) celular. Nas vilosidades intestinais, as células epiteliais polarizadas que formam o epitélio separam dois diferentes compartimentos. Essa barreira epitelial é formada por quatro linhagens de células epiteliais diferentes, incluindo (i) os enterócitos, que expressam na parte apical uma densa e ordenada borda em escova, que consiste de microvilosidades organizadas na membrana; (ii) as células enteroendócrinas, contendo pequenos grânulos com diversos peptídeos hormonais; (iii) as células caliciformes, responsáveis pela produção de muco; e (iv) as células de Paneth, com grânulos apicais contendo peptídeos e proteínas antimicrobianos. Somado a isso, ainda existem as células M (“microfold”) - que são células epiteliais especializadas, localizadas no epitélio folicular associado, que estão sobre o tecido linfóide - presentes no epitélio associado ao folículo (LIEVIN-LE MOAL & SERVIN, 2006).

Em camundongos, o desenvolvimento do epitélio gastrointestinal começa a partir da primeira semana de gestação e se estende até o dia 21 pós-natal. Entretanto, em seres humanos, o desenvolvimento ocorre, principalmente, durante o primeiro trimestre de gestação, mas segue um programa de desenvolvimento similar àquele observado em roedores (MONTGOMERY *et al.*, 1999). A morfogênese e a diferenciação do intestino requerem um “cross-talk” entre o epitélio e as células mesenquimais. Inicialmente, uma onda de diferenciação proximal-distal muda o epitélio pseudoestratificado para uma

camada colunar simples de células epiteliais indiferenciadas. Logo após, a diferenciação celular ocorre como células epiteliais originadas de células tronco multipotentes na base das criptas de Lieberkühn, que são os locais de proliferação de células epiteliais. Após essa etapa, as células primas começam a se diferenciar em quatro tipos celulares (CHENG & LEBLOND, 1974; FALK *et al.*, 1998). As células de Paneth migram para a base da cripta do intestino delgado, enquanto os outros tipos celulares migram da cripta para as vilosidades do intestino delgado. As células colunares, também conhecidas como enterócitos, no intestino delgado, ou colonócitos, no intestino grosso, compreendem mais de 80% de todos os tipos celulares. As células caliciformes estão presentes em todo o intestino, mas aumentam em densidade da porção proximal para a distal. As células enteroendócrinas, com o sistema nervoso sistêmico, estão dispersas em todo o intestino (FURNESS *et al.*, 1999). As células epiteliais intestinais possuem um ciclo de vida de, aproximadamente, 2-5 dias e, durante a morte, são exfoliadas, junto com as bactérias aderentes, o que auxilia na eliminação de patógenos. As células de Paneth possuem uma vida maior, sobrevivendo por mais de 20 dias, ao final dos quais são fagocitadas.

A integridade da camada de células epiteliais é mantida por complexas junções intercelulares compostas por junções serreadas, junções aderentes e desmossomas. As junções serreadas, componentes mais apicais do complexo juncional, criam uma barreira semipermeável entre células individuais, que podem ser reguladas e servem como barreira de permeabilidade (ANDERSON *et al.*, 1993; SCHNEEBERGER & LYNCH, 2004). Quarenta diferentes proteínas estão envolvidas nas junções serreadas, tais como: ZO (zonula occludens)-1, ZO-2, ZO-3, membros da família de proteínas guanilato quinases associadas à membrana, ocludina, claudinas, cingulina, 7H6 e várias fosfoproteínas ainda não identificadas (CITI & CORDENONSI, 1998; MITIC & ANDERSON 1998). Vários patógenos exploram as junções serreadas para modular a permeabilidade intestinal e facilitar a própria entrada no tecido (HOFMAN, 2003; FASANO & NATARO, 2004). Outros patógenos utilizam as células M, que circulam o sistema linfóide associado à mucosa (KRAEHENBUHL & NEUTRA, 2000; NEUTRA *et al.*, 2001), como rota de entrada e, após atravessar essas células, encontram as células fagocíticas, em especial os macrófagos, que estão presentes no folículo (JEPSON & CLARK, 1998; SANSONETTI & PHALIPON, 1999; CLARK & JEPSON, 2003).

As células epiteliais do intestino protegem o hospedeiro fornecendo uma forte barreira física e, também, pela produção de uma variedade de substâncias

antimicrobianas. Essa barreira física é, inicialmente, estabelecida, em seres humanos, dentro de 48 horas após o nascimento, pelo fechamento de membranas, o que limita a exposição sistêmica a antígenos (BINES & WALKER, 1991). As células epiteliais secretam diversas substâncias como muco, defensinas e substâncias antimicrobianas, que inibem o crescimento bacteriano e protegem o epitélio, prevenindo a adesão microbiana e mantendo as substâncias antimicrobianas e os anticorpos secretados na superfície epitelial (MAGNUSSON & STJERNSTROM, 1982; OUELLETTE, 1999). Somado a isso, as células epiteliais secretam diversas citocinas e quimiocinas, incluindo IL (interleucina)-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1 (“monocyte chemoattractant protein 1”), GM-CSF (“granulocyte-macrophage colony-stimulating factor”), TNF- α (“tumor necrosis factor α ”) e TGF- β (“transforming growth factor β ”) (MCCRACKEN & GASKINS, 1999).

O sistema de defesa do hospedeiro contra patógenos entéricos inclui imunidade adaptativa e imunidade inata. A resposta imune adaptativa é observada 4 a 7 dias após a infecção, e esse mecanismo envolve a geração de memória imunológica e a expansão de receptores com especificidade relevante. Em contraste, o sistema imune inato é mobilizado nos primeiros dias para controlar a infecção (MEDZHITOV, 2001). O epitélio intestinal fornece uma superfície onde o hospedeiro pode “sentir” o ambiente microbiano e ativar uma resposta potente pela liberação de moléculas sinalizadoras, como as citocinas e as quimiocinas, e essas recrutam leucócitos e iniciam a atração de células imunes. Entretanto, o epitélio intestinal, ao contrário do epitélio pulmonar, tolera a colonização bacteriana e, embora exposto a bactérias comensais, a mucosa intestinal exibe apenas uma inflamação mínima em resposta aos componentes da microbiota normal, incluindo bactérias Gram-positivo e Gram-negativo. Esses produtos incluem componentes celulares, como o lipopolissacáride (LPS) de bactérias Gram-negativo e lipoproteínas e peptidoglicanos de bactérias Gram-positivo. O intestino do hospedeiro distingue a microbiota normal dos microrganismos enterovirulentos, utilizando sistemas altamente sofisticados de detecção de antígenos (DIDIERLAURENT *et al.*, 2002; ATHMAN & PHILPOTT, 2004; ALDRIDGE *et al.*, 2005). As bactérias indígenas da microbiota compartilham moléculas “self” (ou próprias), conhecidas como motivos moleculares associados a micróbios. Em contraste, após uma infecção, a resposta imune inata da mucosa do hospedeiro é ativada como um resultado do reconhecimento específico por receptores de reconhecimento padrão de estruturas moleculares “non-

self” encontradas em vários grupos de patógenos, conhecidas como motivos moleculares associados a patógenos, PAMP (“pathogen-associated molecular pattern”) (JANEWAY & MEDZHITOV, 2002). Por exemplo, as células epiteliais “sentem” o ambiente dentro do intestino, via receptores de reconhecimento, que incluem os receptores Toll-like (TLRs) e as proteínas NOD (“nucleotide-binding oligomerization domain”) (JANSSENS & BEYAERT, 2003; NETEA *et al.*, 2004; PHILPOTT & GIRARDIN, 2004; ECKMANN, 2005; KAWAI & AKIRA, 2005).

Em síntese, o epitélio intestinal não é apenas uma barreira física que previne os patógenos de ganharem acesso aos órgãos, ele também fornece uma superfície coberta de células especializadas na produção de muco, de peptídeos antimicrobianos e moléculas, como a lisozima que, juntos com a microbiota residente e o sistema imune, fornecem uma linha de defesa contra microrganismos patogênicos (LIEVIN-LE MOAL & SERVIN, 2006).

I.2 Microbiota gastrintestinal

O termo microbiota tem sido usado para descrever a coleção de bactérias abrigadas nas mucosas de um indivíduo (SAVAGE, 1977). O trato gastrintestinal dos mamíferos abriga uma comunidade microbiana que é extremamente densa e diversa, composta por 10^{14} unidades formadoras de colônias (UFCs), número dez vezes maior que o de células do hospedeiro (SAVAGE, 1977; BERG, 1996). Estima-se que o número de espécies bacterianas do trato gastrintestinal gire em torno de 400, embora estudos mais recentes indiquem que esse número varie entre 500-1000 espécies (SONNENBURG *et al.*, 2004; SUZUKI *et al.*, 2007). Entretanto, estudos sugerem que somente 30 a 40 destas espécies chegam a atingir níveis dominantes, necessários para exercer funções no ecossistema do hospedeiro que as alojam (MOORE & HOLDEMAN, 1974; VAUGHAN *et al.*, 2000). Toda esta comunidade microbiana pode se localizar no lúmen, nas criptas de Lieberkühn, na superfície do epitélio intestinal e em qualquer parte do trato digestivo (SAVAGE, 1987). O estabelecimento e a manutenção dessa microbiota constituem um processo complexo, que pode ser influenciado por vários fatores, como dieta, idade, utilização de antibióticos, utilização de probióticos e prebióticos, ambiente, microbiota materna, via do parto, interações microbianas, interações microrganismo-hospedeiro, presença de certos genes (ou

produtos gênicos ou expressão de certos genes) e receptores (MACKIE *et al.*, 1999; SAVAGE, 1999; BOURLIOUX *et al.*, 2003), além de sua sucessão ecológica, demanda nutricional e tolerância oral (VAN DER WAAIJ, 1989).

A maioria dos microrganismos do trato digestivo é anaeróbia, como é o caso das bifidobactérias, ou microaerófila, e estes podem interagir antagonisticamente ou sinergisticamente (MOORE & HOLDEMAN, 1974; FULLER, 1992). Como conseqüência, os gêneros envolvidos na sucessão ecológica darão origem a uma comunidade clímax, que pode ser observada em adultos, nos quais as condições ambientais e nutricionais não influenciam, de maneira significativa, a população dos microrganismos dominantes. São encontradas diferenças na composição dessa comunidade microbiana entre as diferentes espécies de mamíferos - por exemplo, entre ruminantes e não ruminantes e entre carnívoros e onívoros (SMITH & CRABB, 1961). Essa microbiota gastrintestinal varia qualitativamente, quantitativamente e metabolicamente, dependendo do local colonizado, da espécie e da idade do hospedeiro, além da localização longitudinal e transversal do trato gastrintestinal (NICOLI, 1995).

Os mamíferos nascem completamente estéreis. A colonização das superfícies corporais expostas, incluindo a pele, o trato respiratório, o sistema genito-urinário e o tubo digestivo, começa logo após o nascimento. Inicialmente, quando o espaço e a disponibilidade de nutrientes são abundantes, as bactérias com altas taxas de multiplicação começam a dominar. A partir do momento em que o número bacteriano aumenta, esses dois fatores - disponibilidade de nutrientes e espaço - ficam escassos, os "habitats" ficam ocupados por microrganismos mais especializados e a complexidade da biota aumenta (FALK *et al.*, 1998). As primeiras bactérias a colonizarem o trato gastrintestinal são derivadas da microbiota presente no canal do parto. Em recém-nascidos predominam *Escherichia coli*, *Clostridium* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bacteroides* spp. e *Bifidobacterium* spp. (ROTIMI & DUERDEN, 1981). As bifidobactérias formam o grupo mais numeroso enquanto os recém-nascidos são alimentados no peito (BULLEN *et al.*, 1976). A composição da microbiota fecal de crianças de diferentes áreas geográficas apresenta diferenças (ADLERBERTH *et al.*, 1991), que refletem, em parte, o impacto das condições ambientais, por exemplo, das condições sanitárias. A via do parto (NEUT *et al.*, 1987), o tipo de alimentação (ÖRSKOV & BIERING-SÖRENSEN, 1975; STARK & LEE, 1982; BALMER & WHARTON, 1989), hospitalização (LEFROCK *et al.*, 1979) e uso de antibióticos

(BENNET *et al.*, 1986) são outros fatores conhecidos que afetam a composição da microbiota gastrintestinal de crianças.

Comparações entre linhagens congênitas de ratos criados sob condições convencionais (com uma microbiota residente), sob condições isentas de germes e sob condições inicialmente isentas de germes e depois colonizados com certos componentes da microbiota (“ex-germ-free”) mostraram que as bactérias são responsáveis por um grande número de funções bioquímicas (MIDTVEDT, 1986; MIDTVEDT *et al.*, 1987). Essas incluem a desconjugação e desidroxilação de ácidos biliares por *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacteroides* spp., *Eubacterium* spp e *Clostridium* spp. (MIDTVEDT, 1974), a conversão de bilirrubina a urobilinogênio por *Clostridium ramosum* (MIDTVEDT & GUSTAFSSON, 1981) e o metabolismo de colesterol a coprostanol por linhagens pertencentes ao gênero *Eubacterium* (SADZIKOWSKI *et al.*, 1977). Menadiona (vitamina K) é produzida por uma grande variedade de bactérias intestinais, incluindo espécies de *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Enterobacterium*, *Veillonella*, *Enterococcus*, *Enterobacter* e *Streptococcus* (GUSTAFSSON, 1959; HILL, 1997). Além da produção de vitamina K, a microbiota intestinal está envolvida na produção de ácido pantotênico, biotina, piridoxina e outras vitaminas que não são absorvidas no cólon, como as vitaminas B₁₂, niacina, riboflavina e tiamina (ROLFE, 1984; NAIDU *et al.*, 1999; SILVERMAN *et al.*, 1999). A geração de ácidos graxos de cadeia curta é, também, uma característica comum da população clímax, embora as espécies responsáveis por isso ainda permaneçam indefinidas (HØVERSTAD, 1989).

Além das funções bioquímicas e digestivas no seu hospedeiro, a microbiota indígena desempenha outros papéis extremamente importantes. A resistência à colonização é a primeira linha de defesa contra a invasão por patógenos alóctones e por autóctones oportunistas, pela produção de bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos, competição por nutrientes e por sítios de adesão. A presença da microbiota também estimula o peristaltismo, o sistema imune e a maturação e renovação das células epiteliais do cólon (MCFARLAND, 2000b).

Estudos moleculares utilizando *B. thetaiotaomicron* - um comensal componente da microbiota normal de seres humanos e de camundongos - em camundongos isentos de germes, mostrou que esta bactéria modula a expressão de genes envolvidos em importantes funções intestinais, incluindo a absorção de nutrientes, efeito barreira,

metabolismo de xenobióticos, angiogênese e maturação intestinal pós-natal (HOOPER *et al.*, 2001).

A comunidade clímax de micróbios nunca é estática. Estudos de enumeração microbiológica e DNA “fingerprinting” têm revelado diferenças marcantes no número e tipo de subpopulações de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* entre e dentre indivíduos adultos (MCCARTNEY *et al.*, 1996). Um “habitat” no trato gastrointestinal será, em um dado momento, colonizado por espécies nativas (residentes ou autóctones) e um conjunto variável de espécies transientes (alóctones) que irão ocupar, apenas temporariamente, um espaço vago (SAVAGE, 1977). Bactérias alóctones podem representar linhagens cujo “habitat” está localizado em uma região mais proximal do trato gastrointestinal ou microrganismos que foram ingeridos. É difícil definir a composição da microbiota normal em uma dada região do trato gastrointestinal, mesmo dentro de um indivíduo; não só por causa do problema para se distinguir residente de transiente, mas, também, devido à dificuldade de cultivo de muitos componentes *ex vivo*. A microbiota dominante raramente apresentará grandes diferenças entre os indivíduos adultos; entretanto, a microbiota sub-dominante e, principalmente, a residual, podem sofrer alterações devido à idade, à distribuição geográfica, à dieta, ao estresse, às mudanças hormonais, ao comportamento sexual e ao uso de antibióticos (SALMINEN *et al.*, 1995; MARSHALL, 1999; MCFARLAND, 2000b). De todos esses fatores, os antibióticos são os responsáveis pelas mudanças mais rápidas e drásticas na microbiota normal (NICOLI, 1995).

I.3 Probióticos

A microbiota normal possui microrganismos com efeitos benéficos (*Bifidobacterium*, *Eubacterium* e *Lactobacillus*) e microrganismos com efeitos deletérios (*Clostridium* e *Veillonella*) para o hospedeiro (ROBERFROID, 2001). Nos últimos anos, vem aumentando o interesse no uso de microrganismos que exercem os efeitos benéficos com o propósito de beneficiar a saúde do hospedeiro e de prevenir ou tratar doenças. Esses organismos recebem o nome genérico de probióticos e vêm sendo propostos como medicamentos para prevenção e tratamento de um grande número de distúrbios gastrointestinais.

Relatos dos efeitos benéficos das bactérias na alimentação datam desde a versão Persa do Velho Testamento (Gênesis 18:8), que relata que “Abraão atribuiu sua longevidade ao consumo de leite azedo”. Plínio, um historiador romano, em 76 a.C., recomendou o uso de leite fermentado para o tratamento de gastroenterites (TEITELBAUM & WALKER, 2002). O termo probiótico foi criado como um antônimo ao termo antibiótico e, originalmente, foi proposto por LILLEY & STILLWELL (1965), significando aquele que favorece o crescimento de microrganismos. Mais de 20 anos depois, FULLER (1989) definiu probiótico como “um suplemento microbiano vivo que afeta benéficamente o animal hospedeiro graças à melhoria no balanço microbiano intestinal”, embora, hoje, os probióticos já tenham, também, aplicações em outros ecossistemas (BENGMARK, 1998; REID, 2000). Esta definição pode ser estendida ao hospedeiro humano como “microrganismos não-patogênicos que, quando ingeridos, exercem uma influência positiva na saúde ou fisiologia do hospedeiro” (MARTEAU *et al.*, 2001) ou, como “uma preparação ou produto contendo microrganismos viáveis, em número suficiente, para alterar a microbiota em um compartimento do hospedeiro ou para exercer efeitos benéficos no hospedeiro” (SCHREZENMEIR & DE VRESE, 2001). Esta definição enfatiza que outros compartimentos do corpo podem ser alvos dos probióticos, além do intestino, onde uma alteração da microbiota pode exercer um efeito benéfico. Existem alguns trabalhos mostrando a eficácia dos probióticos nas infecções do trato urogenital (HALLEN *et al.*, 1992; HILTON *et al.*, 1992; REID & BRUCE, 1995; PARENT *et al.*, 1996; ASAHARA *et al.*, 2001; REID, 2001; REID *et al.*, 2001), nas infecções causadas pelo *Helicobacter pylori* (KABIR *et al.*, 1997), infecções na boca e dentes (BAYONA GONZALES *et al.*, 1990; BUSSCHER *et al.*, 1999), infecções do trato respiratório (CANGEMI DE GUTIERREZ *et al.*, 2000; GRANGETTE *et al.*, 2001) e outras (BAUTISTA-GARFIAS *et al.*, 1999). Atualmente, a definição mais aceita para probióticos é aquela estipulada pela FAO/WHO (“Food and Agricultural Organization / World Health Organization”), que diz que probiótico é “um microrganismo vivo que, quando ingerido em quantidades suficientes, confere um benefício à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002).

Apesar de a definição de probióticos focar a importância de sua viabilidade, alguns trabalhos sugerem que microrganismos probióticos não-viáveis podem exercer algum efeito benéfico (OUWEHAND & SALMINEN, 1998). KAILA *et al.* (1995), utilizando microrganismos não-viáveis, observaram uma diminuição na duração de

diarréia por rotavirus e, VESA *et al.* (2000) observaram uma melhor tolerância à lactose.

Metchnikoff (1845-1916) foi o primeiro microbiologista a sugerir que o uso de bactérias poderia influenciar positivamente a microbiota do trato intestinal e prolongar a vida (METCHNIKOFF, 1907). Ele observou que a população da Bulgária tinha uma média de vida superior à do restante da Europa e correlacionou esta observação com a grande ingestão de coalhada pelos búlgaros. A partir deste dado, ele supôs que os lactobacilos eram importantes para a saúde humana e passou a defender o uso de iogurtes e alimentos fermentados.

O conceito de probiótico implica que o microrganismo empregado esteja viável, ou tenha condições de ser reativado, para que possa exercer seu efeito benéfico. Esta exigência reduz o número de microrganismos que podem atuar como medicamento, já que o intestino humano apresenta uma microbiota extremamente competitiva, que funciona como uma barreira física e química, conhecida como “barreira intestinal”, possuindo mecanismos poderosos de combate a microrganismos não autóctones (SAAVEDRA, 1995; CHANDAN, 1999). Embora não sejam mencionados números específicos na definição de probióticos, considera-se que, pelo menos, 10^9 unidades formadoras de colônias (UFCs)/dia de microrganismos devam ser ingeridos para chegar ao intestino em níveis iguais aos da microbiota dominante (OUWEHAND *et al.* 2002).

Os probióticos têm sido referidos, também, como agentes bioterapêuticos e alimentos funcionais (“functional foods”); porém, alguns autores preferem se referir a eles com termos distintos, definindo probióticos como “um suplemento microbiano vivo, que afeta benéficamente o animal hospedeiro graças à melhoria no balanço microbiano intestinal”, e alimentos funcionais como “agentes (vivos ou não) que possuem outras funções além de seu papel nutricional”, e reservam o termo “agentes bioterapêuticos” para “microrganismos vivos que possuem eficácia comprovada na prevenção ou tratamento de alguma doença pela interação com a microecologia natural do hospedeiro”. Neste último caso, vários autores consideram a levedura *Saccharomyces boulardii* e a bactéria *Lactobacillus rhamnosus* GG como os principais agentes bioterapêuticos atualmente estudados e comercializados, conforme revisado por ELMER *et al.* (1996), MCFARLAND (2000a) e ELMER & MCFARLAND (2001).

Além dos probióticos, também são estudados os prebióticos e os simbióticos. Os prebióticos são ingredientes alimentares não-digeríveis, que promovem a saúde do hospedeiro ao estimular a multiplicação ou a ação de uma espécie bacteriana - ou um

grupo delas - benéfica no trato digestivo. A lactulose, os frutooligossacarídeos (FOS) e a inulina são os prebióticos mais estudados e comercializados (ROBERFROID, 2001). O primeiro aumenta a atividade lactofermentativa de populações de *Lactobacillus*, e os FOS estimulam o crescimento de *Bifidobacterium*. É interessante salientar que o desenvolvimento dos prebióticos veio da descoberta dos fatores “bifidus”, grupo de oligossacarídeos presentes em maior quantidade no leite humano e que favorecem a multiplicação de *Bifidobacterium* de recém-nascidos amamentados no seio. Alimentos como alcachofra, cebola, banana, aspargo e chicória contêm, naturalmente, componentes com propriedades prebióticas. Já os simbióticos são combinações de probióticos e prebióticos (NICOLI & VIEIRA, 2000).

Entre os probióticos mais estudados, tanto experimentalmente quanto clinicamente, estão as bactérias e as leveduras. Alguns já são comercializados sob a forma de suplemento alimentar ou preparações farmacêuticas, contendo um ou vários microrganismos. Entre os principais probióticos estão as bactérias do ácido láctico (BAL), que incluem os lactobacilos (*Lactobacillus lactis*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. jensenii*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. helveticus*, *L. gasseri*), *Enterococcus faecium* SF68 e *E. faecalis*, *Streptococcus salivarius* e *S. thermophilus*, *Pediococcus acidilactici* e espécies de *Leuconostoc* e *Lactococcus*. Além das BAL, temos também as bifidobactérias (*Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. animalis*, *B. adolescentis*), *Escherichia coli* EMO e *E. coli* Nissle, *Bacillus subtilis* e *B. toyoi*, e as leveduras *S. boulardii* e *S. cerevisiae*. Esta última, geralmente, é utilizada apenas na medicina veterinária.

I.3.1 Efeitos benéficos dos probióticos

Entre os possíveis efeitos benéficos dos probióticos estão a modulação da resposta imune (SCHIFFRIN *et al.*, 1997; NEUMANN *et al.*, 1998; TEJADA-SIMON *et al.*, 1999; ISOLAURI *et al.*, 2001; HE *et al.*, 2002), o balanço da microbiota normal (PERDIGON *et al.*, 1998), a redução de enzimas fecais responsáveis pelo início do desenvolvimento de alguns tipos de cânceres (HIRAYAMA & RAFTER, 2000), prevenção de doenças atópicas (ISOLAURI *et al.*, 2000; KALLIOMAKI *et al.*, 2001; KALLIOMAKI *et al.*, 2003; KIRJAVAINEN *et al.*, 2003; ARVOLA *et al.*, 2004) e

alérgicas (HOPPU *et al.*, 2001; ISOLAURI, 2001; KIRJAVAINEN *et al.*, 2001; LAIHO *et al.*, 2002; RAUTAVA & ISOLAURI, 2002; KALLIOMAKI & ISOLAURI, 2003), tratamento da diarreia do viajante (SCARPIGNATO & RAMPAL, 1995), tratamento da diarreia associada ao uso de antibióticos (BARTLETT, 1992) e da diarreia infecciosa (KAILA *et al.*, 1992; FIGUEIREDO *et al.*, 2001), o controle da infecção por rotavírus e *Clostridium difficile* (MCFARLAND *et al.*, 1994), proteção contra a ação de patógenos (SILVA *et al.*, 1999), o papel de coadjuvante no tratamento com antibióticos no combate às úlceras causadas pelo *H. pylori* (AIBA *et al.*, 1998), a redução do colesterol do soro (EYSEN, 1973; LIN *et al.*, 1989; FUKUSHIMA & NAKANO, 1996; BEENA & PRASAD, 1997), o antagonismo *in vitro* e *in vivo* contra enteropatógenos (NICOLI & RAIBAUD, 1990; VANDENBERG, 1993; LIMA FILHO *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2001), alívio da constipação intestinal (GOLDIN, 1998) e o auxílio na absorção da lactose em pessoas com intolerância a este açúcar (SANDERS *et al.*, 1996; VESA *et al.*, 2000). Devemos observar que estes efeitos, além dos possíveis mecanismos de ação, são os mesmos propostos para os componentes da microbiota intestinal.

Para que um microrganismo utilizado como probiótico exerça o seu efeito benéfico desejado, além de permanecer viável durante sua passagem pelo sistema gastrointestinal, o seu nível populacional deve ser igual ou maior que 10 milhões de células por grama de conteúdo fecal (NICOLI & VIEIRA, 2000). Para isso, ele deve ser ingerido diariamente, para manter seus níveis artificialmente elevados no ecossistema digestivo. À exceção dos *L. rhamnosus* GG e Lcr35, não se conhecem probióticos capazes de persistir por um longo período no trato digestivo do adulto (ALANDER *et al.*, 1999; DE CHAMPS *et al.*, 2003).

I.3.2 Probióticos na dieta animal

Existem vários trabalhos mostrando os benefícios do uso de probióticos na dieta animal. FERREIRA & KUSSAKAWA (1999) relataram que a administração do probiótico *B. subtilis* em granjas de frangos de corte acarretava um aumento da musculatura e uma diminuição da quantidade de gordura, além de uma diminuição na porcentagem de isolamento da *Salmonella* de 60 para 20%. Ainda com este probiótico, observou-se um aumento na atividade das enzimas tripsina, amilase e lipase nos

frangos. Foi obtida uma diminuição no número de coliformes fecais, em frangos de corte, utilizando o probiótico *Bacillus natto* (FERREIRA & KUSSAKAWA, 1999). NADER DE MACIAS *et al.* (1993) observaram que *Lactobacillus* spp. competia com microrganismos indesejáveis do intestino, aumentando, deste modo, a saúde do animal. MAIA *et al.* (2001) observaram o efeito protetor da bactéria *E. faecium*, um componente de um produto comercial (Vitacanis®) composto por *L. acidophilus*, *E. faecium* e *S. cerevisiae*, durante desafio experimental com o enteropatógeno *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium.

Na dieta de ruminantes usa-se muito a levedura *S. cerevisiae*. Ela estimula a atividade dos microrganismos benéficos do trato gastrintestinal, aumentando, deste modo, a digestibilidade de nutrientes e o potencial de produção dos animais (NEWBOLD *et al.*, 1995; SINGH *et al.*, 1995; WOHLT *et al.*, 1998).

I.3.3 Probióticos na dieta humana

O uso de probióticos na dieta humana vem sendo amplamente difundido, tanto como suplemento alimentar (leite, leites acidófilos, iogurtes, coalhadas, etc), como na forma de medicamento, como é o caso da levedura *S. boulardii*, do *Lactobacillus* GG e, mais recentemente, o *L. casei* Shirota. O uso de probiótico como suplemento alimentar é devido, principalmente, à capacidade de várias bactérias diminuírem o colesterol circulante no soro, principalmente as bactérias do ácido láctico. Essas bactérias probióticas promovem um aumento notável no HDL (lipoproteínas de alta densidade) e diminuem a quantidade de LDL (lipoproteínas de baixa densidade) (BEENA & PRASAD, 1997). Um outro modo pelo qual estas bactérias conseguem diminuir o colesterol é acelerando a conversão desta substância em ácidos biliares, o que diminui a concentração de colesterol no soro (EYSEN, 1973; FUKUSHIMA & NAKANO, 1996).

Várias bactérias podem auxiliar na prevenção do câncer de cólon (LIDBECK *et al.*, 1992; LING *et al.*, 1992; LING *et al.*, 1994; WOLLOWSKI *et al.*, 1999), na absorção da lactose em pessoas que não conseguem digerir este açúcar (SANDERS *et al.*, 1996), na produção de certas vitaminas, principalmente a vitamina K e vitaminas do complexo B, no aumento populacional de certas bactérias desejáveis (BENNO *et al.*, 1996; MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 1999), além de outros benefícios adquiridos com

a ingestão destas bactérias (HANSON & YOLKEN, 1999). Adiciona-se a todos estes benefícios citados, o sabor agradável dos alimentos preparados a partir da fermentação realizada por estas bactérias, como os iogurtes e os leites fermentados.

Quanto ao efeito medicamentoso exercido por estes microrganismos, cita-se, principalmente, o uso na recomposição da microbiota após tratamentos com antibióticos de amplo espectro, durante o curso de vários tipos de diarreias e outros usos (conforme citado no item **I.3.1**), por vários mecanismos de ação (item **I.3.4**).

I.3.4 Mecanismos de ação dos probióticos

Existem vários mecanismos propostos para explicar os efeitos benéficos dos probióticos:

Produção de substâncias inibidoras de outros microrganismos. Os microrganismos produzem substâncias que inibem o crescimento de vários patógenos (SILVA *et al.*, 1987; VANDENBERG, 1993). Essas substâncias incluem os ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas, dentre outras. Estes compostos, além de reduzirem o número de células bacterianas viáveis, afetam o metabolismo bacteriano ou a produção de toxinas (ROLFE, 2000). PONGPECH & HENTGES (1989) constataram que as bactérias do ácido lático são capazes de produzir ácidos graxos voláteis, que são responsáveis pelo controle da colonização do intestino pela *Shigella sonnei* e *E. coli* enteropatogênica.

Competição por sítios de adesão e por nutrientes. Vários microrganismos usados como probióticos competem por sítios de adesão na superfície do epitélio intestinal e, por nutrientes, inibindo, deste modo, a fixação e a sobrevivência de patógenos (BERNET *et al.*, 1994; COCONNIER *et al.*, 1998). Um exemplo disso é o patógeno intestinal *Vibrio cholerae*, que precisa aderir à parede intestinal para colonizá-la e produzir a doença. Conseqüentemente, alguns probióticos são escolhidos devido à capacidade de adesão ao epitélio e competição pelos receptores, conforme demonstrado por TANNOCK (1986). Em 1988, WILSON & PERINI observaram, *in vitro*, que os microrganismos do intestino competem mais efetivamente pela glicose, pela N-acetilglicosamina e pelo ácido silfaco, que o patógeno *C. difficile*.

Inibição da produção ou ação de toxinas. A levedura *S. boulardii* pode proteger os animais contra a ação do *C. difficile* pela liberação de uma protease que

cliva as toxinas A e B, inibindo, deste modo, os efeitos na mucosa do cólon (CASTAGLIUOLO *et al.*, 1999). Um outro mecanismo proposto é a ligação da toxina do cólera em sítios específicos desta levedura (BRANDÃO *et al.*, 1998).

Modulação do sistema imune. Evidências sugerem que a modulação da resposta imune específica e não-específica pode ser um outro mecanismo pelo qual os probióticos protegem o hospedeiro contra as desordens gastrintestinais (KAILA *et al.*, 1992; PERDIGON *et al.*, 1995; MATSUZAKI & CHIN, 2000). Um exemplo é a administração de *Lactobacillus* GG durante a diarreia aguda, causada por rotavírus, que está associada ao aumento da resposta imune ao rotavírus (KAILA *et al.*, 1995).

I.3.5 A levedura *Saccharomyces boulardii*

Em meados de 1920, na Indochina, um microbiologista francês, Henri Boulard, estava à procura de uma linhagem de levedura que fosse capaz de suportar altas temperaturas, a fim de produzir um bom vinho. Durante esta época houve uma epidemia de cólera em uma das vilas e o pesquisador foi informado que a população local preparava um chá da casca de uma fruta local (lichia) para aliviar e até mesmo curar a diarreia. Posteriormente, verificou-se que a fruta, na verdade, estava recoberta por uma levedura, e a eficácia contra a diarreia se devia a esta levedura, que foi chamada de *Saccharomyces boulardii* (FLORASTOR, 2003). *Saccharomyces boulardii* é uma levedura não patogênica, termotolerante (cresce na temperatura de 37°C) e de uso muito difundido na medicina humana (MCFARLAND & BERNASCONI, 1993).

A partir de 1960 iniciou-se a comercialização da levedura liofilizada, pelo “Laboratoires Biocodex” (Paris, França). Assim, seu uso como medicamento para combate às diarreias foi difundido em toda Europa e está disponível no mercado sob diversos nomes comerciais, tais como: Ultra-Levure® (França), Florastor® (Estados Unidos), Precosa® (Dinamarca), Levucell® (Lallemand, Canadá), Perenterol® (Alemanha), Perenteryl® (Chile), Codex® (Itália), Floratil® (Brasil). Atualmente, a levedura é amplamente comercializada na Europa, Américas do Sul e do Norte, Ásia e África (MCFARLAND & BERNASCONI, 1993) e recentemente seu uso foi liberado pela FDA (Food and Drug Administration) nos Estados Unidos (FLORASTOR, 2007). Os direitos de comercialização para a América do Sul foram adquiridos pelas Indústrias

Químicas da MERCK S.A. Além disso, outras preparações contendo *S. boulardii* estão disponíveis no Brasil (MARTINS *et al.*, 2005b).

Saccharomyces boulardii foi, inicialmente, identificada como uma espécie distinta do gênero hemiascomiceto *Saccharomyces* (MCFARLAND, 1996). Atualmente, a taxonomia do gênero *Saccharomyces* é baseada em métodos genotípicos. Vários pesquisadores afirmam que a *S. boulardii* é uma linhagem de *S. cerevisiae*, uma vez que os métodos convencionais não podem ser utilizados para separar linhagens de *S. cerevisiae*. Devido ao seu valor terapêutico, à sua deficiência em utilizar galactose e produzir ascósporos, MCFARLAND (1996) sugeriu que esta levedura deveria ser considerada como uma espécie à parte. Uma série de estudos de reassociação de DNA [(nDNA)–nDNA] sugerem a divisão do gênero *Saccharomyces sensu stricto* em quatro espécies relacionadas: *S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* e *S. pastorianus* (CARDINALI & MARTINI, 1994). Cariotipagem eletroforética comparativa e análise multivariada do polimorfismo observado em gel de eletroforese de campo pulsado confirmam a existência de quatro “clusters”, cada um correspondente a um “taxon”, que foram distinguidas com base na comparação do DNA, utilizando a técnica de reassociação (nDNA)–nDNA, e corroboram a classificação de *S. boulardii* fora da espécie *S. cerevisiae* e também fora das outras três espécies (CARDINALI & MARTINI, 1994). Por outro lado, MALLIÉ *et al.* (2001) relataram que a tipagem por isoenzimas e estudo de polimorfismo de restrição do DNA mitocondrial permite a inclusão de *S. boulardii* no complexo *sensu stricto*. *Saccharomyces boulardii* está muito relacionado com *S. cerevisiae* e, por este motivo, propôs-se a denominação de *S. cerevisiae* var. *boulardii*. Um método utilizando polimorfismo de microsatélite, identificou uma seqüência específica 9 (CAG) no locus 4, presente apenas em *S. boulardii* e, deste modo, conferindo uma possível identidade à espécie *S. boulardii*, que não a de uma linhagem da espécie *S. cerevisiae* (HENNEQUIN *et al.*, 2001). VAN DER AA KUHLE & JESPERSEN (2003), analisando seqüências do domínio D1/D2 da região 26S do rDNA, a região ITS1-5.8S rDNA-ITS2 e o gene da subunidade 2 da citocromo oxidase c mitocondrial, mostraram uma relação muito íntima entre *S. boulardii* e *S. cerevisiae* e defenderam a identificação de *S. boulardii* como um membro da espécie *S. cerevisiae*, e não como uma espécie separada. Além do mais, a utilização de galactose não pode ser considerada como critério para classificar *S. boulardii* como uma espécie diferente de *S. cerevisiae* uma vez que esta capacidade é muito variável dentro da espécie (BARNETT *et al.*, 2000), assim como a capacidade de produção de

ascósporos (NAUMOVA *et al.*, 2003). MITTERDORFER *et al.* (2002), utilizando quatro técnicas moleculares diferentes [PCR (“polymerase chain reaction”) espécie-específico, RAPD-PCR (“randomly amplified polymorphic DNA-PCR”), análise do rDNA por RFLP (“restriction fragment length polymorphic”) e PFGE (“pulse-field gel electrophoresis”)] classificaram *S. boulardii* como uma espécie de *S. cerevisiae*. Recentemente, EDWARDS-INGRAM *et al.* (2007), utilizando hibridização genômica comparativa para análise do genoma inteiro, também concluíram que *S. boulardii* e *S. cerevisiae* são membros da mesma espécie.

Entretanto, apesar da semelhança genética entre *S. boulardii* e *S. cerevisiae*, elas apresentam algumas diferenças genéticas e fisiológicas. FIETTO *et al.* (2004) observaram que *S. boulardii* é geneticamente muito semelhante a *S. cerevisiae*, entretanto, metabolicamente e fisiologicamente diferente, particularmente no que se refere ao crescimento e à resistência à temperatura de 37°C e estresse ácido, que são importantes características de um microrganismo usado como probiótico. Alguns autores sugerem que a superexpressão de genes relacionados à síntese de proteínas e respostas a estresses poderiam contribuir para o aumento da taxa de crescimento e melhor sobrevivência de *S. boulardii* ao pH ácido (EDWARDS-INGRAM *et al.* 2007).

I.3.5.1 Usos da levedura *S. boulardii* na medicina humana

Este probiótico é usado no combate a vários tipos de distúrbios gastrintestinais, como diarreia associada ao uso de antibióticos (SURAWICZ *et al.*, 1989a; BARTLETT, 1992; MCFARLAND *et al.*, 1995; SURAWICZ, 2003), no tratamento da diarreia causada pelo *C. difficile* (ELMER & MCFARLAND, 2001; SURAWICZ, 2003), tanto nos casos de prevenção (SURAWICZ *et al.*, 1989a; MCFARLAND *et al.*, 1994; CASTAGLIUOLO *et al.*, 1999), quanto nos casos de recorrência da doença (SURAWICZ *et al.*, 1989b; KIMMEY *et al.*, 1990; ELMER *et al.*, 1999; SURAWICZ *et al.*, 2000), na prevenção e tratamento da diarreia do viajante (SCARPIGNATO & RAMPAL, 1995) e da diarreia em pacientes infectados pelo HIV (SAINT-MARC *et al.*, 1991; BORN *et al.*, 1993). O uso de *S. boulardii* tem sido sugerido na manutenção do tratamento da doença de Crohn (GUSLANDI *et al.*, 2000) e na prevenção de diarreia em pacientes recebendo alimentação por sonda (BLEICHNER *et al.*, 1997). Além destes, existem ensaios clínicos mostrando o seu efeito na microbiota de prematuros

(COSTALOS *et al.*, 2003) e na diminuição da diarreia em pacientes com amebíase aguda (MANSOUR-GHANAIE *et al.*, 2003). Apesar de todos estes trabalhos mostrando os efeitos benéficos de *S. boulardii*, poucos trabalhos se referem a uma relação entre a dose e o efeito de sua ingestão (PERET FILHO *et al.*, 1998; GIRARD *et al.*, 2003).

Existem relatos clínicos demonstrando que a levedura apresenta eficácia sob vários parâmetros clínicos analisados, tais como: incidência, tempo de duração, frequência, consistência e quantidade dos episódios diarreicos. A possibilidade de translocação de *S. boulardii* no interior do intestino é, praticamente, inexistente, uma vez que a levedura não coloniza o cólon (MCFARLAND & BERNASCONI, 1993).

A ingestão ocorre por via oral e, nestas condições, a levedura é insensível à ação dos sucos digestivos e de antibacterianos (BLÉHAUT *et al.*, 1989; BODDY *et al.*, 1991). A administração da levedura deve ser realizada de maneira repetida e regular, pois ela não se implanta no tubo digestivo, embora seja capaz de atingir, rapidamente, altas concentrações no cólon (FULLER, 1992). Dois a cinco dias após a descontinuação do seu uso, ela não é mais encontrada nas fezes (BLÉHAUT *et al.*, 1989). Em um estudo realizado com voluntários humanos, após o tratamento com a levedura, não foram observadas alterações nos níveis populacionais de anaeróbios estritos e facultativos da microbiota normal (KLEIN *et al.*, 1993).

I.3.5.2 Mecanismos de ação da levedura *S. boulardii*

Vários mecanismos de ação da levedura em infecções experimentais foram extensivamente estudados. Ensaio em animais e seres humanos, assim como estudos *in vitro*, mostraram que *S. boulardii* pode ter um papel protetor e atividades específicas contra vários patógenos entéricos, conforme revisado por CZERUCKA & RAMPAL (2002) e CZERUCKA *et al.* (2007).

I.3.5.2.1 Ações no nível celular

(i) Efeito na mucosa intestinal. A análise microscópica de mucosas duodenais e jejunais de camundongos, ratos e seres humanos mostrou que, mesmo em doses

elevadas, *S. boulardii* não provocou alterações morfológicas e/ou morfométricas, tanto no nível das vilosidades quanto nas criptas, assim como não foram observadas alterações na lâmina própria (BUTS *et al.*, 1986; CORTHER *et al.*, 1992; JAHN *et al.*, 1996). Entretanto, a levedura promove um aumento da atividade de diversas dissacaridases na mucosa intestinal, tais como lactase, sacarase e maltase (BUTS *et al.*, 1986; JAHN *et al.*, 1996) graças a um aumento de poliaminas, como a espermidina e a espermina, que regulam a expressão gênica e a síntese protéica (BUTS *et al.*, 1994). Também já foi descrito o efeito da levedura na liberação de aminopeptidases na mucosa e fluido endoluminal de camundongos (BUTS *et al.*, 2002). Foi observada a liberação de proteínas e fatores tróficos durante o trânsito intestinal, que aumentam as defesas imunes, a digestão e a absorção de nutrientes. Existem, ainda, mais de 1500 proteínas não estudadas, que poderiam ser liberadas pela levedura durante seu trânsito intestinal (BUTS & DE KEYSER, 2006).

(ii) Resposta imunológica. Existem diversos trabalhos mostrando o efeito da levedura no sistema imune (CAETANO *et al.*, 1986; BUTS *et al.*, 1990; RODRIGUES *et al.*, 2000). Estudos em ratos e camundongos permitiram demonstrar que a levedura induz um aumento significativo nos níveis de IgA (Imunoglobulina do tipo A) secretados (BUTS *et al.*, 1990; QAMAR *et al.*, 2001); entretanto, em um estudo com 12 voluntários humanos, recebendo a levedura durante 3 semanas, esse aumento de IgA não foi observado (JAHN *et al.*, 1996). Em camundongos desafiados com a toxina A de *C. difficile*, a levedura provocou um aumento de 4 vezes nos níveis de IgA dirigidos contra a toxina A (QAMAR *et al.*, 2001), o que mostra que a levedura possui um efeito modulador da resposta imune. Trabalhando com animais isentos de germes, RODRIGUES *et al.* (2000) também observaram um aumento nos níveis de IgA.

I.3.5.2.2 Ações no nível bacteriano

(i) Um primeiro mecanismo de ação da levedura seria a inibição total ou parcial de vários microrganismos patogênicos (BRUGIER & PATTE, 1975). Este efeito de inibição total é observado apenas *in vitro*, pois existem trabalhos mostrando que esta inibição não ocorre *in vivo*, sendo observada apenas uma proteção (RODRIGUES *et al.*, 1996) e um trabalho que mostra uma diminuição nos níveis populacionais de algumas espécies de *Candida* (DUCLUZEAU & BENSAADA, 1982).

(ii) Efeito sobre a microbiota. Um estudo com voluntários sadios mostrou que a levedura não induz qualquer mudança significativa na microbiota, ainda que se observe um aumento no número de bactérias aeróbias e de coliformes (KLEIN *et al.*, 1993). Em um estudo com prematuros, COSTALOS *et al.* (2003) observaram uma diminuição nos níveis intestinais de *E. coli* e *Enterococcus* e um aumento de *Bifidobacterium* e *Staphylococcus* no grupo tratado com a levedura.

(iii) *Saccharomyces boulardii* e *C. difficile*. De todos os efeitos benéficos da levedura, os mais extensivamente estudados e relatados na literatura são o seu efeito nas diarreias associadas ao uso de antibióticos e nas diarreias associadas ao *C. difficile*. Em um primeiro estudo realizado por TOOTHAKER & ELMER (1984), com hamsters, mostrou-se que a mortalidade associada ao *C. difficile* foi de 51% em animais tratados com a levedura, contra 80% dos animais controle. Como a diarreia associada ao *C. difficile* está diretamente ligada à produção das toxinas A e B, CORTHER *et al.* (1992) observaram que nos animais tratados com a levedura, o título de toxinas diminuiu 1000 vezes, quando comparado com os animais controle. Trabalhando com as toxinas A e B de *C. difficile*, CZERUCKA *et al.* (1991) observaram um efeito protetor da levedura utilizando um modelo de células intestinais. Em um modelo utilizando alças intestinais de ratos, observou-se que a levedura bloqueia a atividade secretória da toxina A (POTHOULAKIS *et al.*, 1993). Esses autores observaram que essa atividade anti-secretória também foi encontrada no meio condicionado da levedura, sugerindo que esse efeito era devido a substância(s) secretada(s) pela levedura e, posteriormente, verificaram que essa inibição da ação das toxinas do *C. difficile* era devida à produção de uma serino-protease de 54 kDa, que clivava as toxinas A e B e seus respectivos receptores na mucosa intestinal (CASTAGLIUOLO *et al.*, 1996; CASTAGLIUOLO *et al.*, 1999). Além disso, em um trabalho com camundongos BALB/c, QAMAR *et al.* (2001) observaram um aumento na resposta imune contra a toxina A. Também foi demonstrado, *in vitro*, que a levedura inibe a adesão do *C. difficile* em células VERO devido a uma serino-protease (TASTEYRE *et al.*, 2002).

(iv) *Saccharomyces boulardii* e *V. cholerae*. Em ratos tratados com a levedura durante 5 dias, foi observado um efeito protetor contra *V. cholerae* (DIAS *et al.*, 1995). Utilizando linhagens celulares, CZERUCKA *et al.* (1989a, 1989b) observaram que a levedura diminui em 50% o aumento de AMPc (adenosine monophosphate cyclic) intracelular induzido pela toxina do cólera, limitando, assim, a secreção de cloro. Como o sobrenadante da levedura foi suficiente para proteger as células da ação da toxina,

observou-se uma diminuição dos níveis de AMPc induzidos pela toxina do cólera devido à ação de uma proteína extracelular de 120 kDa (CZERUCKA *et al.*, 1994; CZERUCKA & RAMPAL, 1999). Também observou-se a inibição de perdas de água, sódio e potássio induzida pelas toxinas de *V. cholerae* (CZERUCKA *et al.*, 1994). Outros estudos mostraram que a inibição da ação da toxina do cólera era devida à ligação da toxina em sítios específicos da levedura, diminuindo, assim, a quantidade de toxina livre capaz de se ligar aos receptores intestinais (BRANDÃO *et al.*, 1998; NEVES *et al.*, 2002).

(v) *Saccharomyces boulardii* e EPEC (*E. coli* enteropatogênica) e EHEC (*E. coli* entero-hemorrágica). MASSOT *et al.* (1983) observaram a inibição de perdas de água, sódio e potássio induzidas por *E. coli*, em células epiteliais intestinais, pela *S. boulardii*. Estudos *in vitro* com células do cólon, infectadas por EPEC, permitiram demonstrar que a levedura é capaz de preservar a integridade da barreira epitelial, mantendo as junções serreadas, assim como sua intervenção na modulação da sinalização celular induzida durante a infecção por esta mesma bactéria (CZERUCKA *et al.*, 2000). DAHAN *et al.* (2003) observaram que a levedura exerce um efeito protetor nas infecções por EHEC, mantendo a integridade epitelial e interferindo em vias de transdução do sinal, assim como diminuindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias via inibição de NF- κ B (“nuclear factor kappa B”) e MAPK (“mitogen activated protein kinase”) ativadas pela bactéria. DALMASSO *et al.* (2006b) demonstraram que *S. boulardii* induz uma diminuição nos níveis de TNF- α e na apoptose relacionados à infecção em células com EHEC.

(vi) *Saccharomyces boulardii* e outros microrganismos. A levedura também é capaz de exercer um efeito protetor em animais infectados com *Salm. Typhimurium* e *S. flexneri* (RODRIGUES *et al.*, 1996) e, no caso de *Salm. Typhimurium*, esse efeito pode estar relacionado a uma imunomodulação pela levedura (RODRIGUES *et al.*, 2000). MUMY *et al.* (2007) demonstraram que *S. boulardii* interfere na sinalização induzida por *S. flexneri* em células T84, além de diminuir a secreção de IL-8 e a migração transepitelial de leucócitos polimorfonucleares, sugerindo que o uso da levedura poderia aliviar os sintomas associados à resposta inflamatória do hospedeiro. Em um modelo de colite *in vivo*, WU *et al.* (2007) observaram que *S. boulardii* mantém a integridade epitelial e diminui os efeitos inflamatórios associados à infecção por *Citrobacter redentium*. Em outro modelo de colite, *in vivo*, induzida quimicamente por DSS (“dextran-sulfate-sodium”), JAWHARA & POULAIN (2007) mostraram que *S.*

boulardii diminui a inflamação causada no intestino, assim como a colonização por *C. albicans* nesse modelo de colite.

I.3.5.2.3 Efeito anti-inflamatório

SOUGIOULTZIS *et al.* (2006) mostraram que *S. boulardii* secreta substâncias anti-inflamatórias. Trabalhando com células HT-29 e THP-1, esses autores observaram que a levedura secreta um fator anti-inflamatório (<1 kDa) termo-estável, que inibe a produção de IL-8, a degradação de I κ B- α (“inhibitory protein κ B α ”) e reduz a ativação de NF- κ B em células tratadas com IL-1 β ou LPS. Observou-se, também, um efeito anti-inflamatório, pela produção de fatores solúveis de baixo peso molecular, que bloqueiam a ativação de NF- κ B e a expressão de IL-8. Segundo os autores, essas substâncias podem mediar, pelo menos em parte, os efeitos benéficos da levedura *S. boulardii* observados nas infecções intestinais. CHEN *et al.* (2006), também trabalhando com o sobrenadante da levedura (SbS), observaram que o SbS inibe a produção de IL-8 induzida pela toxina A do *C. difficile* ou IL-1 β , assim como a ativação de algumas MAP quinases. *In vivo*, demonstraram que SbS normaliza a secreção de fluidos mediada pela toxina A.

LEE *et al.* (2005) observaram que *S. boulardii* possui um efeito anti-inflamatório via PPAR-gamma (“peroxisome proliferator-activated receptor-gamma”), uma molécula que regula a inflamação no epitélio intestinal. Eles observaram que a levedura aumenta a expressão de PPAR-gamma nos níveis de mRNA e proteína, e que ela inibe o efeito de TNF- α , IL-1 β ou LPS na diminuição da expressão de PPAR-gamma. Trabalhos recentes sugerem um novo mecanismo de ação da levedura, envolvendo uma possível inibição da produção de óxido nítrico pela levedura (GIRARD *et al.*, 2003; GIRARD *et al.*, 2005a).

Utilizando animais SCID (“immunoincompetent syngenic severe combined immunodeficiency”), DALMASSO *et al.* (2006a) demonstraram que *S. boulardii* interfere no processo inflamatório, devido a uma alteração específica no comportamento de migração de células T que se acumulam nos linfonodos mesentéricos, e que o tratamento com essa levedura limita a infiltração de células Th1 no cólon inflamado e a amplificação da inflamação induzida pela produção de citocinas pró-inflamatórias.

I.3.5.2.4 Outros efeitos

Além de todos os efeitos já listados, existem trabalhos mostrando a ligação de alguns microrganismos na superfície da levedura (GEDEK, 1999), assim como a presença de receptores para toxinas bacterianas (BRANDÃO *et al.*, 1998; NEVES *et al.*, 2002). GIRARD *et al.* (2005b) mostraram que a levedura minimiza o desequilíbrio eletrolítico induzido por óleo de castor no cólon de ratos.

I.3.5.3 Vantagens e desvantagens da utilização da levedura

A maior parte dos probióticos comercializados é representada por bactérias. Apenas duas leveduras são usadas, a *S. boulardii* na medicina humana e a *S. cerevisiae* na medicina veterinária. A vantagem de se trabalhar com levedura é que ela pode ser liofilizada, é rapidamente eliminada após interrupção da terapia e não é afetada pelo uso de antibacterianos (BLEHAUT *et al.*, 1989; BODDY *et al.*, 1991). Esta última propriedade é importante, pois algumas terapias associam a administração de probióticos com antibacterianos durante infecções gastrintestinais como, por exemplo, no caso de pacientes infectados por *H. pylori*, cuja terapia é uma combinação de drogas (ARMUZZI *et al.*, 2001).

O uso da levedura não acarreta mudanças nas populações normais da microbiota do cólon após exposição por 4-5 dias. Porém, após este tempo, nota-se um aumento nas populações de aeróbios ($1,4 \times 10^6/g$ para $2,1 \times 10^8/g$ de conteúdo intestinal) e de coliformes totais ($1,8 \times 10^6/g$ para $1,9 \times 10^7/g$ de conteúdo intestinal) (MCFARLAND & BERNASCONI, 1993).

Em todo o mundo, já foram descritos 27 casos de fungemia devido ao uso da *S. boulardii* (ZUNIC *et al.*, 1991; PLETINCX *et al.*, 1995; VIGGIANO *et al.*, 1995; BASSETTI *et al.*, 1998; FREDENUCCI *et al.*, 1998; NIAULT *et al.*, 1999; CESARO *et al.*, 2000; HENNEQUIN *et al.*, 2000; PERAPOCH *et al.*, 2000; RIJNDERS *et al.*, 2000; LHERM *et al.*, 2002; CASSONE *et al.*, 2003; LESTIN *et al.*, 2003; RIQUELME *et al.*, 2003). Ultimamente, infecções fúngicas invasivas devido a agentes novos ou raros têm sido, freqüentemente, descritos em todo o mundo. Esses casos são considerados como uma consequência do aumento da população de risco para doenças crônicas ou debilitantes, aumento no uso de drogas imunossupressivas e de antibióticos de amplo

espectro, nutrição parental e uso de catéter venoso central. Devido a tudo isso, o uso da levedura não é recomendado em pacientes imunossuprimidos ou muito debilitados, como no caso de tratamentos radioterápicos ou quimioterápicos (CESARO *et al.*, 2000), já que alguns casos de fungemia têm sido descritos na literatura nesses pacientes após tratamento enteral com *S. boulardii*, embora nenhum deles tenha levado o paciente a óbito devido à levedura e, foram, na maioria dos casos, resolvidos após interrupção do probiótico e utilização de fluconazol ou anfotericina B (CASSONE *et al.*, 2003).

Assim como ocorre com a levedura, existem casos descritos de bacteremia devido à utilização de bactérias usadas como probióticos (OGGIONI *et al.*, 1998; RICHARD *et al.*, 1988; MACKAY *et al.*, 1999; RAUTIO *et al.*, 1999). Entretanto, essas correlações entre infecções sistêmicas e consumo de probióticos são raras e sempre ocorrem em pacientes sob condições médicas extremamente debilitantes.

I.3.6 A levedura *Saccharomyces cerevisiae* linhagem UFMG 905

A levedura *S. cerevisiae* linhagem UFMG 905 foi isolada da destilaria de cachaça de Germana, na cidade de Nova União, em Minas Gerais, na região da zona metalúrgica (VIANNA, 2003). A linhagem foi identificada e classificada como *S. cerevisiae*, segundo métodos descritos em KURTZMAN & FELL (1998) e YARROW *et al.* (1998). A identidade da levedura foi confirmada utilizando o programa YEASTCOMPARE (CIRIELLO & LACHANCE, 2001).

MARTINS (2004) mostrou que a *S. cerevisiae* UFMG 905 foi capaz de reduzir a ação de alguns enteropatógenos. Os resultados mostraram que a levedura foi capaz de diminuir a mortalidade (15% de sobrevivência no grupo controle contra 55% no grupo tratado com a levedura) de animais desafiados com *Salm. Typhimurium* durante 28 dias (Figura 1) e os dados histopatológicos mostraram que a levedura apresentou proteção contra o desafio oral com *C. difficile*, em camundongos gnotobióticos (Figura 2) e preservação do fígado de animais convencionais tratados com a levedura e desafiados com *Salm. Typhimurium* (Figura 3). O menor número de focos inflamatórios no fígado de animais previamente tratados com a *S. cerevisiae* UFMG 905 sugeriu que a levedura diminuiu, *in vivo*, a translocação da *Salm. Typhimurium* (Tabela 1) (MARTINS *et al.*, 2005a).

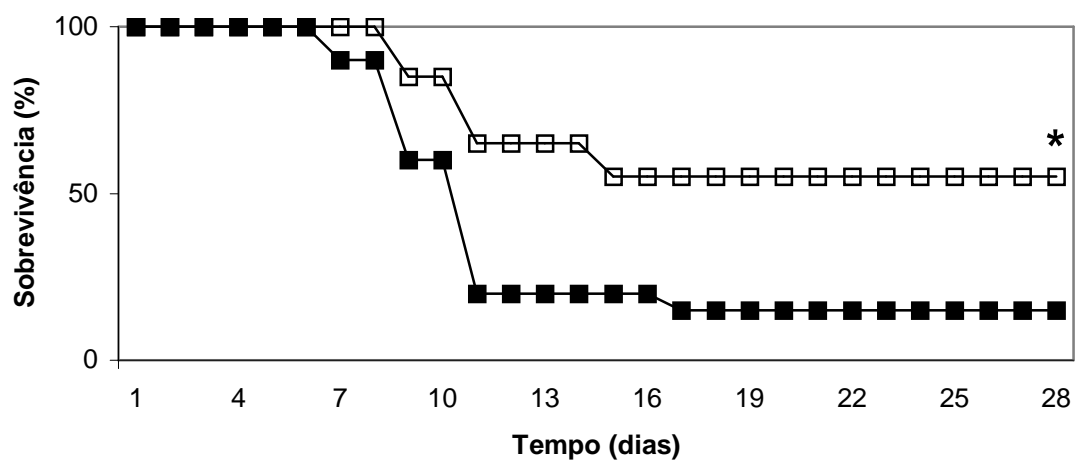


Figura 1. Sobrevivência de camundongos NIH convencionais tratados (□) ou não (■) com *S. cerevisiae* UFMG 905 e desafiados com 10^4 células de *Salm. Typhimurium* no tempo 1. N = 20 (em cada grupo). * Estatisticamente diferente, segundo o teste Mann-Whitney Rank, (P = 0,00326). (MARTINS, 2004).

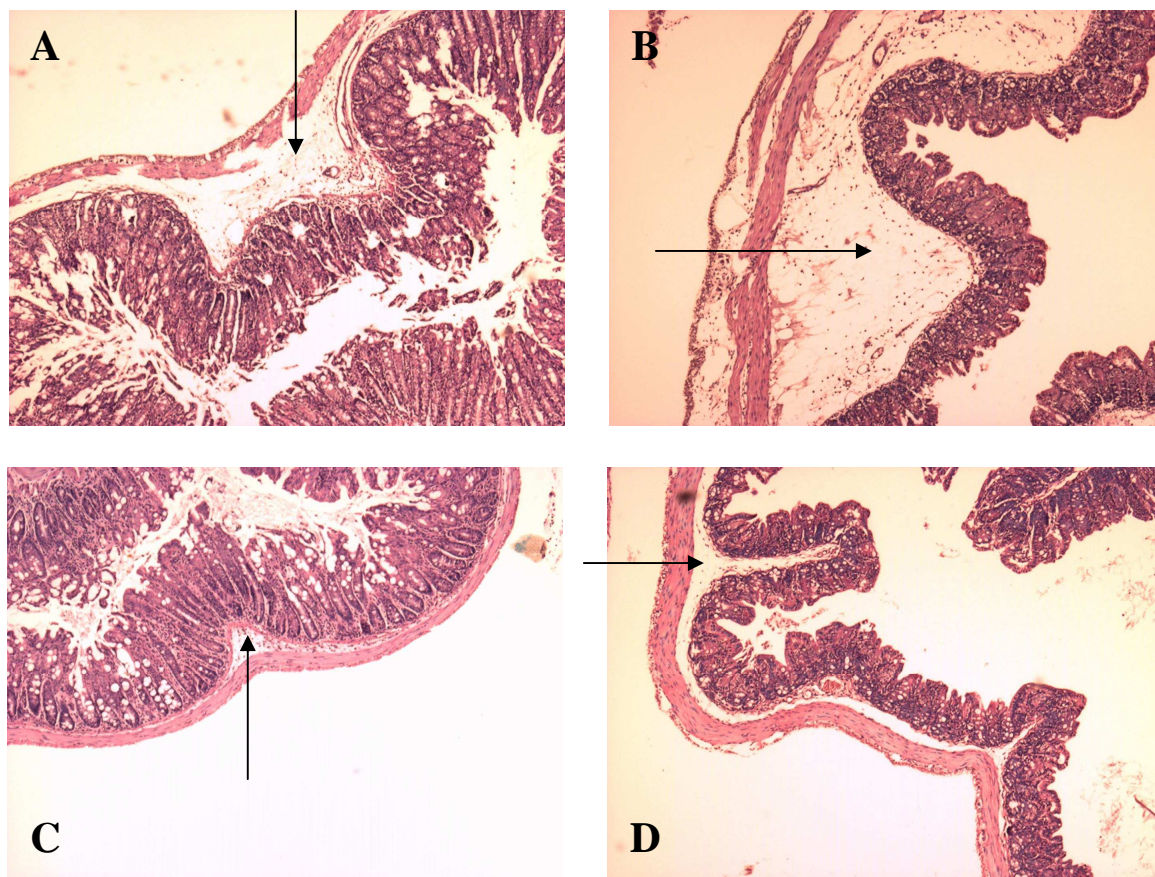


Figura 2. Aspecto histológico do cólon (A e C) e do ceco (B e D) de camundongos NIH gnotobióticos monoassociados (C e D) ou não (A e B) com a levedura *S. cerevisiae* UFMG 905 durante dez dias e desafiados com 10^4 células de *C. difficile* durante 6 dias. Coloração H-E (40X). As setas mostram as áreas de edema. (MARTINS, 2004).

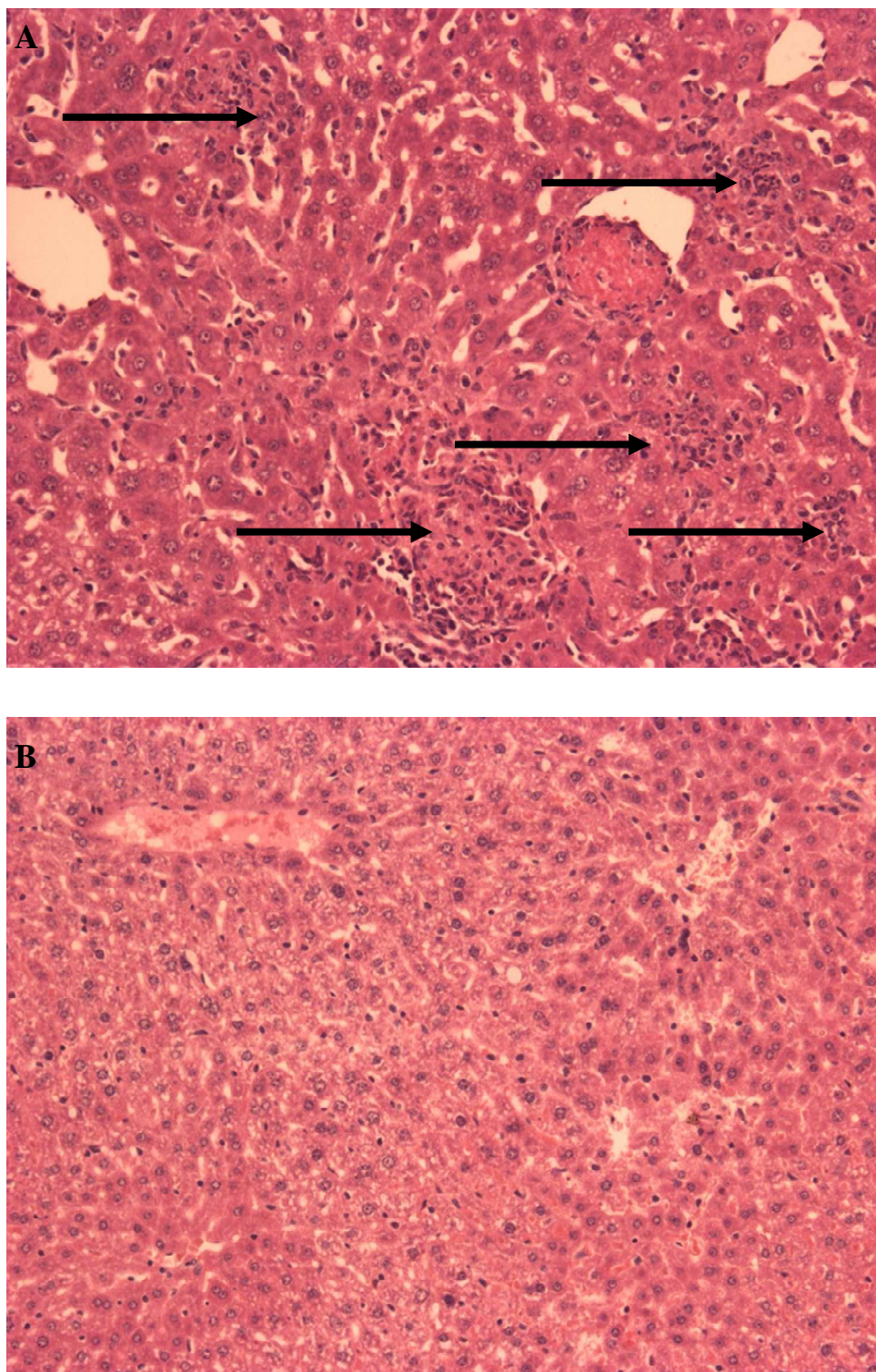


Figura 3. Aspecto histológico do fígado de camundongos NIH convencionais controle (A) ou tratados com a levedura *S. cerevisiae* UFMG 905 durante dez dias (B) e desafiados com 10^4 células de *Salm. Typhimurium* por 28 dias. Coloração H-E (100X). As setas indicam as áreas de focos inflamatórios. (MARTINS, 2004).

Tabela 1. Número de focos inflamatórios por unidades de área presentes nos fígados de camundongos NIH convencionais tratados ou não com a levedura *S. cerevisiae* UFMG 905 durante dez dias e desafiados com 10^4 células de *Salm. Typhimurium* por 28 dias.

Grupo	Número de focos inflamatórios ¹	Área medida (em unidades de área) ²	Focos/unidades de área
Controle	25	$8,7 \times 10^6 \mu\text{m}^2$	25
	20	$8,7 \times 10^6 \mu\text{m}^2$	20
	31	$8,7 \times 10^6 \mu\text{m}^2$	31
Média			$25,3 \pm 5,5^*$
Experimental	9	$8,7 \times 10^6 \mu\text{m}^2$	9
	17	$8,7 \times 10^6 \mu\text{m}^2$	12
	2	$8,7 \times 10^6 \mu\text{m}^2$	3
Média			$8,0 \pm 4,6^*$

¹Foco inflamatório define-se por acúmulo de células inflamatórias em número maior que 10 células, acompanhadas de alterações necróticas do parênquima associado.

²A unidade de área medida em todos os animais foi a somatória da área de 10 campos em aumento de 10X. Cada medida anotada corresponde a um corte (3 cortes medidos, um de cada animal).

* Estatisticamente significativo. Teste “t” de Student (P = 0,014). (MARTINS, 2004).

I.3.7 Utilização de outras leveduras como probióticos

Devido ao grande interesse na utilização de probióticos hoje em dia e, também, pelo estímulo da Organização Mundial da Saúde (OMS) na utilização dessa alternativa ao uso dos antibióticos, grandes laboratórios e centros de pesquisas vêm investindo nesta área. Dados bem preliminares do nosso laboratório, e ainda não publicados, vêm mostrando que outras leveduras não pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, isoladas de diversos ambientes e da indústria agro-alimentar, são capazes de colonizar o trato digestivo de animais experimentais e, também, de produzirem substâncias, ainda não identificadas, responsáveis pela inibição *in vitro* de enteropatógenos (TIAGO, 2008).

Trabalhando com leveduras isoladas de laticínios, KUMURA *et al.* (2004) testaram 8 espécies diferentes de leveduras (*Candida humilis*, *Debaryomyces hansenii*, *Debaryomyces occidentalis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces lodderae*, *Kluyveromyces marxianus*, *S. cerevisiae* e *Yarrowia lipolytica*) quanto à capacidade de aderir em culturas celulares, resistência a ácidos, temperatura corporal humana e sais biliares, além da capacidade de não causar inflamação, e selecionaram uma levedura (*K. lactis*) para testes posteriores para uso como probiótico.

Outros trabalhos (SCHELLENBERG *et al.*, 1994; CHIA *et al.*, 1995; IZADNIA *et al.*, 1998; KOVACS & BERK, 2000) mostram a eficácia de leveduras de cervejaria e panificação, tanto em ensaios laboratoriais quanto em pacientes humanos, no combate às diarreias.

I.4 Diarreias

De acordo com dados da OMS, mais de 75% dos antibióticos são prescritos de forma inapropriada, fato corrente mesmo em hospitais de ensino de países considerados desenvolvidos (WHO, 2002). Além da prescrição e do uso irracional dos antibióticos, apenas uma média de 50% dos pacientes tomam seus medicamentos corretamente. Conseqüentemente, a resistência de microrganismos responsáveis por muitas doenças infecciosas, incluindo diarreia bacteriana, gonorréia, pneumonia e tuberculose, está crescendo.

A diarreia é definida como a passagem de fezes, em três ou mais episódios, num período de 24 horas, suficientemente líquida para ocupar a forma do “container” no qual

ela é colocada (KEUSCH *et al.*, 2006). Ela pode ser causada por microrganismos infecciosos, incluindo vírus, bactérias, protozoários e helmintos, que são transmitidos das fezes de um indivíduo para a boca de outro, a chamada transmissão fecal-oral, ou por outros fatores etiológicos, não-infecciosos, como a diarreia alimentar, diarreia alérgica, causada por estresse e diarreias sem causa aparente (KEUSCH *et al.*, 2006).

As diarreias agudas são responsáveis por altas taxas de mortalidade e morbidade em todo o mundo. Essas taxas estão relacionadas a um aumento na secreção intestinal, resultado de infecções por bactérias produtoras de enterotoxinas (*E. coli* enterotoxigênica, *V. cholerae*, *C. difficile*) ou de uma diminuição da absorção intestinal pela infecção com microrganismos que causam danos ao epitélio intestinal (*E. coli* enteropatogênica, *Shigella* sp., *Salmonella* sp.) (KAUR & GANGULY, 2003).

Dentre as diarreias bacterianas, a habilidade em sobreviver no estômago é um fator determinante do tamanho do inóculo necessário para causar doença. Por exemplo, *Shigella*, que é resistente ao pH ácido, em torno de alguns milhares de UFCs são necessários para causar a doença. Ao contrário, bactérias que são rapidamente inativadas pelo baixo pH, como o *V. cholerae*, requerem um inóculo bem maior (milhões de UFCs) para causar a doença e, assim, precisam, primeiramente, se multiplicar no alimento ou na água para atingir números suficientes para causar a doença (KEUSCH *et al.*, 2006). Dentre as espécies de *Salmonella*, alguns sorotipos são adaptados para infectar animais e, desse modo, não causam doenças em seres humanos. Outros sorotipos são bem adaptados aos seres humanos e não causam doenças em animais. A maioria, entretanto, não é adaptada a um hospedeiro específico e podem, dessa maneira, infectar seres humanos e animais domésticos, facilitando a transmissão. Pouco mais de 10 sorotipos, dos mais de 2500 de *Salmonella*, causam a maioria das infecções humanas, refletindo a necessidade de genes que codificam fatores de virulência essenciais (KEUSCH *et al.*, 2006).

Nas diarreias bacterianas o tratamento corrente é não permitir a desidratação do paciente e, somente em casos mais graves, fazer uso de antibióticos. Esta terapia com antibióticos é eficaz, mas apresenta três grandes inconvenientes: a seleção de bactérias cada vez mais resistentes, a destruição de parte da microbiota intestinal, acarretando diarreias secundárias, o alto custo dos novos antibióticos, uma vez que os antibióticos de primeira geração não são mais eficazes para as possíveis bactérias resistentes, previamente selecionadas (WHO, 2002).

As características socio-econômicas do Brasil, e da maioria dos países no mundo, propiciam o aparecimento de várias infecções bacterianas, principalmente as que atingem o intestino. Diarréias são um sério problema de saúde pública no Brasil, sendo que os índices de mortalidade e morbidade, devido às diarréias, em crianças do Nordeste são significativamente mais elevados (RIBEIRO, 2000).

I.5 O gênero *Salmonella*

Salmonella, o quarto microrganismo patogênico em importância, após *Yersinia*, *Escherichia* e *Shigella*, dentro do grupo das enterobactérias, é um agente infeccioso intracelular facultativo, constituído por espécies de bacilos anaeróbios facultativos, Gram-negativo, que incluem agentes etiológicos de doenças coletivamente chamadas de salmoneloses (BERGEY, 1994). Estas bactérias pertencem à família *Enterobacteriaceae* e fermentam a glicose, reduzem nitrato a nitrito e possuem flagelos peritríquios (exceção da *Salm. pullorum*). A *Salmonella* foi isolada em 1885, por Daniel Salmon, um veterinário americano e, desde então, mais de 2463 sorotipos diferentes foram descritos (BRENNER *et al.*, 2000). Dados da OMS, de 2004, listam 2501 diferentes sorotipos (WHO, 2007). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhi e *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar Paratyphi são os agentes da febre tifóide nos seres humanos, infecções que se tornam um problema de saúde pública, principalmente em regiões onde há pouco ou nenhum acesso a água potável e onde o tratamento de águas é insatisfatório. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium e *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis, outros sorotipos da espécie *S. enterica*, podem infectar diversos hospedeiros (aves, homem, camundongos, répteis, anfíbios) e causam uma gastroenterite que, na maioria das vezes, se resolve sem uso de antibióticos (SALEZ & MALO, 2004).

Enquanto todos os sorotipos podem causar doenças em seres humanos, eles são classificados de acordo com sua adaptação aos hospedeiros. Alguns sorotipos possuem um limitado espectro de hospedeiro, por exemplo, *Salm. Typhi* em primatas, *Salm. enterica* subsp. *enterica* sorovar Dublin em gado e *Salm. enterica* subsp. *enterica* sorovar Choleraesuis em suínos. Quando esses sorotipos causam doença em seres humanos, costuma ser de forma invasiva. A maioria dos sorotipos, entretanto, possui um amplo espectro de hospedeiros. Classicamente eles causam gastroenterite, que

precisam de tratamento específico apenas em crianças, idosos e indivíduos imunodebilitados. Esse grupo compreende *Salm. Enteritidis* e *Salm. Typhimurium*, os dois principais sorotipos transmitidos do animal para o homem (WHO, 2007).

Os sorotipos de *Salm. enterica* estão entre as causas mais comuns de infecções alimentares e causam uma infecção alimentar que resulta em gastroenterite. Os sintomas aparecem dentro de 6 a 24 horas após a ingestão da água ou do alimento contaminado, podendo durar até uma semana. Os sintomas iniciais incluem náusea e vômito, que diminuem após algumas horas. Estes sintomas são seguidos de dores abdominais e diarreia, podendo, também, haver febre. A gravidade da dor e da diarreia varia bastante de pessoa para pessoa, desde dor branda e diarreia quase imperceptível até uma dor que lembra uma apendicite grave e diarreia sanguinolenta. Após o final dos sintomas, a pessoa continua a excretar a bactéria por mais de 3 meses. Em 1 a 3% dos casos, a pessoa se torna um carreador crônico da bactéria por mais de um ano. Muitos casos de gastroenterite ocorrem em crianças com menos de 10 anos de idade, e os sintomas costumam ser mais graves neste grupo de pessoas (MEADOW *et al.*, 1985). A infecção pode se tornar sistêmica, o que é mais comum em crianças e pacientes imunodeprimidos (pacientes com câncer e AIDS) (SALYERS & WHITT, 1994).

Os surtos de salmoneloses envolvem diferentes tipos de alimentos, mas os derivados de leite e de aves domésticas são os mais comuns. Os produtos derivados de aves domésticas são uma fonte comum de infecção porque estes animais carregam, normalmente, estas bactérias em seus tratos intestinais e, também, devido à alimentação rica em proteínas destes animais, o que assegura que eles serão colonizados pela *Salm. Typhimurium* e outros sorotipos de *Salm. enterica*. A bactéria contamina a carcaça após o abate e a superfície de ovos. Foi demonstrado que as aves também transmitem a *Salm. enterica* pela via transovariana. A gastroenterite resulta do cozimento inadequado dos ovos e carne de aves domésticas, mas ela pode resultar de contaminação cruzada de outros alimentos e pela carne crua das aves, por exemplo, quando se utiliza a mesma faca para cortar a carne e fatiar os ingredientes de uma salada (SALYERS & WHITT, 1994).

As infecções por *Salmonella* acometem, geralmente, o trato digestivo. Em camundongos, a *Salm. Typhimurium* causa uma doença sistêmica acompanhada de sintomas semelhantes à febre tifóide causada pela *Salm. Typhi* em seres humanos, independente da via de infecção. Classicamente, a cinética de infecção em camundongos se caracteriza por quatro fases. A primeira se traduz pela rápida

eliminação de bactérias séricas. Durante a semana seguinte à infecção, a *Salmonella* se replica ativamente dentro de células fagocitárias. Essa fase precede uma fase de platô, caracterizada pelo reconhecimento de certos patógenos, por motivos moleculares específicos, pelas células mononucleadas da linhagem fagocitária. Isso resulta na produção de várias citocinas (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IFN- γ) e uma infiltração massiva de monócitos e de neutrófilos polinucleares nos locais de inflamação. Na quarta fase da infecção se instala a defesa inflamatória adquirida, fazendo intervir as células B e T, assim como os fatores humorais que dela decorrem (SALEZ & MALO, 2004).

Os mecanismos de enteropatogenicidade nas salmoneloses são bastante complexos, não sendo, ainda, completamente compreendidos. Sabe-se que a bactéria possui diversos fatores de virulência, como adesinas, exoenzimas, enterotoxinas e endotoxina (MAKELA *et al.*, 1973; FRETER, 1981; KOO *et al.*, 1984), além da capacidade de invadir a mucosa gastrointestinal, multiplicar-se, disseminar-se e sobreviver nas células do sistema retículo-endotelial (CARTER & COLLINS, 1974). A *Salm. Typhimurium* adere e invade diferentes linhagens celulares de mamíferos, incluindo células HeLa (GIANELLA *et al.*, 1973), células Hep-2 (SNALL *et al.*, 1987) e células Henle (ALTMAYER *et al.*, 1993).

Após sua ingestão e passagem pelo estômago, a *Salmonella* coloniza o intestino, interagindo com e translocando através do epitélio intestinal, via três rotas: (i) invasão ativa dos enterócitos, (ii) invasão das células M e, (iii) pelas células dentríticas que intercalam as células epiteliais (TAKEUCHI, 1967; GRASSL & FINLAY, 2008). As bactérias, aderidas à superfície das células epiteliais, induzem degeneração nas microvilosidades do enterócito. Posteriormente, projeções citoplasmáticas das células do hospedeiro circundam as bactérias até que elas fiquem contidas em vacúolos envoltos por membrana. Ocorre, então, a reconstituição da borda em escova dos enterócitos. A *Salm. Typhimurium* induz rearranjos na membrana celular como parte do processo de internalização (FINLAY & FALKOW, 1990; FINLAY *et al.*, 1992; FRANCIS *et al.*, 1992).

Em camundongos inoculados intragastricamente, observou-se que o sítio primário de colonização por *Salm. enterica* é o íleo terminal (CARTER & COLLINS, 1974). Também foi observado que a *Salmonella* interagia, preferencialmente, com as células das placas de Peyer (tecido linfóide associado ao intestino), como é o caso da *Salm. Typhimurium* que, seguindo a rota oral de colonização, associa-se rapidamente com o tecido das placas de Peyer (HOHMANN *et al.*, 1978). A bactéria entra,

seletivamente, pelas células M do epitélio associado aos folículos linfóides (JONES *et al.*, 1994). A entrada bacteriana é seguida pela morte destas células M e, após a eliminação destas células, os microrganismos movem-se lateralmente ao longo da lâmina própria ou invadem os folículos, onde se multiplicam. Com o tempo, a infecção progride para os linfonodos que drenam a região, chegando ao fígado e ao baço (CARTER & COLLINS, 1974; NARDI *et al.*, 1991). Em camundongos, a *Salmonella* cresce em macrófagos residentes do fígado e do baço.

Os receptores de reconhecimento de patógenos, como os TLRs e NLRs [nucleotide binding and oligomerization domain (NOD)-like receptors], são estimulados pelos PAMPs (DELBRIDGE & O'RIORDAN, 2007). Os TLRs estão localizados nas membranas plasmática e do fagossomo, e podem ser ativados por PAMPs como o LPS e a flagelina. Os NLRs estão localizados no citoplasma, onde podem reconhecer PAMPs, como o peptidoglicano. A ligação de PAMPs a esses receptores leva à ativação e transcrição de fatores de transcrição e à subsequente produção de citocinas e quimiocinas (GRASSL & FINLAY, 2008). A *Salmonella* possui, pelo menos, 4 ativadores de TLRs: LPS, lipoproteínas bacterianas, flagelina e DNA CpG, que ativam, respectivamente, TLR4, TLR2, TLR5 e TLR9. Está claramente descrito que, *in vitro*, células como macrófagos e células dendríticas podem “sentir” a *Salmonella* via TLRs e induzir a produção de citocinas que também são relevantes nas respostas, *in vitro*, contra a *Salmonella* (GEROLD *et al.*, 2007).

Por ser uma bactéria Gram-negativo, a *Salmonella* exprime em sua parede externa o LPS, uma molécula extremamente imunogênica. A LBP (LPS-binding protein), proteína de ligação ao LPS, é uma proteína sérica cuja principal característica é apresentar o LPS sob a forma monomérica ao receptor CD14, sua forma livre em solução sendo micelar. Os primeiros trabalhos que colocaram em evidência o papel da LBP, quando da infecção por *Salm. Typhimurium*, o descreveram como sendo necessário para uma reação inflamatória eficaz para eliminar o patógeno invasivo (JACK *et al.*, 1997). O receptor CD14, presente majoritariamente nos monócitos e macrófagos, é o receptor, por excelência, do LPS. Presente nos organismos sob a forma membranar (mCD14) e solúvel (sCD14), ele possui em seu domínio carboxi-terminal, um sítio de ligação para um grupamento GPI (fosfossil-fosfatidil-inositol), que favorece a ancoragem à membrana celular, mas sem a atravessar, impedindo qualquer contato com o meio citoplasmático e, assim, toda interação molecular permite a transdução do sinal (SALEZ & MALO, 2004) (Figura 4).

A fixação do LPS à célula não provoca a ativação celular de imediato. O intervalo de tempo necessário à ativação (15 a 30 minutos) se explica pela necessidade de internalizar o complexo LPS/CD14. Alguns estudos mostram que o bloqueio da fusão endossômica ou da internalização provocam uma ruptura na sinalização induzida pelo LPS (TRIANATAFILOU & TRIANATAFILOU, 2002).

O complexo LPS/LBP pode gerar uma mensagem intracelular via o receptor CD14, por intermédio de uma proteína dotada de um domínio transmembranar, o receptor TLR-4, que reconhece especificamente o LPS. Esse receptor possui um domínio extracelular, rico em leucina, e um domínio intracelular, homólogo ao domínio intracelular do receptor de IL-1 (domínio TIR) (TAKEDA *et al.*, 2003). A fixação do complexo LPS/LBP ao complexo CD14/TLR-4 (em cooperação com MD2, uma proteína perimembranar) produz a ativação de duas vias de sinalização distintas e parcialmente redundantes. Uma primeira via faz intervir duas proteínas adaptadoras, MyD88 (“myeloid differentiation factor 88”) e TIRAP (“toll-interleukin 1 receptor domain-containing adapter protein”) (BEUTLER *et al.*, 2003), capazes de mobilizar a via de sinalização dependente das proteínas IRAK4 (“interleukin 1 receptor-associated kinase”), TRAF6 (“tumor necrosis factor receptor associated factor”), TAB1 (“transforming growth factor β -activated protein kinase-binding protein”) e TAK1 (“transforming growth factor β -associated kinase”), mas também as MAP quinases (“MAPKK, MAP kinase kinase”) e a proteína p38. Essa cascata de ativações moleculares, principalmente pela ubiquidade do complexo molecular NEMO (“nuclear factor κ B essential modifier”) / IKK α (“inhibitor of κ B kinase α ”) / IKK β (“inhibitor of κ B kinase β ”), induz a degradação de I κ B, a translocação de NF- κ B para o núcleo e a ativação de AP-1 (“adaptor protein 1”) levando à ativação transcripcional de certos genes que codificam as citocinas inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 ou ainda MIP1 α (“macrophage inflammatory protein 1 α ”). Independentemente de TRAF6, o fator de transcrição C/EBP β (“CCAAT/enhancer-binding protein β ”) (ou NF-IL-6) parece ser mobilizado desde a ativação dessa via (MyD88), por uma via de sinalização ainda pouco descrita, e permite a produção de prostaglandina E₂ (UEMATSU *et al.*, 2002). A outra via ativada após a ativação do receptor TLR-4 faz intervir uma via independente de MyD88, onde duas outras proteínas adaptadoras intervêm, TRAM (“TRIF-related adapter molecule”) e TRIF (“Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor protein inducing interferon β ”) (YAMAMOTO *et*

al., 2002). Essas proteínas adaptadoras, assim como MyD88/TIRAP, ativam não apenas a via de MAP quinases e a proteína p38, mas também uma via que lhes é própria e que permite a síntese de IFN- β (“interferon β ”), NOS2 (“nitric oxide sintase 2”) e de IP-10 (“interferon inducible protein 10”) após a ativação do fator de transcrição IRF-3 (“interferon regulatory factor 3”) (BEUTLER *et al.*, 2003). Todo esse processo de sinalização pode ser visualizado, esquematicamente, na Figura 4.

O TLR-4 não exerce apenas um papel de reconhecimento do patógeno, ele intervém, também, na fagocitose de bactérias Gram-negativo e Gram-positivo. Esse efeito é regulado pela cascata de sinalização MyD88/IRAK-4/p38 (DOYLE *et al.*, 2004).

A *Salmonella* é, também, reconhecida pelo TLR-5. Contrariamente ao TLR-4, que possui vários ligantes diferentes, o TLR-5 apresenta uma afinidade exclusiva pela flagelina. Essa proteína, expressa nos flagelos bacterianos, possui uma capacidade extremamente imunogênica, como sua capacidade de ativação do sistema fagocitário mononuclear (HAYASHI *et al.*, 2001) e de células epiteliais da mucosa intestinal (GEWIRTZ *et al.*, 2001). TLR-5 induz uma mensagem similar à do TLR-4, uma vez que a via ativada mobiliza NF- κ B e induz a produção de citocinas pro-inflamatórias como TNF- α e IL-6 (HAYASHI *et al.*, 2001) (Figura 4).

Em contato com a célula hospedeira, a *Salmonella* estimula sua própria captura pelas células epiteliais. A habilidade dessa bactéria em entrar na célula hospedeira é central para o sucesso da infecção. Para isso ela faz uso de um aparato, conhecido como secreção do tipo 3 (TTSS, “type 3 secretion system”), onde ela introduz na célula hospedeira um conjunto de proteínas efetoras que são capazes de mimetizar as funções de várias proteínas da célula hospedeira (GALÁN, 2001). O mecanismo de entrada na célula é caracterizado por um profundo rearranjo do citoesqueleto de actina no local onde a bactéria entra em contato com a célula hospedeira (PATEL & GALÁN, 2005). Esse remodelamento do citoesqueleto da célula induz a membrana a formar extensões celulares que envelopam a bactéria, conduzindo à entrada da bactéria em vacúolos ligados à membrana. Essa entrada em células não fagocíticas é absolutamente dependente da liberação de proteínas efetoras específicas introduzidas na célula hospedeira via TTSS codificadas pela ilha de patogenicidade 1 da *Salmonella* (SPI-1, “Salmonella pathogenicity island 1”). Esses fatores de virulência funcionam em

conjunto para empregar as proteínas da célula hospedeira e orquestrar uma série de eventos que culminam na entrada da bactéria (PATEL *et al.*, 2005).

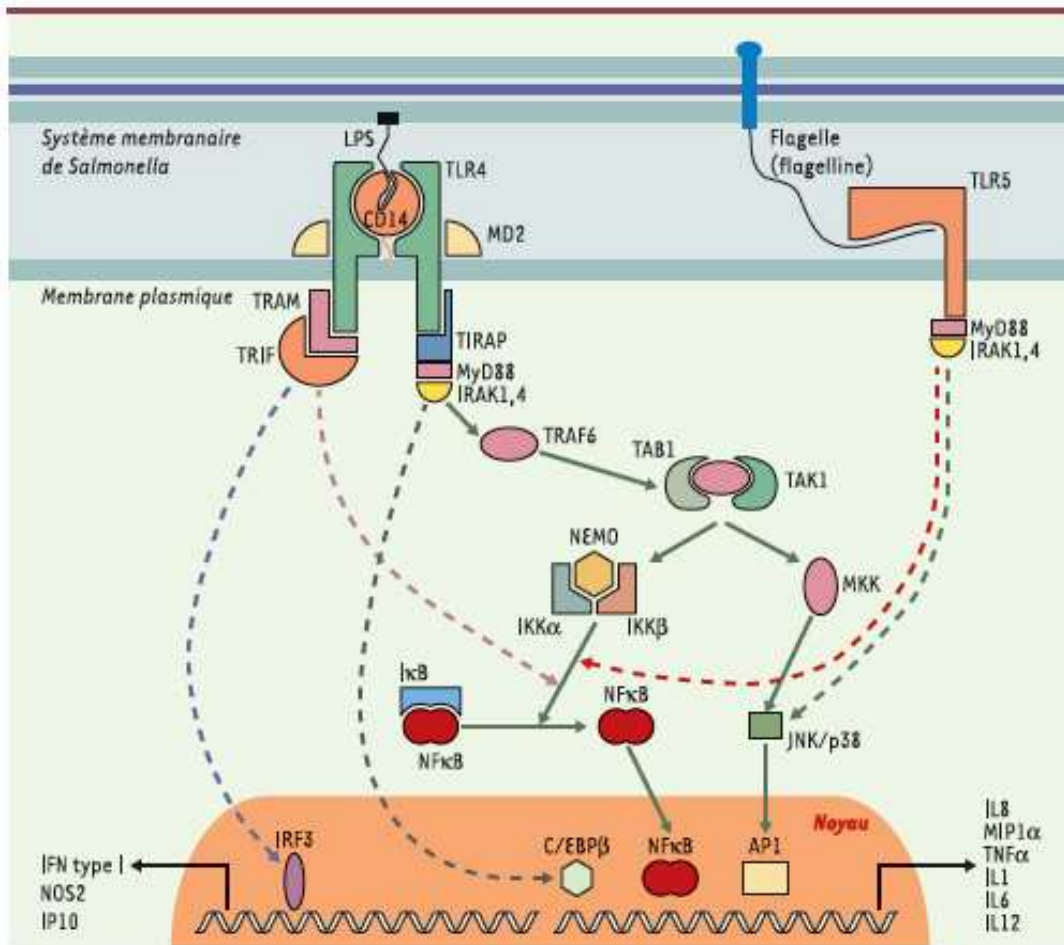


Figura 4. Sinalização celular induzida pela *Salmonella* logo após o seu reconhecimento pelos receptores TLR-4 e TLR-5. (SALEZ & MALO, 2004).

Um alvo celular chave é a família de proteínas Rho, que são pequenas GTPases (“Guanidine Tri-Phosphatases”) reguladoras centrais do citoesqueleto eucarioto (ETIENNE-MANNEVILLE & HALL, 2002). As RhoGTPases funcionam como “ativadores/desativadores” moleculares, alternando entre a forma GTP-ligada ativa e a forma GDP-ligada inativa. Essa troca binária de nucleotídeos induz mudanças estruturais definidas (VETTER & WITTINGHOFER, 2001). A *Salmonella* possui uma estratégia sofisticada para modular reversivelmente essa função ativadora/desativadora das RhoGTPases. Ela codifica três proteínas efetoras do tipo III, SopE, SopE2 (que são intimamente relacionadas) e SopB, que diretamente engajam e ativam dois importantes membros da família Rho: Cdc42 e Rac (HARDT *et al.*, 1998; STENDER *et al.*, 2000), levando ao remodelamento de actina. SopE e SopE2 catalizam diretamente a ativação de GTPase, enquanto SopB funciona indiretamente, via manipulação de fosfoinositídeos. A membrana plasmática está intimamente associada com o citoesqueleto de actina, e essa interação depende de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato [PtdIns(4,5)P₂]. SopB/SigD é uma inositol fosfatase, que induz um rápido desaparecimento de PtdIns(4,5)P₂ pela invaginação de regiões da membrana durante a invasão pela *Salmonella*. Isso aumenta a elasticidade para facilitar o remodelamento da membrana plasmática associada à entrada da bactéria (RAUCHER *et al.*, 2000; TEREKIZNIK *et al.*, 2002).

Além das 3 proteínas efetoras citadas anteriormente, duas outras proteínas são translocadas, SipA, que se liga a e estabiliza a actina, e SipC, que induz nucleação e polimerização da actina (ZHOU & GALÁN, 2001). Após a invasão, uma proteína efetora do tipo III, SptP, age como uma proteína ativadora de GTPase (GAP, “GTPase-activating protein”) para Cdc42 e Rac, inativando essas proteínas G e retornando a morfologia celular a um estado relativamente normal (FU & GALÁN, 1999) e as bactérias internalizadas ocupam o vacúolo gerado pela fusão das vesículas induzidas por SopB.

Após a internalização, o vacúolo contendo a *Salmonella* (SCV, “Salmonella-containing vacuole”) interage, seletivamente, com a maquinaria endocítica do hospedeiro. Inicialmente, o SCV adquire os marcadores endossômicos precoces, EEA1 e Rab5, que são sequencialmente substituídos pelo endossomo tardio, e marcadores lisossômicos Rab 7 e glicoproteínas lisossômicas (Lgps, lysosomal glycoproteins). Entretanto, o SCV não se funde diretamente com os endossomos e lisossomos, em parte devido à atividade fosfatase fosfoinositídica de SopB (PATEL *et al.*, 2005). À medida

que a infecção progride, as proteínas do TTSS contidas na ilha de patogenicidade 2 da *Salmonella* (SPI-2, “*Salmonella* pathogenicity island 2”) (SPI2-TTSS) libera proteínas efetoras adicionais e a replicação bacteriana é iniciada. A proteína SifA é essencial para a formação de filamentos induzidos pela *Salmonella* (Sifs, “*Salmonella*-induced filaments”), túbulos da membrana alongados que emanam do SCV. SifA, SopD2, SseF, SseG e SseJ se localizam no SCV e em Sifs, e participam da formação da membrana (BEUZÓN *et al.*, 2000; BRUMELL *et al.*, 2001; BRUMELL *et al.*, 2002; KUHLE & HENSEL, 2002; RUIZ-ALBERT *et al.* 2002; BRUMELL *et al.*, 2003; FREEMAN *et al.*, 2003). Todo esse processo de internalização da *Salmonella* pela célula hospedeira pode ser visualizado, esquematicamente, na Figura 5, adaptada a partir de PATEL *et al.* (2005).

Somado às modificações pós-transducionais transitórias ocorridas devido à entrada da *Salmonella*, ela induz mudanças drásticas nos níveis transcricionais e transducionais das células infectadas, em especial nas células epiteliais que, após a infecção, se comportam como sentinelas pela indução de um programa transcricional, cuja principal função é regular os mecanismos da defesa imune inata (COSSART & SANSONETTI, 2004). Isso ocorre, principalmente, em resposta à indução de NF- κ B, que regula uma boa parte dos genes pró-inflamatórios. Esse programa pró-inflamatório das células epiteliais - em contraste com a sinalização extracelular, que é mediada pelos TLRs em células fagocíticas, na presença de PAMPs bacterianos - parece ser mediado por um sistema sensor intracelular envolvendo proteínas citosólicas da família Nod (GIRARDIN *et al.*, 2001). Nod1 é prevalente nas células epiteliais do intestino e reconhece muropeptídeos presentes no peptidoglicano de bactérias Gram-negativo. Uma outra proteína citosólica, Nod2, reconhece peptidoglicanos de qualquer bactéria, essencialmente porque ela é capaz de reconhecer o muramil-dipeptídeo, uma estrutura comum a todos os peptidoglicanos (GIRARDIN *et al.*, 2003).

Pela sua capacidade de regular a transcrição gênica e por outras vias, a *Salmonella* pode controlar o destino da célula hospedeira. Dentre os mais intrigantes paradigmas está a capacidade dessa bactéria de controlar os processos apoptóticos da célula. A proteína SipB, liberada pelo TTSS, ativa a caspase-1 (uma cisteíno-protease pró apoptótica), que ativa apoptose em macrófagos infectados enquanto inicia, também, uma resposta inflamatória, via processamento ou maturação de duas potentes citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β e IL-18 (HERSH *et al.*, 1999; HILBI *et al.*, 1998).

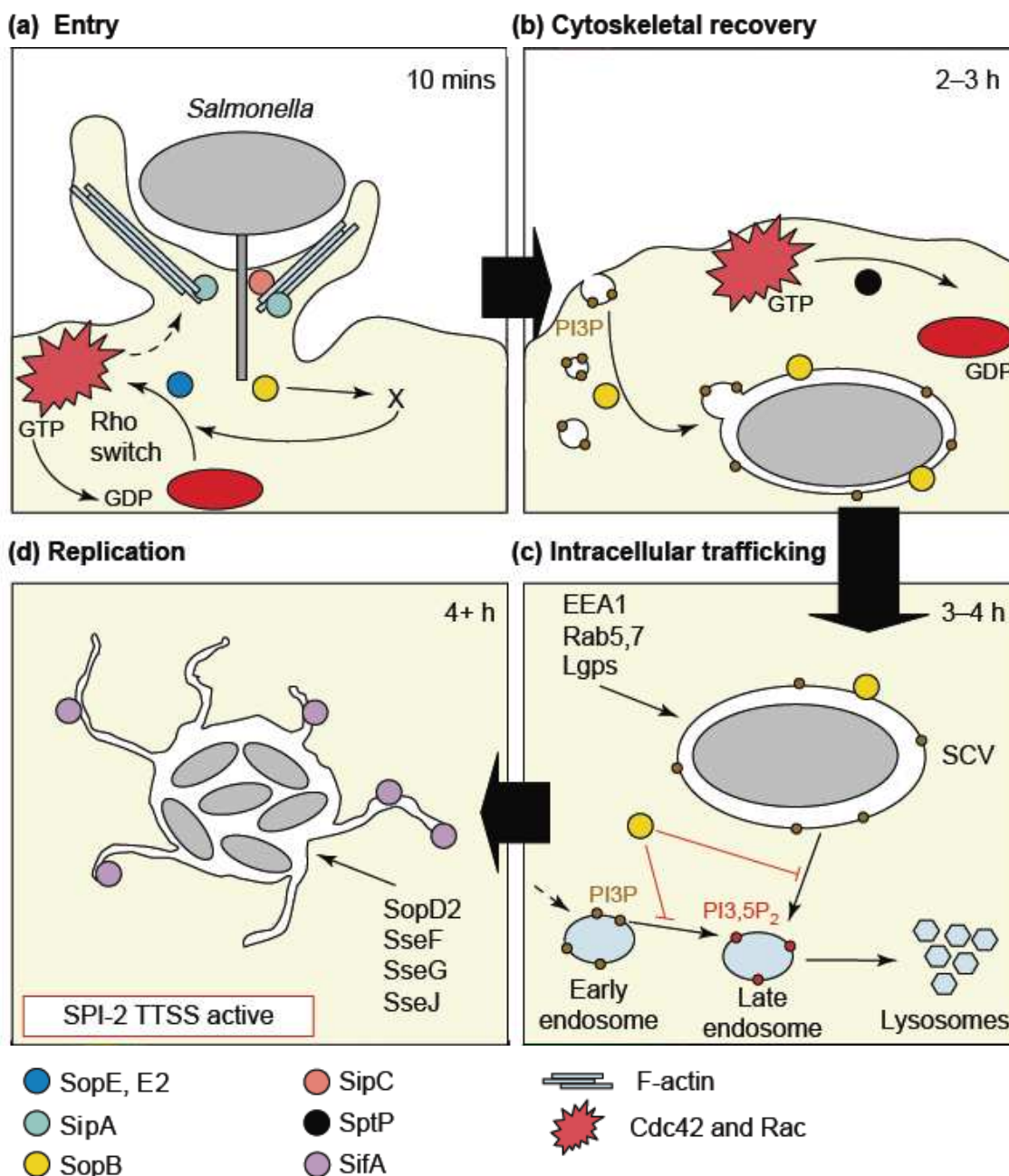


Figura 5. Interação da *Salmonella* com as células epiteliais. (a) Em contato com a célula hospedeira, a *Salmonella* libera várias proteínas efetoras que manipulam o citoesqueleto celular e induz a entrada da bactéria. SopE, SopE2 e SopB ativam Cdc42 e Rac, levando ao remodelamento do citoesqueleto. SipA e SipC estabilizam a actina e induzem nucleação e polimerização da actina. (b) Após a internalização da bactéria, SptP reverte a função de SopE, SopE2 e SopB. (c) Após a internalização, o SCV interage, seletivamente, com a maquinaria endocítica do hospedeiro. (d) Assim que a infecção progride, SPI2-TTSS libera outras proteínas efetoras e a replicação bacteriana é iniciada. (PATEL *et al.*, 2005).

A interação da *Salmonella* com as células epiteliais polarizadas induz a liberação de potentes quimiocinas que direcionam a migração de células polimorfonucleares (PMN, “polymorphonuclear leukocytes”) (MCCORMICK *et al.*, 1993; MCCORMICK *et al.*, 1995; MCCORMICK *et al.*, 1998). Por exemplo, IL-8 é secretada basolateralmente nas células epiteliais e funciona atraindo PMN do espaço intravascular, via lâmina própria, para dentro da mucosa infeccionada (MCCORMICK *et al.*, 1995). PEEC (“pathogen-elicited-epithelial-chemoattractant”) é secretado na parte apical das células epiteliais e direciona a migração de PMN através da camada epitelial pelas junções serreadas (MCCORMICK *et al.*, 1998). A secreção contínua e polarizada de IL-8 e PEEC pelas células epiteliais é responsável por direcionar a movimentação de PMN, no lúmen intestinal, em resposta a infecções por *Salmonella* não-tifóide em seres humanos. A ativação do promotor de IL-8 durante a invasão de células epiteliais é, primariamente, dependente de NF- κ B pela ativação do TLR-5 (GEWIRTZ *et al.*, 2001).

O estudo de salmoneloses em camundongos utilizando a *Salm.* Typhimurium é um excelente modelo, pois os sintomas provocados por esta bactéria e pela *Salm.* Choleraesuis são muito semelhantes aos sintomas da febre tifóide causada pela *Salm.* Typhi em seres humanos (SALYERS & WHITT, 1994). Os resultados obtidos nestes estudos têm sido extrapolados para a compreensão de vários aspectos da infecção causada pela *Salm.* Typhi. Em condições experimentais normais, este último sorotipo não é virulento para o camundongos, sendo incapaz de induzir uma doença progressiva neste animal (CARTER & COLLINS, 1974).

I.6 Probióticos e *Salmonella*

O efeito de probióticos em casos de salmoneloses já vem sendo demonstrado há alguns anos. Estudando o efeito protetor de diversos microrganismos em ensaios laboratoriais, relatou-se, utilizando um modelo animal, que probióticos como *S. boulardii*, *S. cerevisiae*, *E. coli* EMO, *B. longum*, *B. bifidum*, *E. faecium* e *L. acidophilus* (RODRIGUES *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 1999; LIMA FILHO *et al.*, 2000; MAIA *et al.*, 2001; MOURA *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2005a) conferem um efeito protetor aos animais desafiados com *Salm.* Typhimurium e, que na maioria desses casos, o efeito benéfico é devido, pelo menos em parte, a um aumento da

resposta imune do hospedeiro devido ao tratamento com o probiótico (NEUMANN *et al.*, 1998; RODRIGUES *et al.*, 2000; GILL *et al.*, 2001; LIMA FILHO *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2004).

Trabalhando com uma mistura de probióticos (duas linhagens de *L. murinus*, *L. salivarius* subsp. *salivarius*, *L. pentosus* e *Pediococcus pentosaceus*) para suínos, CASEY *et al.* (2007) observaram que os animais tratados e desafiados com *Salm. Typhimurium* apresentaram um número menor de episódios de diarreia, com uma menor gravidade e duração, além de maior ganho de peso, quando comparados com animais controle. Ao contrário do que já havia sido observado em outros trabalhos, eles observaram que essa associação de probióticos possibilitou uma diminuição nos níveis fecais da *Salmonella*, em relação ao controle, após 15 dias de infecção, demonstrando que o tratamento possibilitou uma melhora clínica e microbiológica. Vários autores hipotetizam que o efeito benéfico dos probióticos contra desafios patogênicos com *Salmonella* pode ser explicado pela inibição do crescimento dos patógenos pela diminuição do pH, produção de bacteriocinas e outras substâncias inibidoras de crescimento de patógenos (FAYOL-MESSAOUDI *et al.*, 2005; MAKRAS *et al.*, 2006; THEPPANGNA *et al.*, 2006); entretanto, vários trabalhos *in vivo* sugerem que o efeito benéfico é, na grande maioria das vezes, explicado por outros mecanismos como a imunomodulação (NEUMANN *et al.*, 1998; RODRIGUES *et al.*, 2000; LIMA FILHO *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2004).

Também utilizando um sistema *in vivo*, WATERS *et al.* (2005) observaram que em pássaros tratados com uma cultura contendo microrganismos do ceco e com uma cultura comercial, a contagem de *Salm. Typhimurium* diminuía significativamente, sendo que a cultura comercial proporcionou uma melhor proteção contra o patógeno. Análises do ceco dos animais experimentais não acusaram diferenças entre os grupos, no que se referia ao pH ou concentrações de acetato ou propionato. Entretanto, um aumento nos níveis de butirato foi observado no ceco dos animais tratados com as duas culturas, em relação ao controle. PROMSOPONE *et al.* (1998) também observaram uma diminuição nos níveis de *Salm. Typhimurium* em aves tratadas com *L. acidophilus*, *E. faecium* e anticorpos anti- *Salm. Typhimurium*. Essa diminuição nos níveis de *Salm. Typhimurium* em animais tratados com *L. acidophilus* e lactose não foi observada por JOHANNSEN *et al.* (2004), o que demonstra que o efeito benéfico não é oferecido por todos os microrganismos e que, na grande maioria das vezes, esse efeito é espécie-específico.

Trabalhando com uma associação de probióticos para cães, contendo *L. acidophilus*, *E. faecium* e *S. cerevisiae*, MAIA *et al.* (2001), utilizando o modelo de camundongos isentos de germes, observou que apenas o *E. faecium* promovia uma proteção intestinal e uma menor mortalidade significativa, e que essa proteção não foi devido a uma diminuição dos níveis intestinais de *Salm. Typhimurium*. Também utilizando o mesmo enteropatógeno, RODRIGUES *et al.* (1996) observaram uma proteção em camundongos isentos de germes e convencionais tratados com *S. boulardii*, e que essa proteção estava intimamente relacionada com a imunomodulação promovida pela levedura (RODRIGUES *et al.*, 2000). SILVA *et al.* (1999) observaram um efeito protetor de *B. bifidum* contra *Salm. Typhimurium* e correlacionaram esse efeito a uma capacidade imunomoduladora desse probiótico e uma diminuição da resposta inflamatória (SILVA *et al.*, 2004). Resultados semelhantes, no que diz respeito a proteção e efeito imunomodulador, foram encontrados por LIMA FILHO *et al.* (2004), utilizando *E. coli* EMO em animais isentos de germes desafiados com *Salmonella*.

I.7 As vias de sinalização celular

Os diferentes estímulos externos são integrados, internamente, por vias de sinalização celular. Desse modo, no nível dos enterócitos, duas grandes vias de sinalização celular se distinguem: o fator de transcrição NF- κ B e a via das MAP quinases.

I.7.1 O fator de transcrição NF- κ B

O fator nuclear κ B é um fator de transcrição que desempenha um papel crítico na coordenação das respostas imune, inata e adaptativa, regulando a expressão gênica de vários mediadores celulares (ZINGARELLI *et al.*, 2003). Este fator foi descrito, pela primeira vez, em 1986, por Sen e Baltimore, como um fator nuclear capaz de se ligar à cadeia leve kappa (κ) de imunoglobulinas de linfócitos B, onde ele regula a transcrição (SEN & BALTIMORE, 1986). Sabe-se, atualmente, que o NF- κ B é um fator ubíquo, expresso na maioria dos tipos celulares, e que é um dímero composto de membros da

família Relish (Rel). Este fator reconhece a sequência consenso 5'GGGRNNYYCC3', onde R é uma purina, Y, uma pirimidina e, N, qualquer base.

Nos vertebrados a família NF- κ B/Rel engloba cinco sub-unidades, chamadas p50, p52, p65 (RelA), c-Rel e RelB. Essas sub-unidades podem formar homodímeros ou heterodímeros em várias combinações. A mais comum consiste de dois polipeptídeos de 50 kDa (p50) e 65 kDa (p65). Normalmente, o NF- κ B se encontra no citoplasma, numa forma fisicamente inativa, devido à associação a proteínas inibidoras conhecidas como I κ Bs (Inhibitor κ B proteins). Sete formas diferentes de I κ Bs são conhecidas: I κ B- α , I κ B- β , I κ B- γ , I κ B- ϵ , Bcl-3, p100 e p105, sendo a I κ B- α a mais conhecida e mais bem estudada (ZINGARELLI, 2005). O NF- κ B pode ser ativado por diversos sinais, como: bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, produtos bacterianos (endotoxinas, peptidoglicanos, ácido lipoteicoico), vírus e componentes virais, protozoários, citocinas (como TNF- α e IL-1 β), radicais livres e agentes oxidantes (CAAMANO & HUNTER, 2002).

Estudos *in vitro*, utilizando culturas celulares e, também, estudos *in vivo*, utilizando modelos animais para estudo de sepse, mostraram que a ativação do NF- κ B é rápida e ocorre poucos minutos após o desafio microbiano (CAAMANO & HUNTER, 2002; SHEEHAN *et al.*, 2002; SHEEHAN *et al.*, 2003; ZINGARELLI *et al.*, 2003). A ativação desse fator de transcrição requer a fosforilação de seus inibidores fisiológicos, isto é, as I κ Bs, em especial a I κ B- α , em resíduos específicos de serina. Este evento de fosforilação é mediado por um complexo de três proteínas quinases de I κ B (IKKs): IKK- α , IKK- β e IKK- γ , estas ativam a degradação subsequente de I κ Bs pelo proteossoma 26S (ZINGARELLI *et al.*, 2003). A degradação proteolítica das I κ Bs permite que o NF- κ B se transloque para o núcleo, onde ele regula a expressão de centenas de genes que são importantes nas respostas imune e inflamatória (ZINGARELLI *et al.*, 2003) (Figura 6). Esses incluem genes para citocinas, moléculas de adesão e quimioquinas, receptores requeridos para a adesão de neutrófilos e sua transmigração nas paredes dos vasos sanguíneos, receptores envolvidos no reconhecimento imune (como membros do complexo principal de histocompatibilidade) e proteínas envolvidas na apresentação de antígenos. Ativando a expressão de vários genes que interagem no processo de apoptose e regulam a sobrevivência e proliferação celular, o NF- κ B também modula a sobrevivência de neutrófilos e a proliferação e diferenciação de linfócitos B e T no local de infecção, permitindo que essas células

desempenhem suas funções imunológicas e antimicrobianas (SEN & BALTIMORE, 1986; CAAMANO & HUNTER, 2002; ZINGARELLI *et al.*, 2003).

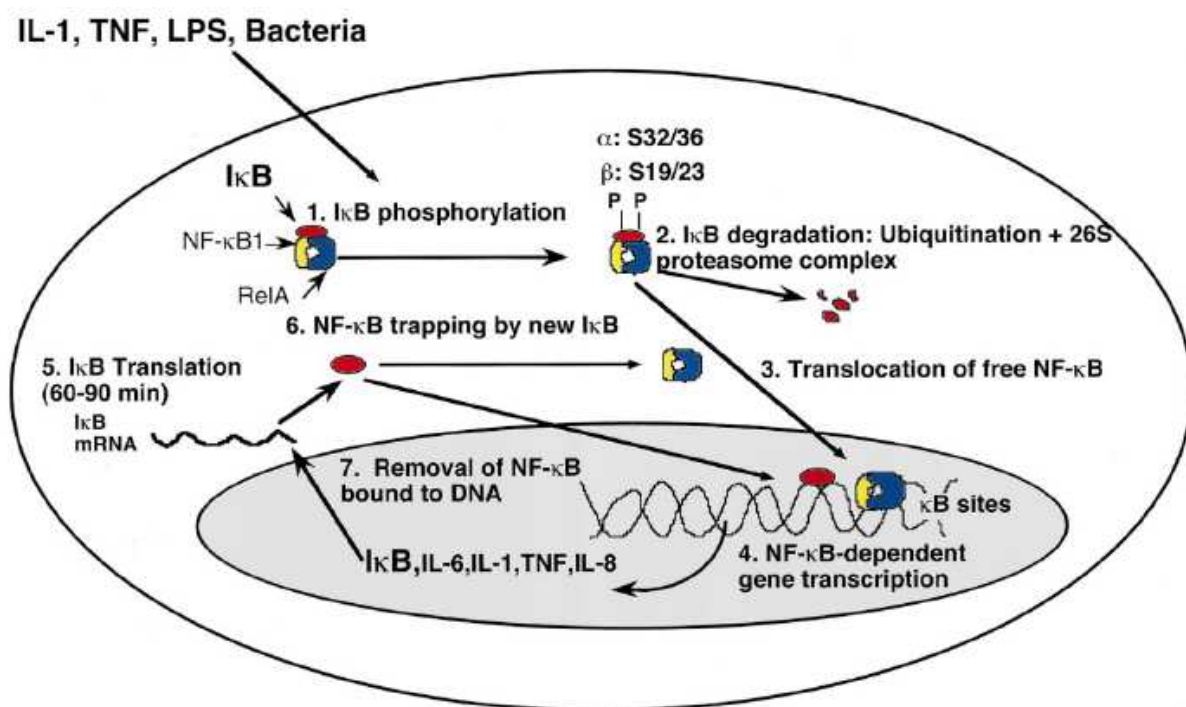


Figura 6. Ativação do fator de transcrição NF-κB. O NF-κB é mantido no citoplasma pelas proteínas inibidoras IκBs. Sob determinados estímulos, IκB é fosforilado, ubiquitinado e degradado, e o NF-κB fica livre para migrar para o núcleo, onde induz a transcrição de diversos genes dependentes de κB. NF-κB é, depois, inativado por novas proteínas IκBs sintetizadas. (JOBIN & SARTOR, 2000).

Além do controle da resposta imune, o NF- κ B estimula, também, a expressão de enzimas cujos produtos contribuem para a patogênese da resposta inflamatória, incluindo a ciclo-oxigenase-2, a forma induzível da óxido nítrico sintase, e uma variedade de citocinas pro-inflamatórias. Vários desses mediadores inflamatórios, que são regulados pelo NF- κ B (como TNF- α e IL-1 β) podem, por sua vez, ativar este fator de transcrição, criando, dessa forma, um ciclo inflamatório que se auto-mantém, o que aumenta a gravidade e a duração da resposta inflamatória (CAAMANO & HUNTER, 2002; ZINGARELLI *et al.*, 2003). Do mesmo modo, como parte de um controle de “feedback” negativo do processo inflamatório, o NF- κ B induz a transcrição de seu próprio inibidor (I κ B- α), ativando um mecanismo que limita sua própria ativação. Desse modo, é possível que exista um balanço dinâmico entre o mecanismo de defesa e o papel inflamatório do NF- κ B durante a infecção. Entretanto, esse balanço pode ser desligado quando a infecção ativa uma resposta inflamatória sistêmica exagerada, levando a uma ativação prolongada do NF- κ B e inapropriada expressão de moléculas tóxicas (CAAMANO & HUNTER, 2002; ZINGARELLI *et al.*, 2003).

1.7.2 As MAP quinases

As MAP quinases são vias de sinalização fortemente conservadas ao longo da evolução. As vias envolvendo as MAP quinases constituem as vias mais importantes da transdução do sinal, da superfície celular ao núcleo. Elas estão implicadas na proliferação, diferenciação e morte celular. São uma cascata onde cada membro ativa outro por fosforilação dos resíduos treonina e/ou tirosina. Na extremidade da cadeia encontramos as MAP quinases controle. A cascata clássica de MAP quinase consiste da ativação de três proteínas quinases intracelulares, que se inicia quando o primeiro membro, MAP quinase quinase quinase (MAPKKK), é ativada. MAPKKK é uma proteína quinase que fosforila e ativa MAP quinase quinase (MAPKK), e essa ativação é seguida pela ativação de uma MAP quinase específica (Figura 7). Dessa maneira, as MAPKs ativam numerosas proteínas quinases, proteínas nucleares e fatores de transcrição, levando a uma transdução do sinal. A ativação da cascata de MAPK é rápida e possibilita às células responder a mudanças ambientais de uma maneira regulada. Três grandes grupos de MAP quinases são reconhecidas em células de

mamíferos: ERK1/2 (extracellular signal regulated kinase), p38 e JNK (c-Jun NH₂ terminal kinase) (WAETZIG & SCHREIBER, 2003; CUSCHIERI & MAIER, 2005) que, junto com NF- κ B, controlam a resposta celular ao estresse e à inflamação.

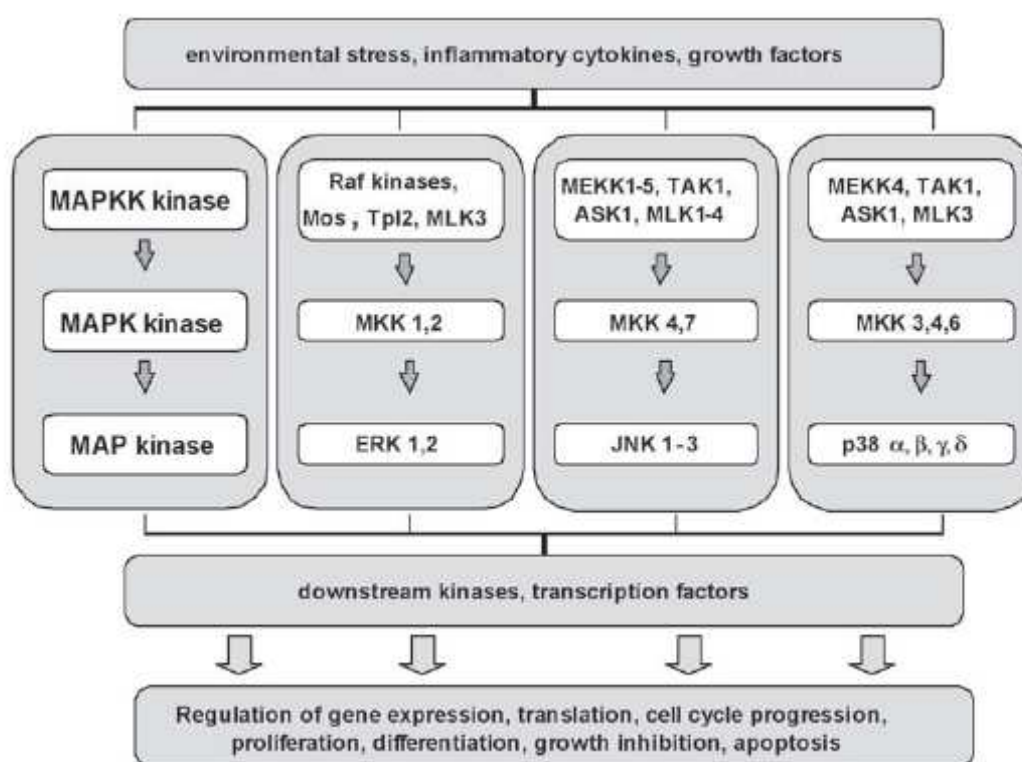


Figura 7. Esquema mostrando a sinalização celular via cascata das MAP quinases ERK, JNK e p38. (KATSOULIDIS *et al.*, 2005).

I.7.2.1 ERK

ERK foi a primeira proteína da família das MAPKs identificada, apresentando-se sob duas isoformas, ERK1 e ERK2, também conhecidas por p44 e p42 MAPK e, normalmente, referida como ERK1/2 (p44/42). Esta proteína está envolvida, primariamente, na proliferação, transformação e diferenciação (COWLEY *et al.*, 1994; HILL & TREISMAN, 1995; HUNTER, 1995; MARSHALL, 1995). Sua ativação é iniciada pela fosforilação e ativação de Raf (MAPKKK), seguida da fosforilação e ativação de MKK1/2 (MAPKK), que leva à ativação de ERK1/2 (MAPK) (KOLCH, 2000) (Figura 7). A ativação da MAPK ocorre pela fosforilação de treonina e tirosina (202 e 204 da MAPK humana - ERK1 - ou 183 e 185 de rato - ERK2) na sequência T*EY* de MEK (STURGILL *et al.*, 1988; PAYNE *et al.*, 1991). Raf é uma quinase altamente conservada que é ativada pela proteína G, Ras. Ras é ativada pela interação com o complexo Grb2-SOS, onde SOS catalisa a formação do complexo Ras-guanosina trifosfato (GTP). Esse complexo se liga a Raf e o ativa de um modo dependente de cálcio (CUSCHIERI *et al.*, 2002). Essa cascata é ativada por diversos mitógenos, incluindo EGF (fator de crescimento epidérmico, epidermal growth factor), fator de crescimento derivado de plaquetas, tromboxano A, angiotensina II, TGF- β , insulina, citocinas, hormônios e neurotransmissores (COBB *et al.*, 1994). Adicionalmente, ERK é ativado em resposta à endotoxina, estresse oxidativo, fator ativador de plaquetas (PAF, “platelet activating factor”) e aderência por células do sistema imune inato como monócitos e macrófagos.

I.7.2.2 p38

p38 MAPK, também conhecida como RH (ROUSE *et al.*, 1994) ou CSBP (HAN *et al.*, 1994), é ativada em resposta a estresses fisiológicos, endotoxina, estresse osmótico, exposição a raios ultravioleta, citocinas inflamatórias, LPS e fatores de crescimento (FRESHNEY *et al.*, 1994; HAN *et al.*, 1994; LEE *et al.*, 1994; ROUSE *et al.*, 1994; RAINGEAUD *et al.*, 1995) e participa na cascata de sinalização, controlando as respostas celulares a citocinas e estresses (FRESHNEY *et al.*, 1994; HAN *et al.*, 1994; LEE *et al.*, 1994; ROUSE *et al.*, 1994). Cinco isoformas do grupo p38 já foram identificadas: p38- α (SAPK2), p38- β , p38- β 2, p38- γ (SAPK3) e p38- δ (CHEN *et al.*,

2001). A expressão dessas isoformas varia entre os tecidos. p38- α é altamente expressa em leucócitos e medula óssea, p38- β é expresso no coração e no cérebro, e p38- γ é expresso, predominantemente, nos músculos esqueléticos. A ativação de p38 é iniciada pela fosforilação e ativação de MEKK4, TAK1, ASK-1, MLK3 (MAPKKK), seguida da fosforilação e ativação de MKK 3,4,6 (MAPKK), que fosforila p38 (MAPK) nos resíduos treonina 180 e tirosina 182 (CUSCHIERI & MAIER, 2005) (Figura 7).

Os principais substratos para p38 incluem proteína quinase 2 ativada por MAPK (MAPKAP-K2) e MAPKAP-K3, que são serino-proteínas quinases conhecidas por ativarem a proteína de choque térmico p27 (HSP-27, heat shock protein-27) (LARSEN *et al.*, 1997), que é uma proteína ligadora de actina que ajuda a reparar o citoesqueleto de actina e inibe a apoptose, além de possuir algumas propriedades anti-inflamatórias. p38 também fosforila e ativa os fatores de transcrição ATF-2 e SP1. ATF-2 é crítico na ativação de várias proteínas inflamatórias (RAINGEAUD *et al.*, 1995), enquanto SP1 parece ser crítico na transcrição da citocina anti-inflamatória IL-10 (MA *et al.*, 2001).

I.7.2.3 JNK

A MAPK JNK foi originalmente identificada como uma proteína quinase de 54 kDa ativada por estresse e, por isso, é também conhecida por SAPK (stress-activated protein kinase). Ela é ativada por vários estímulos que ativam p38, como LPS, TNF- α , IL-1, estresse osmótico e radiação ultravioleta (DAVIS, 1999; ICHIJO, 1999; CHEN *et al.*, 2001; KYRIAKIS & AVARUCK, 2001). As proteínas quinases JNK são codificadas por três genes: JNK1, JNK2 e JNK3. JNK 1 e 2 são expressos de forma ubíqua, enquanto JNK3 é expresso apenas no cérebro, coração e testículos. Quando ativada como um dímero, JNK se transloca para o núcleo onde regula a transcrição, via seus efeitos no c-Jun, ATF-2 e outros fatores de transcrição. A ativação de JNK é iniciada pela fosforilação e ativação de MEKK1-5, TAK1, ASK1 e MLK1-4 (MAPKKK), seguida da fosforilação e ativação de MKK4 e MKK7 (MAPKK), que fosforila JNK (MAPK) na treonina 183 e tirosina 185 (CUSCHIERI & MAIER, 2005) (Figura 7).

O JNK ativado fosforila ATF-2, Elk-1 e c-Jun. Desse modo, JNK desempenha um importante papel na ativação do fator de transcrição AP-1, que é constituído de um

homodímero c-Jun ou um complexo c-Jun-c-Fos. Embora os efeitos de JNK não sejam tão bem compreendidos como aqueles de ERK e p38, este desempenha um importante papel na expressão de TNF e óxido nítrico sintase induzível em macrófagos e monócitos (LAHTI *et al.*, 2003). Adicionalmente, JNK desempenha um papel na proliferação de células T, diferenciação e produção de IL-2.

Os sinais de estresse são transmitidos a essa cascata pelas pequenas proteínas GTPases da família Rho (Rac, Rho, Cdc42). Rac1 e Cdc42 medeiam a estimulação de MEKKs e MLKs. Alternativamente, MKK4-7 podem ser ativadas por uma via independente de GTPases, via estimulação de um membro da família quinase centro germinal (GCK, *germinal center kinase*) (KYRIAKIS, 1999).

I.8 Interleucina-8

Uma infecção ou um dano no organismo sempre resulta em inflamação, cuja principal característica é o recrutamento de neutrófilos do sangue para o tecido onde ocorreu o dano. Esse processo é direcionado por polipeptídeos quimiotáticos de 8 a 14 kDa, conhecidos como quimiocinas. Aproximadamente, 40 quimiocinas são conhecidas hoje em dia (ZLOTNIK & YOSHIE, 2000). A IL-8 foi identificada em 1987 como um novo tipo de citocina ativadora de neutrófilos e muitas de suas propriedades, incluindo sua estrutura tri-dimensional, receptores, mecanismos de sinalização e funções adicionais na angiogênese, progressão de tumores, mitose e remodelamento tissular, são bem conhecidas (BAGGIOLINI & CLARK-LEWIS, 1992). Uma de suas principais propriedades é a variação nos níveis de expressão. Normalmente, a IL-8 é fracamente secretada em células não-induzidas, mas sua produção é rapidamente induzida por uma grande variedade de estímulos, que abrangem as citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α ou IL-1 (KASAHARA *et al.*, 1992; BRASIER *et al.*, 1998), bactérias (AIHARA *et al.*, 1997; HOBBIIE *et al.*, 1997), produtos virais (MURAYAMA *et al.*, 1997; MASTRONARDE *et al.*, 1998) e estresse celular (DEFORGE *et al.*, 1993; SHAPIRO & DINARELLO, 1995; LEE *et al.*, 1997; SONODA *et al.*, 1997). Entretanto, alguns estímulos, como IL-1 e TNF- α , aumentam a expressão de IL-8 em mais de 100 vezes (KASAHARA *et al.*, 1992; MURAYAMA *et al.*, 1997; SONODA *et al.*, 1997; BRASIER *et al.*, 1998), enquanto outros, como certas bactérias ou o EGF, causam um aumento mais moderado, de 5 a 10 vezes, na secreção de IL-8 (AIHARA *et al.*, 1997;

HOBBIIE *et al.*, 1997; HOLTSMANN *et al.*, 1999). Os níveis máximos de IL-8 são gerados pela combinação de três diferentes mecanismos: (i) a desrepressão do fator de transcrição, (ii) a ativação transcricional do gene pelo NF- κ B e pela proteína quinase JNK e, (iii) pela estabilização do mRNA pela MAPK p38 (HOFFMANN *et al.*, 2002) (Figura 8).

Em células não estimuladas, o fator de repressão do NF- κ B (NRF, NF- κ B repressing factor) previne a transcrição de IL-8 (NOURBAKHSR *et al.*, 2001). A ligação de IL-1 ou TNF- α à superfície celular resulta na formação de complexos receptores multiméricos que recrutam as proteínas adaptadoras TRAF6 e TRAF2, respectivamente (MALININ *et al.*, 1997; BAUD *et al.*, 1999; NINOMIYA-TSUJI *et al.*, 1999). A oligomerização de TRAF provoca a ativação de MAPKKK, assim como TAK1, NIK1 ou MEKK1, por mecanismos ainda desconhecidos (MALININ *et al.*, 1997; BAUD *et al.*, 1999; NINOMIYA-TSUJI *et al.*, 1999). TAK1 ou MEKK1 ativa MKK7-JNK e a via IKK- β / γ (CHU *et al.*, 1999; HOLTSMANN *et al.*, 1999; SCHMIDT-SUPPRIAN *et al.*, 2000; HOLTSMANN *et al.*, 2001; NOURBAKHSR *et al.*, 2001). Os alvos diretos de JNK, assim como as proteínas ligadoras para o local de AP-1, ainda não foram identificadas, enquanto IKK fosforila I κ B, permitindo a liberação de NF- κ B (ZANDI & KARIN, 1999). A subunidade p65 do NF- κ B transloca para o núcleo e se liga ao local do promotor de IL-8 (CHEN *et al.*, 1998; NOURBAKHSR *et al.*, 2001), onde interage com NRF e fatores de transcrição de AP-1 (HOLTSMANN *et al.*, 1999; NOURBAKHSR *et al.*, 2001). Modificações pós-transducionais, como fosforilação dos domínios de transativação de AP-1 (WHITMARSH & DAVIS, 1996) e NF- κ B (SCHMITZ *et al.*, 2001), recrutamento do coativador (CBP/p300) (VANDEN BERGHE *et al.*, 1999) e fosforilação ou acetilação de histonas (VANDEN BERGHE *et al.*, 1999; ASHBURNER *et al.*, 2001; WEN & WU, 2001), resultam na remodelagem da cromatina e numa forte transcrição de IL-8. Os elementos *cis* para AP-1, NF- κ B e NRF não podem ser alterados sem diminuir JNK ou a transcrição de IL-8 mediada por NF- κ B (HOLTSMANN *et al.*, 1999; NOURBAKHSR *et al.*, 2001), favorecendo um modelo onde todas as proteínas envolvidas na transcrição interajam para formar um complexo multi-protético. Essa estrutura favorece um contato máximo com a RNA polimerase II, que se auto-fosforila (NISSEN & YAMAMOTO, 2000). Os novos transcritos sintetizados são rapidamente estabilizados pela MAPK p38, que tem como alvo elementos ARE (elementos *cis* ricos em unidades de absorvância, “absorbance unit

(AU)-rich *cis*-elements”) no mRNA para IL-8, por um mecanismo ainda desconhecido que pode envolver proteínas que se ligam ao ARE (WINZEN *et al.*, 1999).

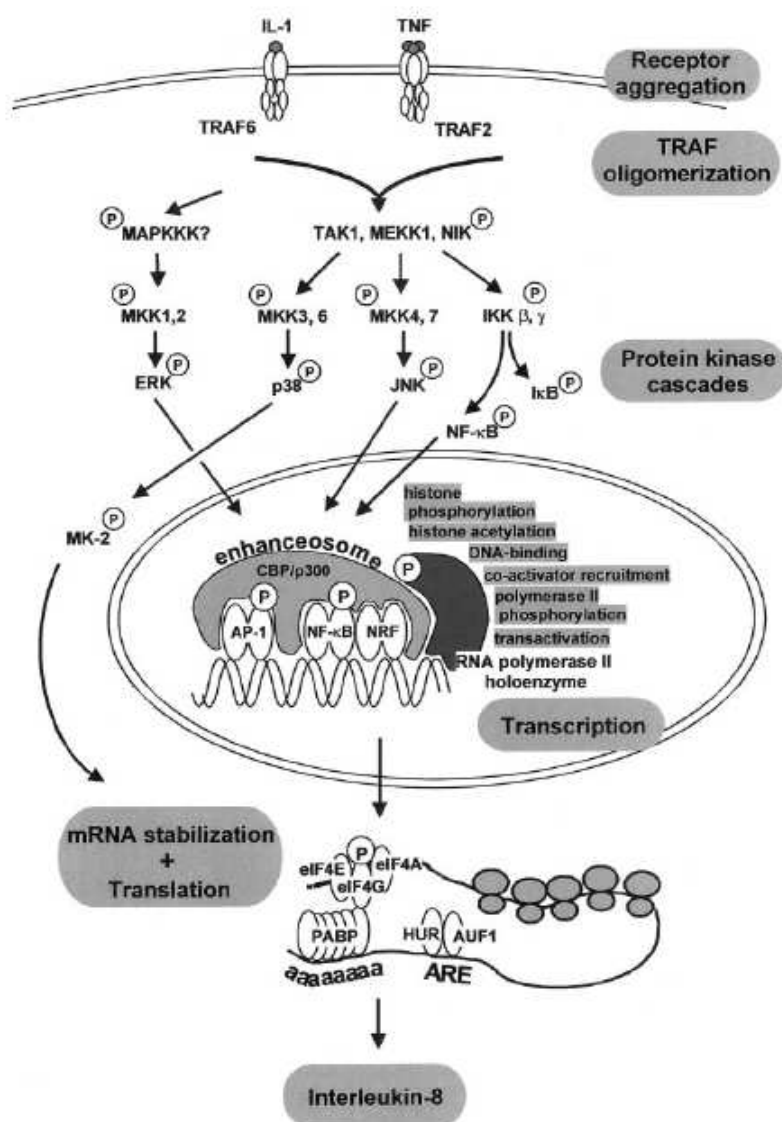


Figura 8. Esquema mostrando as vias de transdução do sinal essenciais para a regulação do gene para IL-8. Após ativadas por diversos estímulos, as proteínas adaptadoras, TRAF 6 e TRAF 2, ativam as vias das MAPKs, assim como fosforila I κ B. O NF- κ B transloca-se para o núcleo onde, junto com a proteína AP-1, ativada pela MAPK JNK, ativam a transcrição do gene para IL-8. O mRNA sintetizado é rapidamente estabilizado pela MAPK p38. (HOFFMANN *et al.*, 2002).

I.9 O modelo animal gnotobiótico

Uma importante estratégia experimental para estudar as relações que ocorrem entre os microrganismos e seus hospedeiros é a utilização de um modelo animal isento de germes (IG). Neste caso, deve-se, primeiro, definir as funções celulares na ausência de microrganismos e, depois, avaliar os efeitos da adição de um único microrganismo ou de uma população definida de microrganismos. A criação de animais sob condições isentas de germes tem desenvolvido um campo científico para este propósito, a gnotobiologia. O termo gnotobiótico foi proposto para designar o campo de investigação interessado na criação de animais e plantas que estão livres de todos os microrganismos, ou associados somente a espécies conhecidas (TREXLER, 1978). A palavra gnotobiologia é derivada do grego onde “gnotos” e “biota” significam, respectivamente, conhecida e vida (GUSTAFSSON, 1948). Os animais IG são, de um certo modo, uma extensão do conceito de cultura pura, permitindo o estudo das interações do hospedeiro com os microrganismos, sem a interferência dos organismos associados (GORDON & PESTI, 1971; TREXLER, 1978).

A tecnologia da gnotobiologia depende da habilidade de controlar a composição do ambiente no qual o organismo se desenvolve e funciona. O uso combinado de organismos geneticamente manipulados e gnotobióticos têm o potencial de fornecer novas e importantes informações sobre como uma bactéria afeta o desenvolvimento normal, o estabelecimento e a manutenção do sistema imune associado à mucosa e as funções célula-epitélio. Além do mais, a gnotobiologia pode ajudar no estudo sobre as etiologias de doenças infecciosas, condições inflamatórias agudas e crônicas (FEDORAK, 1995; SARTOR, 1995) e, possivelmente, em tumorigênese (GORBACH & GOLDIN, 1990).

Desde a década de 1950, quando a produção de ratos e camundongos isentos de germes foi estabelecida, o uso desse modelo animal nas ciências biomédicas vem se expandindo. Entretanto, o estado IG dá origem a uma variedade de aspectos fisiológicos, morfológicos e imunológicos diferentes daqueles encontrados na presença da microbiota normal. Esses animais possuem um grande aumento do ceco, devido, em grande parte, ao acúmulo de muco, que não é degradado na ausência dessas bactérias (GUSTAFSSON *et al.*, 1970). As vilosidades do intestino delgado são maiores e as criptas são mais curtas e contêm menos células (ALAM *et al.*, 1994). As diferenças entre os animais convencionais e os animais isentos de germes são maiores nas regiões

do trato digestivo onde as densidades microbianas são normalmente maiores (FALK *et al.*, 1998).

Além das diferenças na arquitetura geral do trato digestivo, os animais IG apresentam diferenças na motilidade intestinal, na diferenciação epitelial e na imunologia. A distribuição espacial e temporal dos complexos motores que migram no intestino delgado desses animais é mais restrita e mais lenta que em animais convencionais (STRANDBERG *et al.*, 1966). Estudos em camundongos IG mostraram que a morfogênese de unidades de vilosidades da cripta pode ser completada na ausência de microrganismos. Entretanto, comparações entre esses animais e os convencionais revelaram que componentes da microbiota podem diferenciar linhagens intestinais epiteliais durante a morfogênese (FALK *et al.*, 1998).

Os camundongos IG representam um sistema experimental para simplificar o fenômeno de resistência à colonização e os mecanismos envolvidos nesse fenômeno e, também, para testar a capacidade de uma terapia à base de probióticos, para prevenir ou impedir a colonização por patógenos. Muitos estudos mostram que os animais IG, quando infectados por patógenos, podem, em alguns casos, se mostrar mais resistentes e, em outros, mais susceptíveis àquele patógeno (VIEIRA *et al.*, 1998).

O experimento gnotobiótico oferece considerável potencial como uma ferramenta no estudo das relações hospedeiro-microrganismo porque: retrata o hospedeiro quando livre de germes, ou quando modificado por microrganismos conhecidos ou outras associações; permite o estudo da relação inter-microbiana dentro do organismo do hospedeiro; pode ser usado no estudo de algum fator exógeno ou endógeno, em que as ações isoladas de tais fatores, afetadas ou não pela microbiota associada ao hospedeiro, seja de interesse (GORDON & PESTI, 1971). Esses modelos são necessários, pois o estudo das interações entre linhagens bacterianas *in vitro* nem sempre pode ser extrapolado para o que realmente ocorre, *in vivo*, no tubo digestivo de animais gnotoxênicos (DUCLUZEAU, 1989). Esses animais são, também, uma excelente ferramenta para avaliar as mudanças anatômicas, fisiológicas e imunológicas induzidas pela microbiota autóctone e alóctone na mucosa intestinal (NICOLI, 1995).

Inúmeras tentativas vêm sendo feitas para sistematizar a terminologia usada em gnotobiologia, mas nenhum sistema é universalmente aceito. A nomenclatura usada é limitada a termos que, por uso geral, é familiar e compreendida pela maioria dos pesquisadores da área. Animal isento de germes (IG), axênico ou “germ-free” (GF) é um animal livre de toda forma demonstrável de vida, sendo criado e mantido

continuamente em isoladores. O animal gnotobiótico (GN) ou gnotoxênico é aquele inicialmente axênico, mantido em isoladores, em associação intencional com um ou mais tipos microbianos conhecidos. Animal heteroxênico é um animal inicialmente isento de germes, mantido em isoladores, em associação com uma microbiota complexa conhecida ou não e que não é da própria espécie. O animal holoxênico ou convencional (CV) apresenta uma microbiota complexa e desconhecida na sua totalidade e é criado sem precauções especiais desde o nascimento. O animal convencionalizado é o animal ex-isento de germes que foi associado com uma microbiota normal de animais CV (GORDON & PESTI, 1971; GUSTAFSSON, 1984; ANDREMONT *et al.*, 1985).

Os equipamentos e procedimentos correntemente em uso que permitem a manutenção do “status” gnotobiótico de animais experimentais incluem, em essência, equipamentos para transferência do feto maduro do útero para o interior de isoladores de plástico, estéreis, supridos com filtros de ar e luvas de borracha. Procedimentos de rotina incluem criação e manutenção de animais gnotobióticos em isoladores, esterilização de dietas, água, cama e outros utensílios, por autoclavação, irradiação ou filtração, quando aplicável (DUCLUZEAU, 1989).

Como os animais gnotobióticos permitem o estudo e reprodução de mecanismos de interação entre microrganismos e hospedeiro, que não observados por meio de experimentos *in vitro* (GORDON & PESTI, 1971), eles constituem um excelente modelo na avaliação do potencial probiótico de certos microrganismos (NICOLI & RAIBAUD, 1990; NARDI *et al.*, 1991; RODRIGUES *et al.*, 1996; NEUMANN *et al.*, 1998; PERET FILHO *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 1999; LIMA FILHO *et al.*, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2000; MAIA *et al.*, 2001).

I.10 O modelo de células T84

A linhagem celular epitelial T84 é derivada de um adenocarcinoma do cólon humano e já foi extensivamente estudada, tanto morfológica quanto funcionalmente (DHARMSATHAPHORN *et al.*, 1984). Essas células crescem confluentemente como uma monocamada, com a membrana basolateral atachada à superfície da placa de cultura e, a membrana apical, com todas as suas microvilosidades, em contato com o meio. As junções serreadas e os desmossomos já foram demonstrados entre as células adjacentes, tornando este um excelente modelo, também, para o estudo

dessas junções. As monocamadas confluentes conduzem a um transporte vetorial de eletrólitos, similar a um tecido epitelial do intestino. Isso faz dessa célula um excelente modelo de estudo em processos de transporte de eletrólitos e sua regulação por hormônios, peptídeos e neurotransmissores (DHARMSATHAPHORN *et al.*, 1984).

Essa linhagem apresenta as características de enterócitos maduros, quando cultivada sobre filtros: há a formação de uma monocamada de células polarizadas que exprimem as junções celulares. A infecção desta célula por EPEC induz uma diminuição das funções de barreira, seguida do desaparecimento da proteína ZO-1 (PHILPOTT *et al.*, 1996), a formação de lesões do tipo A/E e a indução de certas vias de sinalização, como a ativação de PKC e a fosforilação de MLCK (ROBERT *et al.*, 1997). Este modelo é, também, extremamente utilizado em infecções por *Salm. Typhimurium* (MCCORMICK *et al.*, 1993; MCCORMICK *et al.*, 1995; MCCORMICK *et al.*, 1998; MA *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2005; RAFFATELLU *et al.*, 2005), *E. coli* (CZERUCKA *et al.*, 2000; CZERUCKA *et al.*, 2001; DAHAN *et al.*, 2002; DAHAN *et al.*, 2003; DALMASSO *et al.*, 2006), *Salm. dublin*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* (JUNG *et al.*, 1995).

II - RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A salmonelose é um dos principais problemas de saúde pública e representa um custo significativo para a sociedade em muitos países, em especial naqueles subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Milhões de casos são relatados a cada ano, em todo o mundo, e a doença resulta em milhares de mortes. Atualmente, mais de 2500 sorotipos de *Salmonella* são conhecidos e, os problemas relacionados a essa bactéria, aumentaram significativamente, tanto em termos de incidência, quanto em termos de gravidade da doença. Desde o começo da década de 1990, linhagens de *Salmonella* resistentes a diversos antimicrobianos vêm aumentando e um dos grandes problemas atuais da medicina é a alta resistência bacteriana aos antibióticos disponíveis no mercado (WHO, 2007).

Poucos países relatam os gastos com essa doença. Nos Estados Unidos, uma estimativa de 1,4 milhões de infecções por *Salmonella* não tifóide resulta em 168.000 consultas a hospitais, 15.000 internações e 580 mortes anuais. O custo associado com salmoneloses é estimado em \$ 3 bilhões anuais nos Estados Unidos. Na Dinamarca esse custo é de \$ 15,5 milhões por ano (WHO, 2007).

Nas últimas décadas, muita atenção tem sido dada à modulação da microbiota intestinal normal por adjuvantes microbianos vivos, conhecidos como probióticos. O interesse no uso destes agentes microbianos vivos com o propósito de beneficiar a saúde do hospedeiro e prevenir ou tratar doenças tem sido explorado nesses últimos anos. Esses organismos vêm sendo propostos como medicamentos para prevenção ou tratamento de um grande número de desordens gastrintestinais. A grande vantagem da terapia com os probióticos é a ausência de efeitos secundários, como a seleção de bactérias resistentes. Os efeitos benéficos destes microrganismos são basicamente os mesmos da microbiota normal do corpo humano. O que se faz, neste caso, é a utilização, em grande quantidade, daqueles que possuem eficácia comprovada, podendo ser constituintes normais da microbiota, como é o caso das bifidobactérias e dos lactobacilos, ou não, como da levedura *S. boulardii*.

Atualmente, a única levedura disponível no mercado para uso como probiótico em seres humanos, e com eficácia comprovada, é a *S. boulardii* (nome comercial Floratil®). Como é um medicamento patenteado pelos Laboratoires Biocodex (Paris, França), e comercializado no Brasil pela MERCK S.A. (Rio de Janeiro, RJ), por um valor elevado e, levando-se em consideração que os principais casos de diarreia ocorrem em pessoas de baixa renda, seria de grande interesse a seleção de uma nova levedura de origem nacional, a custos mais acessíveis. Além do mais, uma das principais

preocupações da Organização Mundial da Saúde é a implementação de novas terapias que não atuem como uma forte pressão seletiva, propiciando a geração de patógenos cada vez mais agressivos e resistentes.

Resultados prévios em nosso laboratório mostraram que a *S. cerevisiae* linhagem UFMG 905 foi capaz de reduzir a ação de alguns enteropatógenos. Os resultados mostraram que a levedura foi capaz de diminuir a mortalidade associada a um desafio com *Salm. Typhimurium* (15% de sobrevivência no grupo controle contra 55% no grupo tratado com a levedura) e os dados histopatológicos mostraram que a levedura apresentou proteção contra o desafio oral com *C. difficile* em camundongos gnotobióticos e preservação do fígado de animais convencionais tratados com a levedura e desafiados com *Salm. Typhimurium*, sugerindo que a levedura diminui, *in vivo*, a translocação deste patógeno (MARTINS *et al.*, 2005a).

Uma vez evidenciada a proteção conferida pela levedura, testada em alguns casos, é interesse do grupo prosseguir com os estudos, verificando os mecanismos pelos quais a levedura exerceu seu efeito benéfico, comparar os resultados com aqueles já descritos para a *S. boulardii*, e tentar esclarecer se os mecanismos descritos são os mesmos para as duas leveduras ou se existem outros mecanismos de ação ainda não descritos para os efeitos protetores das leveduras contra a ação de alguns patógenos. Além do mais, para que possa ser liberada a utilização de um microrganismo para uso como probiótico, são necessários dados científicos mostrando a proteção e os mecanismos de ação, além de testes, *in vivo*, em cobaias, e ensaios clínicos.

Espera-se, com essa tese, dar mais um importante passo nesta linha de trabalho, num projeto que integra a competência e a infra-estrutura da UFMG com aquelas de uma reconhecida instituição estrangeira. Numa primeira etapa de experimentos, realizada no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, mostrou-se o efeito, *in vivo*, da levedura no sistema imune do hospedeiro, pela dosagem de imunoglobulinas, além da capacidade da levedura de proteger um ambiente conturbado pelo enteropatógeno *Salm. Typhimurium*.

Na segunda etapa dos experimentos, realizados no laboratório da Dra. Dorota Czerucka (Laboratoire de Gastroentérologie et Nutrition, Faculté de Médecine, Université de Nice-Sophia Antipolis, Nice, France), mostrou-se alguns sinais intracelulares induzidos pelo enteropatógeno, em cultura de células do cólon humano, e o efeito de duas leveduras (*S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905) nos diferentes sinais

induzidos pela ação da bactéria, como a indução de IL-8, NF- κ B, ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (ERK1/2, p38, JNK), além do efeito na invasão celular pela bactéria.

III - OBJETIVOS

III.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos da levedura *S. cerevisiae* UFMG 905 no sistema imune de camundongos NIH, isentos de germes e convencionais, e os efeitos de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 na sinalização celular induzida em células T84, após infecção pelo enteropatógeno *S. Typhimurium*.

III.2 Objetivos específicos

III.2.01 Determinar a translocação da levedura *S. cerevisiae* UFMG 905 para as placas de Peyer, linfonodos mesentéricos, fígado e baço de camundongos NIH, gnotobióticos e convencionais.

III.2.02 Determinar a translocação de *Salm. Typhimurium* para as placas de Peyer, linfonodos mesentéricos, fígado e baço de camundongos NIH, gnotobióticos e convencionais, na presença e na ausência da levedura *S. cerevisiae* UFMG 905.

III.2.03 Determinar e comparar o efeito da levedura *S. cerevisiae* UFMG 905 nas células de Küpffer em camundongos NIH, gnotobióticos e convencionais, controles e experimentais.

III.2.04 Determinar e comparar o efeito da levedura *S. cerevisiae* UFMG 905 no sistema fagocítico de camundongos NIH, gnotobióticos e convencionais, controles e experimentais, quando do desafio endovenoso com *E. coli* B₄₁.

III.2.05 Determinar e comparar os níveis de imunoglobulinas secretadas do tipo A (sIgA) total, IgA, IgG e IgM, no conteúdo intestinal e no soro de camundongos NIH, gnotobióticos e convencionais, controles e experimentais, monoassociados ou tratados com a levedura *S. cerevisiae* UFMG 905, respectivamente.

III.2.06 Verificar o efeito de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 na integridade epitelial de células T84, após infecção pelo enteropatógeno *Salm. Typhimurium* ATCC 14028.

III.2.07 Verificar o efeito de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 sobre a resposta inflamatória (produção de IL-8), em células T84, após infecção pelo enteropatógeno *Salm. Typhimurium* 14028.

III.2.08 Mostrar o efeito de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 nas vias de sinalização celular (fosforilação de MAPKs), fosforilação de I κ B e ativação de NF- κ B, envolvidas na indução de IL-8, em células T84, pela *Salm. Typhimurium* 14028.

III.2.09 Mostrar o efeito do sobrenadante de cultura de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 nas vias de sinalização celular (fosforilação de MAPKs), induzidas em células T84, pela *Salm. Typhimurium* 14028.

III.2.10 Verificar o efeito de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 no crescimento, adesão e invasão celular, em células T84, pelo enteropatógeno *Salm. Typhimurium* 14028.

III.2.11 Verificar o efeito de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 nas vias Rac1 e Cdc42, envolvidas na invasão celular pela *Salm. Typhimurium* 14028

III.2.12 Verificar, utilizando técnicas de microscopia eletrônica e confocal, a capacidade de *Salm. Typhimurium* 14028 de se ligar a *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905.

III.2.13 Verificar o efeito de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 na ativação da via AKT pela *Salm. Typhimurium* 14028.

IV - MATERIAIS E MÉTODOS

Parte I: Efeitos de *S. cerevisiae* UFMG 905 no sistema imune de camundongos NIH, isentos de germes e convencionais

IV.1 Animais

IV.1.1 Animais isentos de germes (IG)

Foram utilizados camundongos IG de 21-23 dias de idade, de ambos os sexos, da linhagem NIH (Taconic, Germantown, USA). Os animais foram propagados no biotério de Gnotobiologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, mantidos em isoladores flexíveis do tipo Trexler (Standard Safety Equipment Company, McHenry, USA) e manuseados de acordo com técnicas já estabelecidas (PLEASANTS, 1974) e adaptadas às nossas condições (SILVA, 1986). Os animais receberam uma ração sólida (Nuvilab Nuvital, Curitiba, PR) e água, esterilizados por calor úmido, *ad libitum*. Para os experimentos, os camundongos foram mantidos em microisoladores (UNO Roestvaststaal B.V., Zevenaar, The Netherlands), no biotério do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Um ciclo diurno/noturno de 12 h foi mantido no biotério.

IV.1.2 Animais convencionais (CV)

Foram utilizados animais CV da linhagem NIH, de 21-23 dias de idade, de ambos os sexos. Estes animais foram obtidos a partir da segunda geração de animais derivados por convencionalização dos animais IG e mantidos em biotério aberto, onde receberam a mesma ração comercial (Nuvilab Nuvital, Curitiba, PR) e água *ad libitum*.

IV.1.3 Manejo dos animais

A manutenção e o uso dos animais nos experimentos foram conduzidos respeitando o “Guide for the care and use of experimental animal”, da Canadian Council

on Animal Care, vol. 1, 1993. O projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG) e aprovado com a referência 075/04 em 03/11/2004. Os experimentos foram iniciados somente após a autorização do CETEA.

IV.2. Microrganismos

IV.2.1 Linhagens bacterianas

A linhagem de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium, de origem humana, que foi utilizada nos experimentos, pertence ao Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

A linhagem de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028 foi cedida pelo Laboratório de Materiais de Referência, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

A linhagem de *Escherichia coli* B₄₁ (K99⁺, F41), de origem humana, cedida pelo Dr. Moon, é proveniente do National Animal Disease Laboratory (NADL), Iowa, Estados Unidos.

As linhagens bacterianas foram conservadas em 0,2 ml de glicerina, esterilizada por calor seco, com 1ml da cultura de 18h, crescida em caldo BHI (Brain Heart Infusion, DIFCO, Detroit, USA), a 37°C e estocadas a -86°C.

Para todos os experimentos, as bactérias foram crescidas em caldo BHI ou LB (Luria Bertani), a 37°C, durante 18 horas, sem agitação.

IV.2.2 Leveduras

A levedura *S. cerevisiae* linhagem UFMG 905, isolada da fermentação artesanal de cachaça, foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa, do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras do Departamento de Microbiologia do

Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil. A linhagem foi identificada e classificada como *S. cerevisiae*, segundo métodos descritos em KURTZMAN & FELL (1998) e YARROW *et al.* (1998). A identidade da levedura foi confirmada utilizando o programa YEASTCOMPARE (CIRIELLO & LACHANCE, 2001).

O probiótico *S. boulardii* foi gentilmente cedido por Laboratoires Biocodex, Paris, França (Ultra-levure®) e pelo Laboratório MERCK, Rio de Janeiro, RJ, Brasil (Floratil®).

A levedura *S. cerevisiae* “wild type” W303 (MATa/ α trp1 ade2 his3 leu2 ura3) foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Ieso de Miranda Castro, do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas do Departamento de Farmácia da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto.

As linhagens foram mantidas em meio contendo 1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 25% de glicerol e conservadas a -86°C, em tubos criogênicos de 2 ml.

Para todos os experimentos, as leveduras foram crescidas em meio YPG (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose), a 37°C, por 24 h, sob agitação constante (150 rpm) e concentradas para obter uma quantidade de 10^9 UFC/ml.

IV.3 Tratamento e desafio dos animais

IV.3.1 Tratamento

Quando tratados com a levedura (grupos experimentais), os camundongos dos grupos IG receberam um inóculo único (monoassociação) de 10^8 células (0,1 ml de uma cultura contendo 10^9 UFC/ml), por inoculação intragástrica, dez dias antes do desafio com a bactéria patogênica. Os animais experimentais, dos grupos CV, receberam um inóculo diário de 10^8 células por inoculação intragástrica, dez dias antes do desafio com a bactéria patogênica. Os animais IG e CV, dos grupos controle, receberam inóculos de água destilada estéril, de acordo com o esquema descrito para os respectivos grupos experimentais, conforme descrito por RODRIGUES *et al.* (1996). Após o desafio com a

bactéria patogênica, apenas os animais CV do grupo experimental continuaram a receber inóculos diários da levedura.

IV.3.2 Desafio

Os inóculos de *Salm. Typhimurium* foram preparados a partir da seleção de uma colônia lisa crescida em ágar MacConkey (DIFCO, Detroit, USA) e, posteriormente repicada para caldo BHI (ou LB) e mantida a 37°C, por 18-24h. A cultura pura foi submetida a diluições sucessivas em PBS (Phosphate Buffer Saline) esterilizado, para obtenção da concentração de células desejada. A confirmação da viabilidade do inóculo e as contagens bacterianas foram feitas em ágar MacConkey, após 24h, de incubação, a 37°C. Os camundongos GN (controle e experimental) receberam inóculos de 0,1 ml, contendo 10² UFC, por via oral, utilizando uma agulha de inoculação intragástrica. Para os animais CV, foram realizados inóculos de 0,1 ml contendo 10⁴ UFC.

Para determinação do experimento de clareamento, foram inoculados 0,2 ml de uma suspensão contendo 10⁸ UFC/ml em PBS de *E. coli* B₄₁, crescida em caldo BHI, a 37°C, por 18-24 h, por injeção, na veia da cauda do camundongo.

IV.4 Determinação da translocação de *S. cerevisiae* UFMG 905 para as placas de Peyer (PP), linfonodos mesentéricos (LM), baço e fígado de camundongos gnotobióticos e convencionais

Para determinação da translocação da levedura *S. cerevisiae* UFMG 905 para as placas de Peyer, linfonodos mesentéricos, baço e fígado, grupos de cinco camundongos GN e CV foram monoassociados, ou tratados, durante 10 dias, com a levedura. Ao final desse período, eles foram sacrificados, por deslocamento cervical, e as PP, os LM, o baço e o fígado foram coletados sob condições assépticas em uma capela de fluxo laminar (VECCO, Campinas, SP). Após a coleta, os órgãos foram imediatamente pesados, triturados com maceradores, homogeneizados e submetidos a diluições decimais em PBS estéril. Alíquotas de 100 µl das diluições adequadas foram incorporadas em ágar Sabouraud (DIFCO, Detroit, USA) para os grupos GN, ou ágar

Sabouraud contendo 0,1% de cloranfenicol, para os grupos CV, e incubadas a 37°C, por 48h, para enumeração das leveduras.

IV.5 Determinação do efeito de *S. cerevisiae* UFMG 905 na translocação de *Salm. Typhimurium* em camundongos gnotobióticos e convencionais

Para determinação do efeito de *S. cerevisiae* UFMG 905 na translocação de *Salm. Typhimurium* para as PP, LM, baço e fígado, grupos de três a cinco camundongos GN e CV foram monoassociados, ou tratados, durante 10 dias, com a levedura, ao final dos quais foram desafiados com *Salm. Typhimurium* (3 dias para os animais GN e 5 e 10 dias para os animais CV). Ao fim do período de desafio, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as PP, os LM, o baço e o fígado foram coletados sob condições assépticas em uma capela de fluxo laminar (VECCO). Após a coleta, os órgãos foram imediatamente pesados, triturados com maceradores, homogeneizados e submetidos a diluições decimais em PBS estéril. Alíquotas de 100 µl das diluições foram semeadas em ágar MacConkey (DIFCO) e incubadas a 37°C, por 24h, para a enumeração bacteriana.

IV.6 Efeito de *S. cerevisiae* UFMG 905 na quantidade de células de Küpffer em camundongos gnotobióticos

Para determinar a quantidade de células de Küpffer em camundongos, grupos de 12 camundongos GN foi monoassociado, durante 10 dias, com a levedura. Um grupo de 12 animais IG foi utilizado como controle. Ao final do período, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Os fígados foram retirados e fixados em formaldeído a 4%, durante 24h, e processados para a inclusão e microtomia em parafina. Foram executados cortes de 3 a 5 micrômetros de espessura, posteriormente corados pela Hematoxilina-Eosina (HE). Para o exame morfológico, foram obtidas imagens utilizando uma microcâmara JVC TK-1270/RGB e o programa analisador de imagens KS 300 Software da Kontron Elektronik/Carl Zeiss image analyzer (Oberkochen, Germany). As células de Küpffer foram contadas e expressas por cem hepatócitos, em 12 campos diferentes.

IV.7 Determinação do efeito de *S. cerevisiae* UFMG 905 no clareamento de *E. coli* B₄₁ em camundongos gnotobióticos

Para determinação do efeito de *S. cerevisiae* UFMG 905 no clareamento de *E. coli* B₄₁ da circulação sistêmica de camundongos GN e IG, grupos de 11 animais foram monoassociados com a levedura ou receberam o mesmo inóculo de água estéril, respectivamente. Ao final de dez dias, os animais dos grupos controle e experimental foram inoculados com 200 µl da bactéria (*E. coli* B₄₁), diluída em PBS (10⁸ UFC/ml), pela veia caudal, conforme descrito por NEUMANN *et al.* (1998). Nos tempos 0, 15, 30, 60 e 90 min, após a injeção, amostras de sangue foram coletadas pelo plexo retro-orbital, submetidas a diluições seriadas em PBS estéril, plaqueadas em ágar MacConkey (DIFCO) e incubadas a 37°C, por 24h. Os resultados foram expressos como porcentagem do número de células bacterianas viáveis por ml de sangue em relação ao tempo 0 (100%).

IV.8 Determinação do efeito de *S. cerevisiae* UFMG 905 no nível de imunoglobulina secretada do tipo A (sIgA) total no conteúdo intestinal de camundongos gnotobióticos e convencionais

Para determinação do efeito de *S. cerevisiae* UFMG 905 no nível de imunoglobulina secretada do tipo A (sIgA) total, no conteúdo intestinal dos camundongos GN e CV dos grupos controle e experimental, um grupo de cinco camundongos controles e um grupo de cinco camundongos experimentais GN e CV foram sacrificados, por deslocamento cervical, 10 dias após a monoassociação ou tratamento com a levedura, e o intestino delgado foi removido, pelo corte nas junções gastroduodenal e ileocecal. O conteúdo foi retirado, pesado e lavado com salina fosfatada, pH 7,2, na proporção de 500 mg do conteúdo / 2,0 ml de PBS. Depois de centrifugado a 2000 g, por 30 min, a 4°C, o sobrenadante foi recolhido e congelado a -86°C, para posterior dosagem de imunoglobulinas. A determinação dos níveis de sIgA total foi realizada pelo método de ELISA. O procedimento de coleta do conteúdo intestinal foi uma modificação do método descrito por NADER DE MACIAS *et al.* (1992) e modificado por RODRIGUES (1995). As amostras de fluido intestinal foram inicialmente diluídas 1:10 em PBS e, em seguida, diluições foram realizadas e

adicionadas, em triplicata, nos poços das placas de ELISA. A sIgA total do fluido intestinal foi determinada utilizando anticorpos anti-IgA de camundongos desenvolvidos em cabra (M-8769, SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA), para revestimento das placas e, anticorpos desenvolvidos em cabra, anti-IgA de camundongo, conjugados com peroxidase (A-4789, SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA) para detecção. A concentração de sIgA total foi determinada utilizando um padrão de IgA purificado (0106-01, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA). A leitura foi feita, a 492 nm, em um leitor de placas (ELISA READER, 2550, BioRad Laboratories, Hercules, USA).

IV.9 Determinação do efeito de *S. cerevisiae* UFMG 905 nos níveis de IgA, IgG e IgM totais no conteúdo intestinal e no soro de camundongos gnotobióticos e convencionais

Para determinação do efeito de *S. cerevisiae* UFMG 905 nos níveis de IgA, IgG e IgM totais no conteúdo intestinal e no soro de camundongos GN e CV dos grupos controle e experimental, um grupo de cinco camundongos controles e um grupo de cinco camundongos experimentais, GN e CV, foram monoassociados ou tratados com a levedura. Ao final de 10 dias, os animais foram anestesiados com éter e o sangue retirado do plexo axilar e, a seguir, centrifugado. O soro foi recuperado e congelado a -86°C para posterior dosagem das imunoglobulinas. Ao final da coleta de sangue, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o intestino delgado foi removido pelo corte nas junções gastroduodenal e ileocecal e o conteúdo foi retirado, processado e armazenado conforme descrito no item **IV.8**. A determinação dos níveis de IgA, IgG e IgM totais foi realizada pelo método de ELISA de captura. Para revestimento das placas, foram utilizados anticorpos anti-IgA (M-8769, SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA), anti-IgG (M-5899, SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA) e anti-IgM (M-6274, SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA) de camundongo, desenvolvidos em cabra. Utilizou-se os anticorpos, desenvolvidos em cabra, conjugados com a peroxidase, anti-IgA (A-4789, SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA), anti-IgG (A-3673, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e anti-IgM (A-8786, SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA) de camundongo para detecção das IgA, IgG e IgM. As

unidades de densidade óptica foram determinadas, a 492 nm, em um leitor de placas (ELISA READER, 2550, BioRad Laboratories, Hercules, USA).

IV.10 Exame anatomopatológico

Amostras das vísceras (baço e fígado) e de porções do trato digestivo (íleo, ceco e cólon) dos camundongos GN e CV, controles e experimentais, sacrificados no final dos experimentos, foram submetidos a exame anatomopatológico. As amostras foram fixadas em formaldeído 4% e processadas para a inclusão e microtomia em parafina. Foram executados cortes de 3 a 5 micrômetros de espessura, posteriormente corados pela Hematoxilina-Eosina HE. Para o exame morfométrico, foram obtidas imagens utilizando uma microcâmera JVC TK-1270/RGB e o programa analisador de imagens KS 300 Software da Kontron Elektronik/Carl Zeiss image analyzer (Oberkochen, Germany). Os fragmentos das amostras codificadas foram observados seqüencialmente, por uma mesma patologista (Profa. Dra. Rosa Maria Esteve Arantes, do Laboratório de Neuro-Imuno Patologia Experimental, NIPE, do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais), que não teve acesso ao significado dos códigos. As amostras foram decodificadas somente após o laudo ter sido emitido pela patologista.

Parte II: Efeitos de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 na sinalização celular induzida, em células T84, após infecção pelo enteropatógeno *Salm. Typhimurium* 14028

IV.11 Culturas celulares

A linhagem celular T84, do cólon humano, foi obtida da European Collection of Animal Cell Culture (Salisbury, England) e cultivada em frascos de 75 cm², a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, em meio completo, constituído dos meios Dulbecco-Vogt modified Eagle e Ham's F-12 (DMEM-F12) (SIGMA, Saint Quentin

Fallavier, France), na proporção de 1:1, suplementado com glutamina, 5% de soro fetal bovino (HYCLONE, Bezons, France), 50 µg/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina (SIGMA, Saint Quentin Fallavier, France), conforme descrito por CZERUCKA *et al.* (2000). O meio foi trocado a cada 48 horas e, após confluência de aproximadamente 80-90%, as células foram tripsinizadas com uma solução de 0,2% de tripsina (SIGMA) contendo 0,5 mM de EDTA e, cultivadas em placas de 6 poços para os experimentos de infecção.

IV.12 Tratamento das monocamadas de células T84 com as leveduras *S. boulardii* ou *S. cerevisiae* UFMG 905 e infecção com *Salm. Typhimurium* 14028

As células cultivadas nas placas de 6 poços, após atingirem 80-90% de confluência, foram lavadas três vezes, com PBS estéril, a 37°C, e o meio foi trocado por DMEM-F12, contendo glutamina e 0,1% de soro albumina bovina (BSA), desprovido de antibióticos e soro fetal bovino, antes da infecção (“overnight”). Para as células pré-tratadas “overnight” com *S. boulardii* ou *S. cerevisiae* UFMG 905, uma alíquota contendo 10^7 UFC/poço (aproximadamente 10 leveduras por célula) de levedura foi adicionada à superfície apical da monocamada de células T84 e incubadas a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂. No momento da infecção, 10^8 UFC de *Salm. Typhimurium* 14028/poço (aproximadamente 100 bactérias por célula) foi adicionada à superfície apical da monocamada de células T84 e incubadas a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂. Quando o tratamento foi feito no mesmo momento da infecção, a mesma quantidade de leveduras (10^7 UFC/poço) e de bactérias (10^8 UFC/poço) foi adicionada, conforme descrito acima. Esta proporção de leveduras não modifica a viabilidade das células intestinais (CZERUCKA *et al.*, 1989b).

IV.13 Medidas da resistência elétrica transepitelial (RTE), em células T84, infectadas com *Salm. Typhimurium* 14028, pré- e co-incubadas (ou não), com *S. boulardii* ou *S. cerevisiae* UFMG 905

Para o experimento de RTE, as células foram crescidas em membranas de filtro porosas de 4,6 cm² (poros de 0.4 µm; Nunc, Poly Labo Paul Block & Cia, Strasbourg,

France). Nessas condições, uma elevada RTE é alcançada ao fim de 20-30 dias. As membranas foram divididas em 8 grupos: grupo 1 (somente as células T84), grupo 2 (células infectadas com *Salm. Typhimurium* 14028, por 8 h), grupo 3 (células infectadas com *Salm. Typhimurium* 14028 e *S. boulardii* ao mesmo tempo, durante 8 h), grupo 4 (células pré-tratadas com *S. boulardii*, “overnight”, e infectadas com *Salm. Typhimurium* 14028, por 8 h), grupo 5 (células apenas tratadas com *S. boulardii*), grupo 6 (células infectadas com *Salm. Typhimurium* 14028 e *S. cerevisiae* UFMG 905 ao mesmo tempo, durante 8 h), grupo 7 (células pré-tratadas com *S. cerevisiae* UFMG 905, “overnight”, e infectadas com *Salm. Typhimurium* 14028, por 8 h) e grupo 8 (células apenas tratadas com *S. cerevisiae* UFMG 905). A RTE foi medida com o equipamento Millicell-ERS (Millipore, Molsheim, France), conforme o método descrito por FINLAY & FALKOW (1990), durante um período de 8h, com intervalos de 2h, conforme descrito por CZERUCKA *et al.* (2000).

IV.14 Efeito de *S. boulardii* ou *S. cerevisiae* UFMG 905 na resposta inflamatória, em células T84, após infecção por *Salm. Typhimurium* 14028

IV.14.1 Dosagem de IL-8

Para avaliar a expressão da citocina pró-inflamatória IL-8, foram utilizadas células com 80-90% de confluência, em placas de 6 poços. Após infecção com *Salm. Typhimurium* 14028, durante 3 horas, na presença ou na ausência de *S. boulardii* ou *S. cerevisiae* UFMG 905, pré- ou co-incubadas, o sobrenadante foi recuperado, centrifugado por 10 minutos, a 10.000 g, a 4°C, e a citocina foi dosada, pelo método ELISA, no sobrenadante da cultura celular utilizando-se o kit Quantikine human IL-8 immunoassay (R&D System, Abington, United Kingdom), conforme descrito em DAHAN *et al.*, 2003.

IV.14.2 Expressão de IL-8 por PCR em tempo real (“real time PCR”)

Para avaliar a expressão do mRNA para IL-8, foram utilizadas células com 80-90% de confluência em placas de 6 poços. Após infecção com *Salm. Typhimurium*

14028, durante 1h, 2h e 3h, na presença, ou não, de *S. boulardii*, pré- ou co-incubada, o sobrenadante foi retirado e as células lavadas três vezes com PBS estéril, a 4°C. As células foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -86°C até o momento de extração do RNA total. A extração do RNA total foi realizada nas células T84 pelo método do tiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio (CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987). O RNA foi convertido em cDNA, utilizando-se oligo (dT)₁₈ em 20 µl de solução de reação para transcrição reversa (Fermentas) e depois usada para a reação em cadeia da polimerase. O cDNA foi amplificado utilizando-se o kit SYBR Green para PCR (Eurogentec), em placas ópticas de microtitulação de 96 poços (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), em um sistema de detecção ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Os sinais de fluorescência foram gerados a cada ciclo de PCR, pela incorporação direta do SYBR Green na dupla fita de DNA, para gerar as informações do PCR quantitativo em tempo real. As condições do PCR foram: 10 min a 94°C e 40 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 60°C e 30s a 72°C para cada amplificação, num volume final de 20 µl. Os primers usados foram: IL-8 senso, 5'-AAGGAACCATCTCACTGTGTGTA AAC-3'; IL-8 antisenso, 5'-ATCAGGAAGGCTGCCAAGAC-3'. O gene de referência RPLP0 (que codifica a fosfoproteína ribossomal ácida humana P0) foi usado para todos os cálculos, uma vez que ele não apresenta mudança na sua expressão durante o tratamento das células. Os valores foram expressos como “fold increased” em relação ao controle negativo.

IV.15 Efeito de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 nas vias de sinalização celular induzidas, em células T84, infectadas por *Salm. Typhimurium* 14028

Para avaliar os diferentes sinais induzidos nas células T84 infectadas pela *Salm. Typhimurium* 14028 e os possíveis efeitos das leveduras *S. boulardii* ou *S. cerevisiae* UFMG 905 nesses sinais, utilizou-se a técnica de “Western Blotting”. As células foram tratadas e/ou infectadas conforme descrito no item **IV.12** e foi avaliado o efeito das leveduras pré- e co-incubadas em células infectadas por *Salm. Typhimurium* 14028. Em tempos pré-determinados (1h, 2h e 3h após a infecção), as células infectadas foram lavadas com PBS estéril e solubilizadas em tampão de lise (50 mM de Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM de NaCl; 1% de Nonidet P-40 [NP-40]; 2 mM de Na₃VO₄; 1 mM de EDTA; 1

μM de aprotinina; 25 μM de leupeptina; 1 μM de pepstatina; 1 mM de AEBSF; 10 mM de NaF; 5 mM de sódio PP_i ; 10 mM de β -glicerofosfato). O lisado foi solubilizado por 30 min, a 4°C, e depois centrifugado a 14.000 g, por 20 min, a 4°C. O conteúdo de proteína presente no sobrenadante foi determinado utilizando-se reagentes da Bio-Rad DC (“Detergent Compatible”). O “Western Blotting” foi realizado de acordo com o método descrito por BOCCIARDI *et al.* (1997). Cinquenta μg de cada amostra foram aplicados e corridos em SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio), utilizando 12% de poliacrilamida. As proteínas foram transferidas para uma membrana de difluorido de polivinilideno (PVPD) (Hybond-P; Amersham) e incubadas, “overnight”, a 4°C, com anticorpos anti-cpp32 (Caspase-3/CPP32, BD Transduction Laboratories), anti-fosfo-ERK1/2 [Phospho-p44/42 Map Kinase (Thr202/Tyr204) Antibody, Cell Signaling Technology, Inc.], anti-fosfo-p38 [Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) Antibody, Cell Signaling Technology, Inc.], anti-fosfo-JNK [Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) Antibody, Cell Signaling Technology, Inc.], ou anti-fosfo-I κ B- α [Phospho-I κ B- α (Ser32/36) (5A5) Mouse mAb, Cell Signaling Technology, Inc.], anti-fosfo-Akt [Phospho-Akt (Ser473) Antibody, Cell Signaling Technology, Inc.]; anti-ERK2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Califórnia, USA), anti-p38 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Califórnia, USA), anti-JNK (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Califórnia, USA), anti-I κ B- α (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Califórnia, USA), seguidos de uma incubação com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase apropriado (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, Cell Signaling Technology, Inc. / Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody, Cell Signaling Technology, Inc.). A presença de anticorpos foi revelada utilizando-se um sistema de detecção por quimioluminescência ECL (Amersham Hyperfilms, Orsay, France), conforme recomendações do fabricante, como descrito por DAHAN *et al.* (2003).

IV.16 Efeito de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 na ativação de NF- κ B, induzido por *Salm. Typhimurium* 14028

Para avaliar a ativação de NF- κ B induzido nas células T84 pela *Salm. Typhimurium* 14028, e os possíveis efeitos das leveduras *S. boulardii* ou *S. cerevisiae*

UFMG 905 nessa ativação, utilizou-se a técnica de Ensaio de Mudança de Mobilidade Eletroforética (“Electrophoretic Mobility Shift Assay” - EMSA). As células foram tratadas e/ou infectadas conforme descrito no item **IV.12** e foi avaliado o efeito das leveduras pré- e co-incubadas com células infectadas com *Salm. Typhimurium* 14028. Em tempos pré-determinados (1h, 2h e 3h após a infecção), as células infectadas foram lavadas com PBS estéril e suspensas em 25 µl de tampão TOTEX (20 mM de HEPES pH 7,9, 350 mM de NaCl, 20% de glicerol, 1% de NP40, 1 mM de MgCl₂, 0,5 mM de EDTA, 0,1 mM de EGTA, 1 mM de DTT, 1 mM de PMSF e 2 µg/ml de aprotinina), para preparação dos extratos celulares totais. Amostras de 10 µg de proteínas foram incubadas por 10 min, a 4°C, com 2 µl de poli-dIdC 15 µg/ml, 5 µl do tampão de ligação (NF5X) e 12 µl de H₂O. Logo após, adicionou-se a sonda marcada e as amostras foram incubadas por 25 min, a 25°C, com oligonucleotídeos de dupla fita (marcados com ³²P) contendo os sítios de ligação para κB (5'-GATCCAAGGGGACTTTCCATG-3'). A especificidade do complexo foi analisada pela incubação com excesso de oligonucleotídeos de κB não marcados. Os complexos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante a 6%, em TBE 0,5X. Os géis foram secos e radiografados (Amersham Hyperfilms, Orsay, France).

IV.17 Efeito de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 no crescimento, adesão e invasão celular induzidos, em células T84, infectadas por *Salm. Typhimurium* 14028

Para avaliar o efeito de *S. boulardii* ou *S. cerevisiae* UFMG 905 na adesão e invasão celular, as células T84 foram tratadas e/ou infectadas conforme descrito no item **IV.12** e foi avaliado o efeito das leveduras pré- e co-incubadas em células infectadas com *Salm. Typhimurium* 14028, após 3h. A adesão bacteriana às células T84 foi quantificada usando-se o método de diluição em placa (ROSENSHINE *et al.*, 1992). Ao final da infecção, as células foram tripsinizadas e lisadas em água contendo 0,1% de BSA. Os lisados celulares, contendo bactérias associadas às células, correspondem às bactérias aderentes e intracelulares. Para a determinação da invasão, após as lavagens com PBS, as monocamadas foram incubadas, por 1h, em meio novo (DMEM-F12) contendo 100 µg/ml de gentamicina. Uma vez que a gentamicina não se concentra nas

células epiteliais, as bactérias intracelulares sobreviveram à incubação, enquanto as bactérias aderidas e dispersas no meio foram mortas (FALKOW *et al.*, 1987). As monocamadas foram lavadas com PBS estéril e as células epiteliais com as bactérias intracelulares foram separadas, utilizando-se tripsina, e lisadas, conforme descrito por ROSENSHINE *et al.* (1992). As células foram diluídas, plaqueadas e as contagens bacterianas foram realizadas em ágar MacConkey, após 24h, a 37°C. A porcentagem de invasão celular foi calculada do seguinte modo: porcentagem de invasão = (numero de bactérias intracelulares) / [número de bactérias associadas às células (aderentes e intracelulares)], conforme descrito por CZERUCKA *et al.* (2000).

IV.18 Efeito de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 nas vias Rac e Cdc42 induzidas, em células T84, infectadas por *Salm. Typhimurium* 14028

O método de “Pull-Down” para ativação de proteínas Rho, utilizando GST-PAK⁷⁰⁻¹⁰⁶, foi previamente descrito por MANSER *et al.* (1998) e REN *et al.* (1999). As células cultivadas nas placas de 60 mm, após atingirem 80-90% de confluência, foram lavadas três vezes com PBS estéril, a 37°C, e o meio trocado por DMEM-F12 contendo glutamina e 0,1% de BSA, desprovido de antibióticos e soro fetal bovino, antes da infecção (“overnight”). As infecções com *Salm. Typhimurium* 14028 foram conduzidas, nesse meio, com 3×10^8 bactérias, na presença (ou não) de 3×10^7 leveduras (*S. boulardii* ou *S. cerevisiae* UFMG 905), “overnight”. Em tempos indicados, as monocamadas foram lavadas com PBS estéril, a 4°C, e lisadas com tampão de lise (25 mM de Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM de NaCl; 5 mM de MgCl₂; 0,5% de Triton X100; 4% de glicerol; 10 mM de NaF) suplementado, no momento de extração, com 1 mM de PMSF, 2 mM de Na₃VO₄, 2 mM de DTT e 20 mM β- glicerofosfato. Os lisados foram centrifugados, durante 10 min, a 10.000 g, a 4°C. Uma alíquota de 50 µg foi coletada (proteína Rho total) e misturada com o tampão de Laemmli. O restante de cada lisado foi incubado com 30 µg de GST-PAK⁷⁰⁻¹⁰⁶ ligados a pérolas de vidro de agarose-glutationa (Sigma-Aldrich), durante 45 min, a 4°C, sob agitação. As pérolas de vidro foram lavadas duas vezes com 1 ml de tampão de lise. As pérolas foram misturadas com 30 µl do tampão de Laemmli e as proteínas foram aplicadas em SDS-PAGE utilizando-se 12% de poliacrilamida e transferidas para uma membrana de PVPD (Hybond-P;

Amersham Biosciences). Os “imunoblottings” foram realizados utilizando-se anticorpos monoclonais, incubados a 4°C, “overnight”, na diluição de 1:250 para o anticorpo anti-Cdc42 (clone 44; Transduction Laboratories), ou 1h à temperatura ambiente, na diluição de 1:1000, para anti-Rac1 (clone 102; Transduction Laboratories), seguidos de uma incubação com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase apropriado (Amersham Biosciences) (DOYE *et al.*, 2006). Os imunocomplexos foram visualizados utilizando-se o sistema de ECL, conforme descrito anteriormente (IV.15).

IV.19 Análise da capacidade de *Salm. Typhimurium* 14028 de se ligar às células de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905

Para avaliar a capacidade de *Salm. Typhimurium* 14028 de se ligar às células de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905, as células T84 foram cultivadas em placas de 35 mm, tratadas “overnight” e/ou infectadas, conforme descrito no item IV.12 e, após 3h de infecção, as células foram fixadas em glutaraldeído à temperatura ambiente, por 1h, enviadas ao Centro de Microscopia da Université de Nice-Sophia Antipolis, Nice, França, para fotografia em microscopia de varredura (6340F; Jeol), utilizando-se técnica padrão (ARNOLD & BOOR, 1986). As amostras foram fotografadas e retornadas para análise.

Para o experimento de microscopia confocal, às placas de 6 poços, foram adicionadas lamínulas, previamente esterilizadas e tratadas, por 30min, com 1ml de uma solução de gelatina (Sigma-Aldrich) a 0,2%. Após o excesso de gelatina ser retirado, as células foram cultivadas até se obter 50% de confluência. As células foram tratadas e/ou infectadas, conforme descrito no item IV.12, e foi avaliado o efeito da pré-incubação da levedura em células infectadas com *Salm. Typhimurium* 14028 transformada com o plasmídeo pMW221 - Ds-Red (que deixa a bactéria corada de vermelho).

Para a transformação da *Salm. Typhimurium* 14028, utilizou-se o mesmo protocolo para marcação de *E. coli*, conforme descrito por HANAHAN *et al.* (1991). A inserção do plasmídeo na bactéria foi feita por método químico utilizando o CaCl₂. A *Salm. Typhimurium* 14028 DsRed marcada foi obtida pela transformação da bactéria com o plasmídeo pMW221 (gentilmente cedido pelo Dr. Artur Altenhoefer, University of Wuerzburg), um derivado do plasmídeo colE1, que expressa uma proteína DsRed variante e confere resistência a ampicilina. A presença do plasmídeo foi determinada

pela contagem de UFCs em ágar LB suplementado com 75 µg/ml de ampicilina, conforme descrito por LEMONNIER *et al.* (2008).

Para marcação da levedura, utilizou-se um anticorpo anti-*S. boulardii* (anti-Sb2), obtido a partir da fração F2, desenvolvido em coelho, conforme descrito por CZERUCKA *et al.* (1994), na diluição de 1/100.

Após 3h de infecção, as células foram lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído a 4%, por 30min, e permeabilizadas com Triton X-100 a 0,1%, por 5min, e depois lavadas novamente com PBS. Logo após, utilizou-se um anticorpo (cyan-5) anti-coelho, na diluição de 1/500, para corar a levedura em azul. A lamínula foi retirada da placa e fixada, “overnight”, a 37°C, em uma caixa escura. As lâminas foram observadas em microscópio confocal (TCS-SP; Leica), em um aumento de 63X, e as imagens foram analisadas utilizando-se o software para análises de imagens MetaMorph 2.0 (Invitrogen).

IV.20 Análise estatística

Os significados estatísticos dos resultados obtidos foram avaliados com a utilização do teste “*t*” de Student. Na realização dos testes descritos, foi utilizado o programa SIGMASTAT (Jandel Scientific Software, versão 1.0, San Rafael, USA), utilizando-se 0,05 como limiar de confiança.

V - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parte I: Efeitos de *S. cerevisiae* UFMG 905 no sistema imune de camundongos NIH isentos de germes e convencionais

V.1 Determinação da translocação da levedura *S. cerevisiae* UFMG 905 para as placas de Peyer, linfonodos mesentéricos, fígado e baço de camundongos NIH, gnotobióticos e convencionais

Resultados prévios obtidos em nosso laboratório mostraram que uma linhagem de *S. cerevisiae*, isolada da fermentação de cana de açúcar, foi capaz de reduzir a ação de alguns enteropatógenos. Os resultados mostraram que a levedura foi capaz de diminuir a mortalidade de animais desafiados com *Salm. Typhimurium* (15% de sobrevivência no grupo controle, contra 55% no grupo tratado com a levedura) e os dados histológicos mostraram que a levedura conferiu uma proteção contra o desafio oral com *C. difficile*, em camundongos gnotobióticos e, também, preservação do fígado de animais convencionais tratados com a levedura e desafiados com *Salm. Typhimurium* (MARTINS, 2004). O menor número de focos inflamatórios no fígado de animais previamente tratados com a *S. cerevisiae* UFMG 905 sugeriu que a levedura diminui, *in vivo*, a translocação da *Salm. Typhimurium*.

A translocação de um microrganismo é definida como a passagem de microrganismos viáveis através da barreira mucosa para locais extra-intestinais, como linfonodos mesentéricos, fígado, baço, rim e sangue (BERG & GARLINGTON, 1979). Como primeiro experimento, avaliou-se a capacidade de *S. cerevisiae* UFMG 905 se translocar do intestino. Para isso, após 10 dias de monoassociação ou tratamento com a levedura, placas de Peyer, linfonodos mesentéricos, baço e fígado foram assepticamente retirados, macerados, diluídos em PBS e plaqueados em ágar Sabouraud, durante 48 horas, a 37°C. A Figura 9A mostra que, nos camundongos monoassociados, a levedura foi detectada apenas nas placas de Peyer. Em animais convencionais (Figura 9B), a levedura foi detectada também nos linfonodos mesentéricos, além das placas de Peyer. Nas placas de Peyer, foi observado que os níveis da levedura variavam entre 10^4 e 10^5 UFC por grama de órgão, nos animais monoassociados (Figura 9A) e, entre 10^3 e 10^6 UFC por grama de órgão, nos animais convencionais tratados (Figura 9B). Nos linfonodos mesentéricos, os níveis populacionais da levedura flutuaram entre 10^2 e 10^3 UFC por grama de órgão, nos animais convencionais tratados (Figura 9B) e não houve

translocação para este órgão, nos animais monoassociados (Figura 9A). A presença da levedura nestes órgãos não resultou em um aumento da relação do peso do órgão / peso corporal nos animais monoassociados ou tratados (dados não mostrados).

Resultados prévios (MARTINS *et al.*, 2005a) mostraram que nem a monoassociação nem o tratamento dos animais com a levedura acarreta qualquer tipo de alteração morfológica considerada patológica, nos órgãos analisados (estômago, intestino delgado, intestino grosso, baço e fígado).

Trabalhando com *S. boulardii*, RODRIGUES *et al.* (2000) observaram que, em animais monoassociados, os níveis populacionais dessa levedura flutuaram entre 10^4 e 10^6 UFC por grama de placas de Peyer e entre 10^2 e 10^4 UFC por grama de linfonodos mesentéricos. Uma possível explicação para a levedura *S. cerevisiae* UFMG 905 não translocar para os linfonodos mesentéricos em animais GN pode ser a alta capacidade de floculação apresentada por ela, o que dificulta a passagem das placas de Peyer para os linfonodos, fenômeno que não ocorre com a levedura *S. boulardii*.

O processo de translocação está envolvido na patogênese de infecções bacterianas intestinais tanto endógenas (infecções oportunistas) quanto exógenas (BERG & GARLINGTON, 1979). BERG (1995) propôs que, normalmente, ocorre uma translocação fisiológica e esta seria responsável pela modulação da resposta imune do hospedeiro pela microbiota indígena. A translocação de um probiótico para órgãos linfóides, como as placas de Peyer e linfonodos mesentéricos, poderia ativar eventos de apresentação de antígenos, respostas imunes *in situ* e sistêmicas. Somado a isso, antes do desenvolvimento de respostas mediadas por células T, eventos de imunidade inata poderiam ser ativados na presença do probiótico em tecidos linfóides associados ao trato digestivo, como os efeitos locais e sistêmicos observados em animais monoassociados com *S. boulardii* (RODRIGUES *et al.*, 2000). Consequentemente, os baixos níveis de translocação observados para *S. cerevisiae* UFMG 905 poderiam ser benéficos, no sentido de preparar a resposta imune do hospedeiro na defesa contra um patógeno.

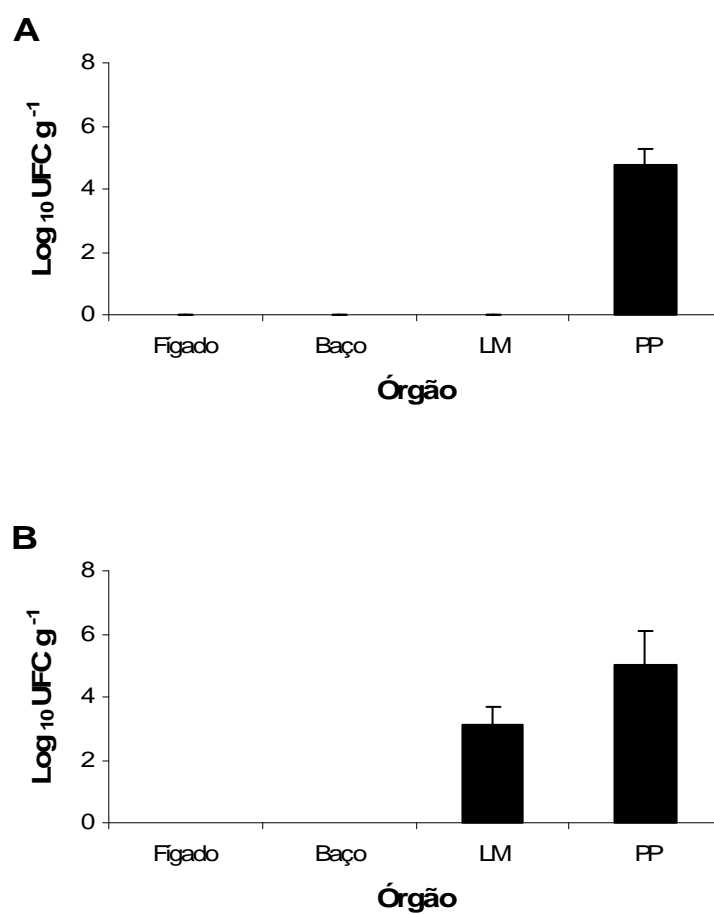


Figura 9. Translocação de *S. cerevisiae* UFMG 905 para o fígado, baço, linfonodos mesentéricos (LM) e placas de Peyer (PP) em animais monoassociados (A) e convencionais (B). N = 5.

V.2 Determinação da translocação de *Salm. Typhimurium* para os linfonodos mesentéricos, fígado e baço de camundongos NIH, gnotobióticos e convencionais, na presença e na ausência da levedura *S. cerevisiae* UFMG 905

Para avaliar o efeito da levedura *S. cerevisiae* UFMG 905 na translocação de *Salm. Typhimurium* em camundongos gnotobióticos, os animais foram monoassociados com a levedura, durante 10 dias, e desafiados com *Salm. Typhimurium*. Ao final de três dias de desafio, os animais foram sacrificados e os linfonodos mesentéricos, baço e fígado foram assepticamente retirados, macerados, diluídos em PBS estéril e plaqueados em ágar MacConkey, durante 24h, a 37°C. A Figura 10 mostra que os níveis populacionais de *Salm. Typhimurium* nos linfonodos mesentéricos e no baço foram os mesmos nos camundongos monoassociados ou não com a levedura. Entretanto, a *Salm. Typhimurium* foi detectada apenas no fígado de animais que não foram previamente monoassociados com a levedura *S. cerevisiae* UFMG 905. Este fato sugere que essa levedura retarda a translocação de *Salm. Typhimurium*, e esse fato pode ser explicado pela capacidade da levedura em estimular o aumento das células de Küpffer (Figura 12 e Tabela 2).

Para avaliar o efeito da levedura *S. cerevisiae* UFMG 905 na translocação de *Salm. Typhimurium* em camundongos convencionais, os animais foram tratados, durante 10 dias, com a levedura e desafiados com *Salm. Typhimurium* (10^4 UFC). Ao final de 5 e 10 dias de desafio, os animais foram sacrificados e os linfonodos mesentéricos, baço e fígado foram assepticamente retirados, macerados, diluídos em PBS estéril e plaqueados em ágar MacConkey, durante 24 h, a 37°C. A Figura 11 mostra que o tratamento com a levedura impede a translocação da *Salm. Typhimurium* para todos os órgãos analisados, após 5 (Figura 11A) e 10 dias (Figura 11B) de desafio. Estes resultados sugerem que a levedura, em presença da microbiota normal, impede a translocação da *Salm. Typhimurium*, o que pode ser explicado pelo efeito barreira ou pela resposta imune da mucosa. Um resultado muito parecido foi observado por RODRIGUES (2000) com o probiótico *S. boulardii*, quando do desafio com uma dose 10 vezes menor da mesma bactéria. Entretanto, trabalhando com a mesma dose de patógeno, não foi observada uma diminuição na translocação entre os dois grupos, sugerindo que o probiótico testado pela autora não impediu, com a dose testada, a translocação da *Salm. Typhimurium* em animais.

A redução da translocação de *Salm. Typhimurium* observada nos animais tratados com *S. cerevisiae* UFMG 905 poderia explicar o baixo número de focos inflamatórios hepáticos nesses animais, após 28 dias de desafio enteropatogênico, como observado em nossos resultados prévios (MARTINS *et al.*, 2005a). A translocação de *Salm. Typhimurium* para o fígado e baço de animais controle, sem detecção do patógeno nos linfonodos (Figura 11A) poderia ser explicada por um maior dano físico no epitélio intestinal desse grupo. Como descrito por BERG (1995), a translocação para o fígado poderia ser feita por passagem intracelular (rota linfática, via linfonodos) ou passagem extracelular (rota vascular, devido a danos físicos no epitélio intestinal). Uma diminuição na translocação também foi observada em vários modelos animais submetidos a queimaduras, danos hepáticos, imunossupressão experimental e infecção abdominal, usando probióticos bacterianos (CHIVA *et al.*, 2002; GUN *et al.*, 2005) e leveduras (BERG *et al.*, 1993; PERET FILHO *et al.*, 1998; HEREK *et al.*, 2004).

Parece que todos os componentes da resposta imune - incluindo imunidades mucosa, mediada por células, e humoral - estão envolvidos no controle da translocação bacteriana. Acredita-se que a sIgA iniba a associação íntima do patógeno com a mucosa epitelial, reduzindo, desse modo, a penetração bacteriana. A imunidade mediada por células na lâmina própria e em órgãos linfóides exerce uma segunda linha de defesa contra a translocação bacteriana. As imunoglobulinas séricas agem, provavelmente, como opsoninas para aumentar a efetividade de fagocitose por macrófagos e leucócitos polimorfonucleares e, subsequentemente, matam as bactérias que translocaram. No caso de uma translocação efetiva, o sistema reticuloendotelial (RES, “reticuloendotelial system”) desempenha um papel importante na remoção de microrganismos da circulação. A fagocitose hepática pelas células de Küppfer é responsável por mais de 80% da função do RES (SABA, 1970). Glicanos e outros produtos de *Saccharomyces* são importantes estimuladores do RES. A proliferação de células tronco hematopoiéticas pluripotentes (células formadoras de colônia de macrófagos e granulócitos e as células formadoras de colônia de eritrócitos), na medula óssea de murinos, foi demonstrada após administração de glicanos (PATCHEN & MCVITTIE, 1982). Além do mais, após a administração de glicano, há um aumento na produção de interleucina-1, por um efeito direto nos macrófagos, ou indireto, por um aumento na produção de fatores estimulantes do cólon de células T estimuladas por glicano (HAMURO *et al.*, 1982).

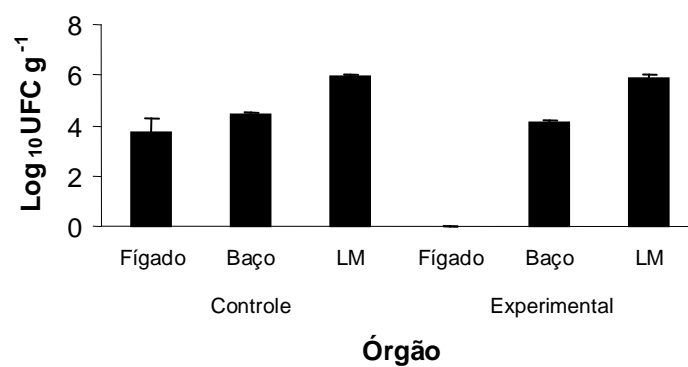


Figura 10. Translocação de *Salm. Typhimurium*, para o fígado, baço e linfonodos mesentéricos (LM), em camundongos gnotobióticos, previamente monoassociados com *S. cerevisiae* UFMG 905 (experimental), ou não (controle). N = 5.

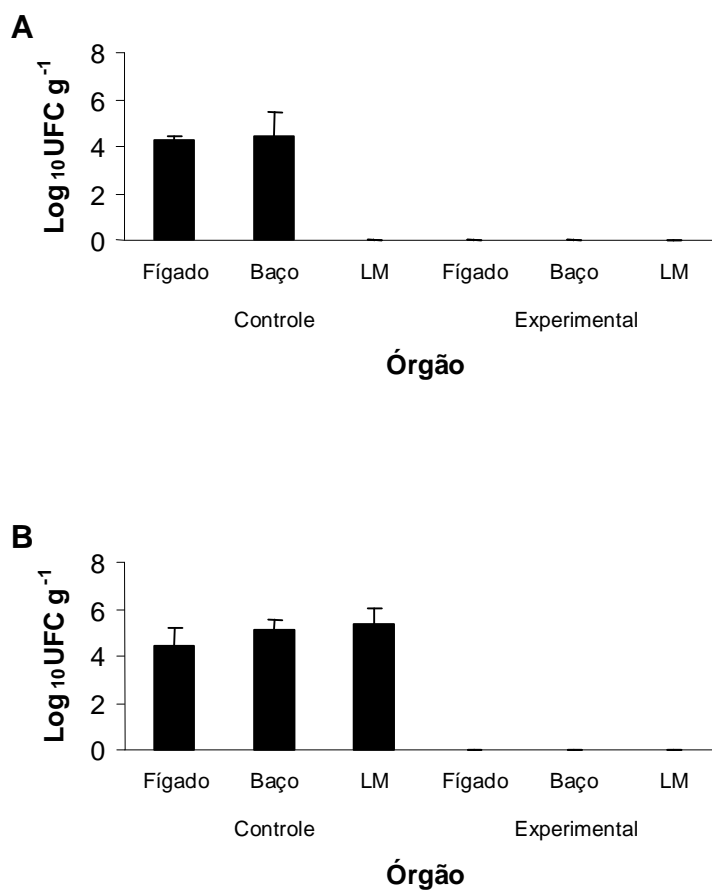


Figura 11. Translocação de *Salm. Typhimurium*, para o fígado, baço e linfonodos mesentéricos (LM), em camundongos convencionais, previamente tratados com *S. cerevisiae* UFMG 905 (experimental), ou não (controle), após 5 (A) e 10 (B) dias de desafio. N = 5.

V.3 Efeito da levedura *S. cerevisiae* UFMG 905, nas células de Küpffer, em animais gnotobióticos

A contagem do número de células de Küpffer foi feita em 12 campos aleatórios. A Figura 12 mostra o aspecto histológico do fígado de camundongos, corado por HE, mostrando o número de células de Küpffer em animais sem germes (Figura 12A) e animais monoassociados com a levedura (Figura 12B). A Tabela 2 mostra o número de células de Küpffer (por 100 hepatócitos) em camundongos sem germes (controle) e camundongos monoassociados, durante 10 dias, com a levedura. O número de células de Küpffer foi significativamente maior ($P = 0,013$) no grupo experimental (animais monoassociados) ($52,9 \pm 15,7$ células de Küpffer por 100 hepatócitos) em relação ao grupo de animais isentos de germes (controle) ($38,1 \pm 9,0$ células de Küpffer por 100 hepatócitos). No grupo experimental, o material mostrou raros mononucleares intra-parenquimatosos e aumento da relação núcleo citoplasmática das células de Küpffer, além de maior hipertrofia e hiperplasia das células de Küpffer, em relação ao controle. O aumento do número de células de Küpffer não resultou em um aumento da relação do peso do órgão / peso corporal nos animais monoassociados (dados não mostrados).

Os mononucleares não são freqüentes no parênquima hepático normal; em geral, aparecem em pequeno numero nos espaços porta, ou no conjuntivo peri veia central. Destaca-se que, nos resultados encontrados, a presença de mononucleares intra-parenquimatosos, mesmo em pequenas quantidades, entre as fileiras de hepatócitos, refletem um aumento da migração destas células, e são um indício de que há resposta inflamatória e aumento de fenômenos migratórios. A hipertrofia (aumento do tamanho das células, que indica, em geral, um aumento da atividade metabólica, de processamento de antígenos) vem acompanhada de um aumento da taxa de divisão celular e aumento do número de células (hiperplasia) (BOGLIOLO & BRASILEIRO FILHO, 2004).

O aumento do número de células de Küpffer, em animais gnotobióticos, também já foi observado em animais monoassociados com *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2B20 (NEUMANN *et al.*, 1998) e *S. boulardii* (RODRIGUES *et al.*, 2000).

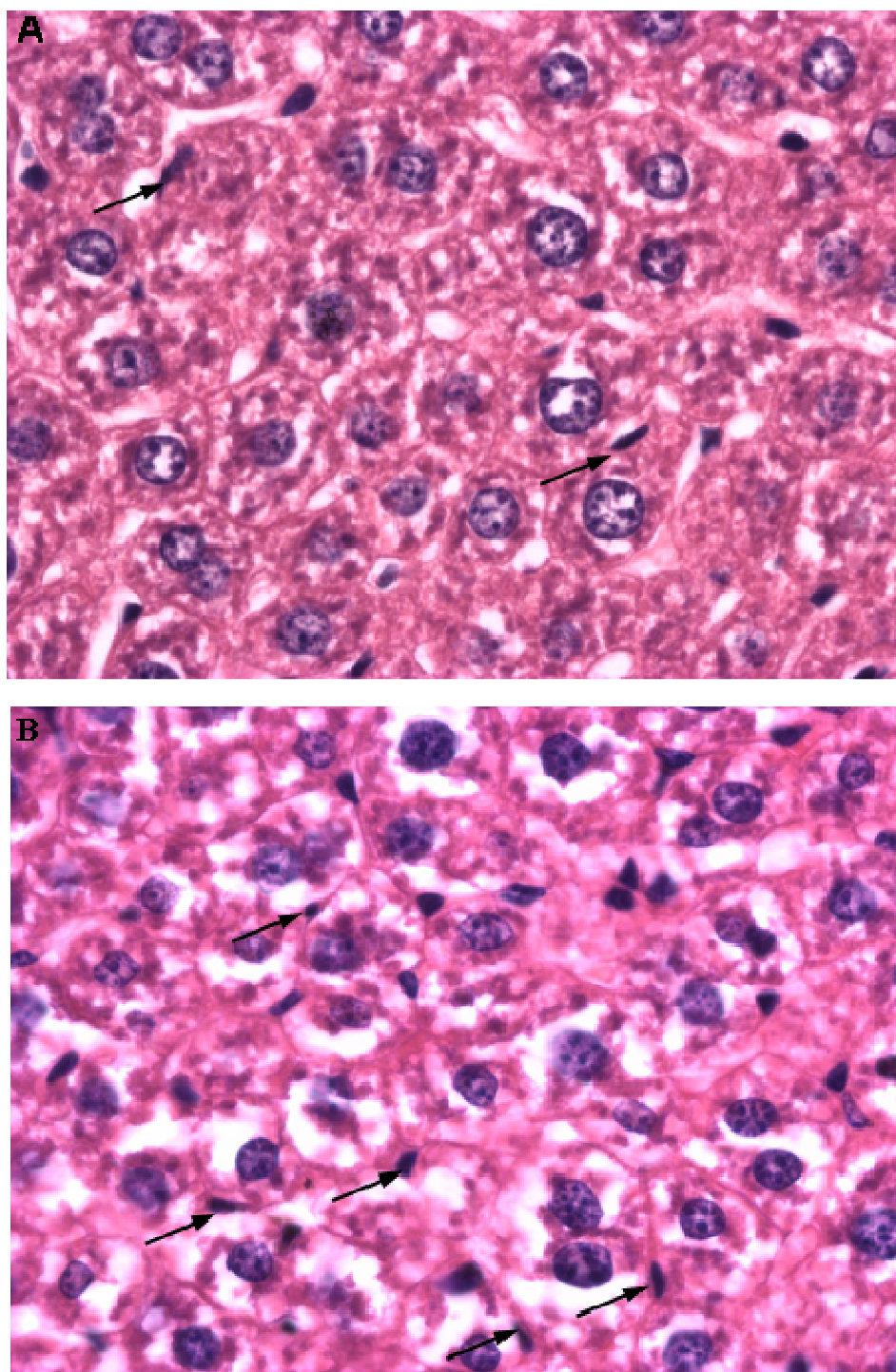


Figure 12. Aspecto histológico do fígado de camundongos corados por HE, mostrando o número de células de Kupffer em animais isentos de germes (A) e animais monoassociados com a levedura (B). Observe o aumento do número de células de Kupffer (setas) no fígado de animais monoassociados com *S. cerevisiae* UFMG 905. Aumento: objetiva de 20X.

Tabela 2. Número de células de Küpffer (por 100 hepatócitos) em camundongos sem germes (controle) e camundongos monoassociados, durante 10 dias, com a levedura *S. cerevisiae* UFMG 905 (experimental). ($P = 0,013$; $N = 12$).

	Controle	Experimental
Número de células de Küpffer (por 100 hepatócitos)	$38,1 \pm 9,0$	$52,9 \pm 15,7^*$

*Indica diferença significativa.

V.4 Efeito da levedura *S. cerevisiae* UFMG 905 no sistema fagocítico de camundongos NIH gnotobióticos, controles e experimentais, quando do desafio endovenoso com *E. coli* B₄₁

Como os macrófagos desempenham um papel importante na resposta imune do hospedeiro, e devido ao aumento observado do número dessas células nos fígados dos animais monoassociados, foi avaliada a influência da associação com a levedura no clareamento sistêmico de uma bactéria na corrente sanguínea. Para isso, um grupo de animais IG foi monoassociado com a levedura e um outro grupo, inoculado com uma dose única de PBS estéril. Após 10 dias, os dois grupos de animais foram inoculados, na veia da cauda, com uma dose de 200 µl contendo 10⁸ UFC/ml de *E. coli* B₄₁ e, nos tempos 0, 15, 30, 60 e 90 min após a injeção, amostras de sangue foram coletadas pelo plexo retro-orbital, plaqueadas, em ágar MacConkey, e incubadas, durante 24 h, a 37°C. A porcentagem de bactérias encontradas em cada grupo de camundongos, em relação ao tempo zero, determinada por diluições decimais, está representada na Figura 13. A capacidade de clareamento (clearance) no grupo experimental foi maior que a observada em animais do grupo controle ($P < 0,05$). Este aumento na capacidade de clareamento não foi devido a um aumento no tamanho do fígado dos animais experimentais, uma vez que não foi observada hepatomegalia (dados não mostrados).

Após 30 minutos de desafio endovenoso, o grupo de animais monoassociados apresentou um clareamento mais rápido em relação ao grupo controle e, após 75 minutos, um clareamento total foi observado apenas no grupo experimental (Figura 13).

É bem conhecido que as células de Küppfer representam uma das maiores populações de macrófagos em tecidos e, junto com os neutrófilos, têm sido implicadas como responsáveis pelo clareamento de patógenos (*Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Trypanosoma musculi*) na corrente sanguínea (KONGSHAVN *et al.*, 1990; HIRAKATA *et al.*, 1991; GREGORY *et al.*, 1996).

O aumento das células de Küppfer (Tabela 2) foi simultâneo com um aumento do clareamento de uma bactéria patogênica injetada sistemicamente (Figura 13). Nossos resultados mostram que a capacidade de clareamento de *E. coli* B₄₁ da corrente sanguínea em animais gnotobióticos experimentais foi maior que aquela observada no grupo controle. Juntos, esses resultados sugerem que, neste modelo experimental, um maior número de células de Küppfer em animais experimentais foi responsável por um melhor clareamento observado, quando comparado com animais controle.

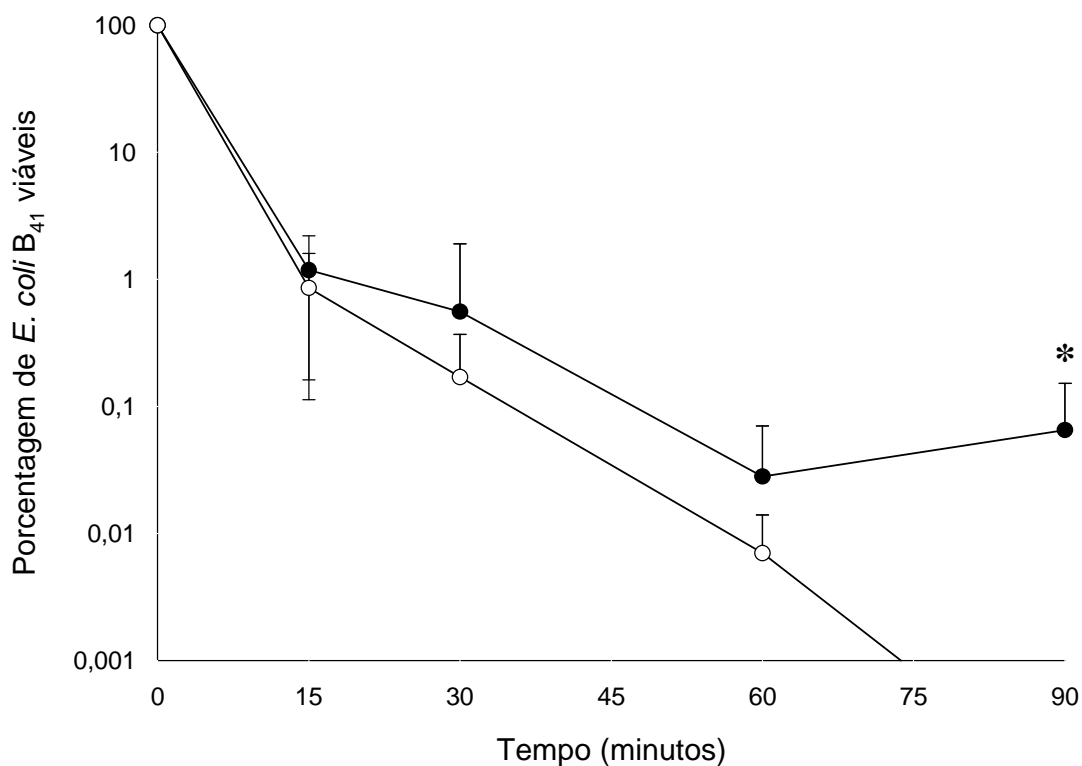


Figura 13. Clareamento de *E. coli* B₄₁ do sangue de camundongos isentos de germes (●) ou monoassociados com *S. cerevisiae* UFMG 905 (○). Os resultados são expressos como porcentagem de bactérias viáveis em relação ao tempo 0 (100%) por ml de sangue. Cada ponto representa a média de 11 animais, de dois experimentos independentes. As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. *Indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e experimental, avaliados pelo teste *t* de Student ($P < 0,05$).

V.5 Níveis de imunoglobulinas secretadas do tipo A (sIgA), IgG e IgM no conteúdo intestinal e no soro de camundongos NIH, gnotobióticos e convencionais, controles e experimentais, monoassociados ou tratados com a levedura *S. cerevisiae* UFMG 905, respectivamente

A superfície mucosa do trato gastrintestinal forma um importante órgão de defesa do hospedeiro. Somado às suas principais funções fisiológicas - digestão e absorção de nutrientes - a mucosa intestinal serve como uma interface protetora entre o ambiente interno e os antígenos presentes nos alimentos e microrganismos vindos do ambiente externo. O hospedeiro é protegido contra esses agentes nocivos por diversos fatores não imunológicos, incluindo saliva, ácido gástrico, peristaltismo, muco, proteólise intestinal, microbiota indígena e a membrana celular com suas junções intercelulares (ISOLAURI, 1999). O sistema imune de mucosas apresenta duas armas de defesa: (i) exclusão imune, desempenhada pelo sistema de imunoglobulinas secretadas (sIg) e, (ii) regulação imune, que é o estado de hiporesposta induzida por uma administração oral de antígenos (BRANDTZAEG, 1995).

A Figura 14 mostra a influência de *S. cerevisiae* UFMG 905 nos níveis de IgA, IgG e IgM produzidas no conteúdo intestinal e soro de camundongos IG (controle) e camundongos monoassociados com *S. cerevisiae* UFMG 905 (experimental). Uma diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre os grupos controle e experimental foi observada apenas nos níveis de IgA total no soro ($24 \pm 3 \text{ ng ml}^{-1}$ de soro de animais IG contra $295 \pm 164 \text{ ng ml}^{-1}$ de soro de animais monoassociados com *S. cerevisiae* UFMG 905. $P = 0,002$. $N = 8$ animais em cada grupo) (Figura 14A); sIgA ($52 \pm 41 \text{ ng g}^{-1}$ de conteúdo intestinal de animais IG contra $168 \pm 42 \text{ ng g}^{-1}$ de conteúdo intestinal de animais monoassociados com *S. cerevisiae* UFMG 905. $P = 0,0002$. $N = 8$ animais em cada grupo) (Figura 14B) e IgM no soro ($5973 \pm 1342 \text{ ng ml}^{-1}$ de soro de animais IG contra $10457 \pm 666 \text{ ng ml}^{-1}$ de soro de animais monoassociados com *S. cerevisiae* UFMG 905. $P = 0,014$. $N = 4$ animais em cada grupo) (Figura 14E). Nas outras dosagens, apenas uma discreta diferença foi observada, mas que não foi estatisticamente significativa: IgG sérica ($16633 \pm 6060 \text{ ng ml}^{-1}$ de soro de animais IG contra $20278 \pm 8670 \text{ ng ml}^{-1}$ de soro de animais monoassociados com *S. cerevisiae* UFMG 905. $P = 0,32$. $N = 9$ animais em cada grupo) (Figura 14C); IgG intestinal ($225 \pm 86 \text{ ng g}^{-1}$ de fluido intestinal de animais IG contra $268 \pm 48 \text{ ng g}^{-1}$ de fluido intestinal

de animais monoassociados com *S. cerevisiae* UFMG 905. $P = 0,32$. $N = 6$ animais em cada grupo) (Figura 14D) e IgM intestinal ($56 \pm 16 \text{ } \eta\text{g g}^{-1}$ de fluido intestinal de animais IG contra $69 \pm 3 \text{ } \eta\text{g g}^{-1}$ de conteúdo intestinal de animais monoassociados com *S. cerevisiae* UFMG 905. $P = 0,21$. $N = 4$ animais em cada grupo) (Figura 14F).

Em animais CV (Figura 15), um aumento nos níveis de IgG (Figura 15A) e IgM (Figura 15B) foi observado apenas no fluido intestinal [IgG ($123 \pm 6 \text{ } \eta\text{g g}^{-1}$ de fluido intestinal de animais CV contra $181 \pm 23 \text{ } \eta\text{g g}^{-1}$ de fluido intestinal de animais CV tratados com *S. cerevisiae* UFMG 905. $P = 0,16$. $N = 4$ animais em cada grupo); IgM ($12 \pm 2 \text{ } \eta\text{g g}^{-1}$ de fluido intestinal de animais CV contra $21 \pm 9 \text{ } \eta\text{g g}^{-1}$ de fluido intestinal de animais CV tratados com *S. cerevisiae* UFMG 905. $P = 0,38$. $N = 4$ animais em cada grupo)], mas essa diferença não foi estatisticamente significativa. Nenhuma alteração foi observada nos níveis de imunoglobulinas séricas nos animais convencionais (dados não mostrados).

Assim como *S. boulardii* (RODRIGUES *et al.*, 2000), *S. cerevisiae* UFMG 905 aumenta tanto a produção local de IgA (no fluido intestinal) como a sua produção sistêmica (no soro). sIgA representa uma barreira imunológica contra a adesão de patógenos à mucosa intestinal, ligando-se à superfície bacteriana e prendendo-a na camada mucosa do epitélio intestinal, ou às moléculas da superfície bacteriana que medeiam a adesão às células epiteliais, prevenindo, assim, a translocação para órgãos internos (HAJISHENGALLIS *et al.*, 1992). Essa habilidade de estimular a produção de sIgA não é a mesma para os diferentes microrganismos e, em camundongos GN, bactérias Gram-negativo e leveduras, geralmente, induzem uma maior estimulação que bactérias Gram-positivo (MOREAU *et al.*, 1982; NEUMANN *et al.*, 1998; RODRIGUES *et al.*, 2000).

O complicado papel da mucosa intestinal em absorver nutrientes e, ao mesmo tempo, proteger contra agentes infecciosos está refletido no tamanho de seu sistema imune. Existem mais células linfóides no trato digestivo que no baço, glândulas linfáticas periféricas e sangue juntos. Isso pode, também, refletir o fato que a mucosa intestinal, com sua superfície de $200\text{-}300 \text{ m}^2$, separa as 10^{13} células eucarióticas humanas das 10^{14} bactérias residentes no trato digestivo (HANSON *et al.*, 1999).

O sistema linfóide associado ao intestino pode ser dividido em dois compartimentos funcionais: um indutor e um efetor, interligados pelas vias hemolinfáticas. Podemos distinguir, em primeiro lugar, os órgãos linfóides organizados (as

placas de Peyer e os gânglios mesentéricos), cujo papel é organizar uma resposta imune específica. O compartimento efetor é formado por um tecido linfóide difuso, constituído de linfócitos T e de plasmócitos (CELLIER *et al.*, 2000). A indução da resposta imune é efetuada mais particularmente nas placas de Peyer. Elas contêm as células M que asseguram o transporte, por pinocitose, de microrganismos e de macromoléculas até as células apresentadoras de antígenos e os linfócitos B e T. Após estimulação por um antígeno, os linfócitos das placas de Peyer migram, através dos gânglios mesentéricos, onde se diferenciam e se multiplicam e, em seguida, encontram a mucosa, após um trânsito pela circulação geral. Essa domiciliação específica é assegurada pelas moléculas de adesão expressas na superfície de certas células endoteliais e dos linfócitos. O sistema linfóide difuso participa igualmente da defesa do intestino, notavelmente via linfócitos T intra-epiteliais, que são células diferenciadas, ricas em perforina e granzima. Estes linfócitos exercem uma potente atividade citotóxica contra alvos infectados por vírus ou parasitas. Enfim, os linfócitos T secretam linfocinas, como IL-5 e IL-6, que favorecem a diferenciação de plasmócitos a IgA e, estes, participam da indução local de produção de anticorpos protetores contra diversos patógenos (CELLIER *et al.*, 2000).

O sistema linfóide do trato digestivo é bem diferente daquele de outros tecidos. Enquanto na imunidade sérica e imunidade tecidual há uma predominância de IgG sobre IgA e IgM, na lâmina própria do trato digestivo existem mais de 20 imunócitos produtores de IgA para cada célula produtora de IgG (GOLDBLUM *et al.*, 1996). Além do mais, as moléculas de IgA e IgG séricas são monômeros, mas os anticorpos IgA produzidos na mucosa intestinal são dímeros de IgA, com uma cadeia J (“joining”) extra. Essa cadeia permite a sua ligação a um receptor especial, o componente secretado (SC, “secretory component”), também chamado receptor poli Ig, na porção basal do epitélio intestinal. A ligação ao SC é seguida pelo transporte através da célula epitelial pelo complexo dímero J de IgA-SC, que é chamado de anticorpo IgA secretada (sIgA). A sIgA, que é mais estável a mudanças de pH e enzimas proteolíticas que anticorpos séricos, aparece na superfície da mucosa intestinal em concentrações relativamente altas. A sIgA funciona neutralizando vírus e toxinas, mas também pode se ligar a bactérias, prevenindo a aderência bacteriana às células intestinais (HANSON *et al.*, 1999).

sIgA está envolvida, principalmente, na proteção imune específica da superfície da mucosa intestinal. Ela é resistente à proteólise intraluminal e não ativa o sistema de

complemento ou a resposta inflamatória. Isso a faz ideal para desempenhar sua função na primeira linha de defesa, em combinação com os mecanismos de defesa não imunológicos. Um homem adulto saudável, com peso de 70 kg, produz aproximadamente 3 g de anticorpos diariamente. Quase dois terços desta quantidade são formados por IgA, produzida pelas células B, nas paredes dos tratos gastrintestinal e respiratório, e transportada ativamente para a luz. A grande quantidade de IgA produzida reflete a grande área de superfície desses órgãos. Após a exposição ao antígeno, a maior parte da resposta dos anticorpos ocorre nos tecidos linfóides, principalmente no baço, nos linfonodos e no tecido linfóide associado às mucosas, mas células produtoras de anticorpos de longa duração podem persistir em outros tecidos, especialmente na medula óssea (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

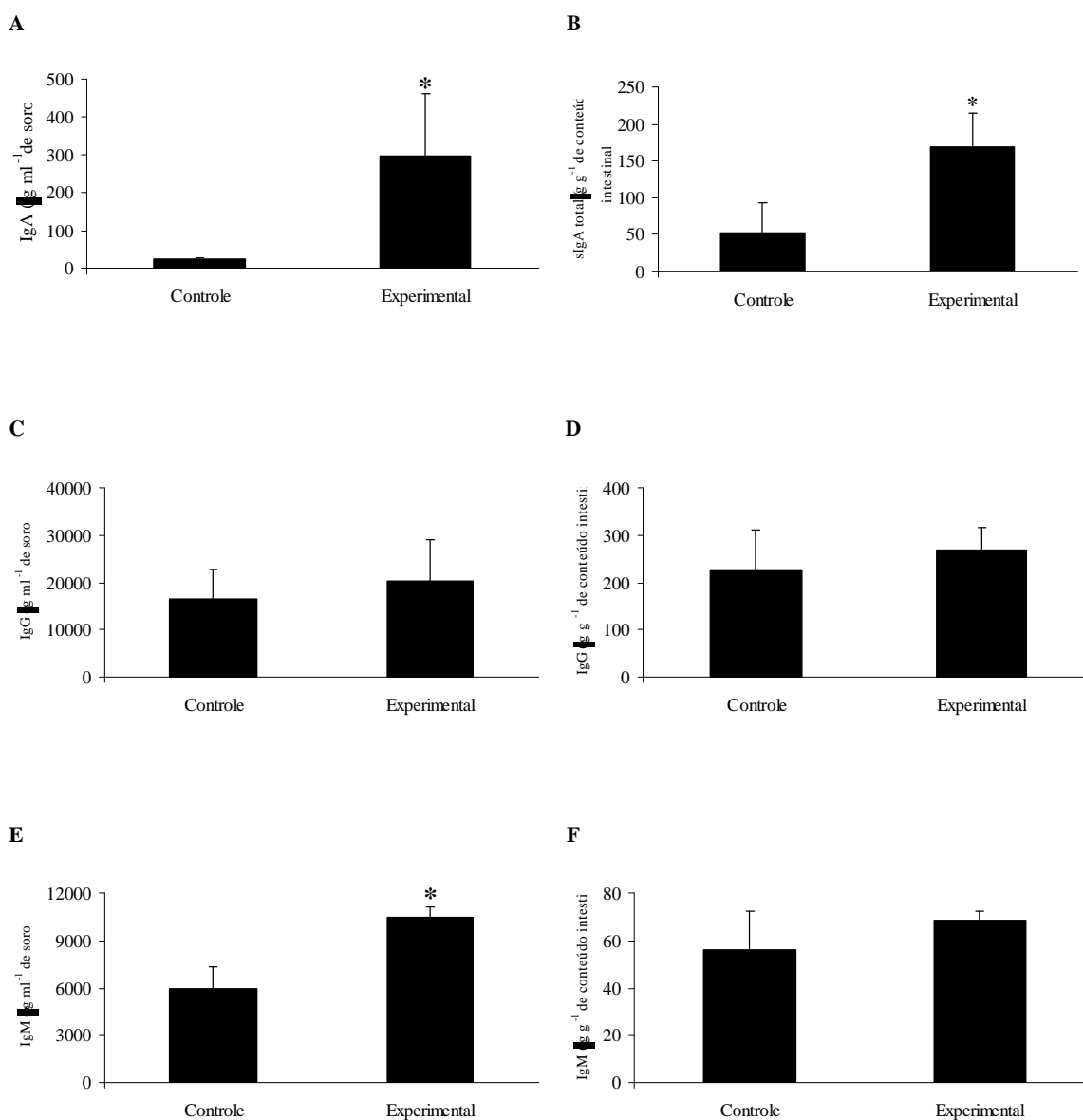


Figura 14. Níveis de IgA (A), sIgA (B), IgG (C-D) e IgM (E-F) produzidas no conteúdo intestinal (B, D e F) e soro (A, C e E) de camundongos isentos de germes (controle) e camundongos monoassociados com *S. cerevisiae* UFMG 905 (experimental). Os resultados estão expressos como média das concentrações de imunoglobulinas (ηg g^{-1} de conteúdo intestinal ou ml^{-1} de soro). As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. *Indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e experimental, avaliados pelo teste *t* de Student ($P < 0,05$). N = 5.

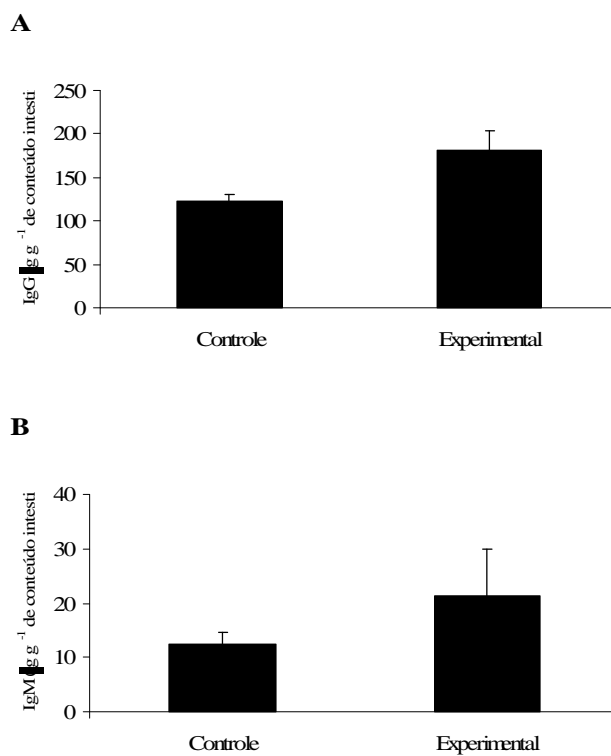


Figura 15. Níveis de IgG (A) e IgM (B) produzidos no conteúdo intestinal de camundongos convencionais tratados (experimental) ou não (controle) com a levedura *S. cerevisiae* UFMG 905. Os resultados são expressos como média da concentração de imunoglobulinas (μg) g^{-1} no conteúdo intestinal. As barras verticais representam os desvios-padrão das médias. Não houve diferença entre os outros grupos. $N = 5$.

Parte II: Efeitos de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 na sinalização celular induzida, em células T84, após infecção pelo enteropatógeno *Salm. Typhimurium* 14028

V.6 Efeito de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 na integridade epitelial de células T84, após infecção por *Salm. Typhimurium* 14028

Para determinar o efeito das duas leveduras (*S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905) na diminuição da resistência transepitelial (RTE) induzida por *Salm. Typhimurium* 14028, as células T84 foram cultivadas sobre filtros, o que permite delimitar um compartimento superior (apical) e um compartimento inferior (basal), e infectadas na porção apical com a bactéria, na presença e na ausência de uma das duas leveduras. A RTE foi acompanhada durante 8 horas e os resultados são mostrados nas Figuras 16 e 17.

A Figura 16 mostra que *S. boulardii* impede a queda da RTE induzida por *Salm. Typhimurium* 14028. Ao final de 8 horas, a RTE caiu 50% nas células infectadas apenas com *Salm. Typhimurium* 14028, enquanto nas células pré-incubadas com *S. boulardii* e infectadas com *Salm. Typhimurium* 14028, a RTE se assemelha à das células controle (sem infecção). Em células infectadas com *Salm. Typhimurium* 14028 e *S. boulardii* ao mesmo tempo, a RTE permanece semelhante à das células controle até 7 horas, quando, ao final de 8 horas, a RTE começa a cair. A presença isolada de *S. boulardii* não interferiu na RTE, conforme observado na Figura 16. Os resultados encontrados com *S. cerevisiae* UFMG 905 (Figura 17) são muito semelhantes àqueles encontrados para *S. boulardii* (Figura 16). Entretanto, ao contrário do que aconteceu com *S. boulardii*, quando *S. cerevisiae* UFMG 905 é incubada ao mesmo tempo com *Salm. Typhimurium* 14028, a RTE cai a níveis próximos aos das células infectadas apenas com *Salm. Typhimurium* 14028, mostrando que o efeito preventivo de *S. cerevisiae* UFMG 905 é melhor que o efeito curativo, no que se refere à RTE (Figura 17).

Essa queda na RTE de enterócitos induzida por *Salm. Typhimurium*, já havia sido observada (BERTELSEN *et al.*, 2004); entretanto, o efeito de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 nessa queda da RTE, induzida por *Salm. Typhimurium*, não havia sido, ainda, demonstrado. CZERUCKA *et al.* (2000) e DAHAN *et al.* (2003) já

havia observado o efeito protetor de *S. boulardii* na queda da RTE em infecções por EPEC e EHEC.

As células epiteliais servem de barreira seletiva entre dois ambientes distintos. Para isso, existem as junções serreadas, situadas no pólo apical, que limitam o fluxo paracelular. Essas junções são compostas de diversas proteínas e o fechamento dos espaços paracelulares é feito por proteínas associadas às membranas, as ocludinas e as claudinas, que interagem com seus homólogos entre as células vizinhas. Ao lado, encontramos as proteínas periféricas, não membranárias, em especial ZO-1, ZO-2 e ZO-3, que são as mais bem estudadas e caracterizadas. Associado a essas proteínas, o citoesqueleto de actina tem um papel importante no controle da permeabilidade das junções serreadas. De fato, a contração do citoesqueleto possibilita a abertura dessas junções. Essa contração está intimamente ligada à fosforilação da MLC (cadeia leve de miosina, “myosin light chain”), fosforilação esta que é feita por duas quinases: a MLCK (MLC quinase) e a PKC (proteína quinase C, “protein kinase C”) (NISHIKAWA *et al.*, 1983). A ruptura das junções serreadas está implicada em diversas doenças, uma vez que ela aumenta a permeabilidade intestinal, favorecendo a passagem de substâncias tóxicas presentes na luz intestinal. Essa desestabilização pode ser verificada, *in vitro*, medindo-se a resistência transepitelial de células cultivadas em monocamadas. A ativação de MLCK está diretamente implicada na queda da RTE, após infecções com *E. coli* enteropatogênicas e enterohemorrágicas (YUHAN *et al.*, 1997; PHILPOTT *et al.*, 1998; CZERUCKA *et al.*, 2001), assim como em infecções por *Salm. Typhimurium* (BERTELSEN *et al.*, 2004).

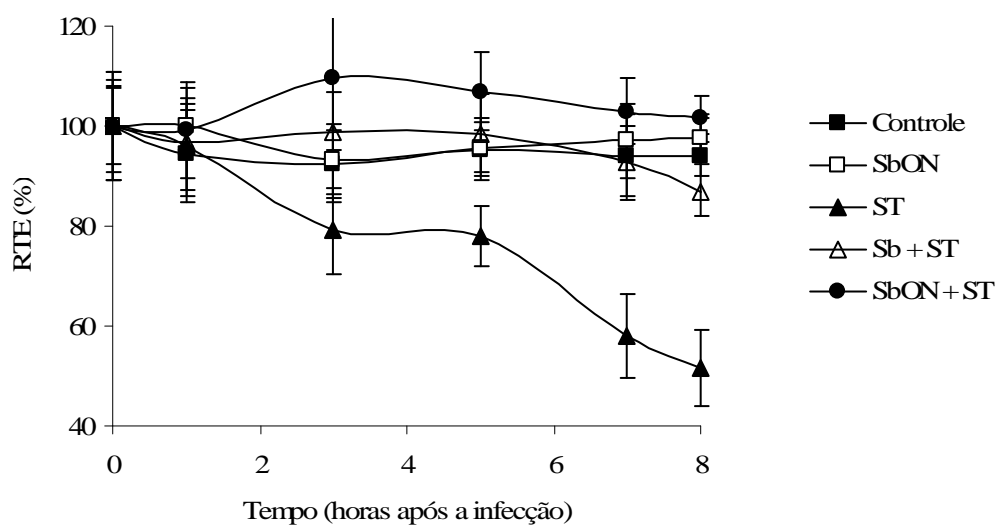


Figura 16. Efeito de *S. boulardii* (Sb) na diminuição da Resistência Trans-Epitelial (RTE) induzida por *Salm. Typhimurium* 14028 (ST), em células T84. A RTE diminui progressivamente em células infectadas com *Salm. Typhimurium* 14028 (▲), quando comparadas com o controle (■) ou em células infectadas na presença simultânea de *S. boulardii* (△), ou em células pré-incubadas com *S. boulardii* e infectadas com *Salm. Typhimurium* 14028 (●). A presença de *S. boulardii*, apenas, não interfere na RTE (□). ON, “overnight”.

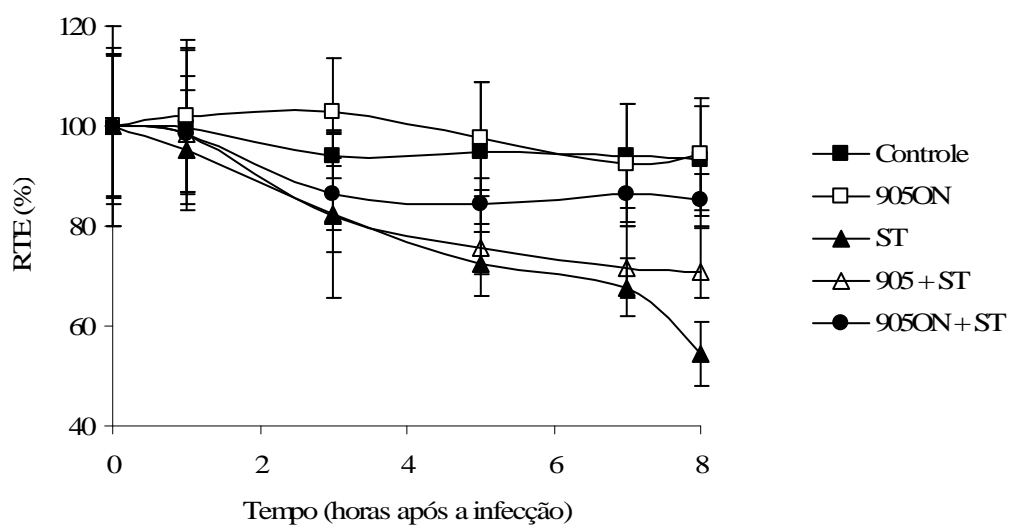


Figura 17. Efeito de *S. cerevisiae* UFMG 905 (905) na diminuição da Resistência Trans-Epitelial (RTE) induzida por *Salm. Typhimurium* 14028 (ST), em células T84. A RTE diminui progressivamente em células infectadas com *Salm. Typhimurium* 14028 (▲), quando comparadas com o controle (■) ou em células infectadas na presença simultânea de *S. cerevisiae* UFMG 905 (△), ou em células pré-incubadas com *S. cerevisiae* UFMG 905 e infectadas com *Salm. Typhimurium* 14028 (●). A presença de *S. cerevisiae* UFMG 905, apenas, não interfere na RTE (□). ON, “overnight”.

V.7 Efeito de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 na resposta inflamatória, em células T84, após infecção por *Salm. Typhimurium* 14028

Em resposta à infecção por *Salm. Typhimurium*, as células secretam IL-8 (HOBBIE *et al.*, 1997). Para verificar o efeito de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 na secreção de IL-8, induzida por *Salm. Typhimurium*, as células foram infectadas, durante 3 horas, com *Salm. Typhimurium* 14028, na presença ou não de uma das duas leveduras, e a concentração de IL-8 presente no sobrenadante das culturas celulares foi analisada pelo método de ELISA (Figuras 18 e 20). A presença de *Salm. Typhimurium* 14028 induz um aumento de, aproximadamente, 50 vezes nos níveis de IL-8, em relação às células controle (de $5,6 \pm 4,5$ pg/ml para $266 \pm 41,3$ pg/ml). Na Figura 18, podemos observar que a presença da levedura *S. boulardii* diminui drasticamente os níveis de IL-8 induzidos por *Salm. Typhimurium* 14028. Quando pré-incubada, *S. boulardii* provoca uma diminuição de mais de nove vezes nos níveis de IL-8 e, quando co-incubada, uma diminuição de três vezes. A presença da levedura *S. boulardii*, apenas, não acarretou um aumento significativo nos níveis de IL-8. Essa diminuição foi, também, observada na expressão do mRNA para IL-8 (Figura 19), pela técnica de PCR em tempo real. Nesse caso, em que foi realizada uma cinética de infecção, avaliou-se o efeito de *S. boulardii* nos níveis de IL-8 mRNA, induzidos por *Salm. Typhimurium* 14028, em células T84, por PCR quantitativo, após 1h, 2h e 3h de infecção com a bactéria, na presença da levedura pré- e co-incubada. Foi observado que, tanto pré- quanto co-incubada, a levedura diminui os níveis do mRNA para IL-8, mas diferenças estatisticamente significativas foram encontradas apenas durante a pré-incubação com a levedura, independentemente do tempo de infecção.

A Figura 20 mostra os mesmos resultados utilizando a levedura *S. cerevisiae* UFMG 905 como probiótico. Assim como *S. boulardii*, ela foi capaz de diminuir os níveis de IL-8 induzidos por *Salm. Typhimurium* 14028. Tanto pré- quanto co-incubada, foi, também, capaz de promover uma diminuição significativa nos níveis de IL-8 (9,3 e 3,2 vezes menos, respectivamente). Esses resultados mostram que as duas leveduras (*S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905) exercem um efeito preventivo na secreção de IL-8 durante a infecção por *Salm. Typhimurium* 14028, em células do cólon.

DAHAN *et al.* (2003) já haviam observado o efeito anti-inflamatório de *S. boulardii* em infecções por EHEC. Trabalhando com culturas de lactobacilos,

NEMETH *et al.* (2006) mostraram um efeito anti-inflamatório do probiótico mediado diretamente pela cultura probiótica ou via secreção de produtos anti-microbianos. Trabalhando com bifidobactérias, RIEDEL *et al.* (2006) observaram um efeito anti-inflamatório devido à inibição da ativação de NF- κ B induzida pelo LPS bacteriano.

O'HARA *et al.* (2006) demonstraram que *B. infantis* e *L. salivarius* diminuía a secreção de IL-8 em células infectadas com *Salm. Typhimurium* e que *B. infantis* também limitava a secreção de IL-8 induzida pela flagelina de *Salm. Typhimurium*. Trabalhando com uma *E. coli* enterotoxigênica, ROSELLI *et al.* (2006) observaram que *B. animalis* MB5 e *L. rhamnosus* GG diminuía a resposta inflamatória causada pelo patógeno, devido a uma diminuição da adesão da bactéria e pela regulação da expressão de quimiocinas e citocinas.

MA *et al.* (2004) também observaram uma inibição da síntese de IL-8 induzida por *Salm. Typhimurium*, em culturas celulares pré-incubadas com *L. reuteri*, e esse efeito foi atribuído à inibição da translocação de NF- κ B para o núcleo, assim como a prevenção da degradação de I κ B.

Todo enteropatógeno, após atingir seu local de ação no hospedeiro, precisa competir com a microbiota presente no trato digestivo para poder se estabelecer e causar infecção. A maioria destes patógenos, como é o caso de *Salmonella* e algumas linhagens de *E. coli*, causa infecção em um processo que envolve três estágios: adesão, indução de sinais nas células do hospedeiro e entrada da bactéria (ou de suas toxinas) na célula (SCALETSKY *et al.*, 1984). Todo este processo leva à indução de várias respostas, dentre elas a resposta imune, via produção de imunoglobulinas e citocinas. Estudos prévios, utilizando ensaios *in vitro* e *in vivo*, mostraram que uma linhagem de EHEC induzia uma potente resposta pró-inflamatória via liberação de IL-8 em células T84 infectadas (DAHAN *et al.*, 2002), que é um dos principais produtos secretados por células epiteliais infectadas (ECKMANN *et al.*, 1993).

A expressão do gene que codifica a IL-8 é regulada por várias vias. A região promotora do gene para IL-8 contém seqüências às quais se ligam vários fatores de transcrição, incluindo NF-IL-6, NF- κ B e AP-1 (MUKAIDA *et al.*, 1994). ELEWAUT *et al.* (1999) mostraram que NF- κ B é o regulador central da resposta imune inata epitélio-célula a infecções por bactérias enteroinvasivas, como é o caso do gênero *Salmonella* e algumas linhagens de *Escherichia*. Além do mais, respostas imunes e inflamatórias no intestino envolvem a transcrição do fator NF- κ B (NEURATH *et al.*,

1998). Na maioria das células, o NF- κ B se encontra no citoplasma na sua forma inativa pela ligação de uma proteína inibitória, a I κ B, que oculta o sinal para localização nuclear no NF- κ B e impede a sua translocação para o núcleo. A translocação do NF- κ B requer a fosforilação de I κ B e, uma vez fosforilado, I κ B é ubiquitinilado e, depois, degradado pela subunidade 26S do proteasoma (BROWN *et al.*, 1995).

A ativação de AP-1 é dependente de MAPKs que desempenham um papel central em muitas respostas do hospedeiro, incluindo resposta a citocinas, respostas a estresses e reorganização do citoesqueleto (DAVIS, 1993; DAVIS, 2000). As vias de MAP quinases formam um grupo de proteínas quinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2) e duas proteínas quinases ativadas por estresse chamadas p38 e JNK. Muitos receptores de superfície de eucariotos utilizam, pelo menos, uma dessas cascatas de MAPK, altamente conservadas para sinalização intracelular (ROBINSON & COBB, 1997).

DAHAN *et al.* (2002), utilizando EHEC como modelo, demonstraram a habilidade desta bactéria em induzir uma resposta pró-inflamatória em células T84 e viram que esta resposta envolvia vias sinalizadoras de NF- κ B, AP-1 e MAPK. Este tipo de infecção é capaz de alterar, também, a permeabilidade intestinal (PHILPOTT *et al.*, 1998).

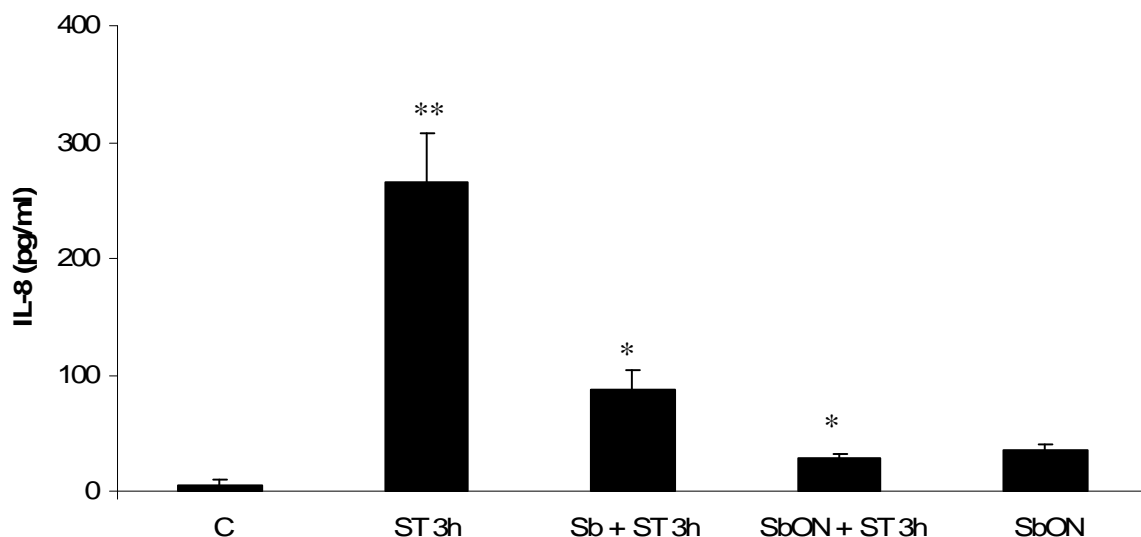


Figura 18. Efeito de *S. boulardii* (Sb) nos níveis de IL-8, induzidos por *Salm.* Typhimurium 14028 (ST), em células T84. A IL-8 foi analisada no sobrenadante de células T84, por ELISA, após 3 horas de infecção com *Salm.* Typhimurium 14028, na presença de *S. boulardii* pré- ou co-incubada. *Diferença estatisticamente significativa entre as células infectadas por *Salm.* Typhimurium 14028 e células infectadas por *Salm.* Typhimurium 14028, na presença de *S. boulardii*. **Diferença estatisticamente significativa entre as células infectadas por *Salm.* Typhimurium 14028 e o controle ($P < 0,05$, $n = 8$). C, controle; ON, “overnight”.

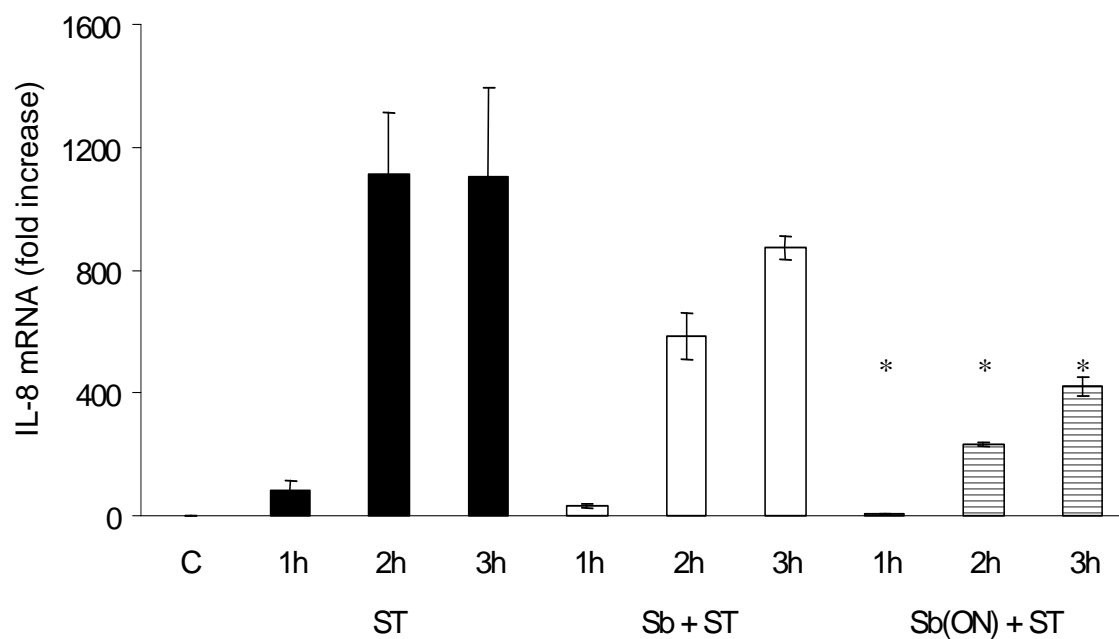


Figura 19. Efeito de *S. boulardii* (Sb) nos níveis de IL-8 mRNA, induzidos por *Salm. Typhimurium* 14028 (ST), em células T84. IL-8 mRNA foi analisado nas células T84, por PCR quantitativo após 1h, 2h e 3h de infecção com *Salm. Typhimurium* 14028, na presença de *S. boulardii* pré- ou co-incubada. *Diferença estatisticamente significativa entre as células infectadas por *Salm. Typhimurium* 14028 e células infectadas por *Salm. Typhimurium* 14028, na presença de *S. boulardii*. ($P < 0,05$, $n = 6$). C, controle; ON, “overnight”.

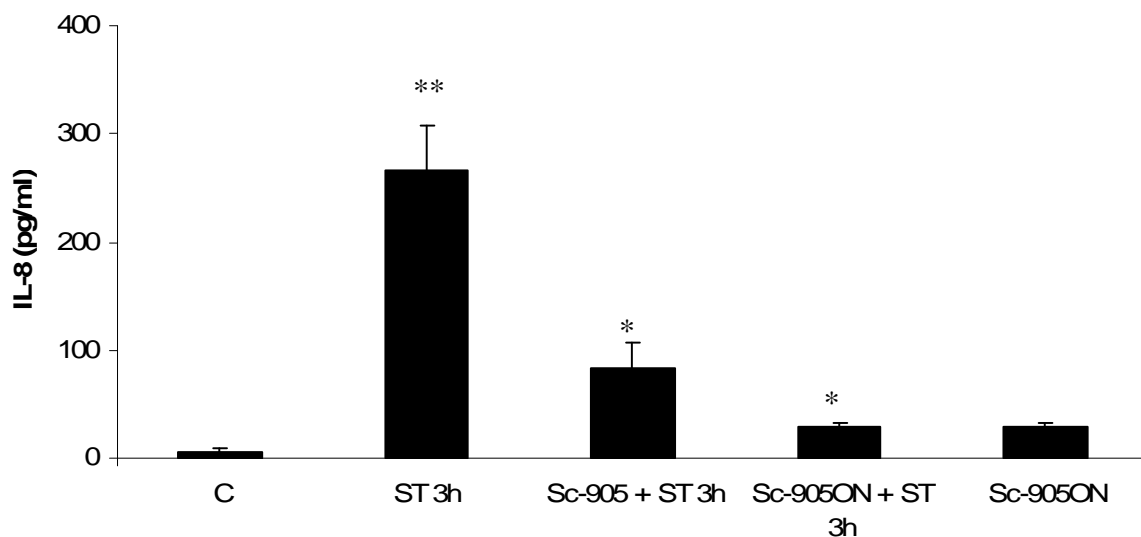


Figura 20. Efeito de *S. cerevisiae* UFMG 905 (Sc-905), nos níveis de IL-8, induzidos por *Salm. Typhimurium* 14028 (ST), em células T84. IL-8 foi analisado no sobrenadante de células T84, por ELISA, após 3 horas de infecção com *Salm. Typhimurium* 14028, na presença de *S. cerevisiae* UFMG 905 pré- ou co-incubada. *Diferença estatisticamente significativa entre as células infectadas por *Salm. Typhimurium* 14028 e células infectadas por *Salm. Typhimurium* 14028, na presença de *S. cerevisiae* UFMG 905. **Diferença estatisticamente significativa entre as células infectadas por *Salm. Typhimurium* 14028 e o controle ($P < 0,05$, $n = 8$). C, controle; ON, “overnight”.

V.8 Efeito de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 nas vias de sinalização celular, induzidas em células T84, por *Salm. Typhimurium* 14028

Diversos trabalhos já mostraram que a secreção de IL-8 é dependente de fatores de transcrição, como NF- κ B e AP-1, assim como das MAP quinases (p38, ERK1/2 e JNK) (HOBBIE *et al.*, 1997; CZERUCKA *et al.*, 2000; GEWIRTZ *et al.*, 2000; CZERUCKA *et al.*, 2001; DAHAN *et al.*, 2002; HOFFMANN *et al.*, 2002; DAHAN *et al.*, 2003). Para avaliar o efeito de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 na indução da fosforilação de MAP quinases (p38, ERK 1/2 e JNK) pela *Salm. Typhimurium*, as células foram cultivadas em placas de 6 poços, infectadas com *Salm. Typhimurium* 14028, na presença ou não de *S. boulardii* ou *S. cerevisiae* UFMG 905 e, ao final da infecção, as proteínas foram extraídas, corridas em SDS-PAGE e analisadas por “imunoblotting” com anticorpos anti-fosfo-p38, anti-fosfo-ERK1/2 ou anti-fosfo-JNK.

A Figura 21 mostra o efeito de *S. boulardii* na indução de fosforilação de MAP quinases induzidas pela *Salm. Typhimurium* 14028, após 1h, 2h e 3h de infecção com a bactéria. A *Salm. Typhimurium* 14028 ativa a fosforilação de todas as três MAP quinases, em todos os tempos, sendo a ativação maior após 3 horas de infecção. A levedura *S. boulardii*, quando incubada ao mesmo tempo com *Salm. Typhimurium* 14028, não inibe as MAPKs ativadas pela *Salm. Typhimurium* 14028; entretanto, quando pré-incubada toda a noite, ela diminui a fosforilação de p38, após 1h e 2h de infecção e bloqueia após 3h de infecção com *Salm. Typhimurium* 14028 (Figura 21A). Além disto, bloqueia completamente a fosforilação de ERK1/2 e JNK, em todos os tempos (Figuras 21B e 21C). Um resultado idêntico foi encontrado com a levedura *S. cerevisiae* UFMG 905 (Figura 22). A presença de *S. boulardii* (Figura 21) ou de *S. cerevisiae* UFMG 905 (Figura 22) apenas, não ativa a fosforilação de nenhuma das MAPKs.

Para avaliar o efeito de uma *S. cerevisiae* de laboratório (*S. cerevisiae* W303) nessa inibição de fosforilação de MAPKs, induzidas por *Salm. Typhimurium* 14028, o mesmo experimento foi realizado com a *S. cerevisiae* W303, no lugar de *S. boulardii* ou *S. cerevisiae* UFMG 905, e, observou-se que, ao contrário das outras duas leveduras, *S. cerevisiae* W303 não foi capaz de inibir o efeito da *Salm. Typhimurium* 14028, mesmo quando pré-incubada, mostrando que o efeito benéfico não foi devido simplesmente à presença de uma levedura (Figura 23). Todos esses resultados mostram que as leveduras

S. boulardii e *S. cerevisiae* UFMG 905 previnem a ativação de MAPKs, induzidas por *Salm. Typhimurium* 14028, em enterócitos.

Muitas vezes a infecção por enteropatógenos leva à morte programada celular ou apoptose. As caspases são proteases que desempenham um papel-chave na iniciação e execução da apoptose. Entre elas, a caspase-3 (cpp-32) é a mais bem estudada. Esta é sintetizada como uma pró-enzima inativa de 32 kDa, que é clivada em células em processo de apoptose em duas formas ativas, uma de 12 kDa e outra de 20 kDa (ZYCHLINSKY & SANSONETTI, 1997).

Para mostrar que nenhuma das células estava em apoptose, avaliou-se, também por “imunoblotting”, a clivagem da caspase-3. *Salmonella Typhimurium* 14028, na presença ou na ausência de *S. boulardii* (Figura 24) ou *S. cerevisiae* UFMG 905 (Figura 25), não ativa a apoptose em células T84. É sabido, pela literatura, que *Salm. Typhimurium* ativa a apoptose; entretanto, quando o fator NF- κ B é ativado, ele inibe a apoptose celular. A *Salm. Typhimurium* é uma bactéria que, ao mesmo tempo em que ativa vias que levam à morte celular, também ativa vias que impedem a apoptose celular, como a via PI3K/Akt (phosphatidyl-inositol-3-kinase) e o fator de transcrição NF- κ B (ZYCHLINSKY & SANSONETTI, 1997).

Trabalhando com EHEC, DAHAN *et al.* (2003) também observaram o efeito protetor de *S. boulardii* na ativação de vias sinalizadoras induzidas por essa bactéria. Este tipo de mecanismo de proteção já foi, também, descrito para um probiótico bacteriano. Estudos utilizando a linhagem celular Caco-2/TC7 mostrou que *L. acidophilus* LB possui um efeito antimicrobiano em infecções causadas por *Salm. Typhimurium* (COCONNIER *et al.*, 2000). Este probiótico induziu uma diminuição do rearranjo dos filamentos de actina nos sítios de adesão da *Salm. Typhimurium* e uma diminuição do número de bactérias aderentes, induzindo uma menor resposta pró-inflamatória pela secreção de IL-8. Além disso, o *L. acidophilus* permitiu, igualmente, a diminuição do número de células de *Salm. Typhimurium* intracelulares e do número de bactérias translocadas.

Estudos recentes mostraram que probióticos de origem bacteriana podem, igualmente, intervir em etapas posteriores à adesão de *Salmonella* e modificar a resposta dos enterócitos à infecção (OTTE & PODOLSKI, 2004).

Como descrito para os colibacilos enteropatógenos, o processo infeccioso da *Salmonella* é composto de três etapas: 1) adesão das bactérias às células (M, enterócitos); 2) formação de um sistema de secreção do tipo III, que permite a

translocação de proteínas dentro do citoplasma da célula hospedeira, e 3) indução, por fosforilação, de vias de sinalizações intracelulares (GRASSL & FINLAY, 2008). Nos enterócitos, a translocação de proteínas bacterianas pela célula do hospedeiro tem, por conseqüência, um acúmulo de actina nos sítios de adesão bacteriana, com formação de vacúolos de macropinocitose e internalização de bactérias. Estas modificações do citoesqueleto da célula hospedeira estão intimamente relacionadas às modificações do metabolismo de fosfo-inositol induzidas pelas bactérias (HOBBIE *et al.*, 1997).

As MAPKs já foram associadas à patogenia de bactérias enteroinvasivas, como a *Salm. Typhimurium* e a *Listeria monocytogenes*. No caso da *Salm. Typhimurium*, a ativação de MAP quinases do tipo ERK 1/2, p38 e JNK, e do fator NF- κ B, estão implicados na síntese de IL-8, em resposta à infecção (HOBBIE *et al.*, 1998). A MAP quinase p38 está envolvida na estabilização do mRNA para IL-8, ERK1/2, na invasão e na indução de respostas inflamatórias e, JNK e os fatores NF- κ B e AP-1 estão envolvidos na síntese de IL-8, em resposta à infecção (HOFFMANN *et al.*, 2002).

Como o fator de transcrição NF- κ B é um dos principais responsáveis pela síntese de IL-8, em resposta a diversos fatores, dentre eles uma resposta à infecção, avaliou-se a ativação desse fator, assim como a fosforilação de sua proteína inibidora (I κ B). Para se avaliar o efeito de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 na indução da fosforilação da proteína inibidora pela *Salm. Typhimurium*, as células T84 foram cultivadas em placas de 6 poços, infectadas com *Salm. Typhimurium* 14028, na presença ou não de *S. boulardii* ou *S. cerevisiae* UFMG 905 e, ao final da infecção, as proteínas foram extraídas, corridas em SDS-PAGE e analisadas, por “imunoblotting”, com anticorpo anti-fosfo-I κ B- α . Para se avaliar o efeito de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 na ativação do fator NF- κ B pela *Salm. Typhimurium*, as células foram cultivadas em placas de 6 poços, infectadas com *Salm. Typhimurium* 14028, na presença ou não de *S. boulardii* ou *S. cerevisiae* UFMG 905 e, ao final da infecção, as proteínas totais foram extraídas, incubadas com oligonucleotídeos, marcados radioativamente, que reconhecem o sítio κ B. Os complexos foram separados por eletroforese em gel de retardamento, analisados e os resultados estão apresentados nas Figuras 26 e 27.

A Figura 26 mostra o efeito de *S. boulardii* na fosforilação de I κ B- α (Figura 26A) e na ativação do fator NF- κ B (Figura 26B) induzidas por *Salm. Typhimurium* 14028. *Salmonella Typhimurium* promove a ativação de I κ B- α , que é a proteína

inibidora que impede que o fator NF- κ B transloque para o núcleo e ative os genes responsáveis pela ativação de diversas citocinas pró-inflamatórias, como a IL-8. A presença de *S. boulardii*, incubada ao mesmo tempo com *Salm. Typhimurium* 14028, não promove uma diminuição da ativação de I κ B- α . Quando pré-incubada, *S. boulardii* promove uma pequena diminuição na fosforilação de I κ B- α (Figura 26A) e essa diminuição não é responsável por uma diminuição da ativação do fator NF- κ B, conforme pode ser observado na Figura 26B. Um resultado muito parecido foi encontrado quando se utilizou *S. cerevisiae* UFMG 905, no lugar de *S. boulardii* (Figura 27).

Uma vez que foi observada uma grande diminuição dos níveis de IL-8, induzida por *Salm. Typhimurium* 14028, na presença de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 (Figuras 18, 19 e 20), e não tendo sido observada uma diminuição da ativação do fator NF- κ B (Figuras 26 e 27), uma explicação plausível para essa diminuição de IL-8 se encontra no fato de as duas leveduras diminuírem a fosforilação de p38 (Figuras 21A e 22A), que é a MAPK responsável pela estabilização do mRNA para IL-8, induzida pela *Salm. Typhimurium*, e também pelo fato de as duas leveduras terem bloqueado a fosforilação de JNK (Figuras 21C e 22C), que junto com o fator NF- κ B, é responsável pela indução de IL-8. Assim, o gene para IL-8 é induzido pelo NF- κ B, mas o mRNA não é estável, uma vez que p38 não é fosforilado na presença das leveduras. Uma outra explicação é o fato de as leveduras inibirem a fosforilação da MAPK JNK, uma vez que AP-1, um outro fator de transcrição para IL-8, é dependente da fosforilação dessa proteína. Como as duas leveduras inibem a fosforilação dessa MAPK, essa poderia ser uma outra explicação para a diminuição dos níveis de IL-8 observados. A diminuição dessa citocina pró-inflamatória também poderia estar relacionada a uma imunomodulação, como a produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória; entretanto, essa hipótese não foi testada nesse trabalho.

A interação de proteínas com o DNA é um ponto-chave no controle de diversos processos celulares, incluindo a replicação, recombinação e reparo do DNA e a transcrição. Uma técnica extremamente útil no estudo da regulação gênica e da interação proteína-DNA é o EMSA (“electrophoretic mobility shift assay”). Essa técnica é baseada na observação de que o complexo proteína-DNA migra mais lentamente que moléculas de DNA livres, quando submetidos a géis de poliacrilamida não desnaturantes. Como a taxa de migração de DNA é mudada ou retardada quando

este aparece ligado a complexos de proteínas, o ensaio é também referido como ensaio de mudança em gel ou ensaio de retardamento (FRIED & CROTHERS, 1981; GARNER & REVZIN, 1981). No EMSA, um oligonucleotídeo de DNA, dupla fita, que contém sítios específicos de ligação de NF- κ B é marcado radioativamente e incubado com células ou extratos nucleares de tecidos. À reação de ligação adiciona-se poli-dIdC para prevenir ligações inespecíficas de proteínas ao oligonucleotídeo marcado e, também, para reduzir o “background”. Essa incubação resulta na ligação de NF- κ B ao nucleotídeo e em uma mudança da mobilidade eletroforética do nucleotídeo no gel de poliacrilamida, sendo que, após separação das amostras, as bandas podem ser visualizadas por fosfo-imagem ou radiografia (VAN DEN BERG *et al.*, 2001).

O método mais amplamente utilizado para determinar a ativação de NF- κ B é o EMSA. Com essa técnica molecular, é possível detectar diferenças nas concentrações de NF- κ B que se translocaram para o núcleo. Essa técnica possibilitou o uso de NF- κ B como um biomarcador funcional de estresse inflamatório em diversos estudos, *in vitro* e *in vivo*. O EMSA é, também, amplamente aplicado em ensaios clínicos, uma vez que pode ser usado em células sanguíneas humanas, fluídos biológicos, biópsias de tecidos, etc (ZINGARELLI, 2005).

Vários estímulos e agentes patogênicos provocam a secreção basolateral de IL-8 pelos enterócitos (JUNG *et al.*, 1995; YANG *et al.*, 1997). A expressão de IL-8 está sob o controle de NF- κ B, assim como das proteínas da família das MAPKs. Foi demonstrado que essas intervêm na expressão de IL-8 em diversos níveis como, por exemplo, na estabilização dos mRNAs (HOFFMANN *et al.*, 2002). Além disso, o emprego de inibidores farmacológicos de MAPKs, em infecções, *in vitro*, por diversas bactérias patogênicas, se traduz em uma importante diminuição da secreção de IL-8, confirmando a importância dessas quinases na produção dessa citocina em condições patológicas (SAVKOVIC *et al.*, 2001; BERIN *et al.*, 2002; DAHAN *et al.*, 2002).

A ativação da via NF- κ B já foi observada por diversos autores, em várias infecções bacterianas, envolvendo, por exemplo: *Salm. Typhimurium* (HOBBIE *et al.*, 1997; GEWIRTZ *et al.*, 2000), *E. coli* enteropatogênica (SAVKOVIC *et al.*, 1997) e *E. coli* enterohemorrágica (DAHAN *et al.*, 2002). Uma relação entre a ativação da via NF- κ B e a produção de IL-8 já foi estabelecida para todas essas bactérias. De fato, as linhagens celulares epiteliais de origem intestinal, transfectadas com o potente repressor IKK β ou I κ B- α impedem toda a ativação de NF- κ B, não secretando mais IL-8 em

resposta às infecções bacterianas (ELEWAUT *et al.*, 1999). A IL-8 secretada pelos enterócitos desempenha um papel importante na defesa do organismo contra as bactérias patogênicas, uma vez que permite o recrutamento e a transmigração de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) através do epitélio, que se encarregam da destruição dos patógenos (SAVKOVIC *et al.*, 1996). Em diversas bactérias patogênicas, um dos principais fatores responsáveis pela ativação de NF- κ B e da potente resposta inflamatória é uma proteína derivada dos flagelos: a flagelina (BERIN *et al.*, 2002; TALLANT *et al.*, 2004).

De uma maneira interessante, a ativação de NF- κ B por EPEC e EHEC é transitória. A inibição de NF- κ B foi atribuída à proteína bacteriana EspB. De fato, linhagens deficientes para EspB são incapazes de inibir NF- κ B (HAUF & CHAKRABORTY, 2003). Esses autores avançaram na hipótese de que essa inibição poderia ser um meio de defesa das bactérias para diminuir a quantidade de IL-8 secretada, limitando, assim, a eliminação bacteriana.

O epitélio está em contato direto com a microbiota intestinal e vários mecanismos de controle são encontrados para evitar um processo patogênico. O glicocálice, que cobre todo o epitélio, limita o contato entre as células e as bactérias; as células de Paneth, no fundo das criptas, secretam as defensinas. Mas o controle da inflamação é feito, também, pelas células epiteliais. Por exemplo, *Bacteroides thetaiotaomicron*, uma bactéria da microbiota normal, exerce um papel anti-inflamatório sobre as células epiteliais intestinais, impedindo a ativação do fator de transcrição NF- κ B. Esta bactéria induz a realocização citoplasmática da sub-unidade p65 do NF- κ B, impedindo a sua ativação (KELLY *et al.*, 2004). Uma outra alternativa para manter a tolerância enterocitária consiste em interferir na via de ubiquitinação que conduz à degradação das proteínas pelo proteasoma. A exposição dos enterócitos a uma espécie não virulenta de salmonela (*Salm. pullorum*) previne a ubiquitinação de I κ B, impedindo, assim, a ativação do fator de transcrição NF- κ B (NEISH *et al.*, 2000). Algumas bactérias comensais, como *E. coli* MG1655, são capazes de induzir uma resposta inflamatória nas células intestinais (BAMBOU *et al.*, 2004) e, nesses casos, o glicocálice limita o contato entre as células intestinais e as bactérias da microbiota, o que previne a resposta inflamatória provocada pela bactéria ou por alguns de seus constituintes.

Uma vez que o efeito de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 sobre as MAPKs é verificado somente quando as leveduras são pré-incubadas toda a noite (Figuras 21 e 22), foi hipotetizado que as leveduras secretam alguma(s) substância(s) que impede(m) a fosforilação das MAPKs pela *Salm. Typhimurium* 14028. Para avaliar isso, as leveduras foram crescidas no mesmo meio de crescimento das células T84 (DMEM/F12), na presença e na ausência das células. Após crescimento por toda a noite, o meio foi centrifugado e filtrado em membranas de 0,22 µm, para eliminar as leveduras e, então, incubado com as células intestinais, na presença ou não de *Salm. Typhimurium* 14028. Após 3h de infecção com o patógeno, as células foram lavadas, congeladas, lisadas e as proteínas extraídas foram corridas em SDS-PAGE e analisadas, por “imunoblotting”, com anticorpos anti-fosfo-p38 e anti-fosfo-ERK1/2. Os resultados são mostrados nas Figuras 28 e 29.

A Figura 28 mostra o efeito do sobrenadante de *S. boulardii* (SbS) na indução da fosforilação de MAPKs (p38 e ERK1/2) pela *Salm. Typhimurium* 14028. Assim como *S. boulardii* pré-incubada inibe a fosforilação das MAPKs, SbS também apresenta um efeito similar. A presença da levedura aderida às células (representada pelas células pré-incubadas com *S. boulardii* e lavadas três vezes para retirar o SbS e *S. boulardii* presente no sobrenadante) por si só não é suficiente para inibir os efeitos da *S. Typhimurium*, indicando que a levedura secreta alguma(s) substância(s) que inibe(m) a ativação das MAPKs. Esse efeito é verificado independentemente de a levedura estar em contato com as células intestinais, uma vez que esse efeito foi observado mesmo quando *S. boulardii* foi crescida em meio na ausência das células T84, indicando que a(s) substância(s) é secretada pela levedura, e não pela célula, em resposta ao contato com a levedura. Um efeito semelhante foi observado quando se trabalhou com a levedura *S. cerevisiae* UFMG 905 (Figura 29).

Trabalhando com o SbS, CHEN *et al.* (2006) observaram que este era capaz de inibir a produção de IL-8 induzida por IL-1β e pela toxina A de *C. difficile*, e, que essa, era dose dependente. Observaram, também, que o SbS inibia as MAPKs ERK1/2 e JNK induzidas por IL-1β e pela toxina A de *C. difficile*, mas não p38. Nesse mesmo trabalho, observaram que, *in vivo*, SbS inibiu, significativamente, ERK1/2, assim como diminuiu a secreção de fluidos e os danos histológicos causados pela toxina A do *C. difficile*. SOUGIOULTZIS *et al.* (2006) também observaram que SbS era capaz de inibir a produção de IL-8, assim como prevenir a degradação de IκB e reduzir a ativação de

NK- κ B induzidas por IL-1 β e TNF- α . Análises mais detalhadas mostraram que esse efeito era devido a um fator anti-inflamatório de menos de 1 kDa, termoestável e solúvel em água.

Outros autores já mostraram a capacidade de *S. boulardii* em liberar substâncias anti-inflamatórias. BUTS *et al.* (2006) observaram que *S. boulardii* libera uma fosfatase de 63 kDa, que é capaz de inibir os efeitos de endotoxinas de *E. coli*, devido a uma grande capacidade de defosforilação. CASTAGLIUOLO *et al.* (1996 e 1999) demonstraram que *S. boulardii* libera uma protease de 54 kDa, que cliva as toxinas A e B de *C. difficile*, assim como o receptor intestinal da toxina A. CZERUCKA *et al.* (1994) e CZERUCKA & RAMPAL (1999) demonstraram que *S. boulardii* libera uma proteína de 120 kDa, que reduz os níveis intestinais de AMPc induzidos pela toxina do cólera.

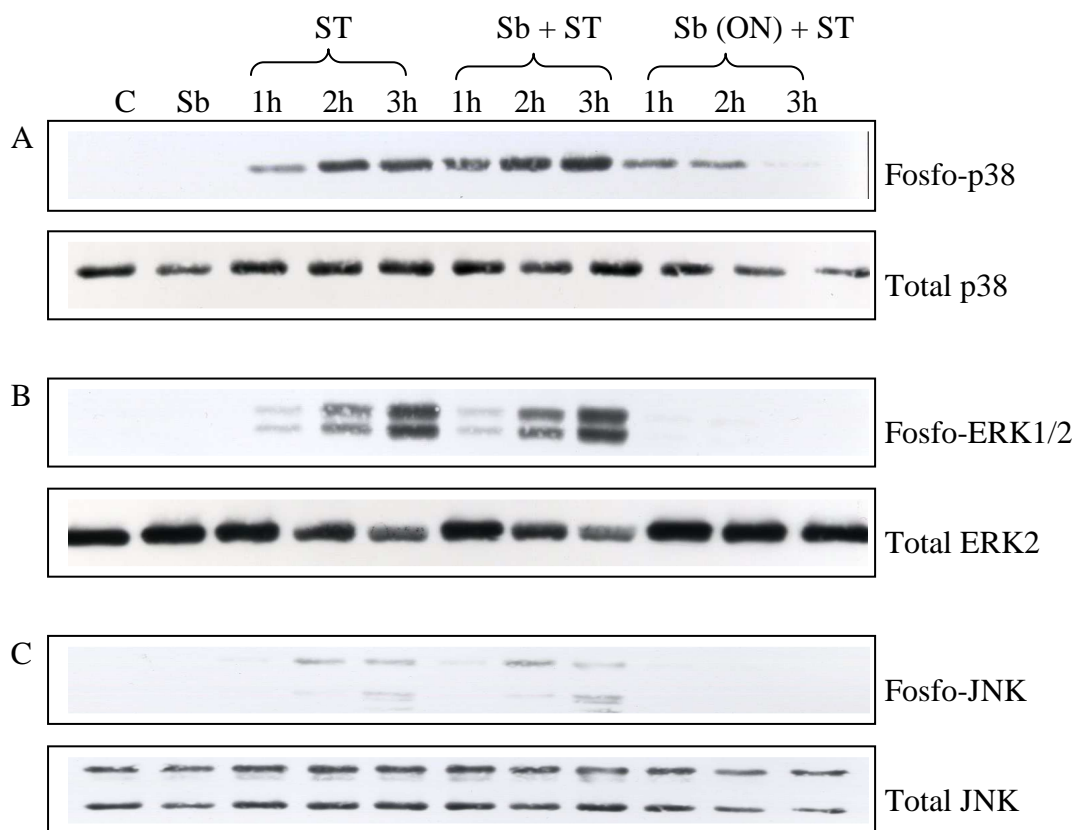


Figura 21. Efeito de *S. boulardii* (Sb) na indução da fosforilação de MAP quinases (p38, ERK1/2 e JNK) pela *Salm. Typhimurium* 14028 (ST), em células T84. As células foram lisadas após 1h, 2h e 3h de infecção com *Salm. Typhimurium* 14028 e as amostras foram corridas em SDS-PAGE e analisadas, por “imunoblotting”, com anticorpos anti-fosfo-p38 (A), anti-fosfo-ERK1/2 (B) ou anti-fosfo-JNK (C). C, controle; ON, “overnight”.

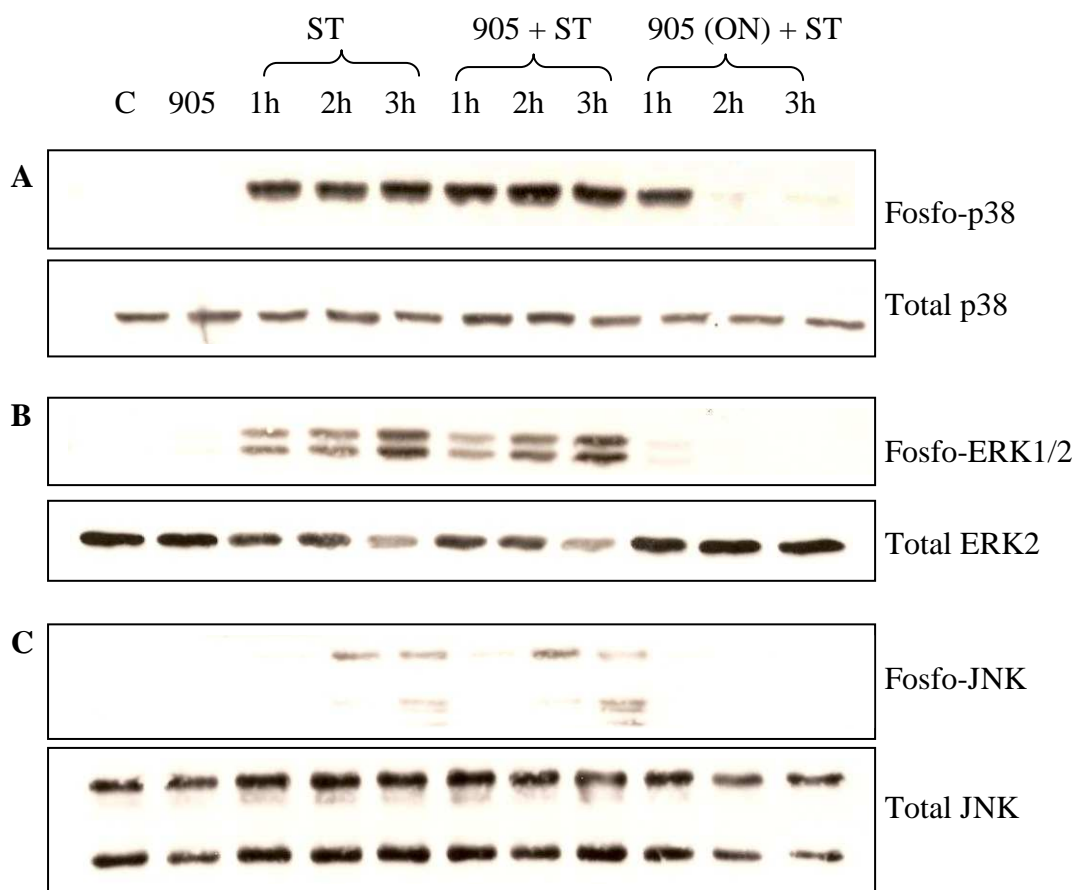


Figura 22. Efeito de *S. cerevisiae* UFMG 905 (905) na indução da fosforilação de MAP quinases (p38, ERK1/2 e JNK) pela *Salm. Typhimurium* 14028 (ST), em células T84. As células foram lisadas após 1h, 2h e 3h de infecção com *Salm. Typhimurium* 14028 e as amostras foram corridas em SDS-PAGE e analisadas, por “imunoblotting”, com anticorpos anti-fosfo-p38 (A), anti-fosfo-ERK1/2 (B) ou anti-fosfo-JNK (C). C, controle; ON, “overnight”.

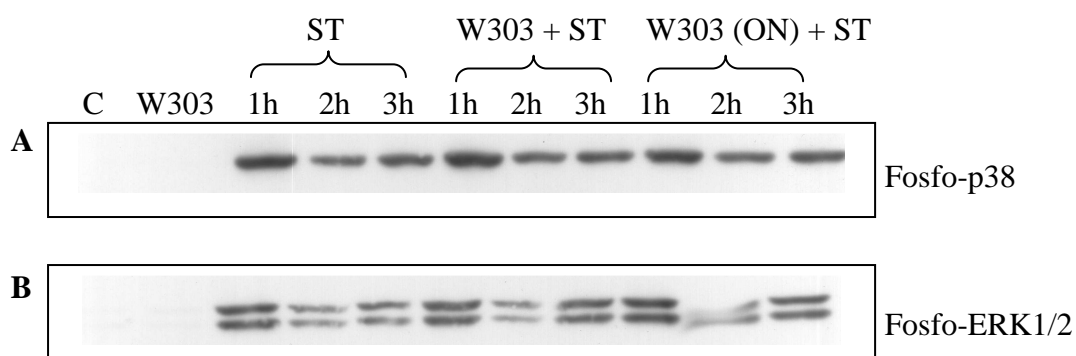


Figura 23. *Saccharomyces cerevisiae* W303 (W303) não diminui a fosforilação de MAP quinases (p38 e ERK1/2), induzidas por *Salm. Typhimurium* 14028 (ST), em células T84. As células foram lisadas após 1h, 2h e 3h de infecção com *Salm. Typhimurium* 14028 e as amostras foram corridas em SDS-PAGE e analisadas, por “imunoblotting”, com anticorpos anti-fosfo-p38 (A) ou anti-fosfo-ERK1/2 (B). C, controle; ON, “overnight”.

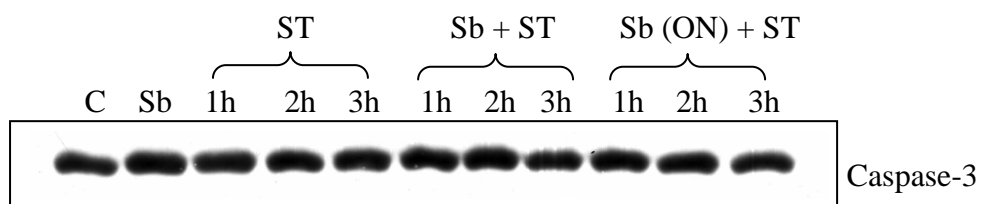


Figura 24. *Salmonella* Typhimurium 14028 (ST), na presença ou ausência de *S. boulardii* (Sb), não ativa a apoptose em células T84. As células foram lisadas após 1h, 2h e 3h de infecção com *Salm.* Typhimurium 14028 e as amostras foram corridas em SDS-PAGE e analisadas, por “imunoblotting” com anticorpo anti-caspase-3. C, controle; ON, “overnight”.

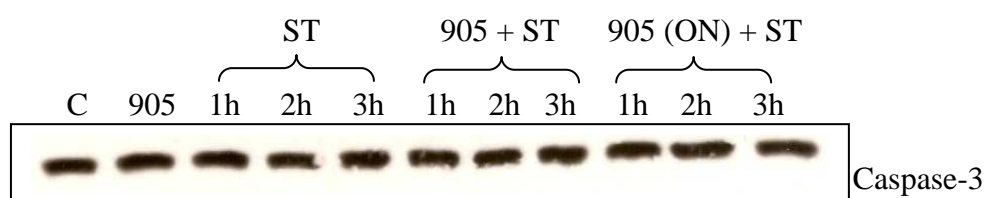


Figura 25. *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (ST), na presença ou ausência de *S. cerevisiae* UFMG 905 (905), não ativa a apoptose em células T84. As células foram lisadas após 1h, 2h e 3h de infecção com *Salm.* Typhimurium 14028 e as amostras foram corridas em SDS-PAGE e analisadas, por “imunoblotting” com anticorpo anti-caspase-3. C, controle; ON, “overnight”.

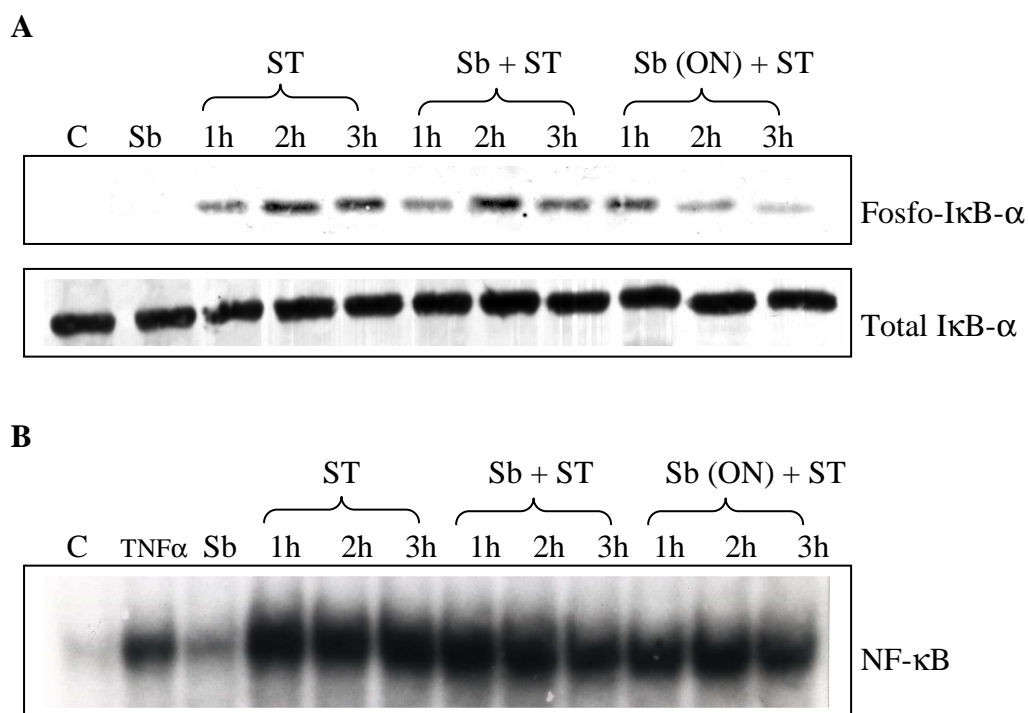


Figura 26. Efeito de *S. boulardii* (Sb) na fosforilação de IκB-α (A) e na ativação do fator NF-κB (B), induzidas por *Salm. Typhimurium* 14028 (ST), em células T84. As células foram lisadas após 1h, 2h e 3h de infecção com *Salm. Typhimurium* 14028 e as amostras foram corridas em SDS-PAGE e analisadas, por “imunoblotting”, com anticorpo anti-fosfo-IκB-α. A ligação do fator NF-κB ao DNA foi examinado pela técnica de EMSA. C, controle; TNF-α (controle positivo); ON, “overnight”.

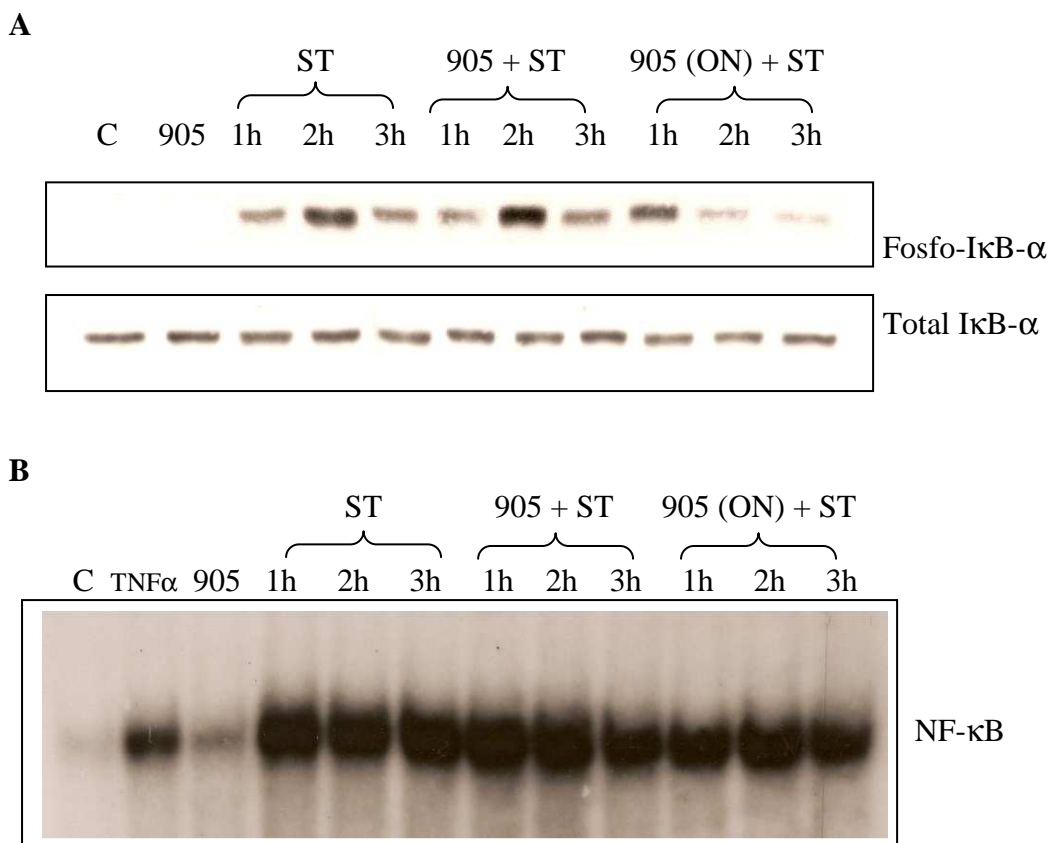


Figura 27. Efeito de *S. cerevisiae* UFMG 905 (905) na fosforilação de IκB-α (A) e na ativação do fator NF-κB (B), induzidas por *Salm. Typhimurium* 14028 (ST), em células T84. As células foram lisadas após 1h, 2h e 3h de infecção com *Salm. Typhimurium* 14028 e as amostras foram corridas em SDS-PAGE e analisadas, por “imunoblotting”, com anticorpo anti-fosfo-IκB-α. A ligação do fator NF-κB ao DNA foi examinado pela técnica de EMSA. C, controle; TNF-α (controle positivo); ON, “overnight”.

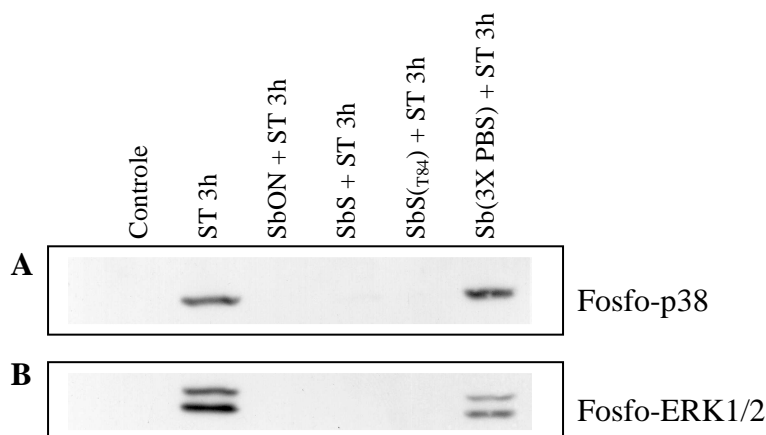


Figura 28. Efeito de *S. boulardii* (Sb) e do sobrenadante de *S. boulardii* (SbS) na indução da fosforilação de MAP quinases (p38 e ERK1/2) pela *Salm.* Typhimurium 14028 (ST), em células T84. As células foram lisadas após 3h de infecção com *Salm.* Typhimurium 14028 e as amostras foram corridas em SDS-PAGE e analisadas, por “imunoblotting”, com anticorpos anti-fosfo-p38 (A) e anti-fosfo-ERK1/2 (B). ON: “overnight”. Controle: células sem infecção; ST 3h: células infectadas com *Salm.* Typhimurium 14028 por 3h; SbON + ST 3h: células pré-incubadas com *S. boulardii* e infectadas, por 3 h, com *Salm.* Typhimurium 14028; SbS + ST 3h: meio de *S. boulardii* crescida em DMEM/F12, durante 12 horas, centrifugado, filtrado e colocado nas células na proporção de 1:1 (1 de DMEM/F12 e 1 de SbS) e infectadas com *Salm.* Typhimurium 14028, por 3h; SbS (T84) + ST 3h: SbS de *S. boulardii* crescida em presença de células T84, durante 12 horas, centrifugado, filtrado e colocado nas células na proporção de 1:1 (1 de DMEM/F12 e 1 de SbS-T84) e infectadas com *Salm.* Typhimurium 14028 por 3h; Sb (3X PBS) + ST 3h: células pré-incubadas com *S. boulardii* e lavadas 3X com PBS a 37°C, antes da infecção, para eliminar todas as leveduras no sobrenadante e, também, qualquer possível substância secretada pela levedura, e infectadas com *Salm.* Typhimurium 14028, por 3h. Obs: após lavagem com PBS, restam $9 (\pm 3,17) \times 10^5$ UFC/poço de *S. boulardii*.

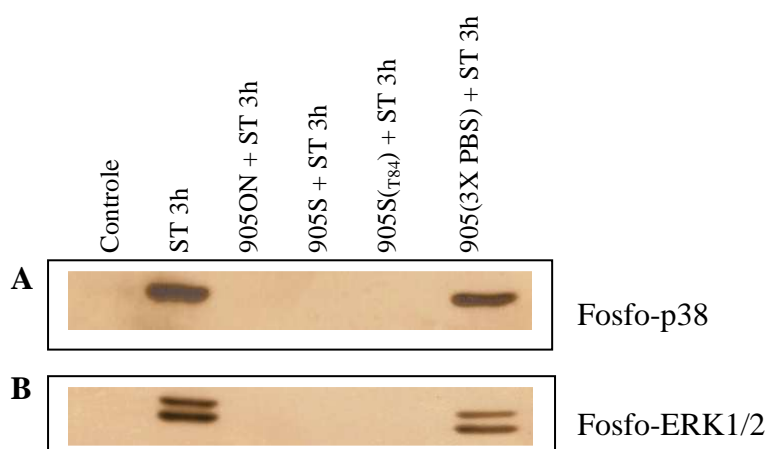


Figura 29. Efeito de *S. cerevisiae* UFMG 905 (905) e do sobrenadante de *S. cerevisiae* UFMG 905 (905S) na indução da fosforilação de MAP quinases (p38 e ERK1/2) pela *Salm. Typhimurium* 14028 (ST), em células T84. As células foram lisadas após 3h de infecção com *Salm. Typhimurium* 14028 e as amostras foram corridas em SDS-PAGE e analisadas, por “imunoblotting”, com anticorpos anti-fosfo-p38 (A) e anti-fosfo-ERK1/2 (B). ON: “overnight”. Controle: células sem infecção; ST 3h: células infectadas com *Salm. Typhimurium* 14028 por 3h; 905ON + ST 3h: células pré-incubadas com *S. cerevisiae* UFMG 905 e infectadas, por 3 h, com *Salm. Typhimurium* 14028; 905S + ST 3h: meio de *S. cerevisiae* UFMG 905 crescida em DMEM/F12, durante 12 horas, centrifugado, filtrado e colocado nas células na proporção de 1:1 (1 de DMEM/F12 e 1 de SbS) e infectadas com *Salm. Typhimurium* 14028, por 3h; 905S (T84) + ST 3h: 905S de *S. cerevisiae* UFMG 905 crescida em presença de células T84, durante 12 horas, centrifugado, filtrado e colocado nas células na proporção de 1:1 (1 de DMEM/F12 e 1 de 905S-T84) e infectadas com *Salm. Typhimurium* 14028 por 3h; Sb (3X PBS) + ST 3h: células pré-incubadas com *S. cerevisiae* UFMG 905 e lavadas 3X com PBS a 37°C, antes da infecção, para eliminar todas as leveduras no sobrenadante e, também, qualquer possível substância secretada pela levedura, e infectadas com *Salm. Typhimurium* 14028, por 3h. Obs: após lavagem com PBS, restam $8,63 (\pm 1,37) \times 10^5$ UFC/poço de *S. cerevisiae* UFMG 905.

V.9 Efeito de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 na invasão celular, em células T84, infectadas por *Salm. Typhimurium* 14028

Para explicar o modo de ação das leveduras *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905, levantou-se a hipótese de que elas poderiam modificar o crescimento bacteriano de *Salm. Typhimurium* durante a infecção. Para verificar essa hipótese, as células foram infectadas na presença ou não de uma das duas leveduras, co- e pré-incubadas e, ao final de 3 horas de infecção, uma alíquota do sobrenadante foi retirada, diluída e plaqueada em ágar MacConkey (Tabelas 3 e 4). O resultado da contagem de bactérias totais no sobrenadante permite descartar-se a hipótese levantada, uma vez que o número de bactérias não foi modificado de uma maneira estatisticamente significativa, tanto na presença de *S. boulardii* (Tabela 3), quanto na presença de *S. cerevisiae* UFMG 905 (Tabela 4), independentemente de a levedura ter sido pré-incubada ou incubada no momento da infecção bacteriana.

Ao contrário do que foi observado nos resultados com as MAPKs (Figuras 28 e 29), as substâncias secretadas pelas leveduras não são eficazes a ponto de impedir um crescimento bacteriano. Trabalhando com *S. boulardii* e EHEC, e utilizando o mesmo modelo celular, DAHAN *et al.* (2003) encontraram resultados semelhantes aos nossos, mostrando que a levedura *S. boulardii* não é capaz de influenciar o crescimento bacteriano. Nossos resultados vão ao encontro daqueles descritos por RODRIGUES *et al.* (1996). Trabalhando com animais isentos de germes, esses autores mostraram que a levedura *S. boulardii* não é capaz de inibir o crescimento de *Salm. Typhimurium*, *S. flexneri* e nem de *E. coli*. MARTINS (2004), trabalhando com *S. cerevisiae* UFMG 905 e 6 diferentes bactérias patogênicas (*Salm. Typhimurium*, *S. flexneri*, *E. coli*, *V. cholerae*, *C. difficile* e *C. perfringens*) demonstrou que essa levedura não era capaz de inibir, *in vivo*, o crescimento de patógenos.

PECQUET *et al.* (1991), também trabalhando com *S. cerevisiae*, observaram que a levedura não era capaz de inibir o crescimento de *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* e *C. difficile*, em camundongos GN. Apesar de ser muito bem descrito na literatura que a levedura *S. boulardii* não exibe, como mecanismo de ação, a inibição do crescimento de patógenos, *in vivo*, SCEVOLA *et al.* (2003) demonstraram que uma linhagem de *S. cerevisiae* conseguia diminuir a população de *Candida* spp. em alguns voluntários humanos. DUCLUZEAU & BENSADA (1982) observaram que *S. boulardii* foi capaz de diminuir os níveis

populacionais de algumas espécies de *Candida*, tanto curativa quanto preventivamente e, que este antagonismo desaparecia quando a levedura era inativada por calor.

Uma vez que a adesão celular é a primeira etapa da patogenia de bactérias entero-aderentes, como é o caso da *Salm. Typhimurium* e das EHEC, avaliou-se o efeito das leveduras *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 na adesão e na invasão bacteriana. Para isso, utilizou-se o método de proteção pela gentamicina. Após 3 horas de infecção, metade das células foram lavadas com PBS, para eliminar todas as bactérias não aderidas, lisadas, vortexadas, diluídas e plaqueadas em ágar MacConkey. A outra metade foi tratada com meio contendo gentamicina (um antibiótico que não entra nas células), durante uma hora, para eliminar todas as bactérias exteriores, deixando as bactérias intracelulares vivas. Após esse tempo, as células foram lavadas extensivamente com PBS, para eliminar todo o antibiótico residual, lisadas com tripsina, vortexadas, diluídas e plaqueadas em ágar MacConkey. A porcentagem de invasão celular foi calculada do seguinte modo: porcentagem de invasão = número de bactérias intracelulares / número de bactérias associadas às células (aderentes e intracelulares), conforme descrito por FALKOW *et al.* (1987). Os resultados estão mostrados nas Tabelas 3 e 4.

A Tabela 3 mostra que não houve uma diferença estatisticamente significativa no número de bactérias aderidas às células, na presença ou não de *S. boulardii*; entretanto, o número de bactérias intracelulares foi, aproximadamente, 19 vezes menor e, a porcentagem de invasão, 32 vezes menor, no grupo pré-tratado com *S. boulardii* e infectado com *Salm. Typhimurium* 14028, em relação ao grupo que continha apenas *Salm. Typhimurium* 14028. A Tabela 4 mostra que também não houve uma diferença estatística no número de bactérias aderidas às células, na presença ou não de *S. cerevisiae* UFMG 905. O número de bactérias intracelulares foi, aproximadamente, 21 vezes menor e a porcentagem de invasão foi 8,4 vezes menor, no grupo pré-tratado com *S. cerevisiae* UFMG 905 e infectado com *Salm. Typhimurium* 14028, em relação ao grupo que continha apenas a bactéria.

A porcentagem de invasão de *Salm. Typhimurium* encontrada em nossos resultados vão ao encontro daqueles descritos por RAFFATELLU *et al.* (2005). RODRIGUES (2000) já havia mostrado o efeito de *S. boulardii* na invasão de *Salm. Typhimurium* em camundongos. Resultados encontrados na primeira parte do nosso trabalho mostraram que *S. cerevisiae* UFMG 905 é capaz de diminuir ou inibir a translocação de *Salm. Typhimurium*, em camundongos gnotobióticos e convencionais.

Para tentar explicar a modulação exercida pelas duas leveduras nas vias de sinalização celular, RTE, níveis de IL-8 e demais resultados encontrados, várias hipóteses podem ser levantadas. Uma primeira explicação poderia ser o efeito das leveduras no crescimento bacteriano, o que, pelos resultados obtidos, foi descartada. Entretanto, como as leveduras influenciam a quantidade de bactérias intracelulares, duas hipóteses foram, a princípio, levantadas. Uma primeira hipótese, é que a levedura influenciaria nos mecanismos de invasão bacteriana e, uma segunda hipótese, é que, ao se ligarem às células intestinais, as leveduras diminuiriam a quantidade de receptores livres para as bactérias e, parte dessas bactérias se ligaria às leveduras, e não às células, o que diminuiria o número de bactérias internalizadas nas células intestinais.

Para testar a primeira hipótese, avaliou-se a influência das leveduras na ativação de duas proteínas regulatórias (Rac1 e Cdc42), que são responsáveis pelos rearranjos dos filamentos de actina que possibilitam a internalização bacteriana. Para isso, as células foram infectadas, na presença ou não de uma das leveduras. Ao final da infecção, as células foram lisadas, as proteínas separadas por SDS-PAGE, transferidas para as membranas e incubadas com anticorpos, anti-fosfo-Cdc42 e anti-fosfo-Rac1, e reveladas. A Figura 30 mostra o efeito de *S. boulardii* na ativação das vias Rac e Cdc42 induzidas pela *Salm. Typhimurium* 14028. Pelos resultados, podemos observar que *S. boulardii* foi eficaz ao inibir a fosforilação da proteína Rac pela *Salm. Typhimurium* 14028. Entretanto, o mesmo resultado não foi observado para Cdc42. Quando se utilizou a levedura *S. cerevisiae* UFMG 905 no lugar de *S. boulardii*, não foi observada a inibição da fosforilação de nenhuma das duas proteínas (dados não mostrados). Os resultados sugerem que o mecanismo de diminuição de invasão da *Salm. Typhimurium* 14028 pela levedura *S. boulardii* pode estar relacionado com a inibição da ativação de Rac pela *S. boulardii*. Para a levedura *S. cerevisiae* UFMG 905, um outro mecanismo pode estar implicado na diminuição da invasão de *Salm. Typhimurium* 14028, sugerindo que os mecanismos de ação das duas leveduras, nesse caso, sejam distintos.

A infecção por *Salm. Typhimurium* envolve invasão das células epiteliais intestinais, indução de um infiltrado inflamatório e uma eventual erosão da arquitetura da mucosa (SANTOS *et al.*, 2001). Análises genéticas mostraram que a expressão de SPII-TTSS e a translocação de proteínas efetoras são requeridas para o processo de invasão bacteriana de células epiteliais, assim como a produção de enterite em modelos animais (GALÁN, 2001; ZHANG *et al.*, 2002). A retirada da *Salmonella* pelas células não fagocíticas do epitélio intestinal envolve uma série de mudanças complexas no

citoesqueleto de actina, que é induzida pelas proteínas efetoras translocadas. Três processos bioquímicos podem ser citados: (1) a ativação de pequenas proteínas regulatórias do citoesqueleto: Cdc42 e Rac1; (2) a interação dos efetores bacterianos com a actina promovendo a polimerização e empacotamento de filamentos de actina; e (3) a restauração do citoesqueleto, após a invasão bacteriana.

A invasão pela *Salmonella* é caracterizada pela formação de “ruffles” na membrana, levando à macropinocitose e engolfamento da bactéria, numa espécie de vacúolo conhecido como SVC. Os efetores SopB, SopE e SopE2 estão envolvidos na ativação das GTPases da família Rho, Cdc42 e Rac1 (HARDT *et al.*, 1998; ZHOU *et al.*, 2001). As proteínas G específicas requeridas para a invasão da *Salmonella* parecem se diferenciar, dependendo do tipo e da orientação. SopB é uma inositol 3-fosfato que aumenta os níveis de (1,4,5,6)P₄, levando à ativação de Cdc42 (ZHOU *et al.*, 2001). SopE e SopE2 são fatores de troca de nucleotídeos guanina para Cdc42 e Rac1 (HARDT *et al.*, 1998; STENDER *et al.*, 2000). SopE é codificado em um fago lisogênico e está presente apenas em algumas amostras de serovar Typhimurium, enquanto SopE2 está presente em todo o gênero *Salmonella* (STENDER *et al.*, 2000). A ativação de Cdc42 e Rac1 leva ao recrutamento e ativação das famílias de proteínas WASP e Scar/WAVE, que, juntas com o complexo Arp2/3, estão envolvidas no início da polimerização de actina (CRISS & CASANOVA, 2003). A perda das funções combinadas de SopB e SopE/E2 resulta em danos no processo de invasão. Junto com a ativação da proteína G, a *Salmonella* transloca duas proteínas ligadoras de actina, SipA e SipC (MCGHIE *et al.*, 2001; HAYWARD & KORONAKISS, 2002). SipC é também requerido para a função de translocação de SPI1-TTSS e é inserido na membrana da célula alvo. Sua localização na membrana pode direcionar a formação de filamentos de actina, em locais apropriados, em posição adjacente à bactéria invasora (HAYWARD & KORONAKIS, 1999; MCGHIE *et al.*, 2001). O papel exato da atividade de ligação de SipC à actina ainda não foi descoberto geneticamente, uma vez que mutantes para SipC não conseguem transportar todo o aparato efector de SPI1-TTSS. Estudos mostraram que SipA se liga a subunidades de actina, formando filamentos estáveis (LILIC *et al.*, 2003). Tudo indica que SipA e SipC agem em parceria, promovendo a polimerização de actina e o empacotamento de F-actina, nos locais de invasão bacteriana. Dessa maneira, o recrutamento da maquinaria Arp2/3, mediado pela proteína G, junto com a ligação de actina localizada mediada por SipA e SipC, resulta na polimerização de actina, que conduz ao engolfamento da bactéria.

A *Salmonella* também transporta a proteína SptP, que é responsável em reverter os rearranjos do citoesqueleto induzidos durante a invasão (GALÁN, 2001). SptP é uma proteína bi-funcional com um domínio ativador de GTPase (GAP), na região N-terminal, e atividade tirosina fosfatase na região C-terminal (FU & GALÁN, 1999; MURLI *et al.*, 2001). A função GAP reverte a ativação das proteínas G, Cdc42 e Rac, e é responsável por restaurar a arquitetura normal do citoesqueleto, logo após a invasão da *Salmonella* (FU & GALÁN, 1999). A fosforilação de tirosina das proteínas do hospedeiro também parece estar envolvida na invasão, assim como a transdução de sinais nucleares na expressão de genes inflamatórios (MURLI *et al.*, 2001). Todos esses processos são revertidos pela atividade tirosina fosfatase presente na região C-terminal do SptP (KUBORI & GALÁN, 2003).

Para testar a segunda hipótese, de ligação da *Salmonella* em sítios das leveduras *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905, foram utilizadas técnicas de microscopia confocal e microscopia eletrônica. Os resultados são mostrados nas Figuras 31, 32 e 33.

As Figuras 31 e 32 apresentam fotos de microscopia eletrônica de varredura mostrando a ligação de *Salm. Typhimurium* 14028 em células de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905, respectivamente. A Figura 33 mostra uma foto de microscopia confocal, onde podemos observar a ligação de *Salm. Typhimurium* 14028 em *S. boulardii*.

GEDEK & AMSELGRUBER (1990) e GEDEK (1999) já haviam mostrado a adesão de *E. coli* O157 e de *Salm. Typhimurium* DT 104 à superfície de *S. boulardii*. PEREZ-SOTELO *et al.* (2005) mostraram que bactérias patogênicas, como *E. coli* e *Salmonella* spp., foram capazes de se ligar a uma linhagem de *S. cerevisiae* utilizada em nutrição animal, sugerindo que esse pode ser um provável mecanismo pelo qual os animais tratados com essa levedura se tornem mais resistentes às infecções por essas bactérias.

Resultados de outros autores (BRANDÃO *et al.*, 1998, NEVES *et al.*, 2002) sugerem que *S. boulardii* também possui receptores para toxinas bacterianas. OATLEY *et al.* (2000) e GRATZ *et al.* (2005) mostraram que a aflatoxina B1 foi capaz de se ligar em bifidobactéria e em *Lactobacillus* e *Propionibacterium*.

Bactérias do gênero *Salmonella* desenvolveram diversos mecanismos anti-inflamatórios, como a via PI3K/Akt (phosphatidylinositol-3-kinase), que podem contribuir para a manutenção da infecção, uma vez que a bactéria foi englobada pela

célula, via TTSS (HUANG *et al.*, 2005). As Figuras 34 e 35 mostram que as duas leveduras são capazes de inibir essa via ativada pela *Salmonella*.

Akt, também conhecido como PKB ou Rac, desempenha um importante papel no controle do balanço entre a sobrevivência e a apoptose. Essa proteína quinase é ativada por insulina e por diversos fatores de crescimento e sobrevivência e, promove a sobrevivência celular, inibindo a apoptose, devido à sua habilidade em fosforilar e inativar diversos alvos, incluindo caspase-9, c-Raf e Bad. Uma vez estimulado, Akt é recrutado do citosol, em uma conformação inativa, para as membranas celulares. Entretanto, sua atividade não é estimulada apenas por sua translocação, mas sim, dependente, também, da fosforilação em dois resíduos (Thr308 e Ser473). A fosforilação e ativação de Akt por *Salm. Typhimurium* é absolutamente dependente da secreção de SopB (também conhecido por SipD) pelo SPI1-TTSS (STEELE-MORTIMER *et al.*, 2000). Essa proteína efetora desfosforila uma variedade de inositol-fosfatos solúveis, assim como inositol-fosfolípidos, e converte inositol 1,3,4,5,6-pentafosfato [Ins(1,3,4,5,6)P₅] em inositol 1,4,5,6-tetrafosfato [Ins(1,4,5,6)P₄]. KNODLER *et al.* (2005) observaram que, em células epiteliais infectadas por *Salmonella*, a apoptose foi bloqueada, e demonstraram que SopB possui uma atividade anti-apoptótica dependente da atividade fosfatase de SopB e da presença de Akt. HUANG *et al.* (2005) observaram que a inibição da via PI3K/Akt, em células T84, resultava em um aumento dos níveis de IL-8, em células infectadas por *Salm. Typhimurium*, indicando que a ativação dessa via, como um sinal anti-inflamatório, pode contribuir para o estabelecimento da *Salmonella* no intestino.

Tabela 3. Efeito de *S. boulardii* na adesão e invasão de *Salm. Typhimurium* 14028, em células T84.

Tratamento celular	Média ± Desvio-padrão			% Invasão
	Bactérias associadas	Bactérias	Bactérias totais no	
	às células (x 10 ⁶ UFC/poço)	intracelulares (x 10 ⁵ UFC/poço)	sobrenadante (x 10 ⁸ UFC/poço)	
<i>Salm. Typhimurium</i> 14028	2,25 ± 0,21	3,00 ± 0,30	1,62 ± 0,79	11,78 ± 0,90
<i>S. boulardii</i> + <i>Salm. Typhimurium</i> 14028	3,80 ± 0,52	2,00 ± 0,13	1,88 ± 0,51	5,12 ± 0,64*
<i>S. boulardii</i> (ON) + <i>Salm. Typhimurium</i> 14028	4,56 ± 0,10	0,16 ± 0,07	1,85 ± 0,42	0,37 ± 0,20*

As células foram infectadas durante 3h, com a *Salm. Typhimurium* 14028 (~100 bactérias/célula), na presença ou ausência de *S. boulardii* (~10 leveduras/célula), co- e pré incubada. O teste de invasão foi realizado pelo método de proteção pela gentamicina. * $P < 0,05$. ON, “overnight”.

Tabela 4. Efeito de *S. cerevisiae* UFMG 905 na adesão e invasão de *Salm. Typhimurium* 14028, em células T84.

Tratamento celular	Média ± Desvio-padrão			% Invasão
	Bactérias associadas	Bactérias	Bactérias totais no	
	às células (x 10 ⁷ UFC/poço)	intracelulares (x 10 ⁵ UFC/poço)	sobrenadante (x 10 ⁸ UFC/poço)	
<i>Salm. Typhimurium</i> 14028	2,61 ± 0,32	5,70 ± 0,10	1,62 ± 0,79	2,16 ± 0,46
<i>S. cerevisiae</i> 905 + <i>Salm. Typhimurium</i> 14028	2,30 ± 0,21	3,85 ± 0,75	1,79 ± 0,40	1,68 ± 0,51
<i>S. cerevisiae</i> 905 (ON) + <i>Salm. Typhimurium</i> 14028	1,15 ± 0,25	0,27 ± 0,11	1,81 ± 0,18	0,26 ± 0,18*

As células foram infectadas durante 3h, com a *Salm. Typhimurium* 14028 (~100 bactérias/célula), na presença ou ausência de *S. cerevisiae* UFMG 905 (~10 leveduras/célula), co- e pré incubada. O teste de invasão foi realizado pelo método de proteção pela gentamicina. * $P < 0,05$. ON, overnight.

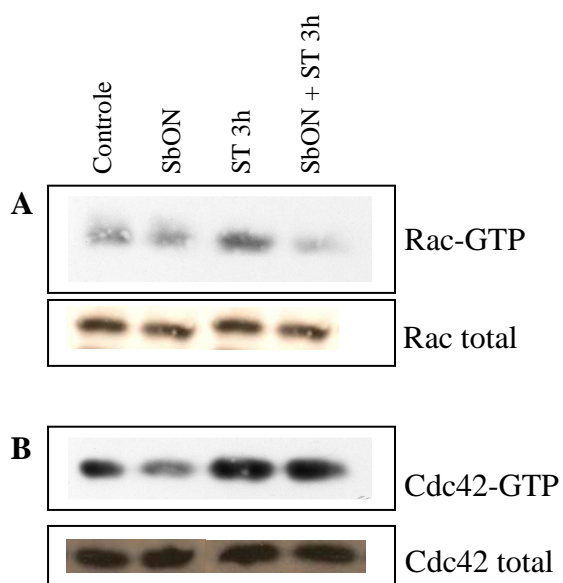


Figura 30. Efeito de *S. boulardii* (Sb) na ativação das vias Rac e Cdc42 induzidas pela *Salm. Typhimurium* 14028 (ST), em células T84. As células foram lisadas, após 3h de infecção com *Salm. Typhimurium* 14028, e as amostras foram corridas em SDS-PAGE e analisadas, por “imunoblotting” com anticorpos anti-Rac (A) ou anti-Cdc42 (B). ON, “overnight”.

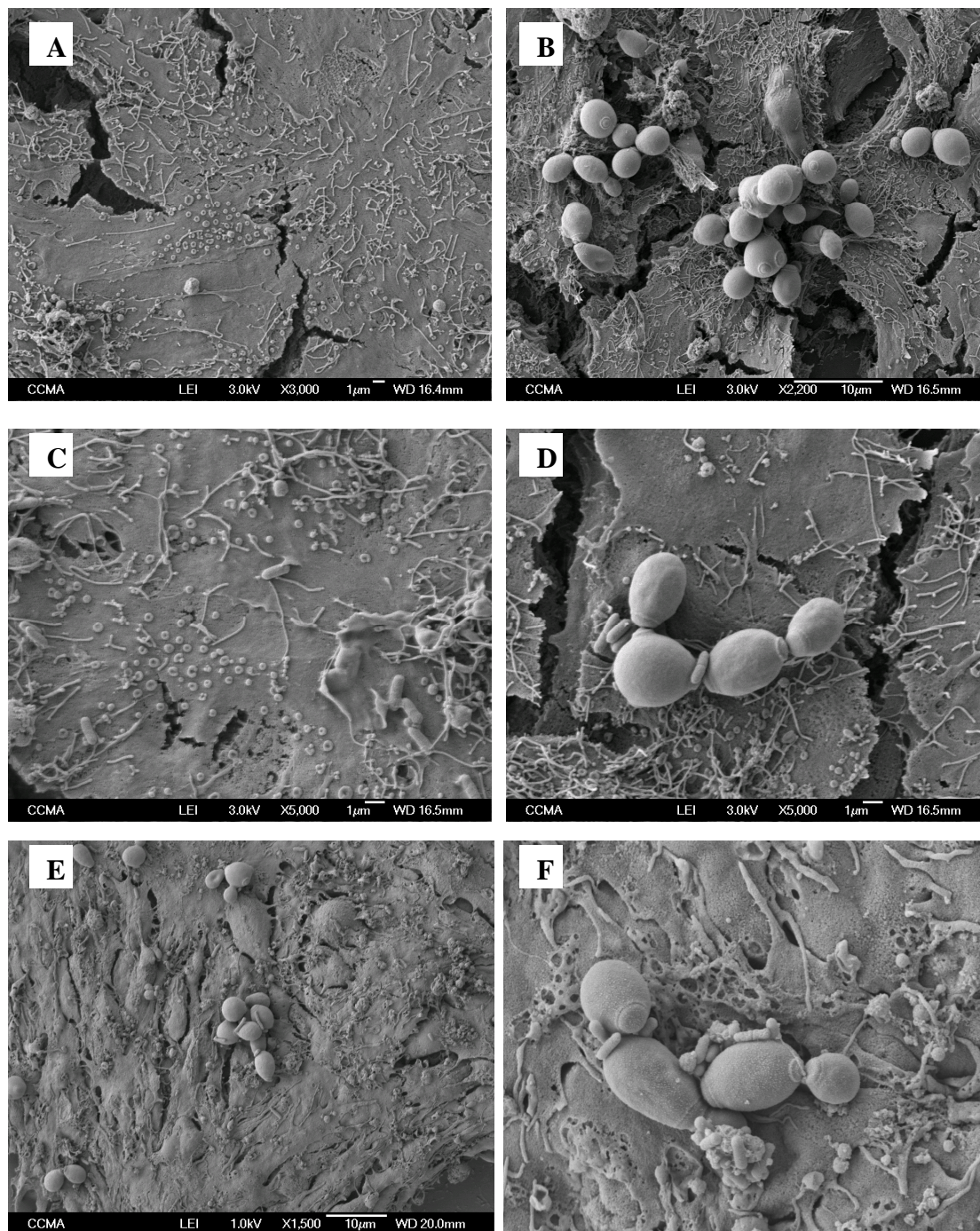


Figura 31. Microscopia eletrônica de varredura mostrando a ligação de *Salm. Typhimurium* 14028 em células de *S. boulardii*. (A) Controle (apenas células T84); (B) Células contendo apenas *S. boulardii*; (C) Células contendo *Salm. Typhimurium* 14028; (D, E, F) Células mostrando ligação de *Salm. Typhimurium* 14028 em *S. boulardii*.

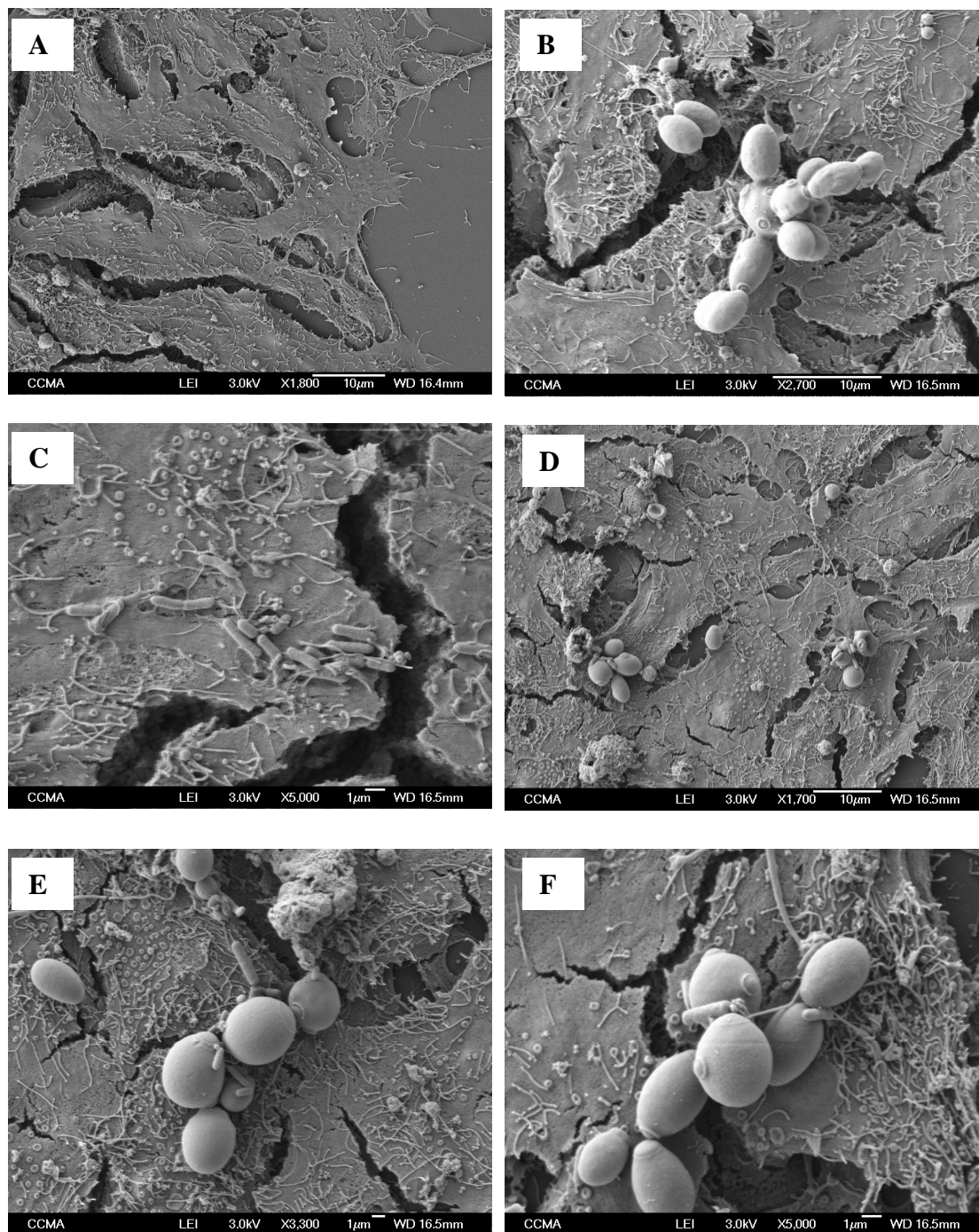


Figura 32. Microscopia eletrônica de varredura mostrando a ligação de *Salm. Typhimurium* 14028 em células de *S. cerevisiae* UFMG 905. (A) Controle (apenas células T84); (B) Células contendo apenas *S. cerevisiae* UFMG 905; (C) Células contendo *Salm. Typhimurium* 14028; (D, E, F) Células mostrando ligação de *Salm. Typhimurium* 14028 em *S. cerevisiae* UFMG 905.

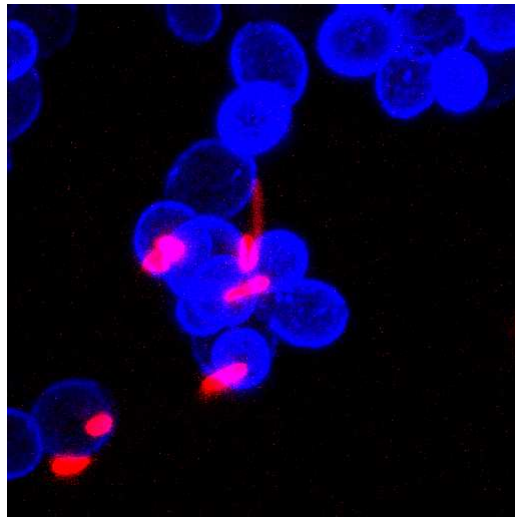


Figura 33. Microscopia confocal mostrando a ligação de *Salm. Typhimurium* 14028 (vermelho) em células de *S. boulardii* (azul).

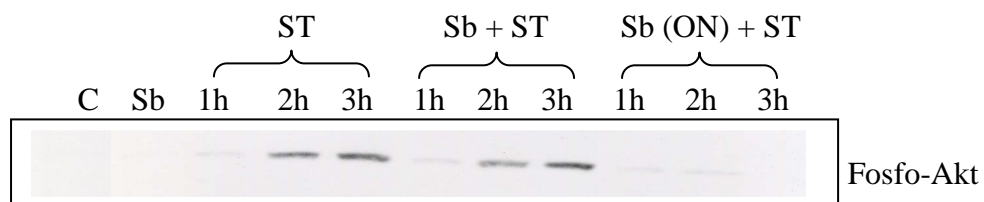


Figura 34. Efeito de *S. boulardii* (Sb), na indução da via PI3K-Akt (phosphatidylinositol-3-kinase) pela *Salm. Typhimurium* 14028 (ST), em células T84. As células foram lisadas após 1h, 2h e 3h de infecção com *Salm. Typhimurium* 14028 e as amostras foram corridas em SDS-PAGE e analisadas, por “imunoblotting” com anticorpo anti-fosfo-Akt. C, controle; ON, “overnight”.

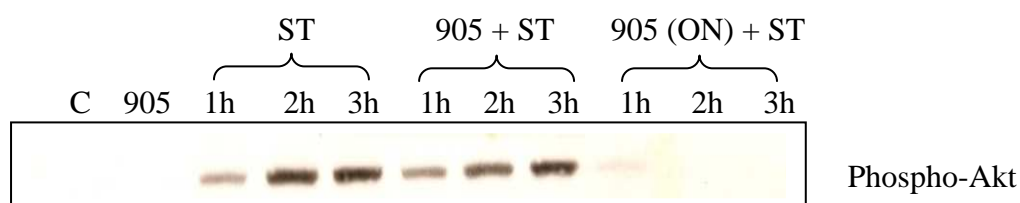


Figura 35. Efeito de *S. cerevisiae* UFMG 905 (905) , na indução da via PI3K-Akt (phosphatidyl-inositol-3-kinase) pela *Salm.* Typhimurium 14028 (ST), em células T84. As células foram lisadas após 1h, 2h e 3h de infecção com *Salm.* Typhimurium 14028 e as amostras foram corridas em SDS-PAGE e analisadas, por “imunoblotting” com anticorpo anti-fosfo-Akt. C, controle; ON, “overnight”.

VI - SÍNTESE DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos podem ser resumidos como a seguir:

VI.01 A levedura *S. cerevisiae* UFMG 905 é capaz de translocar, em níveis baixos, para as placas de Peyer, em animais GN, e para as placas de Peyer e linfonodos mesentéricos, em animais CV, após 10 dias de monoassociação ou tratamento, respectivamente.

VI.02 *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 diminui a translocação de *Salm. Typhimurium* para o baço e linfonodos mesentéricos e retarda a translocação dessa bactéria para o fígado, em animais GN, e inibe a translocação para os linfonodos mesentéricos, baço e fígado, em animais CV, após 5 e 10 dias de desafio.

VI.03 *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 estimula o aumento de células de Küpffer, em animais GN, após 10 dias de monoassociação.

VI.04 *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 estimula o sistema fagocítico de camundongos GN, o que é comprovado pelo aumento da capacidade de clareamento do sangue, quando do desafio endovenoso com uma bactéria Gram-negativo.

VI.05 *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 estimula o aumento dos níveis de sIgA, no fluido intestinal, e de IgA e IgM, no soro de animais GN, após 10 dias de monoassociação.

VI.06 *Saccharomyces boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 mantêm a integridade das células do epitélio intestinal, após infecção com *Salm. Typhimurium* 14028.

VI.07 *Saccharomyces boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 exercem um efeito preventivo na produção de IL-8, durante uma infecção por *Salm. Typhimurium* 14028, em células do cólon.

VI.08 *Saccharomyces boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 diminuem e/ou bloqueiam as MAPKs ativadas em células epiteliais, após infecção por *Salm. Typhimurium* 14028, sendo esse efeito das duas leveduras, uma vez que a linhagem de laboratório, *S. cerevisiae* W303, não foi capaz de exercer esse mesmo efeito.

VI.09 *Saccharomyces boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 não diminuem a ativação do principal fator de transcrição para IL-8, o NF- κ B.

VI.10 O efeito benéfico de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 pode ser devido à produção de substância(s) anti-inflamatória(s), uma vez que o sobrenadante das leveduras foi capaz de bloquear a ativação das MAPKs p38 e ERK1/2.

VI.11 *Saccharomyces boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 diminuem a porcentagem de invasão celular pela *Salm. Typhimurium* 14028 e essa diminuição está relacionada à diminuição da via Rac-1 (para *S. boulardii*) ativada pela *Salm. Typhimurium* 14028 e à capacidade da bactéria em se ligar às leveduras (para *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905), ao invés de se ligar à célula epitelial.

VI.12 *Saccharomyces boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 inibem a ativação da via PI3K/Akt, que é uma via ativada pela *Salm. Typhimurium* 14028, após a sua internalização e que contribui para a manutenção da infecção.

VII - CONCLUSÕES

Sustentado pelos resultados encontrados, podemos concluir que:

VII.1 Tanto *S. boulardii* quanto *S. cerevisiae* UFMG UFMG 905 são capazes de reduzir os efeitos patogênicos de *Salm. Typhimurium*, durante infecções experimentais, em camundongos e em culturas celulares.

VII.2 Essa redução dos efeitos patogênicos da *Salm. Typhimurium* parece resultar de uma estimulação do sistema imune e supressão de sinais intracelulares gerados pela infecção.

VIII - PERSPECTIVAS

Após todos os resultados obtidos, temos como perspectivas:

VIII.1 Uma vez que a levedura *S. cerevisiae* UFMG 905 possui um efeito imunomodulador e um efeito benéfico em camundongos desafiados com *Salm. Typhimurium*, seria interessante verificar esse efeito em outras infecções bacterianas, além de estudar os outros mecanismos de ação para, posteriormente, passarmos para ensaios clínicos.

VIII.2 Como as duas leveduras (*S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905) possuem um efeito na inflamação e nas vias envolvidas nessa inflamação desencadeada pela *Salm. Typhimurium* em células do epitélio intestinal, seria interessante verificar se todos esses mecanismos se repetem num modelo *in vivo*.

VIII.3 Uma vez que a levedura *S. boulardii* está envolvida na inibição da via Rac ativada pela *Salm. Typhimurium*, é de interesse verificar se a levedura está implicada em outros mecanismos de invasão utilizados pela bactéria.

VIII.4 Evidenciado o efeito anti-inflamatório das duas leveduras pela produção de substâncias que inibem a ativação de MAPKs pela *Salm. Typhimurium*, pode-se estudar o efeito desse sobrenadante das leveduras, na inflamação e na invasão, além de identificar quais são as substâncias responsáveis por esse efeito.

VIII.5 Além de todas as perspectivas citadas, também será importante verificar outros mecanismos de ação das leveduras responsáveis pela diminuição da inflamação, como uma imunomodulação, via produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10.

VIII.6 Após o estudo dos mecanismos de ação da levedura *S. cerevisiae* UFMG 905, realizar ensaios clínicos.

IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5ª. Edição. Rio de Janeiro, Elsevier, 2005.

ADLERBERTH, I.; CARLSSON, B.; DE MAN, P.; JALIL, F.; KHAN, S.R.; LARSSON, P.; MELLANDER, L.; SVANBORG, C.; WOLD, A.E.; HANSSON, L.A. Intestinal colonization of enterobacteriaceae in Pakistani and Swedish hospital delivered children. **Acta. Paediatr. Scan.**, v. 80, p. 602-610, 1991.

AIBA, Y.; SUZUKI, N.; KABIR, A.M.; TAKAGI, A.; KOGA, Y. Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 93, p. 2097-2101, 1998.

AIHARA, M.; TSUCHIMOTO, D.; TAKIZAWA, H.; AZUMA, A.; WAKEBE, H.; OHMOTO, Y.; IMAGAWA, K.; KIKUCHI, M.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K. Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. **Infec. Immun.**, v. 65, p. 3218-3224, 1997.

ALAM, M.; MIDTVEDT, T.; URIBE, A. Differential cell kinetics in the ileum and colon of germ-free rats. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 29, p. 445-451, 1994.

ALANDER, M.; SATOKARI, R.; KORPELA, R.; SAXELIN, M.; VILPPONEN-SALMELA, T.; MATTILA-SANDHOLM, T.; VON WRIGHT, A. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 351-354, 1999.

ALDRIDGE, P.D.; GRAY, M.A.; HIRST, B.H.; ANJAM KHAN, C.M. Who's talking to whom? Epithelial-bacterial pathogen interactions. **Mol. Microbiol.**, v. 55, p. 655-663, 2005.

ALTMAYER, R.M.; MCNERM, J.K.; BOSSIO, J.C.; ROSENSHINE, I.; FINLAY, B.B.; GALÁN, J.E. Cloning and molecular characterization of a gene involved in *Salmonella* adherence and invasion of cultured epithelial cells. **Mol. Microbiol.**, v. 7, p. 89-98, 1993.

ANDERSON, J.M.; BALDA, M.S.; FANNING, A.S. The structure and regulation of tight junctions. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 5, p. 772-778, 1993.

ANDREMONT, A.; RAIBAUD, P.; TANCRÉDE, C.; DUVALIFLAH, Y.; DUCLUZEAU, R. The use of germ-free mice associated with human fecal flora as an animal model to study enteric bacterial interactions. **Bact. Diarrh. Dis.**, v. 22, p. 219-228, 1985.

ARMUZZI, A.; CREMONINI, F.; OJETTI, V.; BARTOLOZZI, F.; CANDUCCI, F.; CANDELLI, M.; SANTARELLI, L.; CAMMAROTA, G.; DE LORENZO, A.; POLA, P.; GASBARRINI, G.; GASBARRINI, A. Effect of *Lactobacillus* GG supplementation on antibiotic-associated gastrointestinal side effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy: a pilot study. **Digestion**, v. 63, p. 1-7, 2001.

ARNOLD, J.R.; BOOR, P.J. Improved transmission electron microscopy (TEM) of cultured cells through a "floating sheet" method. **J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.**, v. 94, p. 30-36, 1986.

ARVOLA, T.; MOILANEN, E.; VUENTO, R.; ISOLAURI, E. Weaning to hypoallergenic formula improves gut barrier function in breast-fed infants with atopic eczema. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 38, p. 92-96, 2004.

ASAHARA, T.; NOMOTO, K.; WATANUKI, M.; YOKOKURA, T. Antimicrobial activity of intraurethrally administered probiotic *Lactobacillus casei* in a murine model of *Escherichia coli* urinary tract infection. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, p. 1751-1760, 2001.

ASHBURNER, B.P.; WESTERHEIDE, S.D.; BALDWIN JR., A.S. The p53 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. **Mol. Cell. Biol.**, v. 21, p. 7065-7077, 2001.

ATHMAN, R.; PHILPOTT, D. Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 7, p. 25-32, 2004.

BAGGIOLINI, M.; CLARK-LEWIS, I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. **FEBS Lett.**, v. 307, p. 97-101, 1992.

BALMER, S.E.; WHARTON, B.A. Diet and faecal flora in the newborn: breast milk and infant formula. **Arch. Dis. Child.**, v. 64, p. 1672-1677, 1989.

BAMBOU, J.C.; GIRAUD, A.; MENARD, S.; BEGUE, B.; RAKOTOBE, S.; HEYMAN, M.; TADDEI, F.; CERF-BENSUSSAN, N.; GABORIAU-ROUTHIAU, V. *In vitro* and *ex vivo* activation of the TLR5 signaling pathway in intestinal epithelial cells by a commensal *Escherichia coli* strain. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 42984-42992, 2004.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeast: Characteristics and Identification**, 3rd ed., Cambridge University Press, Cambridge, 2000.

BARTLETT, J.G. Antibiotic-associated diarrhea. **Clin. Infect. Dis.**, v. 15, p. 573-581, 1992.

BASSETTI, S.; FREI, R.; ZIMMERLI, W. Fungemia with *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with *Saccharomyces boulardii*. **Am. J. Med.**, v. 105, p. 71-72, 1998.

BAUD, V.; LIU, Z.G.; BENNETT, B.; SUZUKI, N.; XIA, Y.; KARIN, M. Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. **Genes Dev.**, v. 13, p. 1297-1308, 1999.

BAUTISTA-GARFIAS, C.R.; IXTA, O.; ORDUNA, M.; MARTINEZ, F.; AGUILAR, B.; CORTES, A. Enhancement of resistance in mice treated with *Lactobacillus casei*: effect on *Trichinella spiralis* infection. **Vet. Parasitol.**, v. 80, p. 251-260, 1999.

BAYONA GONZALES, A.; LOPEZ CAMARA, V.; GOMEZ CASTELLANOS, A. Prevención de caries por lactobacilos (resultados finales de un ensayo clínico sobre caries dental con lactobacilos muertos [estreptococos y lactobacilos] por via oral). (Prevention of caries with lactobacillus (final results of a clinical trial on dental caries

with killed lactobacillus [streptococcus and lactobacillus] given orally)). **Pract. Odontol.**, v. 11, p. 37-39, 1990.

BEENA, A.; PRASAD, V. Effect of yogurt and bifidus yogurt fortified with skim milk powder, condensed whey and lactose-hydrolyzed condensed whey on serum cholesterol and triacylglycerol concentration in rats. **J. Dairy Res.**, v. 64, p. 453-457, 1997.

BENGMARK, S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. **Gut**, v. 42, p. 2-7, 1998.

BENNET, R.; ERIKSSON, M.; NORD, C.E.; ZETTERSTRÖM, R. Fecal bacterial microflora of newborn infants during intensive care management and treatment with five antibiotic regimens. **Pediatr. Infect. Dis.**, v. 5, P. 533-539, 1986.

BENNO, Y.; HE, F.; HOSODA, M.; HASHIMOTO, H.; KOJIMA, T.; YAMAZAKI, K.; IINO, H.; MYKKÄNEN, H.; SALMINEN, S. Effects of *Lactobacillus* GG yogurt on human intestinal microecology in Japanese subjects. **Nutr. Today**, v. 31, p. 9S-11S, 1996.

BERG, R.D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **Trends Microbiol.**, v. 3, p. 149-154, 1995.

BERG, R.D. The indigenous gastrointestinal microflora. **Trends Microbiol.**, v. 4, p. 430-435, 1996.

BERG, R.D.; GARLINGTON, A.W. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. **Infec. Immun.**, v. 23, p. 403-411, 1979.

BERG, R.; BERNASCONI, P.; FOWLER, D.; GAUTREAUX, M. Inhibition of *Candida albicans* translocation from the gastrointestinal tract of mice by oral administration of *Saccharomyces boulardii*. **J. Infect. Dis.**, v. 168, p. 1314-1318, 1993.

BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology, v. 1. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins copyright, 1994.

BERIN, M.C.; DARFEUILLE-MICHAUD, A.; EGAN, L.J.; MIYAMOTO, Y.; KAGNOFF, M.F. Role of EHEC O157:H7 virulence factors in the activation of intestinal epithelial cell NF-kappaB and MAP kinase pathways and the upregulated expression of interleukin 8. **Cell Microbiol.**, v. 4, p. 635-648, 2002.

BERNET, M.F.; BRASSART, D.; NEESER, J.R.; SERVIN, A.L. *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultured human intestinal cells lines and inhibits cell-attachment and cell-invasion by enterovirulent bacteria. **Gut**, v. 35, p. 483-489, 1994.

BERTELSEN, L.S.; PAESOLD, G.; MARCUS, S.L.; FINLAY, B.B.; ECKMANN, L.; BARRETT, K.E. Modulation of chloride secretory responses and barrier function of intestinal epithelial cells by the *Salmonella* effector protein SigD. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 287, p. 939-948, 2004.

BEUTLER, B.; HOEBE, K.; DU, X.; ULEVITCH, R.J. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. **J. Leuk. Biol.**, v. 74, p. 479-485, 2003.

BEUZÓN, C.R.; MÉRESSE, S.; UNSWORTH, K.E.; RUÍZ-ALBERT, J.; GARVIS, S.; WATERMAN, S.R.; RYDER, T.A.; BOUCROT, E.; HOLDEN, D.W. *Salmonella* maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of SifA. **EMBO J.**, v. 19, p. 3235-3249, 2000.

BINES, J.E.; WALKER, W.A. Growth factors and the development of neonatal host defense. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 310, p. 31-39, 1991.

BLÉHAUT, H.; MASSOT, J.; ELMER, G.W.; LEVY, R.H. Disposition kinetics of *Saccharomyces boulardii* in man and rat. **Biopharm. Drug. Disp.**, v. 10, p. 353-364, 1989.

BLEICHNER, G.; BLEHAUT, H.; MENTEC, H.; MOYSE, D. *Saccharomyces boulardii* prevents diarrhea in critically ill tube-fed patients. A multicenter, randomized, double-blind placebo-controlled trial. **Intensive Care Med.**, v. 23, p. 517-523, 1997.

BOCCIARDI, R.; MOGRABI, B.; PASINI, B.; BORRELLO, M.G.; PIEROTTI, M.A.; BOURGET, I.; FISHER, S.; ROMEO, G.; ROSSI, B. The multiple endocrine neoplasia type 2B point mutation switches the specificity of the Ret tyrosine kinase towards cellular substrates that are susceptible to interact with Crk and Nck. **Oncogene**, v. 15, p. 2257-2265, 1997.

BODDY, A.V.; ELMER, G.W.; MCFARLAND, L.V.; LEVY, R.H. Influence of antibiotics on the recovery and kinetics of *Saccharomyces boulardii* in rats. **Pharm. Res.**, v. 8, p. 796-800, 1991.

BOGLIOLO, L.; BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo: Patologia Geral**. 3ª Edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004.

BORN, P.; LERSCH, C.; ZIMMERHACKL, B.; CLAASSEN, M. The *Saccharomyces boulardii* therapy of HIV-associated diarrhea (letter). **Dtsch. Med. Wochenschr.**, v. 118, p. 765, 1993.

BOURLIOUX, P.; KOLETZKO, B.; GUARNER, F.; BRAESCO, V. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine," held in Paris, June 14, 2002. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 78, p. 675-683, 2003.

BRANDÃO, R.L.; CASTRO, I.M.; BAMBIRRA, E.A.; AMARAL, S.C.; FIETTO, L.G.; TROPIA, M.J.M.; NEVES, M.J.; SANTOS, R.G.; GOMES, N.C.M.; NICOLI, J.R. Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 564-568, 1998.

BRANDTZAEG, P. Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system. **APMIS**, v. 103, p. 1-19, 1995.

BRASIER, A. R.; JAMALUDDIN, M.; CASOLA, A.; DUAN, W.; SHEN, Q.; GAROFALO, R.P. A promoter recruitment mechanism for tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 transcription in type II pulmonary epithelial cells. Dependence on nuclear abundance of Rel A, NF- κ B1, and c-Rel transcription factors. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 3551-3561, 1998.

BRENNER, F.W.; VILLAR, R.G.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* nomenclature. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 2465-2467, 2000.

BROWN, K.; GERSTBERGER, L.; CARLSON, L.; FRANZOSO, G.; SIEBENLIST, U. Control of I κ B- α proteolysis by site specific, signal-induction phosphorylation. **Science**, v. 267, p. 1485-1488, 1995.

BRUGIER, S.; PATTE, F. Antagonisme *in vitro* entre l'ultra-levure et différent germes bactériens. **Med. Paris**, v. 45, p. 3-8, 1975.

BRUMELL, J.H.; TANG, P.; MILLS, S.D.; FINLAY, B.B. Characterization of *Salmonella*-induced filaments (Sifs) reveals a delayed interaction between *Salmonella*-containing vacuoles and late endocytic compartments. **Traffic**, v. 2, p. 643-653, 2001.

BRUMELL, J.H.; GOOSNEY, D.L.; FINLAY, B.B. SifA, a type III secreted effector of *Salmonella typhimurium*, directs *Salmonella*-induced filament (Sif) formation along microtubules. **Traffic**, v. 3, p. 407-415, 2002.

BRUMELL, J.H.; KUJAT-CHOY, S.; BROWN, N.F.; VALLANCE, B.A.; KNODLER, L.A.; FINLAY, B.B. SopD2 is a novel type III secreted effector of *Salmonella typhimurium* that targets late endocytic compartments upon delivery into host cells. **Traffic**, v. 4, p. 36-48, 2003.

BULLEN, C.L.P.; TEARLE, P.V.; WILLIS, A.T. *Bifidobacteria* in the intestinal tract of infants: an *in vivo* study. **J. Med. Microbiol.**, v. 9, p. 325-333, 1976.

BUSSCHER, H.J.; MULDER, A.F.; VAN DER MEI, H.C. *In vitro* adhesion to enamel and *in vivo* colonization of tooth surfaces by Lactobacilli from a bio-yoghurt. **Caries Res.**, v. 33, p. 403-404, 1999.

BUTS J.P.; DE KEYSER, N. Effects of *Saccharomyces boulardii* on intestinal mucosa. **Dig. Dis. Sci.**, v. 51, p. 1485-1492, 2006.

BUTS, J.P.; BERNASCONI, P.; VAN CRAYNEST, M.P.; MALDAGUE, P.; DE MEYER, R. Response of human and rat small intestinal mucosa to oral administration of *Saccharomyces boulardii*. **Pediat. Res.**, v. 20, p. 192-196, 1986.

BUTS, J.P.; BERNASCONI, P.; VAERMAN, J.P.; DIVE, C. Stimulation of secretory IgA and secretory component of immunoglobulins in small intestine of rats treated with *Saccharomyces boulardii*. **Dig. Dis. Sci.**, v. 35, p. 251-256, 1990.

BUTS, J.P.; DE KEYSER, N.; DE RAEDEMAEKER, L. *Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines. **Pediatr. Res.**, v. 36, p. 522-527, 1994.

BUTS, J.P.; DE KEYSER, N.; STILMANT, C.; SOKAL, E.; MARANDI, S. *Saccharomyces boulardii* enhances N-terminal peptide hydrolysis in suckling rat small intestine by endoluminal release of a zinc-binding metalloprotease. **Pediatr. Res.**, v. 51, p. 528-534, 2002.

BUTS, J.P.; DE KEYSER, N.; STILMANT, C.; DELEM, E.; SMETS, F.; SOKAL, E. *Saccharomyces boulardii* produces in rat small intestine a novel protein phosphatase that inhibits *Escherichia coli* endotoxin by dephosphorylation. **Pediatr. Res.**, v. 60, p. 24-29, 2006.

CAAMANO, J.; HUNTER, C.A. NF- κ B family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, p. 414-429, 2002.

CAETANO, J.A.M.; PARAMÉS, M.T.; BABO, M.J.; SANTOS, A.; FERREIRA, A.B.; FREITAS, A.A.; COELHO, M.R.C.; MATEUS, A.M. Immunopharmacological effects of *Saccharomyces boulardii* in healthy volunteers. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 8, p. 245-259, 1986.

CANGEMI DE GUTIERREZ, R.C.; SANTOS DE ARAOZ, V.S.; NADER-MACIAS, M.E. Effect of intranasal administration of *Lactobacillus fermentum* on the respiratory tract of mice. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 23, p. 973-978, 2000.

CARDINALI, G.; MARTINI, A. Electrophoretic karyotypes of authentic strains of the *sensu stricto* group of the genus *Saccharomyces*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 44, p. 791-797, 1994.

CARTER, P.B.; COLLINS, F.M. The route of enteric infection in normal mice. **J. Exp. Med.**, v. 139, p. 1189-1203, 1974.

CASEY, P.G.; GARDINER, G.E.; CASEY, G.; BRADSHAW, B.; LAWLOR, P.G.; LYNCH, P.B.; LEONARD, F.C.; STANTON, C.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; HILL, C. A five-strain probiotic combination reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in pigs challenged with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 1858-1863, 2007.

CASSONE, M.; SERRA, P.; MONDELLO, F.; GIROLAMO, A.; SCAFETTI, S.; PISTELLA, E.; VENDITTI, M. Outbreak of *Saccharomyces cerevisiae* subtype *boulardii* fungemia in patients neighboring those treated with a probiotic preparation of the organism. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 5340-5343, 2003.

CASTAGLIUOLO, I.; LAMONT, J.T.; NIKULASSON, S.T.; POTHOUKAKIS, C. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits *Clostridium difficile* toxin A effects in the rat ileum. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 5225-5232, 1996.

CASTAGLIUOLO, I.; RIEGLER, M.F.; VALENICK, L.; LAMONT, J.T.; POTHOUKAKIS, C. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of

Clostridium difficile toxins A and B in human colonic mucosa. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 302-307, 1999.

CELLIER, C.; CERF-BENSUSSAN, N.; BROUSSE, N.; MARTEAU, P. Le système immunitaire intestinal. *In* RAMPAL, P.; BEAUGERIE, L.; MARTEAU, P.; CORTHIER, G. eds. **Colites infectieuses de l'adulte**. Paris, John Libbey Eurotext, p. 27-38, 2000.

CESARO, S.; CHINELLO, P.; ROSSI, L.; ZANESCO, L. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in a neutropenic patient treated with *Saccharomyces boulardii*. **Support. Care Cancer**, v. 8, p. 504-505, 2000.

CHANDAN, R.C. Enhancing market value of milk by adding cultures. **J. Dairy Sci.**, v. 82, p. 2245-2256, 1999. *Apud* GIBSON, S.A.W., ed. **Human Health, the Contribution of Microorganisms**. Springer-Verlag, New York, NY, 1994.

CHEN, X.; KOKKOTOU, E.G.; MUSTAFA, N.; BHASKAR, K.R.; SOUGIOULTZIS, S.; O'BRIEN, M.; POTHOUKAKIS, C.; KELLY, C.P. *Saccharomyces boulardii* inhibits ERK1/2 mitogen-activated protein kinase activation both *in vitro* and *in vivo* and protects against *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 24449-24454, 2006.

CHEN, Y.Q.; GHOSH, S.; GHOSH, G. A novel DNA recognition mode by the NF-kappa B p65 homodimer. **Nat. Struct. Biol.**, v. 5, p. 67-73, 1998.

CHEN, Z.; GIBSON, T.B.; ROBINSON, F.; SILVESTRO, L.; PEARSON, G.; XU, B.; WRIGHT, A.; VANDERBILT, C.; COBB, M.H. MAP kinases. **Chem. Rev.**, v. 101, p. 2449-2476, 2001.

CHENG, H.; LEBLOND, C.P. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. Parts I-V. **Am. J. Anat.**, v. 141, p. 461-562, 1974.

CHIA, J.K.S.; CHAN, S.M.; GOLDSTEIN, H. Baker's yeast as adjunctive therapy for relapses of *Clostridium difficile* diarrhea. **Clin. Infect. Dis.**, v. 20, p. 1581, 1995.

CHIVA, M.; SORIANO, G.; ROCHAT, I.; PERALTA, C.; ROCHAT, F.; LLOVET, T.; MIRELIS, B.; SCHIFFRIN, E.J.; GUARNER, C.; BALANZO, J. Effect of *Lactobacillus johnsonii* La1 and antioxidants on intestinal flora and bacterial translocation in rats with experimental cirrhosis. **J. Hepatol.**, v. 37, p. 456-462, 2002.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acidguanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, v. 162, p. 156-159, 1987.

CHU, W.M.; OSTERTAG, D.; LI, Z.W.; CHANG, L.; CHEN, Y.; HU, Y.; WILLIAMS, B.; PERRAULT, J.; KARIN, M. JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. **Immunity**, v. 11, p. 721-731, 1999.

CIRIELLO, C.J.; LACHANCE, M.A. **YEASTCOMPARE**. University of Western Ontario, London, ON, Canada, 2001.

CITI, S.; CORDENONSI, M. Tight junction proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1448, p. 1-11, 1998.

CLARK, M.A.; JEPSON, M.A. Intestinal M cells and their role in bacterial infection. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 293, p. 17-39, 2003.

COBB, M.H.; HEPLER, J.E.; CHENG, M.; ROBBINS, D. The mitogen-activated protein kinases, ERK1 and ERK2. **Semin. Cancer Biol.**, v. 5, p. 261-268, 1994.

COCONNIER, M.H.; LIEVIN, V.; HEMERY, E.; SERVIN, A.L. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection *in vitro* and *in vivo* by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54, p. 4573-4580, 1998.

COCONNIER, M.H.; LIEVIN, V.; LORROT, M.; SERVIN, A.L. Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* LB against intracellular *Salmonella enterica* serovar

Typhimurium infecting human enterocyte-like Caco-2/TC-7 cells. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 1152-1157, 2000.

CORTHER, G.; LUCAS, F.; JOUVERT, S.; CASTEX, F. Effect of oral *Saccharomyces boulardii* treatment on the activity of *Clostridium difficile* toxins in mouse digestive tract. **Toxicon**, v. 30, p. 1583-1589, 1992.

COSSART, P.; SANSONETTI, P.J. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. **Science**, v. 304, p. 242-248, 2004.

COSTALOS, C.; SKOUTERI, V.; GOUNARIS, A.; SEVASTIADOU, S.; TRIANDAFILIDOU, A.; EKONOMIDOU, C.; KONTAXAKI, F.; PETROCHILOU, V. Enteral feeding of premature infants with *Saccharomyces boulardii*. **Early Hum. Dev.**, v. 74, p. 89-96, 2003.

COWLEY, S.; PATERSON, H.; KEMP, P.; MARSHALL, C.J. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. **Cell**, v. 77, p. 841-852, 1994.

CRISS, A.K.; CASANOVA, J.E. Coordinate regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invasion of epithelial cells by the Arp2/3 complex and Rho GTPases. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 2885-2891, 2003.

CUSCHIERI, J.; GOURLAY, D.; GARCIA, I.; JELACIC, S.; MAIER, R.V. Slow channel calcium inhibition blocks proinflammatory gene signaling and reduces macrophage responsiveness. **J. Trauma**, v. 52, p. 434-442, 2002.

CUSCHIERI, J.; MAIER R.V. Mitogen-activated protein kinase (MAPK). **Crit. Care Med.**, v. 33, p. S417-S419, 2005.

CZERUCKA, D.; RAMPAL, P. Effect of *Saccharomyces boulardii* on cAMP - and Ca^{2+} - dependent Cl^{-} secretion in T84 cells. **Dig. Dis. Sci.**, v. 44, p. 2359-2368, 1999.

CZERUCKA, D.; RAMPAL, P. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. **Microbes Infect.**, v. 4, p. 733-739, 2002.

CZERUCKA, D.; NANO, J.L.; BERNASCONI, P.; RAMPAL, P. Effect of *Saccharomyces boulardii* on cholera toxin-induced cAMP levels in rat epithelial intestinal cell lines. **Gastroenterol. Clin. Biol.**, v. 3, p. 383-384, 1989a.

CZERUCKA, D.; NANO, J.L.; BERNASCONI, P.; RAMPAL, P. Response to cholera toxin of 2 epithelial intestinal cell lines. Effect of *Saccharomyces boulardii*. **Gastroenterol. Clin. Biol.**, v. 13, p. 383-387, 1989b.

CZERUCKA, D.; NANO, J.L.; BERNASCONI, P.; RAMPAL, P. Response of the IRD intestinal epithelial cell line to *Clostridium difficile* toxins A and B in rats. Effect of *Saccharomyces boulardii*. **Gastroenterol. Clin. Biol.**, v. 15, p. 22-27, 1991.

CZERUCKA, D.; ROUX, I.; RAMPAL, P. *Saccharomyces boulardii* inhibits secretagogue-mediated adenosine 3',5'-cyclic monophosphate induction in intestinal cells. **Gastroenterology**, v. 106, p. 65-72, 1994.

CZERUCKA, D.; DAHAN, S.; MOGRABI, B.; ROSSI, B.; RAMPAL, P. *Saccharomyces boulardii* preserves the barrier function and modulates the transduction pathway induced in enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 5998-6004, 2000.

CZERUCKA, D.; DAHAN, S.; MOGRABI, B.; ROSSI, B.; RAMPAL, P. Implication of mitogen-activated protein kinases in T84 cell responses to enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 1298-1305, 2001.

CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. Review article: yeast as probiotics - *Saccharomyces boulardii*. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 26, p. 767-778, 2007.

DAHAN, S.; BUSUTTIL, V.; IMBERT, V.; PEYRON, J.F.; RAMPAL, P.; CZERUCKA, D. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection induces interleukin-8

production via activation of mitogen-activated protein kinases and the transcription factors NF-kappaB and AP-1 in T84 cells. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 2304-2310, 2002.

DAHAN, S.; DALMASSO, G.; IMBERT, V.; PEYRON, J.F.; RAMPAL, P.; CZERUCKA, D. *Saccharomyces boulardii* interferes with enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced signaling pathways in T84 cells. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 766-773, 2003.

DALMASSO, G.; COTTREZ, F.; IMBERT, V.; LAGADEC, P.; PEYRON, J.F.; RAMPAL, P.; CZERUCKA, D.; GROUX, H.; FOUSSAT, A.; BRUN, V. *Saccharomyces boulardii* inhibits inflammatory bowel disease by trapping T cells in mesenteric lymph nodes. **Gastroenterology**, v. 131, p. 1812-1825, 2006a.

DALMASSO, G.; LOUBAT, A.; DAHAN, S.; CALLE, G.; RAMPAL, P.; CZERUCKA, D. *Saccharomyces boulardii* prevents TNF-alpha-induced apoptosis in EHEC-infected T84 cells. **Res. Microbiol.**, v. 157, p. 456-465, 2006b.

DAVIS, R.J. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 14553-14556, 1993.

DAVIS, R.J. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase. **Biochem. Soc. Symp.**, v. 64, p. 1-12, 1999.

DAVIS, R.J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. **Cell**, v. 103, p. 239-252, 2000.

DE CHAMPS, C.; MARONCLE, N.; BALESTRINO, D.; RICH, C.; FORESTIER, C. Persistence of colonization of intestinal mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* Lcr35, after oral consumption. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 1270-1273, 2003.

DEFORGE, L.E.; PRESTON, A.M.; TAKEUCHI, E.; KENNEY, J.; BOXER, L.A.; REMICK, D.G. Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 25568-25576, 1993.

DELBRIDGE, L.M.; O'RIORDAN, M.X. Innate recognition of intracellular bacteria. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 19, p. 10-16, 2007.

DHARMSATHAPHORN, K.; MCROBERTS, J.A.; MANDEL, K.G.; TISDALE, L.D.; MASUI, H. A human colonic tumor cell line that maintains vectorial electrolyte transport. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 246, p. G204-G208, 1984.

DIAS, R.S.; BAMBIRRA, E.A.; SILVA, M.E.; NICOLI, J.R. Protective effect of *Saccharomyces boulardii* against the cholera toxin in rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 28, p. 323-325, 1995.

DIDIERLAURENT, A.; SIRARD, J.C.; KRAEHENBUHL, J.P.; NEUTRA, M.R. How the gut senses its content. **Cell. Microbiol.**, v. 4, p. 61-72, 2002.

DOYE, A., BOYER, L., METTOUCHI, A., LEMICHEZ, E. Ubiquitin-mediated proteasomal degradation of Rho proteins by the CNF1 toxin. **Meth. Enzymol.**, v. 406, p. 447-456, 2006.

DOYLE, S.E.; O'CONNELL, R.M.; MIRANDA, G.A.; VAIDYA, S.A.; CHOW, E.K.; LIU, P.T.; SUZUKI, S.; SUZUKI, N.; MODLIN, R.L.; YEH, W.C.; LANE, T.F.; CHENG, G. Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. **J. Exp. Med.**, v. 199, p. 81-90, 2004.

DUCLUZEAU, R. Role of experimental microbial ecology in gastroenterology. In BERGOGNE-BEREZIN, E. (eds.). **Microbial Ecology and Intestinal Infections**. Paris: Springer-Verlag, p. 7-29, 1989.

DUCLUZEAU, R.; BENZAADA, M. Comparative effect of a single or continuous administration of *Saccharomyces boulardii* on the establishment of various strains of *Candida* in the digestive tract of gnotobiotic mice. **Ann. Microbiol. (Paris)**, v. 133, p. 491-501, 1982.

ECKMANN, L. Defense molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 21, p. 147-151, 2005.

ECKMANN, L.; KAGNOFF, M.F.; FIERER, J. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 4569-4574, 1993.

EDWARDS-INGRAM, L.; GITSHAM, P.; BURTON, N.; WARHURST, G.; CLARKE, I.; HOYLE, D.; OLIVER, S.G.; STATEVA, L. Genotypic and physiological characterization of *Saccharomyces boulardii*, the probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 2458-2467, 2007.

ELEWAUT, D.; DIDONATO, J.A.; KIM, J.M.; TRUONG, F.; ECKMANN, L.; KAGNOFF, M.F. NF-kappa B is a central regulator of the intestinal epithelial cell innate immune response induced by infection with enteroinvasive bacteria. **J. Immunol.**, v. 163, p. 1457-1466, 1999.

ELMER, G.W.; MCFARLAND, L.V. Biotherapeutic agents in the treatment of infectious diarrhea. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, v. 30, p. 837-854, 2001.

ELMER, G.W.; SURAWICZ, C.M.; MCFARLAND, L.V. Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 275, p. 870-876, 1996.

ELMER, G.W.; MCFARLAND, L.V.; SURAWICZ, C.M.; DANKO, L.; GREENBERG, R.N. Behavior of *Saccharomyces boulardii* in recurrent *Clostridium difficile* disease patients. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 13, p. 1663-1668, 1999.

ETIENNE-MANNEVILLE, S.; HALL, A. Rho GTPases in cell biology. **Nature**, v. 420, p. 629-635, 2002.

EYSSSEN, H. Role of the gut microflora in metabolism of lipids and sterols. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 32, p. 59-63, 1973.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization / World Health Organization. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. London, Ontario, Canada. 11p. April 30 and May 1, 2002.

FALK, P.G.; HOOPER, L.V.; MIDTVEDT, T.; GORDON, J.I. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, p. 1157-1170, 1998.

FALKOW, S.; SMALL, P.; ISBERG, R.; HAYES, S.F.; CORWIN, D.A. A molecular strategy for the study of bacterial invasion. **Rev. Infect. Dis.**, v. 9, p. S450-S455, 1987.

FASANO, A.; NATARO, J.P. Intestinal epithelial tight junctions as targets for enteric bacteria-derived toxins. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 56, p. 795-807, 2004.

FAYOL-MESSAOUDI, D.; BERGER, C.N.; COCONNIER-POLTER, M.H.; LIÉVIN-LE MOAL, V.; SERVIN, A.L. pH-, Lactic acid-, and non-lactic acid-dependent activities of probiotic *Lactobacilli* against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, p. 6008-6013, 2005.

FEDORAK, R.N. Naturally occurring and experimental models of inflammatory bowel disease, p. 71-95, 1995. In KIRSTNER, J.B.; SHORTER, R.G. (ed.). **Inflammatory Bowel Disease**, 4th. ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.

FERREIRA, F.A.B.; KUSSAKAWA, K.C.K. Uso de probióticos na alimentação de frangos de corte. **Biotecnologia**, v. 8, p. 40-43, 1999.

FIETTO, J.L.; ARAÚJO, R.S.; VALADÃO, F.N.; FIETTO, L.G.; BRANDÃO, R.L.; NEVES, M.J.; GOMES, F.C.; NICOLI, J.R.; CASTRO, I.M. Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. **Can. J. Microbiol.**, v. 50, p. 615-621, 2004.

FIGUEIREDO, P.P.; VIEIRA, E.C.; NICOLI, J.R.; NARDI, R.D.; RAIBAUD, P.; DUVAL-IFLAH, Y.; PENNA, F.J. Influence of oral inoculation with plasmid-free human *Escherichia coli* on the frequency of diarrhea during the first year of life in human newborns. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 33, p. 70-74, 2001.

FINLAY, B.B.; FALKOW, S. *Salmonella* interactions with polarized human intestinal Caco-2 epithelial cells. **J. Infect. Dis.**, v. 162, p. 1096-1104, 1990.

FINLAY, B.B.; LEUNG, K.Y.; ROSENSHINE, I.; GARCIA DEL PORTILLO, F. *Salmonella* interactions with the epithelial cells. **ASM News**, v. 58, p. 486-490, 1992.

FLORASTOR, 2003. Disponível em <http://www.florastor.com>. Acessado em 06 de outubro de 2003.

FLORASTOR, 2007. Disponível em <http://www.florastor.com>. Acessado em 01 de julho de 2007.

FRANCIS, C.L.; STARNBACH, M.N.; FALKOW, S. Morphological and cytoskeletal changes in epithelial cells occur immediately upon interaction with *Salmonella typhimurium* grow under low-oxygen conditions. **Mol. Microbiol.**, v. 6, p. 3077-3087, 1992.

FREDENUCCI, I.; CHOMARAT, M.; BOUCAUD, C.; FLANDROIS, J.P. *Saccharomyces boulardii* fungemia in a patient receiving Ultra-levure therapy. **Clin. Infect. Dis.**, v. 27, p. 222-223, 1998.

FREEMAN, J.A.; OHL, M.E.; MILLER, S.I. The *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* translocated effectors SseJ and SifB are targeted to the *Salmonella*-containing vacuole. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 418-427, 2003.

FRESHNEY, N.W.; RAWLINSON, L.; GUESDON, F.; JONES, E.; COWLEY, S.; HSUAN, J.; SAKLATVALA, J. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. **Cell**, v. 78, p. 1039-1049, 1994.

FRETER, R. Mechanisms of association of bacteria with mucosal surface. **Ciba Found. Symp.**, v. 80, p. 36-55, 1981.

FRIED, M.; CROTHERS, D.M. Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. **Nucleic Acids Res.**, v. 9, p. 6505-6525, 1981.

FU, Y.; GALÁN, J.E. A *Salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. **Nature**, v. 401, p. 293-297, 1999.

FUKUSHIMA, M.; NAKANO, M. Effects of a mixture of organisms, *Lactobacillus acidophilus* or *Streptococcus faecalis* on cholesterol metabolism in rats fed on a fat- and cholesterol-enriched diet. **Br. J. Nutr.**, v. 76, p. 857-867, 1996.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 66, p. 365-378, 1989.

FULLER, R. **Probiotics - The Scientific Basis**. Chapter 1 Edited by R. Fuller, Chapman & Hall, Reading UK, p. 1-8, 1992.

FURNESS, J.B.; KUNZE, W.A.; CLERC, N. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. II. The intestine as a sensory organ: neural, endocrine, and immune responses. **Am. J. Physiol.**, v. 277, p. G922-G928, 1999.

GALÁN, J.E. *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 17, p. 53-86, 2001.

GARNER, M.M.; REVZIN, A. A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. **Nucleic Acids Res.**, v. 9, p. 3047-3060, 1981.

GEDEK, B.R. Adherence of *Escherichia coli* serogroup O 157 and the *Salmonella typhimurium* mutant DT 104 to the surface of *Saccharomyces boulardii*. **Mycoses**, v. 42, p. 261-264, 1999.

GEDEK, B.R.; AMSELGRUBER, W. Mikrobieller antagonismus: zur eliminierung von enteropathogenen *E. coli*-keimen and *Salmonella* aus dem darm durch *Saccharomyces boulardii*, p. 184-186, 1990. In Ottenjann, R.; Muller, J.; Seifert, J. (ed.), **Okosystem Darm II-Mykrobiologie, Immunologie, Morphologie**. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

GEROLD, G.; ZYCHLINSKY, A.; DE DIEGO, J.L. What is the role of Toll-like receptors in bacterial infections? **Seminars Immunol.**, v. 19, p. 41-47, 2007.

GEWIRTZ, A.T.; RAO, A.S.; SIMON, P.O. JR.; MERLIN, D.; CARNES, D.; MADARA, J.L.; NEISH, A.S. *Salmonella typhimurium* induces epithelial IL-8 expression via Ca(2+)-mediated activation of the NF-kappaB pathway. **J. Clin. Invest.**, v. 105, p. 79-92, 2000.

GEWIRTZ, A.T.; NAVAS, T.A.; LYONS, S.; GODOWSKI, P.J.; MADARA, J.L. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. **J. Immunol.**, v. 167, p. 1882-1885, 2001.

GIANELLA, R.A.; FORMAL, S.B.; DAMMIN, G.J.; COLLINS, H. Pathogenesis of salmonellosis. Studies of fluid secretion, mucosal invasion and morphologic reaction in the rabbit ileum. **J. Clin. Invest.**, v. 52, p. 441-453, 1973.

GILL, H.S.; SHU, Q.; LIN, H.; RUTHERFURD, K.J.; CROSS, M.L. Protection against translocating *Salmonella typhimurium* infection in mice by feeding the immunoenhancing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* strain HN001. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 190, p. 97-104, 2001.

GIRARD, P.; PANSART, Y.; LORENTE, I.; GILLARDIN, J.M. Dose-response relationship and mechanism of action of *Saccharomyces boulardii* in castor oil-induced diarrhea in rats. **Dig. Dis. Sci.**, v. 48, p. 770-774, 2003.

GIRARD, P.; PANSART, Y.; GILLARDIN, J.M. Inducible nitric oxide synthase involvement in the mechanism of action of *Saccharomyces boulardii* in castor oil-induced diarrhoea in rats. **Nitric Oxide**, v. 13, p. 163-169, 2005a.

GIRARD, P.; PANSART, Y.; COPPE, M.C.; GILLARDIN, J.M. *Saccharomyces boulardii* inhibits water and electrolytes changes induced by castor oil in the rat colon. **Dig. Dis. Sci.**, v. 50, p. 2183-2190, 2005b.

GIRARDIN, S.E.; TOURNEBIZE, R.; MAVRIS, M.; PAGE, A.L.; LI, X.; STARK, G.R.; BERTIN, J.; DISTEFANO, P.S.; YANIV, M.; SANSONETTI, P.J.; PHILPOTT, D.J. CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. **EMBO Rep.**, v. 2, p. 736-742, 2001.

GIRARDIN, S.E.; BONECA, I.G.; CARNEIRO, L.A.; ANTIGNAC, A.; JEHANNO, M.; VIALA, J.; TEDIN, K.; TAHA, M.K.; LABIGNE, A.; ZÄHRINGER, U.; COYLE, A.J.; DISTEFANO, P.S.; BERTIN, J.; SANSONETTI, P.J.; PHILPOTT, D.J. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. **Science**, v. 300, p. 1584-1587, 2003.

GOLDBLUM, R.M.; HANSON, L.A.; BRANDTZAEG, P. The mucosal defense system. In STIEHM, E.R., ed. **Immunologic Disorders in Infants and Children**. Philadelphia: W.B. SAUNDERS, p. 159-199, 1996.

GOLDIN, B.R. Health benefits of probiotics. **Br. J. Nutr.**, v. 80, p. S203-S207, 1998.

GORBACH, S.L.; GOLDIN, B.R. The intestinal microflora and the colon cancer connection. **Rev. Infect. Dis.**, v. 12 (supl. 12), p. S252-S261, 1990.

GORDON, H.A.; PESTI, L. The gnotobiotic animal as tool in the study of host microbial relationships. **Bacteriol. Rev.**, v. 35, p. 390-429, 1971.

GRANGETTE, C.; MULLER-ALOUF, H.; GOUDERCOURT, D.; GEOFFROY, M.C.; TURNEER, M.; MERCENIER, A. Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 1547-1553, 2001.

GRASSL, G.A.; FINLAY, B.B. Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 24, p. 22-26, 2008.

GRATZ, S.; MYKKANEN, H.; EL-NEZAMI, H. Aflatoxin B1 binding by a mixture of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*: *in vitro* versus *ex vivo*. **J. Food Prot.**, v. 68, p. 2470-2474, 2005.

GREGORY, S.H.; SAGNIMENI, A.J.; WING, E.J. Bacteria in the bloodstream are trapped in the liver and killed by immigrating neutrophils. **J. Immun.**, v. 157, p. 2514-2520, 1996.

GUN, F.; SALMAN, T.; GURLER, N.; OLGAC, V. Effect of probiotic supplementation on bacterial translocation in thermal injury. **Surg. Today**, v. 35, p. 760-764, 2005.

GUSLANDI, M.; MEZZI, G.; SORGHİ, M.; TESTONI, P.A. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. **Dig. Dis. Sci.**, v. 45, p. 1462-1464, 2000.

GUSTAFSSON, B.E. Germ-free rearing of rats, general techniques. **Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.**, v. 111 (supl. LXX), 1948.

GUSTAFSSON, B.E. Vitamin K deficiency in germfree rats. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 78, p. 166-173, 1959.

GUSTAFSSON, B.E. The germ-free: it's potential and its problems. *In* COATES, M.E. & GUSTAFSSON, B.E. (eds.). **The Germ-free Animal in Biomedical Research**. London: Laboratory Animals Ltd., p. 1-10, 1984.

GUSTAFSSON, B.E.; MIDTVEDT, T.; STRANDBERG, K. Effects of microbial contamination on the cecum enlargement of germ-free rats. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 5, p. 309-314, 1970.

HAIJSHENGALLIS, G., NIKOLOVA, E. & RUSSEL, M.W. Inhibition of *Streptococcus mutans* adherence to saliva-coated hydroxyapatite by human secretory immunoglobulin A antibodies to the cell surface protein antigen I/II: reversal by IgA 1 protease cleavage. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 5057-5064, 1992.

HALLEN, A.; JARSTRAND, C.; PAHLSON, C. Treatment of bacterial vaginosis with lactobacilli. **Sex. Transm. Dis.**, v. 19, p. 146-148, 1992.

HAMURO, J., AKIYAMA, Y., IGUCHI, Y., ISAWA, M. & MATSUO, T. Distinct roles of serum factors induced by a T cell specific immune adjuvant lentinan in cellular immune responses. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 4, p. 268, 1982 (Abstract).

HAN, J.; LEE, J.D.; BIBBS, L.; ULEVITCH, R.J. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. **Science**, v. 265, p. 808-811, 1994.

HANAHAH, D.; JESSEE, J.; BLOOM, F.R. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. **Methods Enzymol.**, v. 204, p. 63-113, 1991.

HANSON, L.A.; YOLKEN, R.H. **Probiotics, Other Nutritional Factors and Intestinal Microflora**. Nestlé Nutrition Workshop Series, v. 42, Nestec Ltd., Vevey/Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1999.

HANSON, L.A.; DAHLMAN-HÖGLUND, A.; KARLSSON, M.; LUNDIN, S.; DAHLGREN, U.; TELEMÖ, E. Normal microbial flora of the gut and the immune system, p. 217-228. In HANSON, L.A.; YOLKEN, R.H. **Probiotics, Other Nutritional Factors and Intestinal Microflora**. Nestlé Nutrition Workshop Series, v. 42, Nestec Ltd., Vevey/Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1999.

HARDT, W.D.; CHEN, L.M.; SCHUEBEL, K.E.; BUSTELO, X.R.; GALÁN, J.E. *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. **Cell**, v. 93, p. 815-826, 1998.

HAUF, N.; CHAKRABORTY, T. Suppression of NF-kappa B activation and proinflammatory cytokine expression by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **J. Immunol.**, v. 170, p. 2074-2082, 2003.

HAYASHI, F.; SMITH, K.D.; OZINSKY, A.; HAWN, T.R.; YI, E.C.; GOODLETT, D.R.; ENG, J.K.; AKIRA, S.; UNDERHILL, D.M.; ADEREM, A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. **Nature**, v. 410, p. 1099-1103, 2001.

HAYWARD, R.D.; KORONAKIS, V. Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive *Salmonella*. **EMBO J.**, v. 18, p. 4926-4934, 1999.

HAYWARD, R.D.; KORONAKIS, V. Direct modulation of the host cell cytoskeleton by *Salmonella* actin-binding proteins. **Trends Cell. Biol.**, v. 12, p. 15-20, 2002.

HE, F.; MORITA, H.; OUWEHAND, A.C.; HOSODA, M.; HIRAMATSU, M.; KURISAKI, J.; ISOLAURI, E.; BENNO, Y.; SALMINEN, S. Stimulation of the secretion of pro-inflammatory cytokines by *Bifidobacterium* strains. **Microbiol. Immunol.**, v. 46, p. 781-785, 2002.

HENNEQUIN, C.; KAUFFMANN-LACROIX, C.; JOBERT, A.; VIARD, J.P.; RICOUR, C.; JACQUEMIN, J.L.; BERCHE, P. Possible role of catheters in *Saccharomyces boulardii* fungemia. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 19, p. 16-20, 2000.

HENNEQUIN, C.; THIERRY, A.; RICHARD, G.F.; LECOINTRE, G.; NGUYEN, H.V.; GAILLARDIN, C.; DUJON, B. Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 551-559, 2001.

HEREK, O.; KARA, I.G.; KALELI, I. Effects of antibiotics and *Saccharomyces boulardii* on bacterial translocation in burn injury. **Surg. Today**, v. 34, p. 256-260, 2004.

HERSH, D.; MONACK, D.M.; SMITH, M.R.; GHORI, N.; FALKOW, S.; ZYCHLINSKY, A. The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 96, p. 2396-2401, 1999.

HILBI, H.; MOSS, J.E.; HERSH, D.; CHEN, Y.; ARONDEL, J.; BANERJEE, S.; FLAVELL, R.A.; YUAN, J.; SANSONETTI, P.J.; ZYCHLINSKY, A. *Shigella*-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 32895-32900, 1998.

HILL, C.S.; TREISMAN, R. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. **Cell**, v. 80, p. 199-211, 1995.

HILL, M.J. Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. **Eur. J. Cancer Prev.**, v. 6, p. S43-S45, 1997.

HILTON, E.; ISENBERG, H.D.; ALPERSTEIN, P.; FRANCE, K.; BORENSTEIN, M.T. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* as prophylaxis for candidal vaginitis. **Ann. Intern. Med.**, v. 116, p. 353-357, 1992.

HIRAKATA, Y.; TOMONO, K.; TATEDA, K.; MATSUMOTO, T.; FURUYA, N.; SHIMOBUCHI, K.; KAKU, M.; YAMAGUCHI, K. Role of bacterial association with Küpffer cells in occurrence of endogenous systemic bacteremia. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 289-294, 1991.

HIRAYAMA, K.; RAFTER, J. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. **Microbes Infect.**, v. 2, p. 681-686, 2000.

HOBBIE, S.; CHEN, L.M.; DAVIS, R.J.; GALÁN, J.E. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells. **J. Immunol.**, v. 159, p. 5550-5559, 1997.

HOFFMANN, E.; DITTRICH-BREIHOLZ, O.; HOLTMANN, H.; KRACHT, M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. **J. Leukoc. Biol.**, v. 72, p. 847-855, 2002.

HOFMAN, P. Pathological interactions of bacteria and toxins with the gastrointestinal epithelial tight junctions and/or the zonula adherens: an update. **Cell Mol. Biol.**, v. 49, p. 65-75, 2003.

HOHMANN, A.W.; SCHMIDT, G.; ROWLEY, D. Intestinal colonization and virulence of *Salmonella* in mice. **Infect. Immun.**, v. 22, p. 763-770, 1978.

HOLTMANN, H.; WINZEN, R.; HOLLAND, P.; EICKEMEIER, S.; HOFFMANN, E.; WALLACH, D.; MALININ, N.L.; COOPER, J.A.; RESCH, K.; KRACHT, M. Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. **Mol. Cell. Biol.**, v. 19, p. 6742-6753, 1999.

HOLTMANN, H.; ENNINGA, J.; KALBLE, S.; THIEFES, A.; DORRIE, A.; BROEMER, M.; WINZEN, R.; WILHELM, A.; NINOMIYA-TSUJI, J.; MATSUMOTO, K.; RESCH, K.; KRACHT, M. The MAPK kinase kinase TAK1 plays a central role in coupling the interleukin-1 receptor to both transcriptional and RNA-targeted mechanisms of gene regulation. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 3508-3516, 2001.

HOOPER, L.V.; WONG, M.H.; THELIN, A.; HANSSON, L.; FALK, P.G.; GORDON, J.I. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. **Science**, v. 291, p. 881-884, 2001.

HOPPU, U.; KALLIOMAKI, M.; LAIHO, K.; ISOLAURI, E. Breast milk - immunomodulatory signals against allergic diseases. **Allergy**, v. 56, S23-S26, 2001.

HØVERSTAD, T. The normal microflora and short chain fatty acids, p. 89-108. *In* GRUBB, R.; MIDTVEDT, T.; NORIN, E. (ed.). **The Regulatory and Protective Role of the Normal Microflora**. Macmillan Press, London, England, 1989.

HUANG, F-C.; LI, Q.; CHERAYIL, B.J. A phosphatidylinositol-3-kinase-dependent anti-inflammatory pathway activated by *Salmonella* in epithelial cells. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 243, p. 265-270, 2005.

HUNTER, T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. **Cell**, v. 80, p. 225-236, 1995.

ICHIJO, H. From receptors to stress-activated MAP kinases. **Oncogene**, v. 18, p. 6087-6093, 1999.

ISOLAURI, E. Immune effects of probiotics, p. 229-241. *In* **Probiotics, Other Nutritional Factors and Intestinal Microflora**. Edited by HANSON, L.A.; YOLKEN, R.H. Nestlé Nutrition Workshop Series, v. 42, Nestec Ltd., Vevey/Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1999.

ISOLAURI, E. Probiotics in the prevention and treatment of allergic disease. **Pediatr. Allergy Immunol.**, v. 12, p. 56S-59S, 2001.

ISOLAURI, E.; ARVOLA, T.; SUTAS, Y.; MOILANEN, E.; SALMINEN, S. Probiotics in the management of atopic eczema. **Clin. Exp. Allergy**, v. 30, p. 1604-1610, 2000.

ISOLAURI, E.; SUTAS, Y.; KANKAANPAA, P.; ARVILOMMI, H.; SALMINEN, S. Probiotics: effects on immunity. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 444S-450S, 2001.

IZADNIA, F.; WONG, C.T.; KOCOSHIS, S.A. Brewer's yeast and *Saccharomyces boulardii* both attenuate *Clostridium difficile*-induced colonic secretion in the rat. **Dig. Dis. Sci.**, v. 43, p. 2055-2060, 1998.

JACK, R.S.; FAN, X.; BERNHEIDEN, M.; RUNE, G.; EHLERS, M.; WEBER, A.; KIRSCH, G.; MENDEL, R.; FURLL, B.; FREUDENBERG, M.; SCHMITZ, G.; STELTER, F.; SCHUTT, C. Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine gram-negative bacterial infection. **Nature**, v. 389, p. 742-745, 1997.

JAHN, H.U.; ULLRICH, R.; SCHNEIDER, T.; LIEHR, R.M.; SCHIEFERDECKER, H.L.; HOLST, H.; ZEITZ, M. Immunological and trophical effects of *Saccharomyces boulardii* on the small intestine in healthy human volunteers. **Digestion**, v. 57, p. 95-104, 1996.

JANEWAY, C.A. JR; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 197-216, 2002.

JANSSENS, S.; BEYAERT, R. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 16, p. 637-646, 2003.

JAWHARA, S.; POULAIN, D. *Saccharomyces boulardii* decreases inflammation and intestinal colonization by *Candida albicans* in a mouse model of chemically-induced colitis. **Med. Mycol.**, v. 18, p. 1-10, 2007.

JEPSON, M.A., CLARK, M.A. Studying M cells and their role in infection. **Trends Microbiol.**, v. 6, p. 359-365, 1998.

JOBIN, C.; SARTOR, R.B. The I κ B/NF- κ B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 278, p. C451-C462, 2000.

JOHANNSEN, S.A.; GRIFFITH, R.W.; WESLEY, I.V.; SCANES, C.G. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colonization of the crop in the domestic turkey: influence of probiotic and prebiotic treatment (*Lactobacillus acidophilus* and lactose). **Avian Dis.**, v. 48, p. 279-286, 2004.

JONES, B.D.; GHORI, N.; FALKOW, S. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. **J. Exp. Med.**, v. 180, p. 15-23, 1994.

JUNG, H.C.; ECKMANN, L.; YANG, S.K.; PANJA, A.; FIERER, J.; MORZYCKA-WROBLEWSKA, E.; KAGNOFF, M.F. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. **J. Clin. Invest.**, v. 95, p. 55-65, 1995.

KABIR, A.M.; AIBA, Y.; TAKAGI, A.; KAMIYA, S.; MIWA, T.; KOGA, Y. Prevention of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. **Gut**, v. 41, p. 49-55, 1997.

KAILA, M.; ISOLAURI, E.; SOPPI, E.; VRTANEN, E.; LAINE, S.; ARVILOMMI, H. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by human *Lactobacillus* strain. **Pediat. Res.**, v. 32, p. 141-144, 1992.

KAILA, M.; ISOLAURI, E.; SAXELIN, M.; ARVILOMMI, H.; VESIKARI, T. Viable versus inactivated *Lactobacillus* strain GG in acute rotavirus diarrhoea. **Arch. Dis. Child.**, v. 72, p. 51-53, 1995.

KALLIOMAKI, M.; SALMINEN, S.; ARVILOMMI, H.; KERO, P.; KOSKINEN, P.; ISOLAURI, E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 7, p. 1076-1079, 2001.

KALLIOMAKI, M.; ISOLAURI, E. Role of intestinal flora in the development of allergy. **Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.**, v. 3, p. 15-20, 2003.

KALLIOMAKI, M.; SALMINEN, S.; POUSSA, T.; ARVILOMMI, H.; ISOLAURI, E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomized placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 31, p.1869-1871, 2003.

KASAHARA, T.; MUKAIDA, N.; YAMASHITA, K.; YAGISAWA, H.; AKAHOSHI, T.; MATSUSHIMA, K. IL-1 and TNF-alpha induction of IL-8 and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF) mRNA expression in a human astrocytoma cell line. **Immunology**, v. 74, p. 60-67, 1991.

KATSOULIDIS, E.; LI, Y.; MEARS, H.; PLATANIAS, L.C. The p38 mitogen-activated protein kinase pathway in interferon signal transduction. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 25, p. 749-756, 2005.

KAUR, T.; GANGULY, N.K. Modulation of gut physiology through enteric toxins. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 253, p. 15-19, 2003.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptor downstream signaling. **Arthritis Res. Ther.**, v. 7, p. 12-19, 2005.

KEDINGER, M.; DULUC, I.; FRITSCH, C.; LORENTZ, O.; PLATEROTI, M.; FREUND, J.N. Intestinal epithelial-mesenchymal cell interactions. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 859, p. 1-17, 1998.

KELLY, D.; CAMPBELL, J.I.; KING, T.P.; GRANT, G.; JANSSON, E.A.; COUTTS, A.G.; PETTERSSON, S.; CONWAY, S. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. **Nat. Immunol.**, v. 5, p. 104-112, 2004.

KEUSCH, G.T.; FONTAINE, O.; BHARGAVA, A.; BOSCHI-PINTO, C.; BHUTTA, Z.A.; GOTUZZO, E.; RIVERA, J.; CHOW, J.; SHAHID-SALLES, S.; LAXMINARAYAN, R. Chapter 19: Diarrheal Diseases, p. 371-388. *In* **Disease Control Priorities in Developing Countries**. Edited by JAMISON, D.T.; BREMAN, J.G.; MEASHAM, A.R.; ALLEYNE, G.; CLAESON, M.; EVANS, D.B.; JHA, P.; MILLS, A.; MUSGROVE, P. 2nd Edition. The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank, Washington DC, 2006

KIMMEY, M.B.; ELMER, G.W.; SURAWICZ, C.M.; MCFARLAND, L.V. Prevention of further recurrences of *Clostridium difficile* colitis with *Saccharomyces boulardii*. **Dig. Dis. Sci.**, v. 35, p. 897-901, 1990.

KIRJAVAINEN, P.V.; APOSTOLOU, E.; ARVOLA, T.; SALMINEN, S.J.; GIBSON, G.R.; ISOLAURI, E. Characterizing the composition of intestinal microflora as a prospective treatment target in infant allergic disease. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 32, p. 1-7, 2001.

KIRJAVAINEN, P.V.; SALMINEN, S.J.; ISOLAURI, E. Probiotic bacteria in the management of atopic disease: underscoring the importance of viability. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 36, p. 223-227, 2003.

KLEIN, S.M.; ELMER, G.W.; MCFARLAND, L.V.; SURAWICZ, C.M.; LEVY, R.H. Recovery and elimination of the biotherapeutic agent, *Saccharomyces boulardii*, in healthy human volunteers. **Pharm. Res.**, v. 10, p. 1615-1619, 1993.

KNODLER, L.A.; V.; FINLAY, B.B.; STEELE-MORTIMER, O. The *Salmonella* effector protein SopB protects epithelial cells from apoptosis by sustained activation of Akt. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 9058-9064, 2005.

KOLCH, W. Meaningful relationships: The regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. **Biochem. J.**, v. 351, p. 289-305, 2000.

KONGSHAVN, P.A.; SHAW, K.; GHADIRIAN, E.; ULCZAK, O. Failure to demonstrate a major role for Küppfer cells and radiosensitive leukocytes in immunoglobulin mediated elimination of *Trypanosoma musculi*. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 1971-1978, 1990.

KOO, F.C.W.; PETERSON, J.W.; HOUSTON, C.W.; MOINA, N.C. Pathogenesis of experimental salmonellosis: inhibition of protein synthesis by cytotoxin. **Infect. Immun.**, v. 43, p. 93-100, 1984.

KOVACS, D.J.; BERK, T. Recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis treated with *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast) in combination with antibiotic therapy: a case report. **J. Am. Board Farm. Pract.**, v. 13, p. 138-140, 2000.

KRAEHENBUHL, J.P.; NEUTRA, M.R. Epithelial M cells: differentiation and function. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 16, p. 301-332, 2000.

KUBORI, T.; GALÁN, J.E. Temporal regulation of *Salmonella* virulence effector function by proteasome-dependent protein degradation. **Cell**, v. 115, p. 333-342, 2003.

KUHLE, V.; HENSEL, M. SseF and SseG are translocated effectors of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 that modulate aggregation of endosomal compartments. **Cell. Microbiol.**, v. 4, p. 813-824, 2002.

KUMURA, H.; TANOUE, Y.; TSUKAHARA, M.; TANAKA, T.; SHIMAZAKI, K. Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. **J. Dairy Sci.**, v. 87, p. 4050-4056, 2004.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The Yeasts: a Taxonomic Study**. 4th ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1998.

KYRIAKIS, J.M. Signaling by the germinal center kinase family of protein kinases. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 5259-5262, 1999.

KYRIAKIS, J.M.; AVARUCK, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. **Physiol. Rev.**, v. 81, p. 807-869, 2001.

LAHTI, A.; JALONEN, U.; KANKAANRANTA, H.; MOILANEN, E. c-Jun NH2-terminal kinase inhibitor anthra(1,9-cd)pyrazol-6(2H)-one reduces inducible nitric oxide synthase expression by destabilizing mRNA in activated macro phages. **Mol. Pharmacol.**, v. 64, p. 308-315, 2003.

LAIHO, K.; OUWEHAND, A.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Inventing probiotic functional foods for patients with allergic disease. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, v. 89, p. 75-82, 2002.

LARSEN, J.K.; YAMBOLIEV, I.A.; WEBER, L.A.; GERTHOFFER, W.T. Phosphorylation of the 27-kDa heat shock protein via p38 MAP kinase and MAPKAP kinase in smooth muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. L930-L940, 1997.

LEE, J.C.; LAYDON, J.T.; MCDONNELL, P.C.; GALLAGHER, T.F.; KUMAR, S.; GREEN, D.; MCNULTY, D.; BLUMENTHAL, M.J.; HEYS, J.R.; LANDVATTER, S.W. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. **Nature**, v. 372, p. 739-746, 1994.

LEE, L-F.; HASKILL, S.J.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K.; TING, J.P-Y. Identification of tumor-specific paclitaxel (Taxol)-responsive regulatory elements in the interleukin-8 promoter. **Mol. Cell. Biol.**, v. 17, p. 5097-5105, 1997.

LEE, S.K.; KIM, H.J.; CHI, S.G.; JANG, J.Y.; NAM, K.D.; KIM, N.H.; JOO, K.R.; DONG, S.H.; KIM, B.H.; CHANG, Y.W.; LEE, J.I.; CHANG, R. *Saccharomyces boulardii* activates expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in HT-29 cells. **Korean J. Gastroenterol.**, v. 45, p. 328-334, 2005.

LEFROCK, J.; ELLIS, C.; WEINSTEIN, L. The impact of hospitalization on the aerobic fecal flora. **J. Med. Sci.**, v. 277, p. 269-274, 1979.

LEMONNIER, M.; LEVIN, B.R.; ROMEO, T.; GARNER, K.; BAQUERO, M.R.; MERCANTE, J.; LEMICHEZ, E.; BAQUERO, F.; BLÁZQUEZ, J. The evolution of contact-dependent inhibition in non-growing populations of *Escherichia coli*. **Proc. Biol. Sci.**, v. 275, p. 3-10, 2008.

LESTIN, F.; PERTSCHY, A.; RIMEK, D. Fungemia after oral treatment with *Saccharomyces boulardii* in a patient with multiple co-morbidities. **Dtsch. Med. Wochenschr.**, v. 128, p. 2531-2533, 2003.

LHERM, T.; MONET, C.; NOUGIERE, B.; SOULIER, M.; LARBI, D.; LE GALL, C.; CAEN, D.; MALBRUNOT, C. Seven cases of fungemia with *Saccharomyces boulardii* in critically ill patients. **Intensive Care Med.**, v. 28, p. 797-801, 2002.

LIDBECK, A.; NORD, C.E.; RAFTER, J.; NORD, C.; GUSTAFFSON, J.A. Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplements on mutagen excretion in faeces and urine in humans. **Microbiol. Ecol. Health Dis.**, v. 5, p. 59-67, 1992.

LIEVIN-LE MOAL, V.; SERVIN, A.L. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, p. 315-337, 2006.

LILIC, M.; GALKIN, V.E.; ORLOVA, A.; VANLOOCK, M.S.; EGELMAN, E.H.; STEBBINS, C.E. *Salmonella* SipA polymerizes actin by stapling filaments with nonglobular protein arms. **Science**, v. 301, p. 1918-1921, 2003.

LILLEY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, p. 747-748, 1965.

LIMA FILHO, J.V.M.; VIEIRA, E.C.; NICOLI, J.R. Antagonistic effect of *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* and *Escherichia coli* against

experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella enteritidis* ssp. *typhimurium* in gnotobiotic mice. **J. Appl. Microbiol.**, v. 88, p. 365-371, 2000.

LIMA FILHO, J.V.M.; VIEIRA, L.Q.; ARANTES, R.M.E.; NICOLI, J.R. Effect of the *Escherichia coli* EMO on experimental infection by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium in gnotobiotic mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, p. 1005-1013, 2004.

LIN, S.Y.; AYRES, J.W.; WINKLER, W.; SANDINE, W.E. *Lactobacillus* effects on cholesterol: *in vitro* and *in vivo* results. **J. Dairy Res.**, v. 72, p. 2885-2899, 1989.

LING, W.H.; HANNINEN, O.; MYKKANEN, H.; SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. Colonization and fecal enzyme activities after oral *Lactobacillus* GG administration in elderly nursing home residents. **Ann. Nutr. Metab.**, v. 36, p. 162-166, 1992.

LING, W.H.; KORPELA, R.; MYKKANEN, H.; SALMINEN, S.; HANNINEN, O. *Lactobacillus* strain GG supplementation decreases colonic hydrolytic and reductive enzyme activities in healthy female adults. **J. Nutr.**, v. 124, p. 18-23, 1994.

LOUVARD, D.; KEDINGER, M.; HAURI, H.P. The differentiating intestinal epithelial cell: establishment and maintenance of functions through interactions between cellular structures. **Annu. Rev. Cell Biol.**, v. 8, p. 157-195, 1992.

MA, D.; FORSYTHE, P.; BIENENSTOCK, J. Live *Lactobacillus reuteri* is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 5308-5314, 2004.

MA, W.; LIM, W.; GEE, K.; AUCOIN, S.; NANDAN, D.; KOZLOWSKI, M.; DIAZ-MITOMA, F.; KUMAR, A. The p38 mitogen-activated kinase pathway regulates the human interleukin-10 promoter via the activation of Sp1 transcription factor in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 13664-13674, 2001.

MACKAY, A.D.; TAYLOR, M.B.; KIBBLER, C.C.; HAMILTON-MILLER, J.M.T. *Lactobacillus* endocarditis caused by a probiotic organism. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 5, p. 290-292, 1999.

MACKIE, R.; SGHIR, A.; GASKINS, H.R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.69, p. 1035S-1045S, 1999.

MAGNUSSON, K.E.; STJERNSTROM, I. Mucosal barrier mechanisms. Interplay between secretory IgA (sIgA), IgG and mucins on the surface properties and association of salmonellae with intestine and granulocytes. **Immunology**, v. 45, p. 239-248, 1982.

MAIA, O.B.; DUARTE, R.; SILVA, A.M.; CARA, D.C.; NICOLI, J.R. Evaluation of the components of a commercial probiotic in gnotobiotic mice experimentally challenged with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium. **Vet. Microbiol.**, v. 79, p. 183-189, 2001.

MAKELA, P.H.; VOLTONEV, V.V.; VOLTONEM, M. The role of O antigen (lipopolysaccharide) factors in the virulence of *Salmonella*. **J. Infect. Dis.**, v. 128, p. 81-85, 1973.

MAKRAS, L.; TRIANTAFYLLOU, V.; FAYOL-MESSAOUDI, D.; ADRIANY, T.; ZOUMPOPOULOU, G.; TSAKALIDOU, E.; SERVIN, A.; DE VUYST, L. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. **Res. Microbiol.**, v. 157, p. 241-247, 2006.

MALININ, N.L.; BOLDIN, M.P.; KOVALENKO, A.V.; WALLACH, D. MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. **Nature**, v. 385, p. 540-544, 1997.

MALLIÉ, M.; NGUYEN VAN, P.; BERTOUT, S.; VAILLANT, C.; BASTIDE, J.-M. Genotypic study of *Saccharomyces boulardii* compared to the *Saccharomyces sensu stricto* complex species. **J. Mycol. Med.**, v. 11, p. 19-25, 2001.

MANSER, E., LOO, T. H., KOH, C. G., ZHAO, Z. S., CHEN, X. Q., TAN, L., TAN, I., LEUNG, T., LIM, L. PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. **Mol. Cell**, v. 1, p. 183-192, 1998.

MANSOUR-GHANAIE, F.; DEHBASHI, N.; YAZDANPARAST, K.; SHAFAGHI, A. Efficacy of *Saccharomyces boulardii* with antibiotics in acute amoebiasis. **World J. Gastroenterol.**, v. 9, p. 1832-1833, 2003.

MARSHALL, C.J. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. **Cell**, v. 80, p. 179-185, 1995.

MARSHALL, J.C. Gastrointestinal flora and its alterations in critical illness. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v. 2, p. 405-411, 1999.

MARTEAU, P.R.; VRESE, M.; CELLIER, C.J.; SCHREZENMEIR. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 4305-4365, 2001.

MARTINS, F.S. **Capacidade de colonização do trato gastrointestinal de camundongos NIH isentos de germes e convencionais e de proteção contra bactérias enteropatogênicas como critérios de seleção de leveduras de origem ambiental como probióticos.** Belo Horizonte, 2004. 127p. Dissertação (Mestrado). Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

MARTINS, F.S.; NARDI, R.M.D.; ARANTES, R.M.E.; ROSA, C.A.; NEVES, M.J. AND NICOLI, J.R. Screening of yeast as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v. 51, n. 2, p. 83-92, 2005a.

MARTINS, F.S.; NEVES, M.J.; ROSA, C.A.; NARDI, R.M.D.; PENNA, F.J. & NICOLI, J.R. Comparação de seis produtos probióticos contendo *Saccharomyces boulardii*. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 62, p. 151-155, 2005b.

MASSOT, J.; DESCONCLOIS, M.; ASTOIN, J. Protection par *Saccharomyces boulardii* de la diarrhée à *E. coli* du souriceau. **Ann. Pharm. Fr.**, v. 40, p. 445-449, 1983.

MASTRONARDE, J.G.; MONICK, M.M.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K.; HUNNINGHAKE, G.W. Activator protein-1 is the preferred transcription factor for cooperative interaction with nuclear factor-kappaB in respiratory syncytial virus-induced interleukin-8 gene expression in airway epithelium. **J. Infect. Dis.**, v. 177, p. 1275-1281, 1998.

MATSUZAKI, T.; CHIN, J. Modulating immune responses with probiotic bacteria. **Immunol. Cell. Biol.**, v. 78, p. 67-73, 2000.

MATTILA-SANDHOLM, T.; BLUM, S.; COLLINS, J.K.; CRITTENDEN, R.; DEVOS, W.; DUNNE, C.; FONDEN, R.; GRENOV, G.; ISOLAURI, E.; KIELY, B.; MARTEAU, P.; MORELLI, L.; OUWEHAND, A.; RENIERO, R.; SAARELA, M.; SALMINEN, S.; SAXELIN, M.; SCHIFFRIN, E.; SHANAHAN, F.; VAUGHAN, E.; VON WRIGHT, A. Probiotics: towards demonstrating efficacy. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 10, p. 393-399, 1999.

MCCARTNEY, A.L.; WENZHI, W.; TANNOCK, G.W. Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and lactobacillus microflora of humans. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 4608-4613, 1996.

MCCORMICK, B.A.; COLGAN, S.P.; ARCHER, C.D.; MILLER, S.I.; MADARA, J.L. *Salmonella typhimurium* attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils. **J. Cell Biol.**, v. 123, p. 895-907, 1993.

MCCORMICK, B.A.; HOFMAN, P.M.; KIM, J.; CARNES, D.K.; MILLER, S.I.; MADARA, J.L. Surface attachment of *Salmonella typhimurium* to intestinal epithelia imprints the subepithelial matrix with gradients chemotactic for neutrophils. **J. Cell Biol.**, v. 131, p. 1599-1608, 1995.

MCCORMICK, B.A.; PARKOS, C.A.; COLGAN, S.P.; CARNES, D.K.; MADARA, J.L. Apical secretion of a pathogen-elicited epithelial chemoattractant activity in response to surface colonization of intestinal epithelia by *Salmonella typhimurium*. **J. Immunol.**, v. 160, p. 455-466, 1998.

MCCRACKEN, V.J.; GASKINS, H.R. Probiotics and the immune system. *In* **Probiotics a Critical Review**. Tannock, G.W. (ed.). Norfolk, England: Horizon Scientific Press, p. 85-111, 1999.

MCCRACKEN, V.J.; LORENZ, R.G. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. **Cell. Microbiol.**, v. 3, p. 1-11, 2001.

MCFARLAND, L.V. *Saccharomyces boulardii* is not *Saccharomyces cerevisiae*. **Clin. Infect. Dis.**, v. 22, p. 200-201, 1996.

MCFARLAND, L.V. Beneficial microbes: health or hazard? **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 12, p. 1609-1071, 2000a.

MCFARLAND, L.V. Normal flora: diversity and functions. **Microb. Ecol. Health Dis.**, v. 12, p. 193-207, 2000b.

MCFARLAND, L.V.; BERNASCONI, P. *Saccharomyces boulardii*: A review of an innovative biotherapeutic agent. **Microb. Ecol. Health Dis.**, v. 6, p. 157-171, 1993.

MCFARLAND, L.V.; SURAWICZ, C.M.; GREENBERG, R.N.; FEKETY, R.; ELMER, G.W.; MOYER, K.A.; MELCHER, S.A.; BOWEN, K.E.; COX, J.L.; NOORANI, Z. A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 271, p. 1913-1918, 1994.

MCFARLAND, L.V.; SURAWICZ, C.M.; GREENBERG, R.N.; ELMER, G.W.; MOYER, K.A.; MELCHER, S.A.; BOWEN, K.E.; COX, J.L. Prevention of beta-

lactam-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 90, p. 439-448, 1995.

MCGHIE, E.J.; HAYWARD, R.D.; KORONAKIS, V. Cooperation between actin-binding proteins of invasive *Salmonella*: SipA potentiates SipC nucleation and bundling of actin. **EMBO J.**, v. 20, p. 2131-2139, 2001.

MEADOW, L.; SCHNEIDER, H.; BEEN, M.O. *Salmonella enteritidis* bacteremia in childhood. **J. Infect. Dis.**, v. 152, p. 185-189, 1985.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 1, p. 135-145, 2001.

METCHNIKOFF, E. **The Prolongation of Life**. Heinemann, London, UK, 1907.

MIDTVEDT, T. Microbial bile acid transformation. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 27, p. 1341-1347, 1974.

MIDTVEDT, T. Intestinal microflora-associated characteristics. **Microecol. Ther.**, v. 16, p. 121-130, 1986.

MIDTVEDT, T.; GUSTAFSSON, B.E. Microbial conversion of bilirubin to urobilins *in vitro* and *in vivo*. **Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B**, v. 89, p. 57-60, 1981.

MIDTVEDT, T.; CARLSTEDT-DUKE, B.; HÖVERSTAD, T.; MIDTVEDT, A.C.; NORIN, K.E.; SAXERHOLT, H. 1987. Establishment of a biochemically active intestinal ecosystem in ex-germfree rats. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 53, p. 2866-2871, 1987.

MITIC, L.L.; ANDERSON, J.M. Molecular architecture of tight junctions. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 60, p. 121-142, 1998.

MITTERDORFER, G.; MAYER, H.K.; KNEIFEL, W.; VIERNSTEIN, H. Protein fingerprinting of *Saccharomyces* isolates with therapeutic relevance using one- and two-dimensional electrophoresis. **Proteomics**, v. 2, p. 1532-1538, 2002.

MONTGOMERY, R.K.; MULBERG, A.E.; GRAND, R.J. Development of the human gastrointestinal tract: twenty years of progress. **Gastroenterology**, v. 116, p. 702-731, 1999.

MOORE, W.E.C.; HOLDEMAN, L.V. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. **Appl. Microbiol.**, v. 27, p. 961-979, 1974.

MOREAU, M.C., RAIBAUD, P.; MULLER, M.C. Relation entre le développement du système immunitaire intestinal à IgA et l'établissement de la flore microbienne dans le tube digestif de souris holoxénique. **Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)**, v. 133B, p. 29-39, 1982.

MOURA, L.N.; NEUMANN, E.; VIEIRA, L.Q.; NICOLI, J.R. Protection by *Lactobacillus* UFV-H2B20 against experimental oral infection with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium in gnotobiotic and conventional mice. **Braz. J. Microbiol.**, v. 32, p. 66-69, 2001.

MUKAIDA, N.; OKAMOTO, S.-I.; ISHIKAWA, Y.; MATSUSHIMA, K. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. **J. Leukoc. Biol.**, v. 56, p. 554-558, 1994.

MUMY, K.L.; CHEN, X.; KELLY, C.P.; MCCORMICK, B.A. *Saccharomyces boulardii* interferes with *Shigella* pathogenesis by post-invasion signaling events. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.**, 2007. [Epub ahead of print].

MURAYAMA, T.; OHARA, Y.; OBUCHI, M.; KHABAR, K.S.A.; HIGASHI, H.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K. Human cytomegalovirus induces interleukin-8 production by a human monocytic cell line, THP-1, through acting concurrently on AP-1- and NF-kappaB-binding sites of the interleukin-8 gene. **J. Virol.**, v. 71, p. 5692-5695, 1997.

MURLI, S.; WATSON, R.O.; GALÁN, J.E. Role of tyrosine kinases and the tyrosine phosphatase SptP in the interaction of *Salmonella* with host cells. **Cell. Microbiol.**, v. 3, p. 795-810, 2001.

NADER DE MACIAS, M.E.; APELLA, M.C.; ROMERO, N.C.; S.N.; OLIVER, G. Inhibition of *Shigella sonnei* by *Lactobacillus casei* and *Lact. acidophilus*. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 73, p. 407-411, 1992.

NADER DE MACIAS, M.E.; ROMER, M.E.; APELLA, M.C.; GONZALES, S.N.; OLIVER, G. Prevention of infectious diarrhea produced by *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by feeding fermentation milk with lactobacilli. **J. Food Prot.**, v. 56, p. 401-405, 1993.

NAIDU, A.S.; BIDLACK, W.R.; CLEMENS, R.A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 39, p. 13-126, 1999.

NARDI, R.D.; VIEIRA, E.C.; CROCCO-AFONSO, L.C.; SILVA, M.E.; BAMBIRRA, E.A.; ANDRADE, A.M.V.; NICOLI, J.R. Bacteriological and immunological aspects of conventional and germfree mice infected with *Salmonella typhimurium*. **Rev. Latinoam. Microbiol.**, v. 31, p. 239-243, 1991.

NAUMOVA, E.S.; KORSHUNOVA, I.V.; JESPERSEN, L.; NAUMOV, G.I. Molecular genetic identification of *Saccharomyces sensu stricto* strains from African sorghum beer. **FEMS Yeast Res.**, v. 3, p. 177-184, 2003.

NEISH, A.S.; GEWIRTZ, A.T.; ZENG, H.; YOUNG, A.N.; HOBERT, M.E.; KARMALI, V.; RAO, A.S.; MADARA, J.L. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination. **Science**, v. 289, p. 1560-1563, 2000.

NEMETH, E.; FAJDIGA, S.; MALAGO, J.; KONINKX, J.; TOOTEN, P.; VAN DIJK, J. Inhibition of *Salmonella*-induced IL-8 synthesis and expression of Hsp70 in enterocyte-like Caco-2 cells after exposure to non-starter lactobacilli. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 112, p. 266-274, 2006.

NETEA, M.G.; VAN DER GRAAF, C.; VAN DER MEER, J.W.; KULLBERG, B.J. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. **J. Leukoc. Biol.**, v. 75, p. 749-755, 2004.

NEUMANN, E.; OLIVEIRA, M.A.; CABRAL, C.M.; MOURA, L.N.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, E.C.; CARA, D.C.; PODOPRIGORA, G.I.; VIEIRA, L.Q. Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, p. 1565-1573, 1998.

NEURATH, M.F.; BECKER, C.; BARBULESCU, K. Role of NF- κ B in immune and inflammatory responses in the gut. **Gut**, v. 43, p. 856-860, 1998.

NEUT, C.; BEZIRTZOGLU, E.; ROMOND, C.; BEERENS, H.; DELCROIX, M.; NOEL, A.M. Bacterial colonization of the large intestine in newborns delivered by caesarian section. **Zentbl. Bakteriologie. Mikrobiologie. Hygiene. Ser.**, v. 266, p. 330-337, 1987.

NEUTRA, M.R.; MANTIS, N.J.; KRAEHENBUHL, J.P. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 1004-1009, 2001.

NEVES, M.J.; ETCHEBEHERE, L.; BRANDÃO, R.L.; CASTRO, I.M.; LIMA, M.E.; NICOLI, J.R. Partial characterization of cholera toxin binding on membranes of *Saccharomyces boulardii*. **Microecol. Ther.**, v. 29, p. 185-190, 2002.

NEWBOLD, C.J.; WALLACE, R.J.; CHEN, X.B.; MCINTOSH, F.M. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers *in vitro* and in sheep. **J. Anim. Sci.**, v. 73, p. 1811-1818, 1995.

NIAULT, M.; THOMAS, F.; PROST, J.; ANSARI, F.H.; KALFON, P. Fungemia due to *Saccharomyces* species in a patient treated with enteral *Saccharomyces boulardii*. **Clin. Infect. Dis.**, v. 28, p. 930, 1999.

NICOLI, J.R. Normal gastrointestinal microbiota in domestic animals and human beings. **Enferm. Infec. Microbiol.**, v. 15, p. 183-190, 1995.

NICOLI, J.R.; RAIBAUD, P. *In vivo* and *in vitro* antagonistic effect against *Clostridium perfringens* of a diffusible compound produced by a *Peptostreptococcus* sp. from human intestinal flora in mice. **Microecol. Ther.**, v. 20, p. 141-146, 1990.

NICOLI, J.R. E VIEIRA, L.Q. Probióticos, prebióticos e simbióticos: moduladores do ecossistema digestivo. **Ciência Hoje**, v. 28, p. 34-38, 2000.

NINOMIYA-TSUJI, J.; KISHIMOTO, K.; HIYAMA, A.; INOUE, J.; CAO, Z.; MATSUMOTO, K. The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. **Nature**, v. 398, p. 252-256, 1999.

NISHIKAWA, M.; HIDAKA, H.; ADELSTEIN, R.S. Phosphorylation of smooth muscle heavy meromyosin by calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. The effect on actin-activated MgATPase activity. **J. Biol. Chem.**, v. 258, p. 14069-14072, 1983.

NISSEN, R.M.; YAMAMOTO, K.R. The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. **Genes Dev.**, v. 14, p. 2314-2329, 2000.

NOURBAKSH, M.; KALBLE, S.; DORRIE, A.; HAUSER, H.; RESCH, K.; KRACHT, M. The NF-kappa B repressing factor is involved in basal repression and interleukin (IL)-1-induced activation of IL-8 transcription by binding to a conserved NF-kappa B-flanking sequence element. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 4501-4508, 2001.

OATLEY, J.T.; RARICK, M.D.; JI, G.E.; LINZ, J.E. Binding of aflatoxin B1 to bifidobacteria *in vitro*. **J. Food Prot.**, v. 63, p. 1133-1136, 2000.

OGGIONI, M.R.; POZZI, G.; BALENSIN, P.E.; GALIENI, P.; BIGAZZI, C. Recurrent septicemia in an immunocompromised patient due to probiotic strains of *Bacillus subtilis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 325-326, 1998.

O'HARA, A.M.; O'REGAN, P.; FANNING, A.; O'MAHONY, C.; MACSHARRY, J.; LYONS, A.; BIENENSTOCK, J.; O'MAHONY, L.; SHANAHAN, F. Functional

modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. **Immunology**, v. 118, p. 202-215, 2006.

ÖRSKOV, F.; BIERING-SÖRENSEN, K. *Escherichia coli* serogroups in breast-fed and bottle-fed infants. **Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B**, v. 83, p. 25-30, 1975.

OTTE, J-M.; PODOLSKI, D.K. Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. **Am. J. Physiol. Gastrointest.**, v. 286, p. G613-G626, 2004.

OUELLETTE, A.J. IV. Paneth cell antimicrobial peptides and the biology of the mucosal barrier. **Am. J. Physiol.**, v. 277, p. G257-G261, 1999.

OUWEHAND A.C.; SALMINEN, S.J. The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. **Int. Dairy J.**, v. 8, p. 749-758, 1998.

OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 82, p. 279-289, 2002.

PARENT, D.; BOSSENS, M.; BAYOT, D.; KIRKPATRICK, C.; GRAF, F.; WILKINSON, F.E.; KAISER, R.R. Therapy of bacterial vaginosis using exogenously-applied *Lactobacillus acidophilus* and a low dose of estriol: a placebo-controlled multicentric clinical trial. **Arzneimittelforschung**, v. 46, p. 68-73, 1996.

PATCHEN, M.; MCVITTIE, T. Effects of a soluble glucan on hemopoietic stem cell proliferation. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 4, p. 273, 1982 (Abstract).

PATEL, J.C.; GALÁN, J.E. Manipulation of the host actin cytoskeleton by *Salmonella*-all in the name of entry. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 8, p. 10-15, 2005.

PATEL, J.C.; ROSSANESE, O.W.; GALÁN, J.E. The functional interface between *Salmonella* and its host cell: opportunities for therapeutic intervention. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 26, p. 564-570, 2005.

PAYNE, D.M.; ROSSOMANDO, A.J.; MARTINO, P.; ERICKSON, A.K.; HER, J.H.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D.F.; WEBER, M.J.; STURGILL, T.W. Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). **EMBO J.**, v. 10, p. 885-892, 1991.

PECQUET, S.; GUILLAUMIN, D.; TANCREDE, C.; ANDREMONT, A. Kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* elimination from the intestines of human volunteers and effect of this yeast on resistance to microbial colonization in gnotobiotic mice. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, p. 3049-3051, 1991.

PERAPOCH, J.; PLANES, A.M.; QUEROL, A.; LOPEZ, V.; MARTINEZ-BENDAYAN, I.; TORMO, R.; FERNANDEZ, F.; PEGUERO, G.; SALCEDO, S. Fungemia with *Saccharomyces cerevisiae* in two newborns, only one of whom had been treated with ultra-levure. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 19, p. 468-470, 2000.

PERDIGON, G.; ALVAREZ, S.; RACHID, M.; AGÜERO, G.; GOBBATO, N. Immune system stimulation by probiotics. **J. Dairy Sci.**, v. 78, p. 1597-1606, 1995.

PERDIGON, G.; VALDEZ, J.G.; RACHID, M. Antitumor activity of yogurt: study of possible immune mechanisms. **J. Dairy Res.**, v. 65, p. 129-138, 1998.

PERET FILHO, L.A.; PENNA, F.J.; BAMBIRRA, E.A.; NICOLI, J.R. Dose effect of oral *Saccharomyces boulardii* treatments on morbidity and mortality in immunosuppressed mice. **J. Med. Microbiol.**, v. 47, p. 111-116, 1998.

PEREZ-SOTELO, L.S.; TALAVERA-ROJAS, M.; MONROY-SALAZAR, H.G.; LAGUNAS-BERNABE, S.; CUARON-IBARGUENGOYTIA, J.A.; JIMENEZ, R.M.; VAZQUEZ-CHAGOYAN, J.C. *In vitro* evaluation of the binding capacity of *Saccharomyces cerevisiae* Sc47 to adhere to the wall of *Salmonella* spp. **Rev. Latinoam. Microbiol.**, v. 47, p. 70-75, 2005.

PHILPOTT, D.J.; GIRARDIN, S.E. The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. **Mol. Immunol.**, v. 41, p. 1099-1108, 2004.

PHILPOTT, D.J.; MCKAY, D.M.; SHERMAN, P.M.; PERDUE, M.H. Infection of T84 cells with enteropathogenic *Escherichia coli* alters barrier and transport functions. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 270, p. G634-G645, 1996.

PHILPOTT, D.J.; MCKAY, D.M.; MAK, W.; PERDUE, M.H.; SHERMAN, P.M. Signal transduction pathways involved in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced alterations in T84 epithelial permeability. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 1680-1687, 1998.

PLEASANTS, J.R. Gnotobiotics. *In*: MELBY Jr, E.C.; ALTMANN, N.H. **Handbook of Laboratory Animal Science**. Cleveland, CRC press, p. 119-174, 1974.

PLETINCX, M.; LEGEIN, J.; VANDENPLAS, Y. Fungemia with *Saccharomyces boulardii* in a 1-year-old girl with protracted diarrhea. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 21, p. 113-115, 1995.

PONGPECH, P.; HENTGES, D.J. Inhibition of *Shigella sonnei* and enterotoxigenic *Escherichia coli* by volatile fatty acid in mice. **Microb. Ecol. Health Dis.**, v. 2, p. 153-161, 1989.

POTHOULAKIS, C.; KELLY, C.P.; JOSHI, M.A.; GAO, N.; O'KEANE, C.J.; CASTAGLIUOLO, I.; LAMONT, J.T. *Saccharomyces boulardii* inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum. **Gastroenterology**, v. 104, p. 1108-1115, 1993.

PROMSOPONE, B.; MORISHITA, T.Y.; AYE, P.P.; COBB, C.W.; VELDKAMP, A.; CLIFFORD, J.R. Evaluation of an avian-specific probiotic and *Salmonella typhimurium*-Specific antibodies on the colonization of *Salmonella typhimurium* in broilers. **J. Food Prot.**, v. 61, p. 176-180, 1998.

QAMAR, A.; ABOUDOLA, S.; WARNY, M.; MICHETTI, P.; POTHOULAKIS, C.; LAMONT, J.T.; KELLY, C.P. *Saccharomyces boulardii* stimulates intestinal immunoglobulin A immune response to *Clostridium difficile* toxin A in mice. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 2762-2765, 2001.

RAFFATELLU, M.; WILSON, R.P.; CHESSA, D.; ANDREWS-POLYMENIS, H.; TRAN, Q.T.; LAWHON, S.; KHARE, S.; ADAMS, L.G.; BAUMLER, A.J. SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 contribute to *Salmonella enterica* serotype typhimurium invasion of epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 146-154, 2005.

RAINGEAUD, J.; GUPTA, S.; ROGERS, J.S.; DICKENS, M.; HAN, J.; ULEVITCH, R.J.; DAVIS, R.J. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 7420-7426, 1995.

RAUCHER, D.; STAUFFER, T.; CHEN, W.; SHEN, K.; GUO, S.; YORK, J.D.; SHEETZ, M.P.; MEYER, T. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion. **Cell**, v. 100, p. 221-228, 2000.

RAUTAVA, S.; ISOLAURI, E. The development of gut immune responses and gut microbiota: effects of probiotics in prevention and treatment of allergic disease. **Curr. Issues Intest. Microbiol.**, v. 3, p. 15-22, 2002.

RAUTIO, M.; JOUSIMIES-SOMER, H.; KAUMA, H.; PIETARINEN, I.; SAXELIN, M.; TYNKKYNEN, S.; KOSKELA, M. Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L. rhamnosus* strain GG. **Clin. Infect. Dis.**, v. 28, p. 1159-1160, 1999.

REID, G. Probiotic therapy and functional foods for prevention of urinary tract infections: state of the art and science. **Curr. Infect. Dis. Rep.**, v. 2, p. 518-522, 2000.

REID, G. Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 437S-443S, 2001.

REID, G.; BRUCE, A.W. Low vaginal pH and urinary-tract infection. **Lancet**, v. 346, p. 8991-8992, 1995.

REID, G.; BRUCE, A.W.; FRASER, N.; HEINEMANN, C.; OWEN, J.; HENNING, B. Oral probiotics can resolve urogenital infections. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 30, p. 49-52, 2001.

REN, X. D., KIOSSES, W. B., SCHWARTZ, M. A. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. **EMBO J.**, v. 18, p. 578-585, 1999.

RIBEIRO, H.J.R. Diarrheal disease in a developing nation. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 95, p. S14-15, 2000.

RICHARD, V.; AUWERA, P.; SNOECK, R.; DANEAU, D.; MEUNIER, F. Nosocomial bacteremia caused by *Bacillus* species. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 7, p. 783-785, 1988.

RIEDEL, C.U.; FOATA, F.; PHILIPPE, D.; ADOLFSSON, O.; EIKMANN, B.J.; BLUM, S. Anti-inflammatory effects of bifidobacteria by inhibition of LPS-induced NF-kappaB activation. **World J. Gastroenterol.**, v. 12, p. 3729-3735, 2006.

RIJNDERS, B.J.; VAN WIJNGAERDEN, E.; VERWAEST, C.; PEETERMANS, W.E. *Saccharomyces* fungemia complicating *Saccharomyces boulardii* treatment in a non-immunocompromised host. **Intensive Care Med.**, v. 26, p.825, 2000.

RIQUELME, A.J.; CALVO, M.A.; GUZMAN, A.M.; DEPIX, M.S.; GARCIA, P.; PEREZ, C.; ARRESE, M.; LABARCA, J.A. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia after *Saccharomyces boulardii* treatment in immunocompromised patients. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 36, p. 41-43, 2003.

ROBERFROID, M.B. Prebiotics: preferential substrates for specific germs? **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 406-409, 2001.

ROBERT, Y.; KOUTSOURIS, A.; SAVKOVIC, S.D.; HECHT, G. Enteropathogenic *Escherichia coli* induced Myosin Light Chain phosphorylation alters intestinal epithelial permeability. **Gastroenterology**, v. 113, p. 1873-1882, 1997.

ROBINSON, M.J.; COBB, M.H. Mitogen-activated protein kinase pathways. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 9, p. 180-186, 1997.

RODRIGUES, Ana Cristina Persichini. **Efeito de *Saccharomyces boulardii* contra os enteropatógenos *Salmonella enteritidis* var. Typhimurium, *Shigella flexneri* e *Escherichia coli* enteroinvasora em camundongos NMRI gnotobióticos e convencionais.** Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1995. (Dissertação, Mestrado).

RODRIGUES, Ana Cristina Persichini. **Efeito de *Saccharomyces boulardii* na resposta imune de camundongos gnotobióticos e convencionais.** Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 2000. (Tese, Doutorado).

RODRIGUES, A.C.; NARDI, R.M.; BAMBIRRA, E.A.; VIEIRA, E.C.; NICOLI, J.R. Effect of *Saccharomyces boulardii* against experimental oral infection with *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* in conventional and gnotobiotic mice. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 81, p. 251-256, 1996.

RODRIGUES, A.C.; CARA, D.C.; FRETEZ, S.H.G.G.; CUNHA, F.Q.; VIEIRA, E.C.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q. *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. **J. Appl. Microbiol.**, v. 88, p. 1-12, 2000.

ROLFE, R.D. Interactions among microorganisms of the indigenous intestinal flora and their influence on the host. **Rev. Infect. Dis.**, v. 6, p. S73-S79, 1984.

ROLFE, R.D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **J. Nutr.**, v. 130, p. 396S-402S, 2000.

ROSELLI, M.; FINAMORE, A.; BRITTI, M.S.; MENGHERI, E. Probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* MB5 and *Lactobacillus rhamnosus* GG protect intestinal Caco-2 cells from the inflammation-associated response induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. **Br. J. Nutr.**, v. 95, p. 1177-1184, 2006.

ROSENSHINE, I.; DONNENBERG M.S.; KAPER, J.B.; FINLAY, B.B. Signal transduction between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells: EPEC induces tyrosine phosphorylation of host cell proteins to initiate cytoskeletal rearrangement and bacterial uptake. **EMBO J.**, v. 11, p. 3551-3560, 1992.

ROTIMI, V.O.; DUERDEN, B.I. The development of the bacterial flora in normal neonates. **J. Med. Microbiol.**, v. 14, p. 51-62, 1981.

ROUSE, J.; COHEN, P.; TRIGON, S.; MORANGE, M.; ALONSO-LLAMAZARES, A.; ZAMANILLO, D.; HUNT, T.; NEBREDÁ, A.R. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. **Cell**, v. 78, p. 1027-1037, 1994.

RUIZ-ALBERT, J.; YU, X.J.; BEUZÓN, C.R.; BLAKEY, A.N.; GALYOV, E.E.; HOLDEN, D.W. Complementary activities of SseJ and SifA regulate dynamics of the *Salmonella typhimurium* vacuolar membrane. **Mol. Microbiol.**, v. 4, p. 645-661, 2002.

SAAVEDRA, J.M. Microbes to fight microbes: a not so novel approach to controlling diarrheal disease. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 21, p. 25-29, 1995.

SABA, T.M. Physiology and physiopathology of the reticuloendothelial system. **Arch. Inter. Med.**, v. 126, p. 1031-1052, 1970.

SADZIKOWSKI, M.R.; SPERRY, J.F.; WILKINS, T.D. Cholesterol reducing bacterium from human feces. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 34, p. 355-362, 1977.

SAINT-MARC, T.; ROSSELLO-PRATS, L.; TOURAINÉ, J.L. Efficacy of *Saccharomyces boulardii* in the treatment of diarrhea in AIDS (letter). **Ann. Med. Intern.**, v. 142, p. 64-65, 1991.

SALEZ, L.; MALO, D. Protagonists of innate immunity during in *Salmonella* infections. **Med. Sci. (Paris)**, v. 20, p. 1119-1124, 2004.

SALMINEN, S.; ISOLAURI, E.; ONNELA, T. Gut flora in normal and disorders status. **Chemotherapy**, v. 41, p. 5-15, 1995.

SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. **Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach**. Washington D.C., ASM Press, 1994.

SANDERS, M.E.; WALKER, D.C.; WALKER, K.M.; AOYAMA, K.; KLAENHAMMER, T.R. Performance of commercial cultures in fluid milk applications. **J. Dairy Sci.**, v. 79, p. 943-955, 1996.

SANSONETTI, P.J.; PHALIPON, A. M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process. **Semin. Immunol.**, v. 11, p. 193-203, 1999.

SANTOS, R.L.; ZHANG, S.; TSOLIS, R.M.; KINGSLEY, R.A.; ADAMS, L.G.; BAUMLER, A.J. Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. **Microb. Infect.**, v. 3, p. 1335-1344, 2001.

SARTOR, R.B. Microbial factors in Crohn's disease, ulcerative colitis and experimental intestinal inflammation, p. 96-124, 1995. In KIRSTNER, J.B.; SHORTER, R.G. (ed.). **Inflammatory Bowel Disease**, 4th. ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.

SAVAGE, D.C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 31, p. 107-133, 1977.

SAVAGE, D.C. Factors influencing biocontrol of bacterial pathogens in the intestine. **Food Technol.**, v. 7, p. 82-87, 1987.

SAVAGE, D.C. Mucosal microbiota. In **Mucosal Immunology**. OGRA, P.L.; MESTECKY, J.; LAMM, M.E.; STROBER, W.; BIENENSTOCK, J.; MCGHEE, J.R. (Eds). San Diego: Academic Press, p. 19-30, 1999.

SAVKOVIC, S.D.; KOUTSOURIS, A.; HECHT, G. Attachment of a noninvasive enteric pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli*, to cultured human intestinal

epithelial monolayers induces transmigration of neutrophils. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 4480-4487, 1996.

SAVKOVIC, S.D.; KOUTSOURIS, A.; HECHT, G. Activation of NF-kappaB in intestinal epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. C1160-C1167, 1997.

SAVKOVIC, S.D.; RAMASWAMY, A.; KOUTSOURIS, A.; HECHT, G. EPEC-activated ERK1/2 participate in inflammatory response but not tight junction barrier disruption. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 281, G890-G898, 2001.

SCALETSKY, I.; SILVA, M.L.; TRABULSKI, L.R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.**, v. 45, p. 534-536, 1984.

SCARPIGNATO, C.; RAMPAL, P. Prevention and treatment of traveler's diarrhea: a clinical pharmacological approach. **Chemotherapy**, v. 41, p. 48-81, 1995.

SCEVOLA, D.; PERVERSI, L.; CAVANNA, C.; CANDIANI, C.; UBERTI, F.; CASTIGLIONI, B.; MARONE, P. Acid tolerance and fecal recovery following oral administration of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Chemother.**, v. 15, p. 143-147, 2003.

SCHELLENBERG, D.; BONINGTON, A.; CHAMPION, M.; LANCASTER, R.; WEBB, S.; MAIN, J. Treatment of *Clostridium difficile* diarrhea with brewer's yeast. **Lancet**, v. 343, p. 171-172, 1994.

SCHIFFRIN, E.J.; BRASSART, D.; SERVIN, A.L.; ROCHAT, F.; DONNET-HUGHES, A. Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 66, p. 515S-520S, 1997.

SCHMIDT-SUPPRIAN, M.; BLOCH, W.; COURTOIS, G. ADDICKS, K.; ISRAEL, A.; RAJEWSKY, K.; PASPARAKIS, M. NEMO/IKK gamma-deficient mice model incontinentia pigmenti. **Mol. Cell**, v. 5, p. 981-992, 2000.

SCHMITZ, M.L.; BACHER, S.; KRACHT, M. I kappa B-independent control of NF-kappa B activity by modulatory phosphorylations. **Trends Biochem. Sci.**, v. 26, p. 186-190, 2001.

SCHNEEBERGER, E.E.; LYNCH, R.D. The tight junction: a multifunctional complex. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 286, p. C1213-C1228, 2004.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics and symbiotics – approaching a definition. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 361S-364S, 2001.

SEN, R.; BALTIMORE, D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. **Cell**, v. 47, p. 921-928, 1986.

SHAPIRO, L.; DINARELLO, C.A. Osmotic regulation of cytokine synthesis *in vitro*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 12230-12234, 1995.

SHEEHAN, M.; WONG, H.R.; HAKE, P.W.; MALHOTRA, V.; O'CONNOR, M.; ZINGARELLI, B. Parthenolide, an inhibitor of the nuclear factor- κ B pathway, ameliorates cardiovascular derangement and outcome in endotoxic shock in rodents. **Mol. Pharmacol.**, v. 61, p. 953-963, 2002.

SHEEHAN, M.; WONG, H.R.; HAKE P.W.; ZINGARELLI, B. Parthenolide improves systemic hemodynamics and decreases tissue leukosequestration in rats with polymicrobial sepsis. **Crit. Care Med.**, v. 31, p. 2263-2270, 2003.

SILVA, A.M.; BAMBIRRA, E.A.; OLIVEIRA, A.L.; SOUZA, P.P.; GOMES, D.A.; VIEIRA, E.C.; NICOLI, J.R. Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with *Salmonella enteritidis* subsp. *typhimurium* in conventional and gnotobiotic mice. **J. Appl. Microbiol.**, v. 86, p. 331-336, 1999.

SILVA, A.M.; BARBOSA, F.H.F.; DUARTE, R.; VIEIRA, L.Q.; NICOLI, J.R. Influence of oral treatment with *Bifidobacterium* Bb12 and Bb46 on *Salmonella typhimurium* translocation and clearance of *Escherichia coli* in gnotobiotic and conventional mice. **Microecol. Ther.**, v. 29, p. 179-184, 2002.

SILVA, A.M.; BARBOSA, F.H.F.; DUARTE, R.; VIEIRA, L.Q.; ARANTES, R.M.E.; NICOLI, J.R. Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis in mice. **J.Appl. Microbiol.**, v. 97, p. 29-37, 2004.

SILVA, M.; JACOBUS, N.V.; DENEKE, C.; GORBACH, S.L. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 8, p. 1231-1233, 1987.

SILVA, M.E. **Modelos experimentais para o estudo de doença de Chagas, camundongos e ratos isentos de germes e convencionais.** Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1986 (Dissertação, Mestrado).

SILVA, S.H.; VIEIRA, E.C.; DIAS, R.S.; NICOLI, J.R. Antagonism against *Vibrio cholerae* by diffusible substances produced by bacterial components of the human faecal microbiota. **J. Med. Microbiol.**, v. 50, p. 161-164, 2001.

SILVERMAN, H.; ROMANO, J.; ELMER, G. **The Vitamin Book.** New York: Bantam Books, 1999.

SINGH, R.; CHAUDHARY, L.C.; KAMRA, D.N.; PATHAK, N.N. Effect of feeding yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell suspension on growth and nutrient utilization in rabbits. **Indian J. Anim. Sci.**, v. 65, p. 104-106, 1995.

SMITH, H.W.; CRABB, W.E. The faecal bacterial flora of animals and man: its development in the young. **J. Pathol. Bacteriol.**, v. 82, p. 53-66, 1961.

SNALL, P.L.; ISBERG, R.R.; FALKOW, S. Comparison of the ability of enteroinvasive *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* to enter and replicate within Hep-2 cells. **Infect. Immun.**, v. 55, p. 1674-1679, 1987.

SONNENBURG, J.L.; ANGENENT, L.T.; GORDON, J.I. Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine? **Nat. Immunol.**, v. 5, p. 569-573, 2004.

SONODA, Y.; KASAHARA, T.; YAMAGUCHI, Y.; KUNO, K.; MATSUSHIMA, K.; MUKAIDA, N. Stimulation of interleukin-8 production by okadaic acid and vanadate in a human promyelocyte cell line, an HL-60 subline. Possible role of mitogen-activated protein kinase on the okadaic acid-induced NF-kappaB activation. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 15366-15372, 1997.

SOUGIOULTZIS, S.; SIMEONIDIS, S.; BHASKAR, K.R.; CHEN, X.; ANTON, P.M.; KEATES, S.; POTHOUKAKIS, C.; KELLY, C.P. *Saccharomyces boulardii* produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF-kappaB-mediated IL-8 gene expression. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 343, p. 69-76, 2006.

STARK, P.L.; LEE, A. The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. **J. Med. Microbiol.**, v. 15, p. 189-203, 1982.

STEELE-MORTIMER, O.; KNODLER, L.A.; MARCUS, S.L.; SCHEID, M.P.; GOH, B.; PFEIFER, C.G.; DURONIO, V.; FINLAY, B.B. Activation of Akt/protein kinase B in epithelial cells by the *Salmonella typhimurium* effector SigD. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 37718-37724, 2000.

STENDER, S.; FRIEBEL, A.; LINDER, S.; ROHDE, M.; MIROLD, S.; HARDT, W.D. Identification of SopE2 from *Salmonella typhimurium*, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell. **Mol. Microbiol.**, v. 36, p. 1206-1221, 2000.

STRANDBERG, K.; SEDVALL, G.; MIDTVEDT, T.; GUSTAFSSON, B.E. Effect of some biologically active amines on the cecum wall of germ-free rats. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 121, p. 699-702, 1966.

STURGILL, T.W.; RAY, L.B.; ERIKSON, E.; MALLER, J.L. Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. **Nature**, v. 334, p. 715-718, 1988.

SURAWICZ, C.M. Probiotics, antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* diarrhoea in humans. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 17, p. 775-783, 2003.

SURAWICZ, C.M.; ELMER, G.W.; SPEELMAN, P.; MCFARLAND, L.V.; CHINN, J.; VAN BELL, G. Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*. **Gastroenterology**, v. 96, p. 981-988, 1989a.

SURAWICZ, C.M.; MCFARLAND, L.V.; ELMER, G.; CHINN, J. Treatment of recurrent *Clostridium difficile* colitis with vancomycin and *Saccharomyces boulardii*. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 84, p. 1285-1287, 1989b.

SURAWICZ, C.M.; MCFARLAND, L.V.; GREENBERG, R.N.; RUBIN, M.; FEKETY, R.; MULLIGAN, M.E.; GARCIA, R.J.; BRANDMARKER, S.; BOWEN, K.; BORJAL, D.; ELMER, G.W. The search for a better treatment for recurrent *Clostridium difficile* disease: use of high-dose vancomycin combined with *Saccharomyces boulardii*. **Clin. Infect. Dis.**, v. 31, 1012-1017, 2000.

SUZUKI, K.; HA, S.-A.; TSUJI, M.; FAGARASAN, S. Intestinal IgA synthesis: A primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut. **Seminars Immunol.**, v. 19, p. 127-135, 2007.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 21, p. 335-376, 2003.

TAKEUCHI, A. Electron microscope studies of experimental *Salmonella* infection. I. Penetration into the intestinal epithelium by *Salmonella typhimurium*. **Am. J. Pathol.**, v. 50, p. 109-136, 1967.

TALLANT, T.; DEB, A.; KAR, N.; LUPICA, J.; DE VEER, M.J.; DIDONATO, J.A. Flagellin acting via TLR5 is the major activator of key signaling pathways leading to NF-kappa B and proinflammatory gene program activation in intestinal epithelial cells. **BMC Microbiol.**, v. 23, p. 33-57, 2004.

TANNOCK, G.W. Microbial interactions and influences in gastrointestinal tract. *Lactobacilli* and the gastrointestinal tract. **Proc. IV ISME**, p. 526-532, 1986.

TASTEYRE, A.; BARC, M.C.; KARJALAINEN, T.; BOURLIOUX, P.; COLLIGNON, A. Inhibition of *in vitro* cell adherence of *Clostridium difficile* by *Saccharomyces boulardii*. **Microb. Pathog.**, v. 32, p. 219-25, 2002.

TEITELBAUM, J.E.; WALKER, W.A. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 22, p. 107-138, 2002.

TEJADA-SIMON, M.V.; LEE, J.H.; USTUNOL, Z.; PESTKA, J.J. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate immunoglobulin A responses to cholera toxin in mice. **J. Dairy Sci.**, v. 82, p. 649-660, 1999.

TEREBIZNIK, M.R.; VIEIRA, O.V.; MARCUS, S.L.; SLADE, A.; YIP, C.M.; TRIMBLE, W.S.; MEYER, T.; FINLAY, B.B.; GRINSTEIN, S. Elimination of host cell PtdIns(4,5)P₂ by bacterial SigD promotes membrane fission during invasion by *Salmonella*. **Nature Cell Biol.**, v. 4, p. 766-773, 2002.

THEPPANGNA, W.; OTSUKI, K.; MURASE, T. Inhibitory effects of *Enterococcus* strains obtained from a probiotic product on *in vitro* growth of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis strain IFO3313. **J. Food Prot.**, v. 69, p. 2258-2262, 2006.

TIAGO, Fabiana da Conceição Pereira. **Seleção de leveduras não-Saccharomyces de origem ambiental e agro-alimentar para uso como probiótico**. Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil, 2008. (Dissertação, Mestrado).

TOOTHAKER, R.D.; ELMER, G.W. Prevention of clindamycin-induced mortality in hamsters by *Saccharomyces boulardii*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 26, p. 552-556, 1984.

TREXLER, P.C. A rationale for the development of gnotobiotics. **Lab. Anim.**, v. 12, p. 257-262, 1978.

TRIANTAFILOU, M.; TRIANTAFILOU, K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. **Trends Immunol.**, v. 23, p. 301-304, 2002.

UEMATSU, S.; MATSUMOTO, M.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E(2) production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E(2) synthase gene induced by the Toll-like receptor 4/MyD88/NFIL6 pathway. **J. Immunol.**, v. 168, p. 5811-5816, 2002.

VAN DEN BERG, R.; HAENEN, G.R.; VAN DEN BERG, H.; BAST, A. Transcription factor NF-kappaB as a potential biomarker for oxidative stress. **Br. J. Nutr.**, v. 86, p. S121-S127, 2001.

VAN DER AA KUHLE, A.; JESPERSEN, L. The taxonomic position of *Saccharomyces boulardii* as evaluated by sequence analysis of the D1/D2 domain of 26S rDNA, the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region and the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 26, p. 564-571, 2003.

VAN DER WAAIJ, D. Bioregulation of the digestive tract microflora. **Rev. Sci. Techn. Off. Inter. Epizoot.**, v. 8, p. 333-345, 1989.

VANDEN BERGHE, W.; DE BOSSCHER, K.; BOONE, E.; PLAISANCE, S.; HAEGEMAN, G. The nuclear factor-kappaB engages CBP/p300 and histone acetyltransferase activity for transcriptional activation of the interleukin-6 gene promoter. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 32091-32098, 1999.

VANDENBERG, P.A. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 221-238, 1993.

VAUGHAN, E.E.; SCHUT, F.; HEILIG, H.G.H.J.; ZOETENDAL, E.G.; DE VOS, W.M.; AKKERMANS, A.D.L. A molecular view of the intestinal ecosystem. **Curr. Issues Intest. Microbiol.**, v. 1, p. 1-12, 2000.

VESA, T.; MARTEAU, P.; KORPELA, R. Lactose intolerance. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 19, p. 165S-175S, 2000.

VETTER, I.R.; WITTINGHOFER, A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. **Science**, v. 294, p. 1299-1304, 2001.

VIANNA, Cristina Roscoe. **Efeito do estresse térmico e alcoólico no metabolismo da trealose e expressão das proteínas de choque térmico em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas durante a produção da cachaça mineira.** Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil, 2003. (Dissertação, Mestrado).

VIEIRA, L.Q.; OLIVEIRA, M.R.; NEUMANN, E.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, E.C. Parasitic infections in germfree animals. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, p. 105-110, 1998.

VIGGIANO, M.; BADETTI, C.; BERNINI, V.; GARABEDIAN, M.; MANELLI, J.C. *Saccharomyces boulardii* fungemia in a patient with severe burns. **Ann. Fr. Anesth. Reanim.**, v. 14, p. 356-358, 1995.

WAETZIG, G.H.; SCHREIBER, S. Review article: mitogen-activated protein kinases in chronic intestinal inflammation - targeting ancient pathways to treat modern diseases. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 18, p. 17-32, 2003.

WATERS, S.M.; MURPHY, R.A. POWER, R.F. Assessment of the effects of Nurmi-type cultures and a defined probiotic preparation on a *Salmonella typhimurium* 29E challenge *in vivo*. **J. Food Prot.**, v. 68, p. 1222-1227, 2005.

WEN, X.; WU, G.D. Evidence for epigenetic mechanisms that silence both basal and immune-stimulated transcription of the IL-8 gene. **J. Immunol.**, v. 166, p. 7290-7299, 2001.

WHITMARSH, A.J.; DAVIS, R.J. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. **J. Mol. Med.**, v. 74, p. 589-607, 1996.

WILSON, K.H.; PERINI, F. Role of competition for nutrients of *Clostridium difficile* by the colonic microflora. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 2610-2614, 1988.

WINZEN, R.; KRACHT, M.; RITTER, B.; WILHELM, A.; CHEN, C.Y.; SHYU, A.B.; MULLER, M.; GAESTEL, M.; RESCH, K.; HOLTMANN, H. The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. **EMBO J.**, v. 18, p. 4969-4980, 1999.

WOHLT, J.E.; CORCIONE, T.J.; ZAJAC, P.K. Effect of yeast on feed intake and performance of cows fed diets based on corn silage during early lactation. **J. Dairy Sci.**, v. 87, p. 1345-1352, 1998.

WOLLOSWSKI, I.; JI, S.T.; BAKALINSKY, A.T.; NEUDECKER, C.; POOL-ZOBEL, B.L. Bacteria used for the production of yogurt inactivate carcinogens and prevent DNA damage in the colon of rats. **J. Nutr.**, v. 129, p. 77-82, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, 2002. Disponível em <http://www.who.int/medicines>. Acessado em 06 de setembro 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, 2007. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>. Acessado em 30 de junho de 2007.

WU, X.; VALLANCE, B.A.; BOYER, L.; BERGSTROM, K.S.; WALKER, J.; MADSEN, K.L.; O'KUSKY, J.R.; BUCHAN, A.M.; JACOBSON, K. *Saccharomyces boulardii* ameliorates *Citrobacter rodentium*-induced colitis through actions on bacterial virulence factors. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.**, 2007. [Epub ahead of print].

YAMAMOTO, M.; SATO, S.; MORI, K.; HOSHINO, K.; TAKEUCHI, O.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Cutting edge: A novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. **J. Immunol.**, v. 169, p. 6668-6672, 2002.

YANG, S.K.; ECKMANN, L.; PANJA, A.; KAGNOFF, M.F. Differential and regulated expression of C-X-C, C-C, and C-chemokines by human colon epithelial cells. **Gastroenterology**, v. 113, p. 1214-1223, 1997.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. In KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The Yeasts: a Taxonomic Study**. 4th ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p. 77-100, 1998.

YUHAN, R.; KOUTSOURIS, A.; SAVKOVIC, S.D.; HECHT, G. Enteropathogenic *Escherichia coli*-induced myosin light chain phosphorylation alters intestinal epithelial permeability. **Gastroenterology**, v. 113, p. 1873-1882, 1997.

ZANDI, E.; KARIN, M. Bridging the gap: composition, regulation, and physiological function of the IkappaB kinase complex. **Mol. Cell. Biol.**, v. 19, p. 4547-4551, 1999.

ZHANG, S.; SANTOS, R.L.; TSOLIS, R.M.; STENDER, S.; HARDT, W.D.; BAUMLER, A.J.; ADAMS, L.G. The *Salmonella enterica* serotype typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 3843-3855, 2002.

ZHOU, D.; GALÁN, J. *Salmonella* entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins. **Microbes Infect.**, v. 3, p. 1293-1298, 2001.

ZHOU, D.; CHEN, L.M.; HERNANDEZ, L.; SHEARS, S.B.; GALÁN, J.E. A *Salmonella* inositol polyphosphatase acts in conjunction with other bacterial effectors to promote host cell actin cytoskeleton rearrangements and bacterial internalization. **Mol. Microbiol.**, v. 39, p. 248-259, 2001.

ZINGARELLI, B. Nuclear factor- κ B. **Crit. Care Med.**, v. 33, p. S414-S416, 2005.

ZINGARELLI, B.; SHEEHAN, M.; WONG, H.R. Nuclear factor- κ B as a therapeutic target in critical care medicine. **Crit. Care Med.**, v. 31, p. S105-S111, 2003.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, v. 12, p. 121-127, 2000.

ZUNIC, P.; LACOTTE, J.; PEGOIX, M.; BUTEUX, G.; LEROY, G.; MOSQUET, B.; MOULIN, M. *Saccharomyces boulardii* fungemia. A propos d'un cas. **Therapie**, v. 46, p. 498-489, 1991.

ZYCHLINSKY, A.; SANSONETTI, P. Apoptosis in bacterial pathogenesis. **J. Clin. Investig.**, v. 100, p. 493-496, 1997.

X.1 Artigos publicados

MARTINS, F.S.; CARA, D.C.; ROSA, C.A.; NEVES, M.J.; PENNA, F.J. & NICOLI, J.R. Efeito do método de conservação na viabilidade, reativação, colonização intestinal e efeito imunomodulador de dois produtos probióticos à base de leveduras. *Revista Brasileira de Medicina*, v. 62, n. 1/2, p. 36-41, 2006.

MARTINS, F.S.; RODRIGUES, A.C.P.; TIAGO, F.C.P.; PENNA, F.J.; ROSA, C.A.; ARANTES, R.M.E.; NARDI, R.M.D.; NEVES, M.J.; NICOLI, J.R. *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. *Journal of Medical Microbiology*, v. 56, n. 3, p. 352-359, 2007.

X.2 Artigos aceitos para publicação

MARTINS, F.S.; MIRANDA, I.C.; ROSA, C.A.; NICOLI, J.R.; NEVES, M.J. Effect of the trehalose levels on the screening of yeast as probiotic by *in vivo* and *in vitro* assays. (Artigo submetido à revista “Brazilian Journal of Microbiology” e aceito para publicação).

X.3 Artigos a publicar

MARTINS, F.S.; LAGADEC, P. PEYRON, J-F; NICOLI, J.R.; RAMPAL, P.; CZERUCKA, D. The probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* prevents *Salmonella* Typhimurium infection of T84 cells. (Este artigo será submetido à revista “Infection and Immunity”).

MARTINS, F.S.; DALMASSO, G.; IMBERT, V.; PEYRON, J-F; NEVES, M.J.; ROSA, C.A.; PENNA, F.J.; NICOLI, J.R. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 on barrier function and signal transduction pathway in T84 cells infected by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. (Este artigo será submetido à revista “Journal of Medical Microbiology”).

MARTINS, F.S.; DALMASSO, G.; DOYE, A.; LEMICHEZ, E.; IMBERT, V.; PEYRON, J-F; RAMPAL, P.; NICOLI, J.R.; CZERUCKA, D. Epithelial integrity, inflammation and involvement of MAP Kinases of T84 intestinal cells infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. (Este artigo será submetido à revista “Journal of Medical Microbiology”).

MARTINS, F.S.; VELOSO, L.C.; ARANTES, R.M.E.; NICOLI, J.R. Comparação de cinco preparações comerciais contendo *Saccharomyces boulardii*, na forma liofilizada, ou *Saccharomyces cerevisiae*, em suspensão, em termos de proteção contra a infecção experimental por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium em camundongos convencionais.

X.4 Participação em eventos

III Fórum de Microbiologia do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.. Belo Horizonte/MG, 11 de Abril de 2007.

WORKSHOP: BIOQUÍMICA E FISILOGIA DE MICRORGANISMOS: ASPECTOS BÁSICOS E APLICADOS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, 30 de Abril a 02 de Maio de 2007.

X INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY CONFERENCE & XXXVI ANNUAL MEETING OF SBBq (SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR). Salvador/BA, Brasil, 21 a 25 de Maio de 2007.

X.5 Trabalhos apresentados em eventos

MARTINS, A.K.S.; **MARTINS, F.S.**; TIAGO, F.C.P.; CARA, D.C.; ROSA, C.A.; PENNA, F.J.; NEVES, M.J.; NARDI, R.M.D.; NICOLI, J.R. Efeito do método de conservação na viabilidade, reativação, colonização intestinal e efeito imunomodulador de dois produtos probióticos à base de leveduras. II Fórum do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. Belo Horizonte/MG, 15 de Março de 2006.

MARTINS, F.S.; DALMASSO, G.; VELOSO, L.C.; DOYE, A.; LEMICHEZ, E.; IMBERT, V.; PEYRON, J-F; RAMPAL, P.; NICOLI, J.R.; CZERUCKA, D. Efeitos de *Saccharomyces boulardii* na invasão, integridade epitelial e sinalização celular induzidas em células intestinais infectadas por *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. III Fórum de Microbiologia do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Belo Horizonte/MG, 11 de Abril de 2007.

VELOSO, L.C.; **MARTINS, F.S.**; NICOLI, J.R. Comparação de cinco preparações comerciais contendo *Saccharomyces boulardii* ou *S. cerevisiae* em termos de proteção contra a infecção experimental por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium em camundongos convencionais. III Fórum de Microbiologia do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Belo Horizonte/MG, 11 de Abril de 2007.

MARTINS, A.K.S.; **MARTINS, F.S.**; VELOSO, L.C.; CARA, D.C.; NICOLI, J.R. NARDI, R.M.D. Estudo de antagonismo *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* do probiótico biovicerin® contra microorganismos patogênicos. III Fórum de Microbiologia do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Belo Horizonte/MG, 11 de Abril de 2007.

TIAGO, F.C.P.; **MARTINS, F.S.**; VELOSO, L.C.; CARA, D.C.; ROSA, C.A.; NICOLI, J.R. Estudo de leveduras de origem ambiental para uso como probiótico. III Fórum de Microbiologia do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Belo Horizonte/MG, 11 de Abril de 2007.

MARTINS, F.S.; DALMASSO, G.; DOYE, A.; LEMICHEZ, E.; IMBERT, V.; PEYRON, J-F; RAMPAL, P.; NICOLI, J.R.; CZERUCKA, D. Efeitos de *Saccharomyces boulardii* na invasão, integridade epitelial e sinalização celular induzidas em células intestinais infectadas por *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. WORKSHOP: BIOQUÍMICA E FISILOGIA DE MICRORGANISMOS: ASPECTOS BÁSICOS E APLICADOS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, 30 de Abril a 02 de Maio de 2007.

TIAGO, F.C.P.; **MARTINS, F.S.**; VELOSO, L.C.; CARA, D.C.; ROSA, C.A.; NICOLI, J.R. Estudo de leveduras de origem ambiental para uso como probiótico. WORKSHOP: BIOQUÍMICA E FISILOGIA DE MICRORGANISMOS: ASPECTOS BÁSICOS E APLICADOS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto, 30 de Abril a 02 de Maio de 2007.

MARTINS, F.S.; BARBOSA, F.H.F.; CARA, D.C.; ROSA, C.A.; PENNA, F.J.; NEVES, M.J.; NICOLI, J.R. Efeito do método de conservação na viabilidade, reativação, colonização intestinal e efeito imunomodulador de dois produtos probióticos contendo *Saccharomyces boulardii* ou *Saccharomyces cerevisiae*. III CONGRESSO LATINO AMERICANO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS / IX CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS / II ENCONTRO NACIONAL DE CENTROS DE CONTROLE DE ZOONOSES. Porto Seguro/BA. 01 a 04 de Maio de 2007.

TIAGO, F.C.P.; **MARTINS, F.S.**; SOUZA, T.C.; CARA, D.C.; ROSA, C.A.; NICOLI, J.R. Seleção de leveduras do gênero *Pichia* para uso como probiótico. III CONGRESSO LATINO AMERICANO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS / IX CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS / II ENCONTRO NACIONAL DE CENTROS DE CONTROLE DE ZOONOSES. Porto Seguro/BA. 01 a 04 de Maio de 2007.

LIMA, L.P.J.; BARBOSA, F.H.F.; BAMBIRRA, F.H.S.; BAMBIRRA, L.H.S.; **MARTINS, F.S.** Produção de proteínas unicelulares (*Candida utilis*) a partir de vinhoto

de cana-de-açúcar suplementado com fontes de carbono alternativas para a alimentação animal. III CONGRESSO LATINO AMERICANO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS / IX CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS / II ENCONTRO NACIONAL DE CENTROS DE CONTROLE DE ZOONOSES. Porto Seguro/BA. 01 a 04 de Maio de 2007.

MARTINS, F.S.; DALMASSO, G.; DOYE, A.; LEMICHEZ, E.; IMBERT, V.; PEYRON, J-F.; RAMPAL, P.; NICOLI, J.R.; CZERUCKA, D. Effects of *Saccharomyces boulardii* on the invasion, barrier function and signal transduction pathway induced in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-infected T84 cells. X INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY CONFERENCE & XXXVI ANNUAL MEETING OF SBBq (SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR). Programas e Resumos da X IUBMB Conference 2007 & XXXVI Annual Meeting of SBBq. Salvador/BA, Brasil, 21 a 25 de Maio de 2007.

MARTINS, F.S.; MARTINS, A.K.S.; DALMASSO, G.; DOYE, A.; LEMICHEZ, E.; IMBERT, V.; PEYRON, J-F.; RAMPAL, P.; NICOLI, J.R.; CZERUCKA, D. Effects of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in the epithelial integrity, inflammation and implication of MAP kinases in response to the infection in cells. X INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY CONFERENCE & XXXVI ANNUAL MEETING OF SBBq (SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR). Programas e Resumos da X IUBMB Conference 2007 & XXXVI Annual Meeting of SBBq. Salvador/BA, Brasil, 21 a 25 de Maio de 2007.

MARTINS, F.S.; TIAGO, F.C.P.; DALMASSO, G.; IMBERT, V.; PEYRON, J-F.; ROSA, C.A.; NEVES, M.J.; PENNA, F.J.; NICOLI, J.R. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 in the barrier function and signal transduction pathway induced in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-infected T84 cells. X INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY CONFERENCE & XXXVI ANNUAL MEETING OF SBBq (SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR). Programas e Resumos da X IUBMB

Conference 2007 & XXXVI Annual Meeting of SBBq. Salvador/BA, Brasil, 21 a 25 de Maio de 2007.

ELIAN, S.D.A.; **MARTINS, F.S.**; VELOSO, L.C.; ARANTES, R.M.E.; NARDI, R.M.D.; NICOLI, J.R. Comparação de cinco preparações comerciais contendo *Saccharomyces boulardii* ou *S. cerevisiae* em termos de viabilidade, velocidade de reativação e proteção contra a infecção experimental por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium em camundongos convencionais. XVI Semana de Iniciação Científica da UFMG. Belo Horizonte/MG, 01 a 05 de Outubro de 2007.

MARTINS, F.S.; LAGADEC, P. PEYRON, J-F; NICOLI, J.R.; RAMPAL, P.; CZERUCKA, D. The probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* prevents *Salmonella* Typhimurium infection of T84 cells. 15th United European Gastroenterology Week. Le Palais des Congrès de Paris, Paris, France. 27-31 de Outubro de 2007.

X.6 Prêmios recebidos

Trabalho selecionado para apresentação oral: ***Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in mice**, XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2005. Santos/SP, 22 a 25 de Novembro de 2005.

X.7 Autorização do Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO
ANIMAL (CETEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº **075/04** relativo ao projeto intitulado "*Sinalização intracelular e imunomodulação induzidas por Saccharomyces cerevisiae linhagem UFMG905 como mecanismos de ação na proteção contra enteropatógenos*", que tem como responsável Jacques Robert Nicoli, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo *Comitê de Ética em Experimentação Animal* (CETEA/UFMG), tendo sido aprovado em reunião de **03.11.2004**.

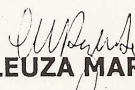
Este certificado expira-se em **03.11.2009**

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **075/04** related to the project entitled "*Intracellular signalling and immunomodulation induced by sacchoromyces cerevisae (UFMG905) as the mechanims of protection against enteropathogens*", under the supervision Jacques Robert Nicoli, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the *Ethics Committee in Animal Experimentation* (CETEA/UFMG) and was approved in **03.11.2004**.

This certificate expires in **03.11.2009**.

Belo Horizonte, 03 de novembro de 2004


Dra. CLEUZA MARIA F. REZENDE
Presidente do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais -Reitoria – Campus Pampulha
Avenida Antônio Carlos 6627-7 Andar CEP: 31270-901 - Belo Horizonte MG-Brasil
Telefone: (31) 3499-4031 – Fax: (31) 3499-4027 – Home page: [www. ufmg.br/prpq/cetea](http://www.ufmg.br/prpq/cetea)

X.8 Certificado de realização de estágio na Université de Nice, França

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Ministério da Educação - Anexos I e II - 2º Andar
Caixa postal 365
70359-970 - Brasília, DF
Brasil

**A QUEM INTERESSAR POSSA**

Declaramos, para os devidos fins, que o(a) interessado(a) abaixo, foi bolsista da Capes e realizou Estágio de doutorando no Exterior, por meio do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior - PDEE.

Bolsista: FLAVIANO DOS SANTOS MARTINS
Período da bolsa: 09/2005 a 08/2006
Instituição: UNIVERSITÉ DE NICE
País: FRANÇA
Área: BIOLOGIA E FISILOGIA DOS MICROORGANISMOS.

Brasília, 27 de Outubro de 2006

Sandra Lopes Hugo de Jesus
Coordenação de Bolsa no Exterior