

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA CAPACIDADE DE
LIGAÇÃO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS E NÃO
PATOGENICAS EM SÍTIOS ESPECÍFICOS DAS
LEVEDURAS *SACCHAROMYCES BOULARDII* E
SACCHAROMYCES CEREVISIAE UFMG A-905**

Fabiana da Conceição Pereira Tiago

**Belo Horizonte
2012**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA CAPACIDADE DE
LIGAÇÃO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS E NÃO
PATOGENICAS EM SÍTIOS ESPECÍFICOS DAS
LEVEDURAS *SACCHAROMYCES BOULARDII* E
SACCHAROMYCES CEREVISIAE UFMG A-905**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Orientador:

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

Co-orientador:

Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins
(Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG)

Colaboradores:

Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG).

Prof. Dr. Ieso de Miranda Castro (Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas- NUBEP/UFOP).

Prof. Dr. Rogélio Lopes Brandão (Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas- NUBEP/ UFOP).

Dr. Paulo F. P. Pimenta (Centro de Pesquisa René Rachou / Fiocruz)

Dra. Helena Rocha Araújo (Centro de Pesquisa René Rachou / Fiocruz)

Belo Horizonte/MG
2012

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho a meus pais, minha irmã e ao meu marido, que estiveram comigo em todos os momentos deste trabalho, me apoiando e incentivando.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força espiritual e pelo dom da vida.

Ao meu orientador, Prof. Jacques Robert Nicoli, pelo apoio durante a realização do projeto, pela orientação neste trabalho e pelas oportunidades de crescimento profissional e pessoal.

Ao meu co-orientador Flaviano dos Santos Martins pela orientação, paciência e amizade. Pelo olhar crítico e ótimas sugestões.

À Universidade Federal de Minas Gerais, pela oportunidade de cursar o Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

Ao meu colaborador Carlos Rosa pela disponibilização das leveduras.

Ao meu colaborador Rogélio Brandão pela orientação e disponibilização da coleção de leveduras mutantes da Euroscarf.

Ao meu colaborador Dr. Ieso de Miranda pela orientação, pela disponibilização da coleção de leveduras mutantes da coleção Euroscarf. Por ter marcado minha vida com seus ensinamentos em biologia molecular e sempre me auxiliar em tudo que preciso.

Ao meu colaborador Dr. Paulo F. P. Pimenta pelo apoio e possibilidade de realizar os experimentos em microscopia eletrônica e pelas valiosas discussões no desenho experimental.

A Dr. Helena Araujo pelos ótimos momentos na Fiocruz, por todo o apoio e carinho. Pela paciência nas inúmeras manhãs e tardes diante do MEV.

Aos alunos e pesquisadores do Laboratório de Entomologia Médica. Obrigada pelo convívio e pelo auxílio quando necessário.

Aos meus pais, Adair e Maria de Fátima, pelo grande exemplo de vida, amor e dedicação à família, com resignação e humildade, mas também com coragem e sem nunca desistir.

A minha querida irmã Tati pelo carinho, otimismo e boas risadas dos problemas.

Ao meu amado companheiro de todas as horas, Izaque Vasconcelos, que me acompanhou na minha formação, me apoiando, estimulando e contribuindo na tomada de decisões.

Ao Bernardo Barbosa, pelo indispensável auxílio técnico.

A amiga Clélia pela preciosa ajuda técnica, amizade inestimável, simpatia e alegria.

Aos Professores e colegas do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos pela amizade, convivência e auxílio sempre quando necessário.

A minha amiga Ariane pelo incentivo desde o início da graduação, por compartilhar comigo sonhos e anseios, pela amizade e confiança.

Às minhas amigas Tássia e Silvia pela amizade, pelos incentivos nos momentos difíceis e por tornarem o trabalho no laboratório muito mais divertido.

À minha amiga Éricka, pelo auxílio nos experimentos, pelas intermináveis diluições e plaqueamentos. Pelo indispensável auxílio nas dosagens e principalmente pela amizade e carinho.

Ao aluno de iniciação científica Fábio Cassier pela grandiosa ajuda.

Ao Antônio e Marcelo pelo manuseio com os animais isentos de germe.

A todos que de alguma forma contribuíram com seu ombro amigo, seu sorriso e palavras de apoio, obrigada.

Ao CNPq, CAPES e Fapemig pelo apoio financeiro.

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver...”

Martin Luther King

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	xiii
Lista de figuras	xiv
Lista de gráfico	xvi
Lista de tabelas	xvii
Resumo	xix
Abstract	xx
I. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	1
I.1 Microbiota indígena	1
I.2 Probióticos	3
I.3 A levedura <i>Saccharomyces boulardii</i>	4
I.4 A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
I.5 Processo de adesão das leveduras	8
I.6 Estrutura da parede celular das leveduras <i>Saccharomyces</i>	10
I.7 Processo de adesão das bactérias	12
I.8 Ligação de bactérias e toxinas em probióticos	14
I.9 Quimiotaxia	16
I.10 Comparação fisiológicas e moleculares entre <i>S. boulardii</i> e <i>S. cerevisiae</i>	18
1.11 O modelo animal gnotobiótico	19
II RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	22
III. OBJETIVOS	24
III. 1 Objetivo geral	24
III. 2 Objetivo específico 1	24
III. 3 Objetivo específico 2	24
IV. METODOLOGIA	25
IV.1 Micro-organismos	25
IV.1.1 Leveduras	25
IV.1.2 Bactérias	26
IV.2 Animais	26
IV.3 Ensaio de aglutinação	27
IV.4 Ensaio de adesão	27
IV.5 Ensaio de sedimentação	28

IV.6 Avaliação de fatores que influenciam na adesão	28
IV.6.1 Carboidratos	28
IV.6.2 Teste com oxgall	28
IV.6.3 Viabilidade da levedura	29
IV.6.4 Fases do crescimento	29
IV.6.5 Avaliação do pH e minerais na adesão	29
IV.7 Ensaio de floculação	29
IV. Microscopia Eletrônica	30
IV.8.1 Microscopio Eletrônico de Varredura (MEV) <i>in vitro</i>	30
IV.8.2 Microscopio Eletrônico de Varredura (MEV) <i>in vivo</i>	31
IV.9 Experimentação de quimiotaxia	31
IV.10 Avaliação da capacidade de ligação dos patógenos à parede celular das leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741 mutantes de parede celular	33
IV.11 Expressão dos genes relacionados com a síntese de componentes responsáveis pela ligação patógeno-levedura.	33
IV.11.1 Extração do DNA cromossômico da levedura BY4741 e realização de PCR	33
IV.11.2 Amplificação por PCR	34
IV.12 Ensaio de sedimentação utilizando micro-organismos da microbiota	34
IV.13 Estatística	34
V. RESULTADO E DISCUSSÃO	39
V.1 Ensaio de adesão e aglutinação	39
V.2 Ensaio de sedimentação e efeito da viabilidade e das diferentes fases de crescimento	42
V.3 Ensaio de sedimentação e adesão utilizando <i>S. cerevisiae</i> W303 e o sobrenadante do meio YPG	45
V.4 Avaliação de fatores influenciando na adesão	48
V.4.1 Carboidrato	48
V.4.2 Ensaio com ácidos biliares	50
V.4.3 Avaliação da influencia do pH na adesão	53
V.4.4 Avaliação da influencia de minerais na adesão	56
V.5 Floculação entre bactérias e leveduras	58
V.6 Adesão <i>in vitro</i> visualizada por MEV	60
V.7 Adesão <i>in vivo</i> visualizada por MEV	63
V.8 Experimentação de quimiotaxia	66

V.9 Avaliação da capacidade de ligação dos patógenos na superfície de mutantes de <i>S. cerevisiae</i> BY4741 para parede celular	69
V.10 Ensaio de sedimentação dos patógenos com os mutantes BY4741 negativos para adesão	76
V.11 Ensaio de sedimentação com micro-organismos da microbiota	79
V.12 Extração e amplificação por PCR do DNA da levedura <i>S. cerevisiae</i> BY4741	82
VI. RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES	85
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
VIII. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO	108
VIII.1 Atividades desenvolvidas	108
VIII.1.1 Disciplinas cursadas	108
VIII.1.2 Trabalhos apresentados em congresso	108
VIII.1.3 Artigo publicados e submetido à publicação	109
VIII.1.4 Participação em eventos	110
VIII.1.5 Participação em cursos	110
IX. ANEXOS	112

LISTA DE ABREVIATURAS

CDTEC - *E. coli* produtora de toxina de distensão citoletal

DHEC - *E. coli* associada a diarreia hemolítica

EAggEC - *E. coli* enteroagregativa

EHEC - *E. coli* enterohemorrágica

EIEC - *E. coli* enteroinvasiva

EPEC - *E. coli* enteropatogênicas

ETEC - *E. coli* enterotoxigênica

GM1 – monossialogangliosídeo

GPI – glicosilfosfatidilinositol

GPI – glicosilfosfatidilinositol

ITS – espaço interno de transcrição

MAPK - mitogen activated protein kinase

MCPs - proteínas aceptoras de metil

NF- κ B - nuclear factor kappa B

TNF – α – fator de necrose tumoral α

LISTA DE FIGURA

Figura 1 - Arquitetura lateral da parede celular da levedura.....	12
Figura 2 – Interação dos transdutores das proteínas de quimiotaxia.....	18
Figura 3 – Placas para experimentação em quimiotaxia	32
Figura 4 – Fotomicrografia demonstrando a adesão da <i>S.enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 a levedura <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905 (10x100).....	41
Figura 5 – (A) <i>S. boulardii</i> associada a <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028. (B) <i>S. cerevisiae</i> W303 associada a <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028. (C, D, E e F) <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905 associada a <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028.....	61
Figura 6 – (A e B) <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 associada a <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028. A seta branca evidencia a ligação da fimbria da bactéria aderida na parede da levedura. (C) <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905 associada a <i>E. coli</i>	62
Figura 7 – (A, B, C, D) <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 aderidas no epitelial do ceco de animais NIH isentos de germes (grupo controle). (E, F) - <i>S.boulardii</i> associada a <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028. Podemos observar a aderência da bactéria nas leveduras e a formação de glomeros (seta branca).....	64
Figura 8 – (A, B) <i>S.boulardii</i> associada a <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028. (C, D, E, F) – <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905 associada a <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028. Pode ser observado em todos os casos a adesão da bactéria nas leveduras. Estruturas de co-agregação (glomeros) estão indicados pelas setas brancas.....	65
Figura 9 - Figuras A, B e C ilustram a adesão entre a levedura <i>S. cerevisiae</i> BY4741 e <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028.....	74

Figura 10 – Fotomicrografia do fenômeno de adesão entre *S. cerevisiae* mutante YGL032C e *S. Typhimurium* ATCC 14028. (C) Ausência de adesão entre *S. cerevisiae* mutante YGR 279C e *S. Typhimurium* ATCC 14028 levedura.....75

Figura 11. Gel de agarose dos produtos de PCR dos genes.....84

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1 . Floculação entre as leveduras e bactérias no sobrenadante da cultura leveduriforme.....	59
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Leveduras mutantes de parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741 que foram testadas.....	35
Tabela 2. Ensaio de adesão das leveduras vivas ou mortas com as bactérias patogênicas.....	40
Tabela 3. Influência da viabilidade (viva ou morta) das leveduras nos ensaios de sedimentação com os patógenos. Os resultados são expressos em \log_{10} de UFC/mL.....	43
Tabela 4. Análise da influência da fase de crescimento (logarítmica ou estacionária) das leveduras nos ensaios de sedimentação com os patógenos. Os resultados são expressos em \log_{10} de UFC/mL.....	44
Tabela 5. Ensaio de sedimentação com a levedura <i>S. cerevisiae</i> W 303 e as bactérias patogênicas. Os resultados são expressos em \log_{10} de UFC/mL.....	46
Tabela 6. Ensaio de sedimentação das bactérias patogênicas associado ao sobrenadante da cultura da levedura <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905. Os resultados são expressos em \log_{10} de UFC/mL.....	47
Tabela 7. Ensaio de aglutinação na presença de carboidratos.....	49
Tabela 8. Ensaio de adesão na presença de oxgall 1%. Os valores são expressos em \log_{10} de UFC/mL.....	51
Tabela 9. Ensaio de adesão na presença de oxgall 3%. Os valores são expressos em \log_{10} de UFC/mL.....	52

Tabela 10. Contagem de patógenos do grupo controle e do grupo associado com as leveduras <i>S.boularii</i> e <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 em diferentes condições de pH. Os resultados estão expressos em Log ₁₀ de UFC/mL.e.....	54
Tabela 11. Contagem de patógenos do grupo controle e do grupo associado com as leveduras <i>S. boularii</i> e <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905 na presença de fostato de cálcio (Ca) e fosfato de potássio (K). Os resultados estão expressos em Log ₁₀ de UFC/mL.....	57
Tabela 12. Presença ou ausência do fenômeno de quimiotaxia da <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 e <i>P.aeruginosa</i> na presença das levedua <i>S. boulardii</i> e <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905.....	68
Tabela 13. Ensaio de adesão entre a levedura <i>S. cerevisiae</i> BY4741 e enteropatógenos.....	70
Tabela 14. Ensaio de sedimentação com a levedura <i>S. cerevisiae</i> BY 741. Os resultados são expressos em log ₁₀ UFC/mL.....	71
Tabela 15. Teste de adesão das leveduras mutantes de parede celular para <i>S.cerevisiae</i> BY 4741.....	72
Tabela 16. Contagem de patógenos do grupo controle e do grupo associado com as leveduras mutantes BY 4741 negativas no teste de aglutinação. Os resultados estão expressos em Log ₁₀	78
Tabela 17. Contagem de bactérias representantes da microbiota quando associadas com <i>S. boulardii</i> , <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905, <i>S. cerevisiae</i> BY4741, uma <i>S. cerevisiae</i> mutante de BY4741 positiva no teste de adesão (YGL032C) e uma <i>S. cerevisiae</i> mutante de BY4741 negativa no teste de adesão (YMR306W). Os resultados estão expressos em log ₁₀ UFC/mL.....	81
Tabela 18. Iniciadores específicos dos genes da levedura <i>S. cerevisiae</i> BY4741.....	83

RESUMO

Muita atenção tem sido dada à modulação da microbiota intestinal por adjuvantes microbianos vivos chamados de probióticos. A grande vantagem da terapia com os probióticos é a ausência de efeitos secundários, como a seleção de bactérias resistentes quando antibióticos são usados. A única levedura disponível no mercado para uso como probiótico em seres humanos é a *Saccharomyces boulardii*. Estudos realizados por MARTINS *et al.* mostraram que a *Saccharomyces cerevisiae* linhagem UFMG A-905 foi capaz de colonizar e sobreviver no trato gastrointestinal de camundongos convencionais e isentos de germes, e de proteger estes animais contra infecção experimental com *Salmonella* Typhimurium e *Clostridium difficile*. A adesão alternativa dessas bactérias patogênicas na superfície de *S. cerevisiae* UFMG A-905 em vez de seus receptores intestinais poderia explicar o efeito protetor da levedura. Neste sentido, o presente trabalho avalia a aderência de bactérias patogênicas na parede das leveduras *S. boulardii*, *S. cerevisiae* UFMG A-905, *S. cerevisiae* W303 e *S. cerevisiae* BY4741 mating a. Para entendermos o mecanismo de adesão dos patógenos às leveduras, lançamos mão de mutantes de parede da linhagem parental de *S. cerevisiae* BY4741 mating a, devido à dificuldade em mutar leveduras poliplóides, como é o caso da *S. cerevisiae* e *S. boulardii*. Testes de sedimentação, adesão e floculação demonstraram que entre 10 enterobactérias testadas somente *Escherichia coli* e *S. enterica* Typhimurium aderiram na superfície das leveduras *S. boulardii*, *S. cerevisiae* UFMG 905, e *S. cerevisiae* BY4741 mating a. A presença de manose inibiu a adesão. Dentro de 49 mutantes de parede de *S. cerevisiae* BY4741 mating a, cinco deles perderam a capacidade de fixar as bactérias. A microscopia eletrônica mostrou o fenômeno de adesão bactéria-levedura tanto *in vitro* como *in vivo* (trato digestivo de camundongos dixênicos). Os resultados obtidos até agora mostram que algumas bactérias patogênicas testadas foram captadas na superfície de *S. boulardii*, *S. cerevisiae* UFMG A-905, e *S. cerevisiae* BY4741 mating a, impedido assim a sua adesão em receptores específicos no epitélio intestinal e posterior invasão do hospedeiro.

ABSTRACT

Recently, most attention has been given to the modulation of the intestinal microbiota by using living microbial adjuvants called probiotics. The great advantage of therapy with probiotics is the lack of side effects, such as selection of resistant bacteria when antibiotics are used. The only yeast available in the market for probiotic use in humans is *Saccharomyces boulardii*. Studies by Martins *et al.* showed that the strain *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 was able to colonize and survive in the gastrointestinal tract of conventional and germ-free mice, and to protect these animals against experimental infection with *Salmonella* Typhimurium and *Clostridium difficile*. The alternative adhesion of these pathogenic bacteria onto the surface of *S. cerevisiae* UFMG 905 instead on their intestinal receptors could explain the protective effect of the yeast. In this sense, the present study evaluates the adhesion of pathogenic bacteria on the cell wall of *S. boulardii*, *S. cerevisiae* UFMG 905, *S. cerevisiae* W303 and *S. cerevisiae* BY 4741 mating a. To understand the mechanism of adhesion of pathogens to yeast, we used cell wall mutants of the parental strain of *S. cerevisiae* BY 4741 mating a due to the difficulty of mutate polyploid yeast, as is the case for *S. cerevisiae* and *S. boulardii*. Tests of sedimentation, flocculation and adherence showed that among 10 enterobacteria tested, only *Escherichia coli* and *S. Typhimurium* adhered to the surface of *S. boulardii*, *S. cerevisiae* UFMG 905, and *S. cerevisiae* BY 4741 mating a. The presence of mannose inhibited this adhesion. Within 49 cell wall mutants of *S. cerevisiae* BY 4741 mating a, five of them lost the ability to fix the bacteria. Electron microscopy showed that the phenomenon of yeast-bacteria adhesion occurred both *in vitro* and *in vivo* (digestive tract of dixeric mice). These partial results show that some pathogenic bacteria were captured on the surface of *S. boulardii*, *S. cerevisiae* UFMG 905, and *S. cerevisiae* BY 4741 mating a, thus preventing its adhesion to specific receptors on the intestinal epithelium and its subsequent invasion of the host.

I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I.1 Microbiota indígena

Todo feto normal nasce microbiologicamente estéril. Após o nascimento processa-se rapidamente a colonização gastrointestinal, oriunda da mãe e do meio ambiente que o circunda. O trato gastrointestinal passa, então, a abrigar uma comunidade microbiana que é extremamente densa e diversa, variando quantitativamente, qualitativamente e metabolicamente em função da espécie animal, da localização transversal e longitudinal no trato digestivo e da idade do hospedeiro (NICOLI, 1995). Uma vez instalada, esta comunidade é composta por aproximadamente 10^{14} unidades formadoras de colônias (UFCs) de micro-organismos, número dez vezes maior que o de células do próprio hospedeiro (SAVAGE, 1977; BERG, 1996). Estima-se que o número de espécies bacterianas do trato gastrointestinal gire em torno de 1000 (VAUGHAN *et al.*, 2005), embora estudos indiquem que somente 30 a 40 destas espécies chegam a atingir níveis dominantes, onde passam ter funções para o hospedeiro que as aloja (HOLDMAN, 1977; VAUGHAN *et al.*, 2000).

Estudos mostram que em seres humanos adultos, a microbiota é constituída em sua maior parte por bactérias anaeróbias obrigatórias, sendo os gêneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Faecalibacter*, *Roseburia* e *Ruminococcus* os mais predominantes. Os aeróbios (anaeróbios facultativos) tais como *Escherichia*, *Enterococcus* e *Lactobacillus*, representam os gêneros subdominantes (ROTIMI & DUERDEN, 1981; GUARNER & MALAGELADA, 2003).

A atividade metabólica da microbiota intestinal é comparável à do fígado, que é o órgão metabolicamente mais ativo do corpo humano (GILL & GUARNER, 2004). A atividade metabólica da microbiota intestinal está envolvida na fermentação de fontes de carbono endógenos e exógenos e fontes de energia. Esta fermentação envolve diferentes tipos de poli e oligossacarídeos, o que é benéfico para o hospedeiro, pois fornece energia adicional na forma de ácidos graxos de cadeia curta. Destes ácidos, o butírico é a principal fonte de energia dos colonócitos, importante na manutenção da saúde do cólon. Vale ressaltar, também, que muitos membros da microbiota indígena intestinal produzem vitaminas, como por exemplo, K2 e B12 (GIBSON *et al.*, 2004). A

importância da microbiota na questão energética e na produção de vitaminas é mais claramente observada em animais isentos de germes, ou animais axênicos, que são animais livres de qualquer forma de vida detectável (WOSTMANN, 1996). Comparado com os animais convencionais, os animais isentos de germes requerem 30% a mais de energia na sua dieta, sendo necessário, também, a complementação alimentar com vitaminas K e do complexo B para a manutenção do seu peso corporal (ISOLAURI *et al.*, 2004). A microbiota intestinal tem como papel principal a manutenção da estrutura da mucosa. Estudos em animais isentos de germes têm mostrado que a estabilidade de uma microbiota normal aumenta o tecido da mucosa e a área da superfície intestinal, além de aumentar a renovação das células epiteliais (FARTHING, 2004).

Além de funções bioquímicas e digestivas no seu hospedeiro, a microbiota indígena desempenha outros papéis extremamente importantes como, por exemplo, na proteção do hospedeiro contra patógenos. A presença da microbiota proporciona resistência à colonização, sendo esta a primeira linha de defesa contra a invasão por patógenos alóctones e autóctones oportunistas, pela produção de bacteriocinas e de ácidos orgânicos, competição por nutrientes e por sítios de adesão. A microbiota também estimula o peristaltismo, o sistema imunológico e a maturação e renovação das células epiteliais do cólon, além de promover a estabilidade de uma população residente de macrófagos e outras células inflamatórias dentro do epitélio e da lâmina própria, que é a linha de frente da resposta imunológica na defesa contra a invasão de enteropatógenos (FARTHING, 2004), estimulando, assim, o desenvolvimento na mucosa intestinal do sistema imunológico celular e humoral (CEBRA, 1999; WALLACE *et al.*, 2011).

A microbiota normal possui micro-organismos com efeitos benéficos (*Bifidobacterium*, *Eubacterium* e *Lactobacillus*) e micro-organismos com efeitos antibióticos (*Clostridium*, *E. coli*, *Enterococcus* e *Veillonella*) para o hospedeiro (ROBERFROID, 2001). Nos últimos anos vêm aumentando o interesse no uso de micro-organismos que possuam 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 para prevenção ou tratamento de um grande número de distúrbios gastrointestinais. Atualmente diversos micro-organismos vêm sendo usados com esta finalidade, como é o caso dos lactobacilos e das bifidobactérias. A grande maioria dos probióticos disponíveis no mercado hoje em dia foi isolada de humanos saudáveis e alguns deles já possuem diversos de seus mecanismos

de ação desvendados, tendo sido testados tanto em ensaios experimentais quanto em ensaios clínicos.

I.2 Probióticos

O benefício da ingestão de bactérias no alimento já vem sendo documentado há muito tempo. Relatos dos efeitos benéficos da ingestão de produtos fermentados datam desde a versão Persa do Velho Testamento, quando Abraão atribuiu a sua longevidade ao consumo de leite azedo. Plínio, um historiador romano, em 76 a.C., recomendou o consumo de produtos de leite fermentado para o tratamento de gastroenterites (TEITELBAUM & WALKER, 2002). No entanto, apenas no início do século XX que foi sugerido que os efeitos benéficos desses produtos fermentados eram devido à presença de bactérias, quando Metchnikoff sugeriu o consumo de leite fermentado para a modulação intestinal (METCHNIKOFF, 1907; PENNA *et al.*, 2000).

O termo probiótico foi primeiramente usado em 1965, em contraste à palavra antibiótico, tendo como definição “substância secretada por um microrganismo, que estimula o crescimento de outro” (LILLEY & STILLWELL, 1965). Deste então o significado da palavra tem evoluído para a aplicabilidade desta bactéria que contribui para o balanço intestinal. Probióticos podem ser definidos como micro-organismos não patogênicos que, quando ingeridos, exercem uma influência positiva sobre a saúde ou fisiologia do hospedeiro. Eles consistem de leveduras ou bactérias, principalmente bactérias ácido-láticas. Os efeitos dos probióticos podem ser diretos ou indiretos pela modulação da microbiota endógena ou do sistema imunológico (MARTEAU *et al.*, 2001). A definição oficial de probiótico foi recomendada pela Organização Mundial de Saúde como “micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002), apesar de alguns autores terem demonstrado efeito benéfico quando o probiótico é administrado na sua forma inativa (GENEROSO, *et al.*, 2010).

Quatro mecanismos têm sido usualmente atribuídos para explicar o efeito protetor dos probióticos: (1) antagonismo pela produção de substâncias que inibem ou matam os patógenos; (2) competição com os patógenos pelos sítios de adesão ou por fontes nutricionais; (3) imunomodulação do hospedeiro; (4) inibição da produção ou da ação das toxinas bacterianas (FILHO-LIMA *et al.*, 2000). A grande maioria dos micro-

organismos utilizados como probióticos são bactérias: linhagens de *L. acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium*. No entanto, há apenas uma levedura empregada atualmente como probiótico humano a levedura *Saccharomyces boulardii* (CZERUCKA *et al.*, 2007).

I.3 A levedura *Saccharomyces boulardii*

A grande maioria dos micro-organismos utilizados como probióticos são bactérias de origem humana, no entanto existe uma única levedura utilizada como probiótico, a levedura *S. boulardii*. Apesar de *S. boulardii* ser o único micro-organismo utilizado como probiótico que não é de origem humana, ela possui a seu favor um grande número de ensaios laboratoriais e clínicos (MCFARLAND, 2010). Em meados de 1920, na Indochina (hoje, o Vietnam), um microbiologista francês, Henri Boulard, estava à procura de uma linhagem de levedura que fosse capaz de suportar altas temperaturas para produzir um bom vinho. Durante esta época houve uma epidemia de cólera em uma das vilas e ele observou que a população local preparava um chá da casca de uma fruta local (a lichia) para aliviar e até mesmo suprimir os sintomas da diarreia. Posteriormente, verificou-se que a fruta, na verdade, estava recoberta por uma levedura, e a eficácia contra a diarreia se devia à presença desta levedura, que foi isolada, identificada e chamada de *S. boulardii* (FLORASTOR, 2006). A *S. boulardii* é uma levedura não patogênica, termotolerante (cresce na temperatura de 37°C) e, atualmente, de uso muito difundido na medicina humana (MCFARLAND & BERNASCONI, 1993; CZERUCKA *et al.*, 2000; CZERUCKA & RAMPAL, 2002; KELESIDIS & POTHOUKAKIS 2012). A partir de 1960 iniciou-se a comercialização da levedura liofilizada, pelo “Laboratoire Biocodex” (Paris, França). Assim seu uso como medicação para combate às diarreias foi difundido em toda Europa. Atualmente, a levedura é amplamente comercializada na Europa, Américas do Sul e do Norte, Ásia e África (MCFARLAND & BERNASCONI, 1993). Os direitos de comercialização para a América do Sul foram adquiridos pela MERCK S.A. Indústrias Farmacêuticas (MARTINS *et al.*, 2005a).

Este probiótico é usado contra vários tipos de distúrbios gastrointestinais, como diarreia associada ao uso de antibióticos (SURAWICZ *et al.*, 1989; BARTLETT, 1992; MCFARLAND *et al.*, 1995; SURAWICZ, 2003), tratamento da diarreia causada pelo *Clostridium difficile* (ELMER & MCFARLAND, 2001; SURAWICZ, 2003) tanto nos

casos de prevenção (SURAWICZ *et al.*, 1989; MCFARLAND *et al.*, 1994; CASTAGLIUOLO *et al.*, 1999) quanto nos casos de recorrência da doença (KIMMEY *et al.*, 1990; ELMER *et al.*, 1999; SURAWICZ *et al.*, 2000), 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). *Saccharomyces boulardii* tem sido sugerida ainda na manutenção do tratamento da doença de Crohn (GUSLANDI *et al.*, 2000; VIELA *et al.*, 2008) e na prevenção de diarreia em pacientes recebendo alimentação por sonda (BLEICHNER *et al.*, 1997). Além disso, existem ensaios clínicos mostrando o seu efeito benéfico sobre a 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 da *S. boulardii*, poucos trabalhos têm feito uma relação entre a dose e o efeito de sua ingestão (PERET FILHO *et al.*, 1998; GIRARD *et al.*, 2003).

Existem relatos clínicos claros 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 do *S. boulardii* no interior do intestino é praticamente inexistente em condições normais, uma vez que a levedura não coloniza o cólon (MCFARLAND & BERNASCONI, 1993). Em todo o mundo, em 45 anos de uso, foram descritos somente alguns 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, TARP *et al.*, 2012). Ultimamente infecções fúngicas invasivas devido a agentes novos ou raros têm sido descritas 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 cateter venoso central. Devido a tudo isso, o uso da levedura, e de probióticos em geral, não é recomendado em pacientes imunossuprimidos ou muito debilitados, como no caso de tratamentos radioterápicos ou quimioterápicos (CESARO *et al.*, 2000). Os casos de fungemia descritos na literatura nesses pacientes não levaram

a óbito, e foram, na maioria dos casos, resolvidos após interrupção do probiótico ou 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 (RICHARD *et al.*, 1988; OGGIONI *et al.*, 1998; 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.

A ingestão da levedura ocorre por via oral e, nestas condições, ela 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 artificiais 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 estudo realizado com voluntários humanos, após o tratamento com a levedura, não foi observado alterações nos níveis populacionais de anaeróbios estritos e facultativos da microbiota normal (KLEIN *et al.*, 1993).

Vários mecanismos de ação da levedura foram extensivamente estudados. Ensaaios em animais e seres humanos, assim como estudos *in vitro*, mostraram que a *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).

Um primeiro mecanismo de ação da levedura seria a inibição total ou parcial de vários micro-organismos patogênicos (BRUGIER & PATTE, 1975). Este efeito de inibição total foi observado apenas *in vitro*, pois existem trabalhos mostrando que esta inibição não ocorre *in vivo*, onde somente uma proteção é observada (RODRIGUES *et al.*, 1996). Entretanto um trabalho demonstrou a diminuição nos níveis populacionais de algumas espécies de *Candida*, devido à ação inibitória da levedura (DUCLUZEAU & BENZAADA, 1982). Também se observou que a *S. boulardii* pode estimular o sistema imunológico (CAETANO *et al.*, 1986; BUTS *et al.*, 1990; RODRIGUES *et al.*, 2000), além de inibir a ação das toxinas do *C. difficile* devido à produção de uma serino-protease de 54 kDa, pela levedura, que cliva as toxinas A e B e seus respectivos receptores na mucosa intestinal (POTHOULAKIS *et al.*, 1993; CASTAGLIUOLO *et al.*, 1996; CASTAGLIUOLO *et al.*, 1999) e aumenta a resposta imune contra a toxina A (QAMAR *et al.*, 2001). Outras ações da levedura são: a inibição da ação da toxina do

cólera pela ligação dessa toxina em sítios específicos da levedura, diminuindo a quantidade de toxina livre capaz de se ligar aos receptores intestinais (BRANDÃO *et al.*, 1998; NEVES *et al.*, 2002), a diminuição dos níveis de AMPc induzidos pela toxina do cólera devido à ação de uma proteína de 120 kDa (CZERUCKA *et al.*, 1989; CZERUCKA *et al.*, 1994; CZERUCKA & RAMPAL, 1999), e também a inibição de perdas de água, sódio e potássio induzidas pelas toxinas de *Vibrio cholerae* (CZERUCKA *et al.*, 1994) e de *E. coli* em células epiteliais intestinais (MASSOT *et al.*, 1983). Preservação da função de barreira de células infectadas com *E. coli* enteropatogênica e *Salmonella*. Typhimurium, assim como a modulação da sinalização induzida durante a infecção por estas mesmas bactérias foram, também, descritas dentro dos efeitos protetores da levedura (CZERUCKA *et al.*, 2000; MARTINS *et al.*, 2010a).

A maior parte dos probióticos comercializados são bactérias. Apenas duas leveduras são usadas, a *S. boulardii* na medicina humana (CZERUCKA *et al.*, 2000) e a *Saccharomyces cerevisiae* na medicina veterinária (BLEHAUT *et al.*, 1989; BODDY *et al.*, 1991). Nos animais, a administração de *S. cerevisiae* fornece proteção contra lesões intestinais causadas por vários patógenos diarreicos. 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 gastrointestinais como, por exemplo, no caso de pacientes infectados por *Helicobacter pylori*, cuja terapia é uma combinação de drogas (ARMUZZI *et al.*, 2001).

I. 4 A levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae tem sido utilizada há mais de uma década como probiótico em suínos, devido ao seu efeito sobre o crescimento e desempenho reprodutivo e para a redução da morbidade e da mortalidade, especialmente em animais jovens (PÉREZ-SOTELO *et al.*, 2005). Várias linhagens de *S. cerevisiae* estão comercialmente disponíveis e têm sido usadas na indústria de produção animal. *Saccharomyces cerevisiae* Sc47 é uma linhagem disponível comercialmente, originalmente destinada para a indústria alimentar e tem sido usada por cerca de 20 anos como probióticos de suínos e na pecuária, reduzindo a frequência de diarreia (PÉREZ-SOTELO *et al.*, 2005).

Alguns dos mecanismos que podem ajudar a entender como as leveduras são capazes de proteger os hospedeiros contra agentes patogênicos foram citados acima e incluem o estímulo do sistema imune, a degradação de toxinas bacterianas por enzima proteolítica da levedura ou a inibição da sua aderência às células epiteliais gastrointestinais pela liberação de uma protease que degrada os receptores de toxina, como do *C. difficile*, e formação de um conglomerado levedura-bactéria pela adesão da bactéria na parede das células da levedura. Existem inúmeras linhagens de *S. cerevisiae*, mas apenas algumas foram estudadas e demonstraram propriedades probióticas (PÉREZ-SOLETO *et al.*, 2005).

Em um trabalho prévio (MARTINS *et al.* 2005b) várias linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de diferentes ambientes do Brasil (associados a insetos, frutas tropicais, queijo e produção de cachaça) foram pré selecionadas em testes *in vitro*, (simulando as condições gastrointestinais) e posteriormente testadas *in vivo*, pela capacidade de colonizar o trato gastrointestinal sem causar patogenicidade, e pelo seu efeito protetor em animais gnotobióticos desafiados com *S. Typhimurium* e *C. difficile*. Os resultados do estudo sugeriram que *S. cerevisiae* UFMG A-905 teria um potencial probiótico, sendo capaz de reduzir a ação de algumas bactérias patogênicas, assim como reduzindo níveis de translocação de *S. Typhimurium* e estimulando o sistema imunológico do hospedeiro (MARTINS *et al.*, 2007). GENEROSO e colaboradores (2010) observaram um decréscimo da translocação de *E. coli* 10536 nos grupos tratados com *S. cerevisiae* UFMG A-905 em comparação ao grupo controle, esta diminuição foi significativa tanto para o tratamento com a levedura viável quanto inviável (GENEROSO *et al.*, 2010). Vários gêneros de leveduras têm sido testados para uso como agente bioterapêutico, apesar de alguns outros gêneros apresentarem uma provável atividade probiótica, como *Kluyveromyces*, por exemplo, (TIAGO *et al.*, 2009), apenas o gênero *Saccharomyces* demonstrou, em experimentos *in vivo* e *ex vivo*, possuir propriedade que a enquadram na categoria de probiótico (MARTINS *et al.*, 2007, 2011).

I.5 Processo de adesão das leveduras

Alguns estudos mostraram que a levedura *S. cerevisiae* forma um conglomerado levedura-bactéria pela adesão da bactéria na parede celular da levedura, protegendo, assim o hospedeiro de bactérias patogênicas (PEREZ-SOLETO *et al.*,

2005; MARTINS *et al.* 2011). A parede celular das leveduras é a estrutura fundamental no processo de adesão, uma vez que funciona como uma ferramenta de interação microbiana com o meio ambiente, além de ser responsável pela estabilização e proteção da célula contra choques mecânicos (VERSTREPEN & KLIS, 2006).

Uma das funções mais importantes da superfície celular é a sua capacidade de aderir às células e outras superfícies. Outro ponto positivo da capacidade de adesão das leveduras é perceptível no campo industrial, na produção de vinho e cerveja, uma vez que se torna mais prático separar a biomassa dos demais produtos da fermentação. Ao final do processo fermentativo, quando os açúcares disponíveis foram convertidos em etanol e dióxido de carbono, as células leveduriformes começam a aderir umas às outras para formarem flocos macroscópicos, constituído por milhares de células. Este fenômeno de adesão entre as células leveduriformes é frequentemente chamado de floculação. Uma das características mais marcantes da adesão de leveduras é a sua variabilidade fenotípica e plasticidade. A aderência é conferida por proteínas de superfície celular chamadas adesinas ou floculinas, que se ligam a resíduos específicos de açúcar ou aminoácidos na superfície de outra célula ou de superfícies abióticas (VERSTREPEN & KLIS, 2006).

As adesinas dos fungos partilham a mesma estrutura com três domínios: uma parte C-terminal que contém uma âncora GPI (glicosilfosfatidilinositol) que permite a ligação à parede celular; um -N terminal que se estende para o exterior da parede celular e contém, frequentemente, um polissacarídeo ou peptídeo como domínio de ligação; e uma longa porção intermédia caracterizada pela presença de múltiplas repetições ricas em serina e treonina. Em muitos casos os íons Ca^{2+} permitem que as adesinas adquiram a sua conformação ativa (GUO *et al.*, 2000; VERSTREPEN & KLIS, 2006).

Na última década identificaram algumas diferenças sutis de especificidade entre as várias adesinas. GUO *et al.* (2000) super-expressaram os genes FLO1, FLO10 e FLO11 de *S. cerevisiae* e descobriram que a expressão de FLO1 resultou em forte floculação, a expressão de FLO10 conferiu fraca floculação, e a expressão de FLO11 não resultou em floculação, mas demonstrou capacidade de adesão ao ágar e ao plástico. A adesão da *S. cerevisiae* é caracterizada por dois tipos: o primeiro é denominado adesão “sensível a açúcares”, que como o nome indica, depende da ligação das lectinas para a adesão a resíduos de açúcares na superfície de outras células. Em *S. cerevisiae* a adesão ligada a lectina é dividida em duas outras sub-categorias: FLo1 e NewFlo. Enquanto que na primeira a agregação passa apenas pelo reconhecimento e ligação de

oligómeros de manose na sua superfície, na segunda podem ligar-se vários açúcares (manose, glicose, maltose). A maioria das linhagens industriais são do tipo NewFlo pois a inibição por competição conferida pelos açúcares no meio impede-na de flocular antes de todos os açúcares fermentáveis serem convertidos a etanol, o que é exatamente desejado pelos produtores de vinho e cerveja. O segundo tipo é a adesão independente de açúcar, que é mediada pelas adesinas que se ligam a peptídeos, ao invés do açúcar, ou aumenta a hidrofobicidade da superfície celular, promovendo interações hidrofóbicas entre as células e certas superfícies abióticas. Como exemplo temos a adesina FLo1 em *S. cerevisiae*, que confere hidrofobicidade baseada na adesão de superfícies abióticas, e as proteínas Als (Agglutinin-Like Sequence) em *Candida albicans* patogênicas, que reconhecem certos peptídeos nas células hospedeiras (KLOTZ *et al.*, 2004).

Floculação é uma característica básica importante para linhagens de leveduras fermentadoras. Na natureza, a floculação ajuda as células leveduriformes a sobreviverem no meio ambiente com escassez de nutrientes. Algumas células acabam morrendo nos flocos e assim alimentam as suas congêneres vizinhas. Alterações genéticas tais como deleção completa ou parcial no cromossomo do gene LG-FLO1 foram sugeridas como razões do declínio da floculação. A teoria da lectina é amplamente aceita e sugere que são necessários dois parceiros de ligação para a floculação. Estão envolvidas proteínas de floculação (floculinas) que interagem com a região final não reduzida de α (1,3)-ligada aos ramos laterais da manose, ambas localizadas na parede celular. Floculinas são proteínas tipo lectina, e a sequência completa das leveduras demonstra que há pelo menos 33 genes conhecidos envolvidos na floculação (HEINE *et al.*, 2009).

Os genes da adesão são ativados por diferentes respostas ambientais, como a falta de carbono ou nitrogênio e variações de pH ou níveis de etanol. A mudança entre a forma não floculada para a floculada provavelmente permite a adaptação das leveduras ao estresse (VERSTREPEN & KLIS, 2006).

I.6 Estrutura da parede celular das leveduras do gênero *Saccharomyces*

Células fúngicas são envolvidas por uma parede resistente, que permite suportar a pressão osmótica interna e proporciona proteção contra danos mecânicos. A parede dos fungos também é importante na adesão a superfícies abióticas e bióticas e na patogenicidade (YIN *et al.*, 2007). A parede da *S. cerevisiae* representa, aproximadamente,

30% de seu peso seco, sendo composta, em grande parte, de polissacarídeos (~80%) e proteínas (~15%). Análises bioquímicas revelaram que a glicose, *N*-acetilglicosamina (GlcNAc) e resíduos de manose representam de 80 a 90%, 1 a 2%, e de 10 a 20% do total de polissacarídeos, respectivamente. Resíduos de glicose são ligados a outras moléculas de glicose por ligação β -1,3 e β -1,6 e a GlcNAc via β -1,4 (KITAGAKI *et al.*, 2002). Manoproteínas podem estar ligadas a cadeias de glicose β -1,6 pelo processo de glicosilfosfatidilinositol (glycosylphosphatidylinositol – GPI) (Figura 1) (LESAGE & BUSSEY, 2006).

Cadeias de β -1,3 glucano, com um grau de polimerização de aproximadamente 1.500 unidades de glicose por cadeia, apresentam-se como uma estrutura coloidal que confere elasticidade e resistência à parede. Extratos da parede celular, β -1,3-glucano, são encontrados como polímeros ramificados com ligações inter-cadeias β -1,6 e β -1,3-glucano. Além de ter a ligação β -1,3-glucano, muitos fungos, incluindo *S. cerevisiae*, têm uma segunda ligação, β -1,6-glucano. Em contraste com a estrutura microfibrilar de β -1,3-glucano em *S. cerevisiae*, o polímero β -1,6 é menor do que β -1,3 e age como uma cola flexível, formando ligações covalentes cruzadas de β -1,3-glucano, quitina e manoproteínas da parede celular. A cadeia polimérica tem, em média, 350 resíduos de glicose, com a espinha dorsal β -1,6 ramificada com cadeias secundárias (LESAGE & BUSSEY, 2006).

Quitina é um polímero linear de ligação β -1,4 ligado a GlcNAc. Sua forma microfibrilar é estabilizada por ligações de hidrogênio. Na forma cristalina, microfibras podem se orientar de forma paralela, antiparalela, ou uma alternância entre paralelos e de maneira antiparalela. Quitina é o menor constituinte da parede lateral de *S. cerevisiae* (1 a 2% da parede celular de peso seco) (LESAGE & BUSSEY, 2006).

Proteínas da parede celular associadas com as manoproteínas estão envolvidas na aglutinação sexual, floculação, hidrofobicidade da superfície celular e resistência a enzimas líticas em células na fase estacionária (KITAGAKI *et al.*, 2002).

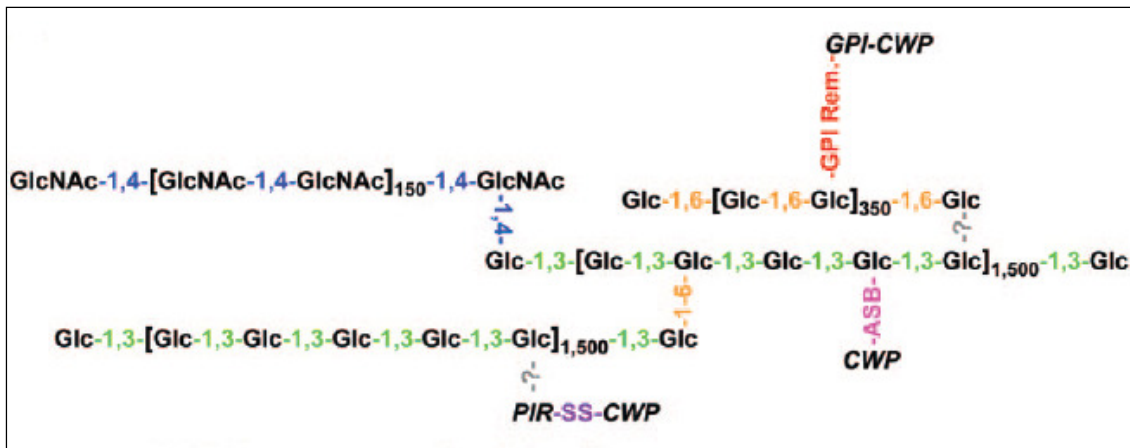


Figura 1. Arquitetura lateral da parede celular da levedura. As ligações β-1,3, β-1,4 e β-1,6-glicosídica estão representadas em verde, azul e laranja, respectivamente. Parede celular de manoproteína (CWP) pode estar associada à β-1,3-glucano pela via sensível a álcali (ASB) ou a proteínas PIR (protein with internal repeats) por uma ligação dissulfídica (SS). Proteínas da parede celular GPI estão associadas a β-1,6-glucano. As ligações entre β-1,3-glucano e β-1,6-glucano ou das proteínas PIR não estão ainda caracterizadas (LESAGE & BUSSEY, 2006).

A família de glicosilfosfatidilinositol (GPI)-ligadas a glicoproteínas da superfície celular determina a adesão fúngica, uma importante característica para os fungos patogênicos, por exemplo, *Candida albicans* que se adere às células epiteliais e endoteliais de mamíferos. Estas proteínas apresentam uma sequência N-terminal, um domínio central contendo altas repetições de sequências ricas em serina/treonina e um domínio C-terminal contendo sequências de ancoragem GPI. Expressões destas proteínas (por exemplo, Als1p de *Candida albicans*, Epa1p de *Candida glabrata*) em *Saccharomyces* permitem adesão em células de mamíferos (GUO *et al.*, 2000).

I.7 Processo de adesão das bactérias

Sabe-se que leveduras do gênero *Saccharomyces* têm a habilidade de ligarem a outras leveduras e a bactérias patogênicas (VERSTREPEN & KLIS, 2006; GARCÍA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2011), logo é importante não somente conhecer o processo de adesão das leveduras, como também, entender o processo de ligação das bactérias. Estudos de colonização do intestino humano por bactérias patogênicas têm identificado um grande número de fatores envolvidos na adesão de genes relacionados com este fenômeno. Durante as duas últimas décadas microbiologistas têm focado seus estudos

principalmente nos tipos de adesão de bactérias a outras células. CONWAY e HENRIKSONN (1989) demonstraram que proteínas localizadas na superfície das bactérias é fator determinante na adesão específica das linhagens de *Lactobacillus fermentum* nas células epiteliais do estômago de suínos e que carboidratos estariam parcialmente envolvidos neste processo (AMROSINI *et al.*, 1999).

Bactérias que possuem fímbria do tipo 1 são caracterizadas pela habilidade em mediar a aglutinação de eritrócitos em aves domésticas e suínos, na ausência de α -D-manose. Esta fímbria tem sido observada em diferentes espécies de enterobactérias, como por exemplo, *Shigella*, *Escherichia* e *Klebsiella* (CLEGG & GERLACH, 1987). Fímbrias do tipo 1 são finas, com 7 nm de largura, encontradas em polímero de superfície protéica na maioria das linhagens de *E. coli*. Eles mediam a aderência a manosídeos e permitem que as bactérias colonizem várias superfícies epiteliais e aglutinem eritrócito (KLEMM, 1986).

Adesividade ao tecido do hospedeiro ou a componentes circulantes é muito importante no ciclo de vida de *E. coli*, o que é refletido no alto número de diferentes tipos de adesinas e seus altos níveis de expressão na superfície bacteriana. A formação de fímbria representa um grande gasto energético. A maioria das fímbrias de *E. coli* se ligam a moléculas de carboidratos em receptor glicoconjugado e, conseqüentemente, também são chamadas fímbrias-lectinas. A cadeia alvo de oligossacarídeo pode estar presente no epitélio, na membrana basal ou em macromoléculas circulantes. A diversidade de adesinas e suas funções biológicas são bem exemplificadas pela fímbria do tipo 1 de *E. coli*, que são definidas pela sua ligação a α -D-manosídeos. Manosídeos são comuns nas cadeias de oligossacarídeos e glicoproteínas de mamíferos. Os receptores para fímbria do tipo 1 incluem proteínas sobre a superfície apical do epitélio da bexiga humana, na membrana basal da lâmina própria, molécula CD48 de macrófagos de camundongo, leucócitos e glicoproteínas da saliva humana. Também se ligam a proteínas de manose livre, além de terem o papel de auto-agregação. As funções biológicas da fímbria do tipo 1 incluem colonização da superfície intestinal em seres humanos e animais, bem como colonização da bexiga humana durante infecção do trato urinário inferior. Fímbria do tipo 1 de *E. coli* exibe uma notável variação fenotípica na ligação de moléculas de manose, bem como em receptores não-manose (WESTERLUND-WIKSTRÖM *et al.*, 2005).

Estudo realizado por GEDEK (1999) tem relatado a aderência da *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, *E. coli* enteropatogênicas (EPEC) e *E. coli*

enterohemorrágica (EHEC) em células de *S. boulardii*. A EPEC adere inicialmente nas células epiteliais intestinais em um padrão descrito como aderência localizada. Este padrão de aderência é caracterizado por micro-colônias de bactérias associadas às células epiteliais e é dependente da expressão de pili do tipo IV. Em seguida, as bactérias induzem sinal de transdução nas células do hospedeiro, levando a uma elevação intracelular dos níveis de Ca^{2+} , inositol trifosfato e à fosforilação de proteínas celulares. Estes eventos de sinalização culminam com lesões e são caracterizados pela degeneração das microvilosidades. A EPEC também é capaz de induzir a sua internalização em células epiteliais monofagocíticas (GEDEK, 1999; CZERUCKA *et al.*, 2000).

Bactérias do ácido lático também apresentam vários determinantes de superfície que estão envolvidos na sua interação com as células epiteliais intestinais. Os processos de adesão destas bactérias incluem força passiva, interações eletrostáticas e hidrofóbicas, ácido lipoteicoico e estruturas específicas como os apêndices externos recobertos por lectina (SERVIN & COCONNIER, 2003).

I.8 Ligação de bactérias e toxinas em probióticos

PÉREZ-SOTELO *et al.* (2005) observaram que a levedura *S. cerevisiae* Sc47 se liga a linhagens de *Salmonella*, particularmente naquelas que expressam fímbrias do tipo 1. Esta afinidade é mediada pela manose da parede celular da levedura. Diferenças na capacidade de ligação têm sido demonstradas, sendo observado que as condições de crescimento das salmonelas, tais como temperatura, umidade e pH podem ter um grande impacto sobre a capacidade de expressar fímbrias, alterando a sua capacidade de adesão à parede celular da levedura (PÉREZ-SOTELO *et al.*, 2005).

Em um fenômeno similar, estudos mostraram que a inibição da ação da toxina do cólera era devido 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). BRANDÃO *et al.* (1998) demonstraram que a incubação de células de leveduras com toxina do cólera desencadeia sinalização mediada por AMPc, levando à ativação da trealase sugerindo uma ligação específica da toxina ao receptor localizado na membrana da levedura. A presença e a caracterização parcial dos sítios de ligação da toxina do cólera na superfície das células de *S. boulardii* sugerem um possível método profilático, que envolve a

ingestão oral da levedura para “lavar” a toxina da cólera ou outras toxinas semelhantes (como a toxina termo lábil de *E. coli*) do ecossistema intestinal (BRANDÃO *et al.*, 1998). Neste caso a fixação da toxina do cólera teria o mesmo gatilho de sinalização intracelular como nos enterócitos. Como consequência da estimulação do sistema enzimático dependente de AMPc, tais como a trealase, este mecanismo está presente em *S. boulardii*, e provavelmente é encontrado em outras leveduras como, por exemplo, *S. cerevisiae*. NEVES *et al.* (2002) observaram que o receptor da toxina do cólera na levedura é, provavelmente, estruturalmente e funcionalmente semelhante ao receptor GM1 (monossialogangliosídeo) encontrado em enterócitos. Os resultados sugeriram que a atividade da toxina do cólera pode ser neutralizada devido a sua ligação à superfície de *S. boulardii*, reduzindo o número das moléculas de toxina disponíveis para se ligarem a receptores de enterócitos, produzindo uma diarreia atenuada em pacientes tratados com as células das leveduras (NEVES *et al.*, 2002).

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 (*E. coli* entero-hemorrágica), 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.* (2006) demonstraram que *S. boulardii* induz uma diminuição nos níveis de TNF- α e na apoptose relacionados à infecção em células com EHEC.

A localização de sítios de ligação para bactérias entéricas em parede de *Saccharomyces* já tem sido bem estudado usando método de detecção lectina-histoquímica e microscopia eletrônica. Estudo realizado por GEDEK (1999) demonstrou que a fimbria do tipo 1 de *E. coli* está mais fortemente ligada à superfície de *S. boulardii* quando comparada a outras linhagens probióticas de *S. cerevisiae* (GEDEK, 1999).

Estudo realizado por MARTINS (2008) demonstrou que o número de *S. Typhimurium* intracelulares foi, aproximadamente, 19 vezes menor e, a porcentagem de

invasão, 32 vezes menor, no grupo de células T84 pré-tratadas com *S. boulardii* e infectadas com *S. Typhimurium* 14028, em relação ao grupo que continha apenas *S. Typhimurium* 14028. 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 A-905 e infectado com *S. Typhimurium* 14028, em relação ao grupo que continha apenas a bactéria (MARTINS *et al.*, 2008). Estudos realizados por MARTINS *et al.* (2010) além de observar a diminuição dos níveis intracelulares nas células T 84 de *S. Typhimurium* quando associados a *S. boulardii*, também observou que tratamento oral com esta levedura aumentou a sobrevivência de camundongos de 40% do grupo controle (grupo não tratado desafiado com *S. Typhimurium*) para 70% grupo experimental (grupo tratados com *S. boulardii* desafiados com *S. Typhimurium*) (MARTINS *et al.*, 2010a). Em experimentos para demonstrar a ligação da *Salmonella* em sítios das leveduras *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG A-905 foram utilizadas técnicas de microscopia eletrônica e visualizado a aderência do patógeno à célula leveduriforme (MARTINS *et al.*, 20011). GEDEK & AMSELGRUBER (1990) e GEDEK (1999) já haviam mostrado a adesão de *E. coli* O157 e de *S. Typhimurium* DT 104 à superfície de *S. boulardii*. PEREZ-SOTELO *et al.* (2005) demonstraram que bactérias patogênicas, como *E. coli* e *Salmonella* sp., 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.

I. 9 Quimiotaxia

Estudos realizados por MARTINS *et al.* (2008 e 2010a) mostraram uma maior afinidade da bactéria *Salmonella* Typhinurium para se ligar a levedura que nas células T 84 (MARTINS *et al.*, 2008 e 2010), indicando que, provavelmente, ocorra um fenômeno de quimiotaxia bactéria-levedura. Quimiotaxia é a habilidade de migrar em direção a um atraiante, requerendo do organismo a capacidade de detectar um sinal, transmiti-lo intracelularmente e respondê-lo. Para uma resposta efetiva, as células devem ser capazes de detectar pequenas diferenças na concentração do atraiante, e esta detecção deve ser convertida como uma informação direcional para a célula. A geração de resposta ao quimio-atraente requer a polarização do citoesqueleto e subsequente crescimento ou movimento em direção à fonte atraente. A habilidade de uma variedade

de micro-organismos em detectar e responder a um atraiante tem sido estudado extensivamente (ARKOWITZ, 1999), sendo um importante comportamento adaptativo de bactérias móveis que exigem um sofisticado processo de informação. A célula deve detectar concentrações de atraentes (por exemplo, açúcar e aminoácidos) ou repelente (por exemplo, substâncias químicas potencialmente danosas) e se mover a cerca destes gradientes, amplificando e integrando diversos estímulos recebidos, gerando um sinal de saída coerente que elege uma resposta adequada à locomoção. Para realizar estas tarefas, bactérias têm concebido um notável mecanismo molecular para amplificar os sinais (PARKINSON *et al.*, 2005).

Bactérias utilizam quimiorreceptores para encontrar condições de crescimento favoráveis. Respostas quimiotáticas exigem sensibilidade, dinamicidade e uma adaptação precisa. O alto desempenho do sistema de sinalização quimiotática de *E. coli* envolve um número limitado de componentes, mas de notável sofisticação, com cinco tipos de receptores quimiotáticos, e uma enzima adicional, CheZ, que desfosforila CheA. A resposta quimiotática representa um paradigma de um simples sistema de sinalização e, apesar da sua relativa simplicidade, mostra notável sensibilidade e robustez (KENTHER & SOURJIK, 2006). *Escherichia coli* usa duas estratégias de transdução de sinais para migrar preferencialmente num micro-ambiente: quimiotaxia dependente e independente do metabolismo. Em quimiotaxia independente do metabolismo uma mudança na concentração de moléculas ligantes em quimiorreceptores de transmembrana é detectada. Comportamento dependente do metabolismo, energia de taxias, é menos caracterizado e inclui aerotaxias, taxias de aceptor de elétron, taxias redox e fototaxia (BOIN *et al.*, 2004). Os quimiorreceptores de transmembrana são conhecidos como proteínas aceptoras de metil (MCPs) e direciona a locomoção da célula pela regulação da histidina quinase CheA, esta proteína fosforilada é uma quinase sensora que controla a direção rotacional do motor flagelar (Figura 2) (HAZELBAUER *et al.*, 2007).

Estudos *in vitro* têm mostrado a capacidade de β -glucano (presente na parede das leveduras) em aumentar a quimiotaxia em neutrófilos humanos. Trabalho realizados por LEBLANC *et al.* (2006) demonstraram que o β -glucano extraído de *S. cerevisiae* tem uma função potencial leucocítica, além de não produzir citocinas líticas em animais experimentais e em células sanguíneas humanas (LEBLANC *et al.*, 2006).

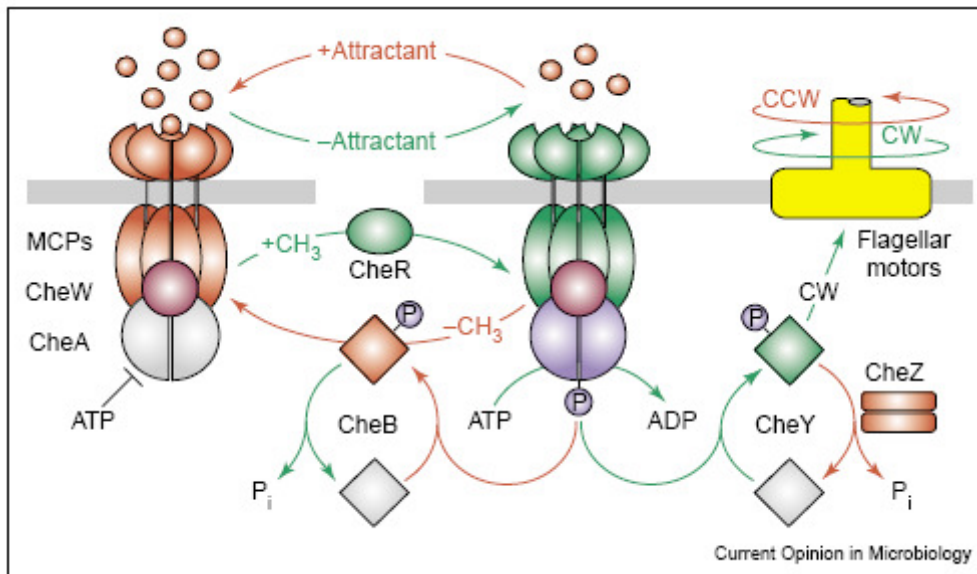


Figura 2. Interação dos transdutores, das proteínas de quimiotaxia (Che) e do motor flagelar, na quimiotaxia bacteriana. O transdutor (MCPs) forma um complexo com a quinase sensora CheA e a proteína acopladora CheW. Esta combinação resulta em uma autofosforilação de CheA, originando CheA-P, regulada pelo sinal. A CheA-P pode então fosforilar os reguladores de resposta CheB e CheY. CheY fosforilado (CheY-P) interage diretamente com o alternador do motor flagelar. CheZ desfosforila CheY-P. A proteína CheR adiciona continuamente grupos metil ao transdutor. CheB-P remove os grupos metil. O grau de metilação do transdutor controla sua capacidade de responder aos atrativos e repelentes, levando à adaptação (PARKINSON *et al.*, 2005).

I.10 Comparações fisiológicas e moleculares entre *S. boulardii* e *S. cerevisiae*

Saccharomyces boulardii, que tem sido usada como um agente terapêutico mostrou ser uma variante de *S. cerevisiae*, baseando-se em parâmetros moleculares e metabólicos. CARDINALI & MARTINI (1994) utilizando cariotipagem eletroforética comparada e análises de multivariância de polimorfismo observado em eletroforese de campo pulsátil, classificaram *S. boulardii* como uma espécie além de *S. cerevisiae*. Estudos conduzidos por MCCULLOUGH *et al.* (1998) demonstraram que o probiótico *S. boulardii* pertence a um grupo separado dentro de espécies de *S. cerevisiae*. HENNEQUIN *et al.* (2001) identificou um único e específico alelo microsatélite capaz de identificar *S. boulardii* e distingui-la de outras linhagens de *S. cerevisiae*. A sequência de DNA ribossômico ITS (*internal transcribed spacer*) de *S. boulardii* (GeneBank AY 428861) foi comparado com o genoma de *S. cerevisiae* apresentando-se idênticos. Diferenças no DNA ribossômico têm sido usadas para distinguir espécies de

leveduras. Estas regiões mostram uma variabilidade intra-específica baixa e um polimorfismo interespecífico alto (HENNEQUIN *et al.*, 2001).

Saccharomyces boulardii apresenta uma importante vantagem em relação à sua utilização como um probiótico, tanto por questão tecnológica (tempo de geração curto para produção industrial), como funcional (melhor capacidade de competição com outros micro-organismos no ecossistema gastrointestinal) (FIETTTO *et al.*, 2004). FIETTTO *et al.* (2004) compararam características fisiológicas entre *S. cerevisiae* W303 e *S. boulardii* e observaram que ambas leveduras cresceram às temperaturas de 30°C e 37°C, no entanto *S. boulardii* cresceu mais rapidamente quando comparado a *S. cerevisiae* W303 nas duas temperaturas testadas. O pH extremamente baixo do ambiente gástrico (pH~2,0) é um estresse grave e letal para a maioria dos micro-organismos. Por esta razão as leveduras *S. cerevisiae* W303 e *S. boulardii* foram expostas a condições ácidas simulando o ambiente gástrico por 60 minutos. A viabilidade sob estas condições são indistinguíveis nos primeiros 10 minutos, mas depois de 15 minutos *S. boulardii* se mostrou mais resistente, mantendo sua viabilidade em cerca de 75%, enquanto *S. cerevisiae* W303 manteve sua viabilidade em cerca de 30% (FIETTTO *et al.*, 2004).

1.11 O modelo animal gnotobiótico

Uma importante estratégia experimental para estudar as relações que ocorrem entre os micro-organismos e seu hospedeiro é a utilização de um modelo animal isento de germes. Neste caso, deve-se, primeiro, definir as funções celulares na ausência de micro-organismos e depois avaliar os efeitos da adição de um único micro-organismo ou de uma população definida de micro-organismos. A criação de animais sob condições isentas de germes tem desenvolvido um campo científico para este propósito: a gnotobiologia. O termo gnotobiológico foi proposto para designar o campo de investigação interessado na criação de animais e plantas que estão livres de todos os micro-organismos ou associados somente a espécies conhecidas (TREXLER, 1978). A palavra gnotobiologia é derivada do grego onde, “gnotos” significa conhecido e “biota” flora e fauna (GUSTAFSSON & COATES, 1984).

Os animais isentos de germes são, de certo modo, uma extensão do conceito de cultura pura, permitindo o estudo das interações entre o hospedeiro e um microrganismo

sem a interferência da microbiota indígena (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 tem 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, na gênese de tumores (GORBACH & GOLDIN, 1990). Desde a década de 1950, quando a produção de ratos e camundongos isentos de germes foi obtida, o uso desse modelo animal nas ciências biomédicas vem aumentando. Entretanto, o estado isento de germes dá origem a uma variedade de aspectos fisiológicos, morfológicos e imunológicos diferentes daqueles encontrados na presença da microbiota normal (GUSTAFSSON *et al.*, 1970), como, por exemplo, as vilosidades do intestino delgado, que 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 isentos de germes apresentam diferenças na motilidade intestinal, na diferenciação epitelial e na imunologia. A distribuição espacial e temporal dos complexos motores migratórios no intestino delgado desses animais é mais restrita e mais lenta que em animais convencionais (SPANGLER, 1992). Estudos em camundongos isentos de germes mostraram que a morfogênese de unidades de vilosidades da cripta pode ser completada na ausência de micro-organismos. 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 isentos de germes representam um sistema experimental para simplificar o fenômeno de resistência à colonização e os mecanismos envolvidos nesse fenômeno, permitindo testar a capacidade de uma terapia à base de probióticos para prevenir ou impedir a colonização por patógenos. Muitos estudos mostram que os animais isentos de germes, quando infectados por patógenos podem, em alguns casos, se mostrarem mais resistentes e, em outros, mais susceptíveis (VIEIRA *et al.*, 1998).

O experimento gnotobiótico oferece considerável potencial como uma ferramenta no estudo das relações hospedeiro-micro-organismos porque retrata o

hospedeiro quando livre de germes, ou quando modificado por micro-organismos 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 onde as ações isoladas de tais fatores podem ou não serem afetadas pela microbiota associada no hospedeiro. Como os animais gnotobióticos permitem o estudo e reprodução de mecanismos de interação entre micro-organismos e hospedeiro, que não são observados por meio de experimentos *in vitro* (GORDON & PESTI, 1971), eles constituem um excelente modelo na avaliação do potencial probiótico de certos micro-organismos (NICOLI & RAIBAUD, 1990; NARDI *et al.*, 1991; RODRIGUES *et al.*, 1996; NEUMANN *et al.*, 1998; PERET FILHO *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 1999; FILHO-LIMA *et al.*, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2000; MAIA *et al.*, 2001).

II RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, muita atenção tem sido dada à modulação da microbiota intestinal normal por adjuvantes microbianos vivos chamados de probióticos. A grande vantagem da terapia com os probióticos é a ausência de efeitos secundários, como a seleção de bactérias resistentes quando antibióticos são usados. Os efeitos benéficos destes micro-organismos são basicamente os mesmos da microbiota normal do corpo humano.

Existe, atualmente, uma grande variedade de bactérias utilizadas como probióticos, com as bifidobactérias e os lactobacilos. A única levedura disponível no mercado para uso como probiótico em seres humanos é a *S. boulardii*, que aumenta a resistência do ecossistema intestinal contra doenças infecciosas e *S. cerevisiae*, utilizado como um probiótico na alimentação de animais. Existem alguns trabalhos mostrando a eficácia de outras leveduras do gênero *Saccharomyces* em ensaios laboratoriais, no combate às diarreias.

Sabe-se que 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 seleção de patógenos cada vez mais agressivos e resistentes, como é o caso se antibióticos são utilizados. Sabemos que há muitas diferenças nas linhagens de *S. cerevisiae*, mas somente umas poucas têm tido suas características probióticas comprovadas. Estudos realizados por MARTINS *et al.* (2005a, 2007 e 2011) e GENEROSO *et al.* (2010) mostraram que a *S. cerevisiae* linhagem UFMG A-905, isolada da produção da cachaça, foi capaz de colonizar e sobreviver no trato gastrointestinal de camundongos convencionais e isentos de germes, e de proteger estes animais contra infecção experimental com *S. Typhimurium* e *C. difficile* e em um modelo de obstrução intestinal. Os resultados obtidos por MARTINS *et al.* (2010 e 2011) sugerem que muitos dos efeitos benéficos observados na proteção contra infecções experimentais por *Salmonella* pode ser devido à capacidade de leveduras probióticas se ligarem a essa enteropatógeno.

Algumas linhagens de *S. cerevisiae* aderem potencialmente em bactérias patogênicas como *E. coli* e *Salmonella* sp. Isto poderia tornar animais, que se alimentam com esta levedura, mais resistentes a infecções causadas por micro-organismos patogênicos, diminuindo, assim, o uso de antibiótico em criações de animais de consumo, como no tratamento de doenças diarreicas em humanos.

Neste sentido, o presente trabalho visa avaliar a aderência de bactérias patogênicas na parede das leveduras *S. boulardii*, *S. cerevisiae* UFMG A-905, *S. cerevisiae* W303 e *S. cerevisiae* BY4741. Para entendermos o mecanismo de adesão dos patógenos às leveduras lançamos mão de mutantes de parede celular da linhagem parental de *S. cerevisiae* BY4741 mating a, devido à dificuldade em mutar leveduras poliplóides, como é o caso da *S. cerevisiae* e *S. boulardii*. Utilizamos os mutantes para nos ajudar a definir os componentes de parede responsáveis pela ligação dos patógenos, expressando genes responsáveis pela síntese deste componente, avaliando a ligação levedura-patógeno.

III OBJETIVOS

III.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade de ligação de bactérias patogênicas à parede das leveduras *S. boulardii*, *S. cerevisiae* UFMG A-905, *S. cerevisiae* W303 e *S. cerevisiae* BY4741 mating a, e determinar os sítios dessa ligação utilizando uma coleção de mutantes de parede celular da levedura BY4741 mating a.

III.2 Objetivos específicos 1

Avaliar a capacidade de adesão de bactérias patogênicas na superfície das leveduras *S. boulardii*, *S. cerevisiae* UFMG A-905, *S. cerevisiae* W303 e *S. cerevisiae* BY4741 mating a nos seguintes passos:

1. Selecionar bactérias patogênicas que apresentaram adesão nas leveduras *S. boulardii*, *S. cerevisiae* UFMG A-905.
2. Avaliar alguns fatores que podem influenciar na adesão.
3. Visualizar, em microscopia eletrônica, detalhes da adesão entre bactéria e levedura, *in vitro* e *in vivo*.
4. Avaliar a possibilidade de quimiotaxia entre leveduras e bactérias que foram selecionadas no teste de adesão.
5. Utilizar a levedura BY4741 e seus mutantes de parede para caracterizar o processo de adesão.

III.3 Objetivo específico 2

Avaliar a capacidade de adesão de bactérias da microbiota na superfície das leveduras *S. boulardii*, *S. cerevisiae* UFMG A-905, *S. cerevisiae* BY4741.

IV. METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Conta com a colaboração do Laboratório de Biologia Celular e Molecular – NUPEB- da Universidade Federal de Ouro Preto e do Laboratório de Entomologia Médica da Fiocruz.

IV.1 Micro-organismos

IV .1.1 Leveduras

A levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 foi cedida pelo Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa, do Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de fungos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. A linhagem foi identificada e classificada como *S. cerevisiae*, segundo métodos descritos por KURTZMAN & FELL (1998) e YARROW (1998). A identidade da levedura foi confirmada utilizando o programa YEASTCOMPARE (CIRRIELLO & LACHANCE, 2001). A levedura *S. boulardii* foi cedida pela MERCK indústrias farmacêuticas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil (Floratil®). As leveduras BY4741-mating a da coleção da Euroscarf (European *Saccharomyces Cerevisiae* Archive for Functional analysis) (Tabela 1) e a levedura *S. cerevisiae* W303 foram cedidas pelos Professores Dr. Ieso de Miranda Castro e Dr. Rogélio Lopes Brandão do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas (NUBEP) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

As linhagens foram mantidas em meio contendo 1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 25% de glicerol e conservadas a -80°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), para as leveduras *S. cerevisiae* UFMG A-905 e *S. boulardii*, e a 28°C sob agitação constante (150 rpm) para as leveduras da coleção BY4741- mating a e *S. cerevisiae* W303. As leveduras foram concentradas por centrifugação para obter uma concentração de 10⁸ UFC/mL.

IV.1.2 Bactérias

A linhagem de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium, e *Vibrio cholerae* de origem humana e *Streptococcus faecalis* (Yakult®) pertencem ao Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos (LEFM) do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

As linhagens de *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Clostridium difficile* (ATCC 9689), *Clostridium perfringens* tipo A (ATCC 13124), *E. faecalis* (ATCC 19433), *Escherichia coli* (ATCC 25723), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), *Salmonella enterica* sorovar Typhi (ATCC 19430), *S. enterica* sorovar Typhimurium (ATCC 14028) – isolado clínico de criança com meningite, *Shigella sonnei* (ATCC 11060), *Pseudomonas aeruginosa* 25853 e *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433) foram cedidas pelo Laboratório de Materiais de Referência, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ. As linhagens representantes da microbiota humana: *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *Bifidobacterium longum* A5, *E.coli* Nissle 1917 (Mutaflor®), *Lactobacillus delbrueckii* H2b20 pertencem ao Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos.

As linhagens bacterianas patogênicas anaeróbias facultativas foram conservadas em 1 mL de uma solução aquosa com 20% de glicerina, esterilizadas por calor úmido, com 1 mL da cultura de 18 h em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Difco, Sparks, USA). As bactérias anaeróbias estritas foram crescidas durante 24-48 h a 37°C em caldo BHI-S (BHI suplementado com 0,5% de extrato de levedura, 0,1% de hemina e 0,1% de menadiona) (HOLDMAN *et. al.*, 1977) e incubadas na câmara de anaerobiose (Forma Scientific Company, Marietta, USA contendo N₂ 85%, H₂ 10% e CO₂ 5%,) a 37°C. Todas as amostras foram estocadas em tubos criogênicos de 2 mL a -80°C.

IV.2 Animais

Foram utilizados camundongos NIH (Taconic Farms, Germantown, USA) isentos de germes de 21 a 23 dias de ambos os sexos. Os animais foram mantidos em isoladores flexíveis (Standard Safety Company, McHenry, USA) e alimentados com ração autoclavável (Nuvital, Curitiba, PR). Os experimentos foram realizados em microisoladores (UNO Roestsvaal, Zevenar, Holanda). O projeto foi submetido ao comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, protocolo nº

195/2010. Todos os animais foram mantidos em um biotério NB2 (Departamento de Microbiologia) com controle de ciclo de luminosidade (12 horas luz e 12 horas escuridão) e de temperatura (23°C).

Os animais foram divididos em três grupos: o grupo controle somente desafiado com a *S. Typhimurium* ATCC 14028 e dois grupos experimentais previamente tratados com a levedura *S.boulevardii* e *S. cerevisiae* UFMG A-905. Após 48 horas do tratamento os animais foram desafiados com a *S. Typhimurium* ATCC 14028. Duas horas após o desafio os animais foram sacrificados e suas porções intestinais foram removidas e processadas e visualizadas em microscopia eletrônica de varredura.

IV.3 Ensaio de aglutinação

O teste para analisar a habilidade das leveduras de se aglutinarem aos patógenos testados foi realizado conforme descrito por PÉREZ-SOTELO *et al.* (2005) com algumas modificações. Mil microlitros da cultura de levedura contendo 10^8 UFC/mL foram misturadas com 500 μ L da suspensão *overnight* da bactéria a ser testada na concentração de 10^9 UFC/mL em uma placa de 6 poços. A aglutinação foi observada macroscopicamente, estimando-se a intensidade da ligação imediatamente após os micro-organismos serem colocados juntos. O tempo máximo para se observar a presença ou ausência da aglutinação foi de 3 h.

IV.4 Ensaio de adesão

Todos os poços em que foram observado aglutinação ao exame a olho nu foram posteriormente visualizados sob microscopia óptica. Foram feitas lâminas coradas pelo método de Gram e observadas nos aumentos de 10, 40 e 100X. A adesão foi avaliada qualitativamente observando-se as adesões entre as bactérias e as leveduras.

IV.5 Ensaio de sedimentação

As leveduras foram crescidas em meio YPG, por 24 h, e a concentração ajustada para de 10^8 UFC/mL. Mil microlitros da solução contendo a levedura foram colocados juntamente com 500 μ L da cultura bacteriana a ser testada, contendo 10^9 UFC/mL em um eppendorf de 1,5 mL. Em seguida a solução foi homogeneizada com pipeta e incubada à temperatura ambiente por 15 min. Posteriormente foi avaliado o tamanho do sedimento no tubo eppendorf. Também foi avaliada a concentração do patógeno e da levedura no sobrenadante em intervalos de tempo de 0, 15, 30, 60 e 120 min. Os microorganismos associados foram deixados sobre agitação (Agitador Rotativo TG 165 Tecnal) por 40 min, para uma melhor aderência entre eles. Posteriormente foram plaqueados 100 μ L do sobrenadante em meio Sabouraud (Difco) suplementado com 0,1% de cloranfenicol para contagem da levedura, e em meio específico suplementado com 0,1% de cicloheximida para a contagem da bactéria patogênica. O grupo controle incluiu uma solução contendo unicamente a levedura ou bactéria a serem testadas.

IV.6 Avaliação de fatores que influenciam na adesão

IV.6.1 Carboidratos

Este experimento consistiu em um ensaio de adesão na presença de diversos carboidratos. Para isso todos os isolados foram testados quanto à adesão sensível a manose, galactose, glicose e maltose conforme descrito por PÉREZ-SOTELO *et al.* (2005). As leveduras foram diluídas em 1 mL de salina tamponada contendo 5% (p/v) de manose, glicose, galactose ou maltose. Juntamente com 1 mL da levedura, na concentração de 10^8 UFC/mL, adicionou-se um volume igual da cultura bacteriana contendo 10^9 UFC/mL. Foi observada a olho nu a presença ou ausência de aglutinação do patógeno à levedura na presença dos carboidratos testados, nos tempos de 5, 15 e 120 minutos.

IV.6.2 Teste com sais biliares

Para determinarmos a ocorrência da adesão entre as leveduras e as bactérias patogênicas na presença de sais biliares (Oxgall, Difco) as culturas foram tratadas

conforme descrito por GUGLIELMETTI *et al* (2009), com algumas modificações. As leveduras e as bactérias foram crescidas em meio YPG e em caldo BHI, respectivamente, acrescidos do sal oxgall em duas concentrações diferentes (1 g/L e 3 g/L), por 24 h e também ressuspensas em meio contendo oxgall nas concentrações 1 g/L e 3 g/L. Posteriormente foram feitos os testes de sedimentação e aglutinação conforme os itens **IV.3.** e **IV.5.**

IV.6.3 Viabilidade da levedura

As leveduras foram inativadas utilizando calor úmido (121°C por 15 min) e posteriormente foram realizados os ensaios de aglutinação, adesão e sedimentação descritos, respectivamente, nos itens **IV.3,** **IV.4,** **IV.5** avaliando a ligação patógeno-levedura.

IV.6.4 Fases do crescimento das leveduras

A ligação patógeno-levedura foi avaliada em duas fases do crescimento das leveduras: logarítmica e estacionária, utilizando-se os os ensaios de aglutinação, adesão e sedimentação descritos, respectivamente, descritos nos itens **IV.3,** **IV.4,** **IV.5.**

IV.6.5 Avaliação da influencia do pH e minerais na adesão

A ligação patógeno-levedura foi avaliada em duas diferentes condições de crescimento das leveduras: variação do pH e presença de sais, utilizando-se o teste de sedimentação descrito no item **IV.5.** Primeiramente foi feito os experimentos variando-se o pH de 4 a 8, e outra condição foi acrescentando sais minerais fosfato de cálcio e fosfato de potássio ao meio, na concentração 5% (p/v).

IV.7 Ensaio de flocculação

O ensaio de flocculação foi realizado de acordo com PENG *et al.* (2001), com algumas modificações. Duzentos microlitros da cultura bacteriana em suspensão juntamente com 2 mL de tampão fosfato foram colocados em tubo Falcon de 15 mL, adicionando em seguida 1,8 mL da cultura de células de levedura. Os tubos foram então

incubados em agitador (Agitador Rotativo TE 165 Tecnal) a 37°C, 150 rpm por 3 h, para alcançar o ponto de equilíbrio da floculação. Após a incubação de 3 horas, as suspensões foram deixadas em repouso à temperatura ambiente por 10 min. A leitura das amostras foi realizada no espectrofotômetro a 600 nm. Para a amostra da DO inicial (branco) foi utilizado 3,8 mL de tampão fosfato adicionado a 0,2 mL da cultura bacteriana. Posteriormente foram separados o sobrenadante e o precipitado de cada amostra, realizando se duas leituras. Primeiramente foram removidos 3,5 mL do sobrenadante dos ensaios experimentais para um novo tubo Eppendorf e adicionado 0,5 mL de água. Esta suspensão foi designada A. Ao precipitado foi acrescentado 3,5 mL de água destilada autoclavada, sendo designado B. Da amostra designada branca foram descartados 3,5 mL e ao restante (0,5 mL) foi acrescentada água até complementar o volume de 4 mL, essa suspensão sendo designada C. Todos os tubos foram “vortexados” para homogeneização das suspensões e a densidade das células (DO_A , DO_B , DO_C) foram medidas. A floculação foi calculada como:

$$[(DO_B - DO_C)/(DO_A + DO_B)] \times 100\%.$$

IV.8 Microscopia Eletrônica

IV.8.1 Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) *in vitro*

A amostra da levedura associada à bactéria patogênica foi fixada utilizando glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7.2 em tubo de microcentrifugação à temperatura ambiente. Posteriormente foram realizadas 3 lavagens com PBS 1X, e esperado o material sedimentar naturalmente. Após as lavagens incubaram-se as células em lamínulas previamente tratadas com poly-l-lisina durante 1 h, e em cada lamínula foram colocadas 2 gotas de tetróxido de ósmio 1% + ferricianeto de potássio 0,2% (PIMENTA & DE SOUZA, 1985) e deixado por 30 min protegido da luz. Em seguida a lamínula foi lavada com PBS 1X pra a retirada do ósmio. A etapa seguinte foi a de desidratação em séries de concentrações crescentes de acetona 30% - 50% - 70% - 90% - 100% - 100% por 30 min em cada concentração. Posteriormente foi realizada a secagem pelo ponto crítico em CO_2 e as lamínulas coladas em *stubs* (suporte porta-amostras do MEV), devidamente identificados, com a utilização de um adesivo condutor e submetidas à metalização com cobertura de ouro (PIMENTA & DE

SOUZA, 1986). Finalmente as amostras foram observadas no MEV (Jeol® JSM-5600, California - USA) e fotografadas.

IV.8.2 Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) *in vivo*

Animais foram previamente tratados por gavagem com 0,1 mL das leveduras na concentração de 10^9 UFC/mL por inóculo único e, após 48 h, foram desafiados com a *S. Typhimurium* ATCC 14028 (10^9 UFC por gavagem). Os animais foram sacrificados duas horas após o desafio, sendo removidas partes do intestino (colón e ceco) para serem analisadas ao MEV para verificar se ocorreu ligação entre os micro-organismos (patógeno – levedura) *in vivo*.

A amostra dos tecidos dos animais tratados com a levedura e desafiados com a bactéria foi limpa, removendo-se os resíduos de fezes com PBS, e fixada utilizando glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 em tubo de microcentrifugação à temperatura ambiente. Posteriormente foram realizadas 3 lavagens, de 30 min cada, com PBS 1X. Após as lavagens as amostras foram incubadas em tetróxido de ósmio e ferricianeto de potássio 0,2% (v/v) por 1 h 30 min, protegidas da luz. Em seguida as amostras foram lavadas com PBS 1X para a retirada do ósmio. A etapa seguinte foi a de desidratação em séries crescentes de acetona 20% - 30% - 40% - 50% - 60% - 70% - 80% - 90% - 100% (3 vezes), deixando por 40 min em cada concentração. Posteriormente foi realizada a secagem pelo ponto crítico em CO₂ e as amostras coladas em *stubs* (suporte porta-amostras do MEV), devidamente identificados, com a utilização de um adesivo condutor e submetidas à metalização com cobertura de ouro (PIMENTA & DE SOUZA, 1985). Finalmente as amostras foram observadas no MEV (Jeol® JSM-5600) e fotografadas.

IV.9 Experimentação de quimiotaxia

Para observarmos a presença ou ausência do fenômeno de quimiotaxia, foram realizados experimentos como descrito por ADLER (1972) e PALLERONI (1976) com algumas modificações. Placas para experimentação em quimiotaxia foram confeccionadas (fig. 3), sendo a placa constituída por quatro câmaras escavadas em uma placa de acrílico medindo 5,5 cm de lado e 1 cm de espessura. Cada uma das câmaras é formada por dois compartimentos cilíndricos medindo 1 mm de diâmetro e 5 mm de altura ligadas por um canal de 24 mm de comprimento, 2 mm de largura e 2 mm de profundidade. As placas

foram esterilizadas por radiação ultravioleta *overnight*. A cultura de bactéria patogênica foi crescida em BHI por 24 horas e 400 μL desta cultura foi pipetada para encher o compartimento. Dentro do canal unindo os dois compartimentos foi colocado um capilar esteril com aproximadamente 24 mm de diâmetro, que foi anteriormente imerso na cultura leveduriforme crescida em meio YPG, por 24 h. As placas de quimiotaxia foram deixadas à temperatura ambiente e a presença ou ausência do fenômeno foi observado nos tempos de 5, 15, 30 e 45 min. Após o término de cada tempo os capilares foram cuidadosamente removidos por uma pinça e lavados externamente com jatos finos de salina estéril, tomando o devido cuidado de lavar a extremidade que ficou em contato com as células bacterianas. Após as lavagens o capilar foi lavado internamente com 30 μL de salina estéril e o conteúdo recolhido em tubo de microcentrifugação, realizadas diluições seriadas e 100 μL da diluição foi plaqueada em meio apropriado para contagem bacteriana.

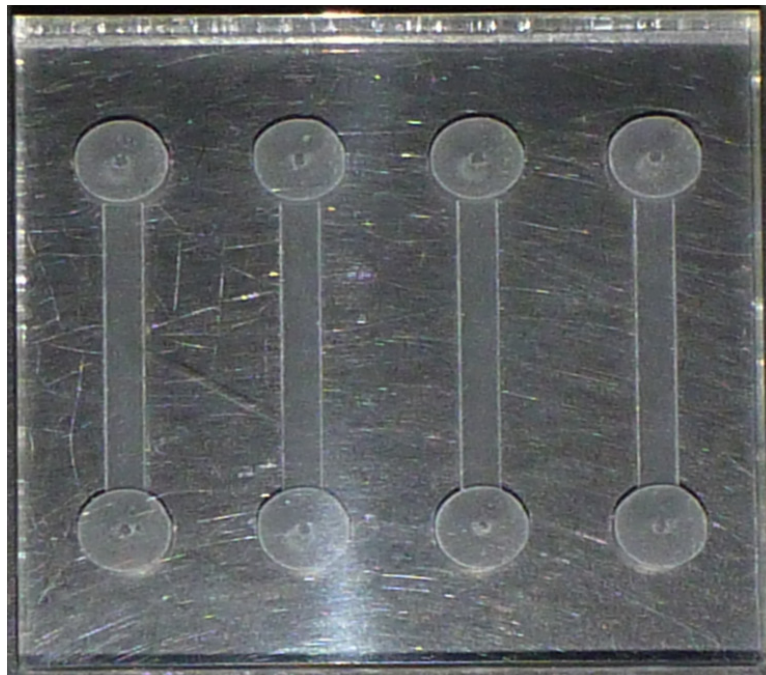


Figura 3- fotografia da placa para experimentação em quimiotaxia.

IV.10 Avaliação da capacidade de ligação dos patógenos à parede celular das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 mutantes de parede celular

As leveduras mutantes descritas na Tabela 1 foram avaliadas quanto à capacidade de aglutinação, conforme a metodologia descrita no item IV.3, para avaliar qual gene estaria relacionado com a capacidade da levedura BY4741 se aderir à bactéria patogênica. As leveduras que não apresentaram a capacidade de aglutinação foram selecionadas para os experimentos posteriores.

IV.11 Expressão dos genes relacionados com a síntese de componentes responsáveis pela ligação patógeno-levedura

IV.11.1 Extração do DNA cromossômico da levedura BY4741 e realização de PCR

A levedura BY4741 foi crescida até a fase estacionária, em 5 mL do meio YPG. Posteriormente a cultura foi colocada em tubo Falcon de 15 mL e centrifugada a 2300 g por 4 min. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 0,5 mL de água estéril e transferido para um tubo de microcentrifugação para a centrifugação a 4000 g por 5 min. Após descarte do sobrenadante, as células foram ressuscitadas em 40 µL de solução de liticase (0,3 g/mL liticase e 0,8 µl/mL de β-mercaptoetanol) e incubadas de 20 a 40 min a 37°C. Após a incubação, foram adicionados 300 µL do tampão de lise (2% SDS em 50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA pH 8,0). Incubou-se por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 200 µL de NaCl 5M e colocado no gelo por 2 h. Após a incubação em gelo a solução foi centrifugada a 18.000 g por 10 min e o *pellet* foi ressuscitado em 300 µL de tampão TE (10 mM de Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0), 300 µL PCI (fenol/clorofórmio, álcool isoamílico em 25/24/1) e agitado em vortex. A suspensão foi novamente centrifugada a 18.000 g por 5 min e a camada aquosa foi transferida para um novo microtubo, e adicionada de 2 volumes de etanol 100%. A precipitação ocorreu a -20°C por 1 h ou por 30 min a -70°C. Posteriormente a suspensão foi centrifugada a 18.000 g por 15 min e o *pellet* lavado com etanol 70%. O DNA foi seco em um bloco térmico e ressuscitado em 100 µL de tampão TE.

IV.11. 2 Amplificação por PCR

Para amplificação de DNA por PCR foi utilizado um volume de reação total de 25 µL com concentrações finais dos seguintes reagentes: 50-500 ng DNA genômico ou 1-10 ng DNA plasmidial; 0,25 mM de cada dNTP; tampão de reação 1X; 3,5 mM de MgCl₂, 0,1-1 µM de cada oligonucleotídeo (senso e anti-senso); 1U DNA polimerase (Taq DNA Polimerase, Invitrogen, St Louis, USA).

O programa adotado para as reações de PCR foi o seguinte: primeiro ciclo 94°C 2 min, 30 ciclos [94 °C 1 min, 50-58°C 1 min e 1 min/pb] e período de extensão final de 10 min. Em geral foram adotadas as temperaturas de anelamento de 56°C ou 58°C e, quando necessário, a temperatura foi calculada de acordo com a fórmula abaixo:

$$T_m = 4(G+C)+2(A+T)-10$$

O período de extensão primário foi estabelecido da seguinte maneira: 30 seg para fragmentos de até 800 pb, 1 min para fragmentos de 800-2000 pb e 2-3 min para fragmentos maiores que 2000 pb. Após amplificação, os produtos de PCR foram checados em gel de agarose 1% usando Smart Ladder (Eurogentec, Texas, USA) ou 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen).

IV.12 Ensaio de sedimentação utilizando micro-organismos da microbiota

A ligação patógeno levedura foi avaliada com micro-organismos da microbiota de acordo com o teste de sedimentação descrito no item **IV.5**.

IV.13 Estatística

Os significados estatísticos das diferenças foram avaliados com a utilização do teste “*t*” de Student. Para a realização dos testes foi utilizado o programa SigmaStat versão 3.5 (Systat Corporation Software Inc., 2005), utilizando 0,05 como limiar de confiança.

Tabela 1- Levedura mutante de parede celular *Saccharomyces cerevisiae* BY4741

Gene associado		Nome sistemático do mutante	Descrição Geral
1	<i>AGA2</i>	YGL032C	Subunidade de adesão da alfa-aglutinina das células
2	<i>BGL2</i>	YGR282C	Proteína principal da parede celular, envolvida na sua manutenção (endo beta-1,3 glicanase)
3	<i>CCW12</i>	YLR110C	Manoproteína da parede celular
4	<i>CKA2</i>	YOR061W	Floculação via interação de carboidrato com proteína da parede celular
5	<i>CIS3</i>	YJL158C	Glicoproteínas constituinte da parede celular, membro da família PIR (<i>proteins with internal repeats</i>)
6	<i>CRH1</i>	YGR189C	Proteínas da parede celular que funciona na transferência da quitina para beta-1,6glicano. Localizado nos sítios de polarização do crescimento, sua expressão é induzida por condições de estresse
7	<i>CRR1</i>	YLR213C	Proteína expressa durante a esporulação
8	<i>CWH41</i>	YGL027C	Envolvida na montagem de beta-1,6 glicano da parede celular.
9	<i>CWP1</i>	YKL096W	Manoproteína da parede celular ligada a beta-1,3 e beta-1,6 glicano (envolvida na organização da parede celular)
10	<i>CWP2</i>	YKL096W-A	Proteína covalentemente ligada a manoproteína da parede celular. Tem papel na estabilização da parede celular, estando envolvida na resistência a pH baixo.
11	<i>DCW1</i>	YKL046C	Associada a manosidase, proteína de membrana requerida para a biossíntese da parede celular
12	<i>DFG5</i>	YMR238W	Associada a manosidase, proteína de membrana requerida para a biossíntese da parede celular e na formação de gemas

Continuação Tabela 1

Gene associado		Nome sistemático do mutante	Descrição Geral
13	<i>DSE2</i>	YHR143W	Proteína secretada, especificamente, pelas células filhas (degrada a parede celular resultando na separação da célula filha com a célula mãe. A expressão é reprimida pelo cAMP
14	EXG1	YLR300W	Principal exo-1,3-beta-glicanase da parede celular envolvido na montagem de beta-glicano
15	EXG2	YDR261C	Principal exo-1,3-beta-glicanase da parede celular envolvido na montagem de beta-glicano
16	FIG2	YCR089W	Adesina da parede celular
17	FIT1	YDR534C	Manoproteína que está incorporada dentro da parede celular, via ancora GPI
18	FIT2	YOR382W	Manoproteína que está incorporada dentro da parede celular, via ancora GPI
19	FKS3	YMR306W	Proteína importante para montagem da parede espórica
20	FLO1	YAR050W	Floculação via interação de carboidrato com proteína da parede celular
21	FLO8	YER109C	Floculação via interação de carboidrato com proteína da parede celular
22	FLO10	YKR102W	Floculação via interação de carboidrato com proteína da parede celular
23	<i>GSC2</i>	YGR032W	Subunidade catalítica da síntese de beta-1,3 glicano
24	<i>GUK1</i>	YDR454C	Necessária para o crescimento e alongação das cadeias de manose da parede celular
25	<i>HKR1</i>	YDR420W	Proteína envolvida na regulação da síntese de beta-1,3 glicano da parede celular
26	<i>KNH1</i>	YDL049C	Proteína envolvida na síntese de beta-1,6 glicano da parede celular
27	<i>KRE6</i>	YPR159W	Proteína requerida para a biossíntese de β -1,6 glicano
28	<i>KTR1</i>	YOR99W	Alfa-1,2 manosiltransferase envolvida na ligação proteínas glicosiladas a proteínas de membrana

Continuação Tabela 1

Gene associado		Nome sistemático do mutante	Descrição Geral
29	<i>LAS21</i>	YJL062W	Proteína da membrana plasmática envolvida na síntese da estrutura GPI, mutações neste gene afeta a integridade da parede
30	<i>MNT2</i>	YGL257C	Manosiltransferase envolvido na adição do 4° ou 5° resíduo de manose a glucose
31	<i>PIR3</i>	YKL163W	Proteína da parede celular glicosilada, importante para a estabilidade da parede
32	<i>PST1</i>	YDR055W	Proteína da parede celular que contém um sítio de ligação GPI
33	<i>ROT2</i>	YBR229C	Subunidade catalítica glicosidase II, necessária para a síntese normal da parede celular
34	<i>SCW4</i>	YGR279C	Proteína da parede celular similar a glicanase
35	<i>SCW10</i>	YMR305C	Proteína da parede celular similar a glicanase (pode ter um importante papel na conjugação durante o acasalamento)
36	<i>SCW11</i>	YGL028C	Proteína da parede celular similar a glicanase (pode ter um importante papel na conjugação durante o acasalamento)
37	<i>SHE10</i>	YGL228W	Associada a proteína ancorada a GPI, função desconhecida
38	<i>SKN1</i>	YGR143W	Proteína envolvida na síntese de esfingolipídio (proteína de membrana)
39	<i>SMK1</i>	YPR054W	Proteína quinase ativada especificamente pela esporulação.
40	<i>SPI1</i>	YER150W	Proteína da parede celular com função desconhecida
41	<i>SPR1</i>	YOR190W	Proteína específica para a esporulação
42	<i>SRL1</i>	YOR247W	Manoproteínas necessária para estabilidade da parede celular (rica em regiões serino-treonina)

Continuação Tabela 1

Gene associado		Nome sistemático do mutante	Descrição Geral
43	SUN4	YNL066W	Proteína da parede celular relacionada com a glucanase, possivelmente envolvidos na septação da parede
44	UTR2	YEL040W	Proteína da parede celular que age na ligação quitina com β 1-6 glicano, responsável pela manutenção da parede
45	<i>YPS1</i>	YLR120C	Protease aspártica, ligada a membrana plasmática pela âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI)
46	<i>YPS3</i>	YLR121C	Protease aspártica, ligada a membrana plasmática pela âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI)

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1 Ensaio de adesão e aglutinação

A habilidade das leveduras se aglutinarem às bactérias patogênicas testadas é mostrada na Tabela 2. As leveduras *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG A-905 apresentaram uma aglutinação rápida (15 min), tanto nas suas formas viva e morta, com os seguintes patógenos: *S. Typhimurium* (origem humana), *S. Typhimurium* ATCC 14028 e *E. coli* ATCC 25723. E uma aglutinação um pouco mais lenta foi obtida com *S. Typhi*. Para os patógenos *S. sonnei*, *E. faecalis* (Yakult), *E. faecalis* ATCC 19433, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. faecalis*, *V. cholerae*, *C. difficile* e *C. perfringens*, não foi observada aglutinação no período de 3 h, assim como também não foi observada aglutinação da levedura *S. cerevisiae* W303 frente a todos patógenos testados. A capacidade de aglutinação é um importante fator encontrado nos probióticos e prebióticos veterinários. Paredes de leveduras presentes no suplemento alimentar de suínos (Bio-Mos) também apresentaram a capacidade de aglutinação com algumas bactérias patogênicas (*E. coli*, *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium*). A ação benéfica deste suplemento seria por inibir da adesão do patógeno no epitélio intestinal bloqueando a ligação das adesinas bacterianas com os carboidratos epiteliais (KOGAN *et al.*, 2007).

A adesão foi confirmada em lâminas submetidas à coloração de Gram como pode ser observado na Figura 4, na qual observamos células de levedura rodeadas por bactérias. Sugerrindo um fenômeno de atração entre os dois micro-organismos (quimiotaxia).

Tabela 2. Ensaio de aglutinação das leveduras vivas ou mortas com as bactérias patogênicas

	Adesão				
	<i>S. boulardii</i> viva	<i>S. cerevisiae</i> UFMG A 905 viva	<i>S. cerevisiae</i> W303 viva	<i>S. boulardii</i> morta	<i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905 morta
<i>S. Typhi</i> ATCC19430	+	+	-	+	+
<i>S. Typhimurium</i> (origem humana)	+	+	-	+	+
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	+	+	-	+	+
<i>E. coli</i> ATCC 25723	+	+	-	+	+
<i>S. sonnei</i> ATCC11060	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> (yakult)	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	-	-	-	-	-
<i>V. cholerae</i> (origem humana)	-	-	-	-	-
<i>C. difficile</i> ATCC 9689	-	-	-	-	-
<i>C. perfringens</i> ATCC 15313	-	-	-	-	-

- ausência de adesão

+ presença de adesão até 20 min.

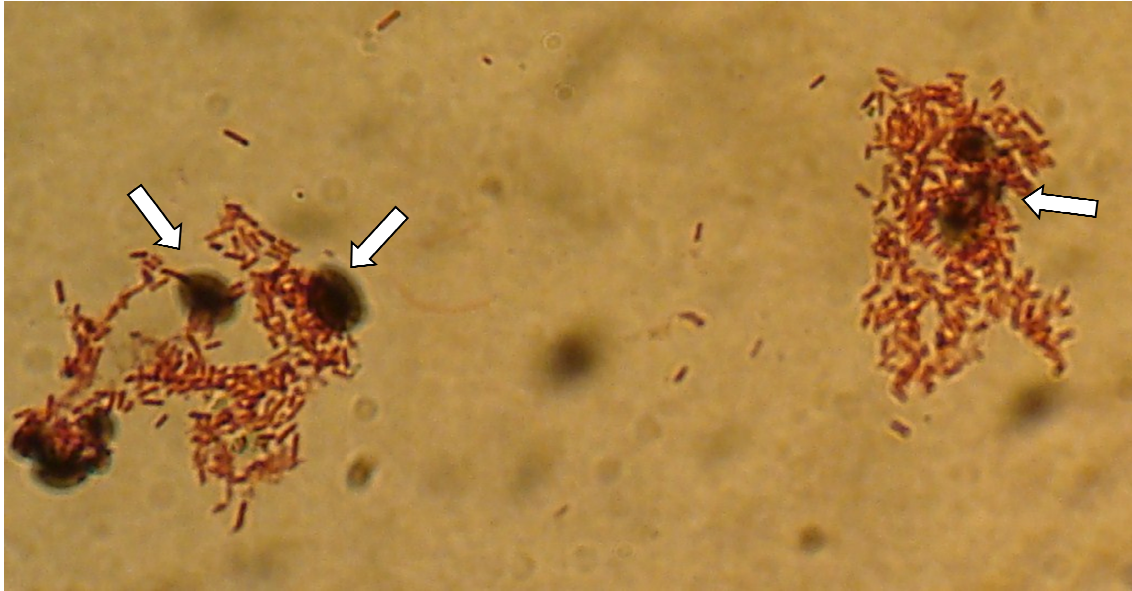


Figura 4 – Fotomicrografia mostrando a aglutinação da *S. Typhimurium* ATCC 14028 à *S. cerevisiae* UFMG A-905. As setas brancas indicam as células da levedura circundada pelas células bacterianas. Coloração de Gram, 10 x 100.

V.2 Ensaio de sedimentação e efeito da viabilidade e das diferentes fases de crescimento

A definição de probióticos pela FAO/WHO (2002) enfatiza a necessidade do micro-organismo estar vivo. No entanto, alguns autores demonstraram que os micro-organismos mortos também podem conferir benefícios aos hospedeiros (GENEROSO *et al.*, 2010). O objetivo deste experimento foi avaliar a capacidade de adesão entre os patógenos testados com as leveduras vivas ou mortas (mortas por calor úmido). Os resultados obtidos demonstraram que todas as situações analisadas apresentaram diferença estatística significativa ($P < 0,05$ pelo teste t de Student) quando comparadas com o grupo controle (Tabela 3). Esses dados confirmam que as bactérias se aderem às leveduras, independentemente da viabilidade, sedimentando mais rapidamente e levando a uma queda da concentração da bactéria no sobrenadante. Fato este também observado na formação dos *pellets*, que se apresentaram visualmente maiores no grupo experimental em relação aos controles (somente patógeno ou somente levedura).

Posteriormente foi feito um estudo estatístico comparando as leveduras viáveis na fase estacionária e logarítmica, com o intuito de observar se há uma melhor adesão em uma das fases de cultura (Tabela 4). Foi observado que geralmente as duas leveduras apresentaram um melhor processo de adesão na fase estacionária quando associada a *S. Typhimurium* ATCC 14028 e *E. coli*, quando comparado com a fase logarítmica, sendo esta diferença estatisticamente significativa. Quando associado a *S. Typhi*, tanto *S. cerevisiae* UFMG A-905 quanto *S. boulardii* apresentaram uma melhor adesão na fase logarítmica, uma vez que o número de bactéria no sobrenadante foi menor na fase logarítmica em comparação com a fase estacionária independentemente da levedura utilizada, esta diferença foi estatisticamente significativa (Tabela 4).

Tabela 3. Influência da viabilidade (viva ou morta) das leveduras nos ensaios de sedimentação com os patógenos. Os resultados são expressos em log₁₀ de UFC/mL.

Associações	Contagem dos patógenos*	P	Associações	Contagem dos patógenos*	P
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	6,20		<i>S. Typhi</i>	7,36	
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 / <i>S. bouldarii</i> viva	5,62	P < 0,001	<i>S. Typhi</i> / <i>S. bouldarii</i> viva	6,72	P < 0,01
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 / <i>S. bouldarii</i> morta	5,03	P < 0,01	<i>S. Typhi</i> / <i>S. bouldarii</i> morta	5,61	P < 0,001
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 viva	5,78	P < 0,001	<i>S. Typhi</i> / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 viva	6,51	P < 0,01
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 morta	5,68	P < 0,01	<i>S. Typhi</i> / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 morta	5,43	P < 0,001
<i>S. Typhimurium</i> origem humana	6,43		<i>E. coli</i> ATCC 25723	6,46	
<i>S. Typhimurium</i> origem humana / <i>S. bouldarii</i> viva	5,77	P < 0,001	<i>E. coli</i> ATCC 25723 / <i>S. bouldarii</i> viva	5,45	P < 0,001
<i>S. Typhimurium</i> origem humana / <i>S. bouldarii</i> morta	5,63	P < 0,01	<i>E. coli</i> ATCC 25723 / <i>S. bouldarii</i> morta	5,61	P < 0,01
<i>S. Typhimurium</i> origem humana / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 viva	5,87	P < 0,001	<i>E. coli</i> ATCC 25723 / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 viva	5,83	P < 0,001
<i>S. Typhimurium</i> origem humana / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 morta	5,71	P < 0,01	<i>E. coli</i> ATCC 25723 / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 morta	5,54	P < 0,001

*Media dos valores para os tempos 0, 15, 30, 60 e 120 min (cada um em triplicata). Para detalhes, ver Anexo 1. Em negrito estão os grupos controle.

Tabela 4. Análise da influência da fase de crescimento (logarítmica ou estacionária) das leveduras nos ensaios de sedimentação com os patógenos. Os resultados são expressos em log₁₀ de UFC/mL.

Associações	Contagem dos patógenos*	P	Associações	Contagem dos patógenos*	P
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 / <i>S. boulardii</i> (fase estacionária)	5,62	P < 0,001	<i>S. Typhi</i> associada a <i>S. boulardii</i> (fase estacionária)	6,72	P < 0,05
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 / <i>S. boulardii</i> (fase logarítmica)	6,80		<i>S. Typhi</i> / <i>S. boulardii</i> (fase logarítmica)	5,54	
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 (fase estacionária)	5,78	P < 0,001	<i>S. Typhi</i> / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 viável (fase estacionária)	6,51	P < 0,01
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 (fase logarítmica)	6,87		<i>S. Typhi</i> / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 viável (fase logarítmica)	5,77	
<i>S. Typhimurium</i> origem humana / <i>S. boulardii</i> viável (fase estacionária)	5,77	P > 0,05	<i>E. coli</i> ATCC 25723/ <i>S. boulardii</i> viável (fase estacionária)	5,45	P > 0,05
<i>S. Typhimurium</i> origem humana / <i>S. boulardii</i> (fase logarítmica)	6,38		<i>E. coli</i> ATCC 25723 / <i>S. boulardii</i> viável (fase logarítmica)	5,79	
<i>S. Typhimurium</i> origem humana / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 (fase estacionária)	5,87	P < 0,001	<i>E. coli</i> ATCC 25723 / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 viável (fase estacionária)	5,83	P < 0,001
<i>S. Typhimurium</i> origem humana / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 (fase logarítmica)	6,39		<i>E. coli</i> ATCC 25723 / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 viável (fase logarítmica)	6,26	

*Média dos valores para os tempos 0, 15, 30, 60 e 120 min. Para detalhes, ver Anexo 2.

V.3 Ensaio de sedimentação e adesão utilizando *S. cerevisiae* W303 e o sobrenadante do meio YPG

Posteriormente foi feito o mesmo experimento descrito nos itens **IV. 3** e **IV.5** para a levedura *S. cerevisiae* W303 e o sobrenadante do meio de cultura onde foi crescida a levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905. Primeiramente foi feito o teste de sedimentação e adesão com a levedura *S. cerevisiae* W303, com o objetivo de confirmar os dados obtidos anteriormente (Tabela 2), quando não se observou aglutinação desta levedura frente a nenhum patógeno testado. Os resultados corroboraram com os dados já obtidos, uma vez que não se observou diferença estatística significativa entre o grupo controle (somente patógeno) e o grupo experimental (patógeno associado à levedura *S. cerevisiae* W303) (Tabela 5). Embora a levedura *S. cerevisiae* W303 seja geneticamente próxima a *S. boulardii* análises fisiológicas e bioquímicas têm demonstrado diferenças significativas entre estas duas leveduras. FIETTO e coloboradores (2004) demonstraram que a levedura *S. cerevisiae* W303 possui baixa resistência a pH ácidos, a altas temperaturas e a presença de sais biliares, além de crescerem mais lentamente, na mesma temperatura, quando comparado a *S. boulardii* (FIETTO *et al.*, 2004), indicando que a *S. cerevisiae* W303 não apresenta características probióticas.

Em seguida foi avaliado se o sobrenadante do meio de cultivo das leveduras teria um papel no processo de adesão levedura-bactéria. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os controles e os grupos experimentais (Tabela 6). Este dado reforça a idéia de que a bactéria se liga à parede da célula da levedura e não a algum substrato presente no meio.

Tabela 5. Ensaio de sedimentação e adesão com a levedura *S. cerevisiae* W 303 e as bactérias patogênicas. Os resultados são expressos em log₁₀ de UFC/mL.

Associações	Contagem dos patógenos*	P
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	7,74	
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 / <i>S. cerevisiae</i> W 303	7,64	P > 0,05
<i>S. Typhimurium</i> origem humana	7,72	
<i>S. Typhimurium</i> origem humana / <i>S.cerevisiae</i> W 303	7,43	P > 0,05
<i>S. Typhi</i>	7,02	
<i>S. Typhi</i> / <i>S.cerevisiae</i> W 303	6,66	P > 0,05
<i>E. coli</i> ATCC 25723	7,28	
<i>E. coli</i> ATCC 25723 / <i>S.cerevisiae</i> W 303	7,28	P > 0,05

*Media dos valores para os tempos 0, 15, 30, 60 e 120 min. Em negrito estão os grupos controles. Para detalhes, ver Anexo 3.

Tabela 6. Ensaio de sedimentação das bactérias patogênicas associado ao sobrenadante da cultura da levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905. Os resultados são expressos em log₁₀ de UFC/mL.

Associações	Contagem dos patógenos*	P
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	6,57	
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 no sobrenadante de <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905	6,93	P > 0,05
<i>S. Typhimurium</i> origem humana	6,40	
<i>S. Typhimurium</i> origem humana no sobrenadante de <i>S. cerevisiae</i> UFMG A- 905	6,87	P > 0,05
<i>S. Typhi</i>	7,04	
<i>S. Typhi</i> no sobrenadante de <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905	6,77	P > 0,05
<i>E. coli</i> ATCC 25723	6,72	
<i>E. coli</i> ATCC 25723 no sobrenadante de <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905	6,60	P > 0,05

*Media dos valores para os tempos 0, 15, 30, 60 e 120 min. Em vermelho estão os grupos controles Para detalhes, ver Anexo 4

V.4 Avaliação de fatores que influenciam na adesão

V.4.1 Carboidratos

Para investigar o papel dos resíduos de açúcares na interação levedura-bactéria, foi feito um ensaio de adesão sensível a carboidratos. Foi observada a presença ou ausência de aglutinação do patógeno à levedura na presença dos carboidratos testados (Tabela 7). Interessantemente nenhuma bactéria demonstrou propriedades de aderir nas leveduras na presença de manose, de maneira similar aos dados encontrados por PÉREZ-SOLETO *et al.* (2005), que não observou aglutinação da levedura *S. cerevisiae* SC47 frente a várias linhagens de *Salmonella*, na presença de manose. GOLOWCZC e colaboradores observaram uma diminuição significativa da agregação de seis linhagens de lactobacilos em presença de manose (GOLOWCZC *et al.*, 2009). ADLERBERTH e colaboradores (1996) também observaram a inibição da capacidade de adesão de *E. coli* 506 MS na presença de manose (ADLERBERTH *et al.*, 1996). Inversamente, a galactose não interferiu na adesão para todas as combinações testadas. No caso da glicose e da maltose, a inibição da adesão foi observada somente para *S. boulardii*, viável e inviável, com *S. Typhi*, e para *S. boulardii* viável com *S. Typhimurium*.

Diferenças na capacidade de ligação dos micro-organismos podem estar relacionadas com as condições de crescimento das culturas como variação de temperatura e pH. Estudos prévios mostraram que algumas *Saccharomyces* apresentam afinidade de ligação com linhagens de salmonelas que expressam fímbria do tipo 1, sendo esta afinidade mediada pelo monossacarídeo manose da parede celular da levedura. Na presença de manose no meio a afinidade é inibida (GEDEK *et al.*, 1999; MARTEAU *et al.*, 2001; PÉREZ-SOLETO *et al.*, 2005).

Tabela 7. Ensaio de aglutinação na presença de carboidratos

Associações	Carboidratos				Associação	Carboidratos			
	Galactose	Glicose	Maltose	Manose		Galactose	Glicose	Maltose	Manose
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 / <i>S. boulardii</i> viva	++	++	++	-	<i>S. Typhi</i> / <i>S. boulardii</i> viva	+	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 / <i>S. boulardii</i> morta	+	+	+	-	<i>S. Typhi</i> / <i>S. boulardii</i> morta	+	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 viva	++	+	+	-	<i>S. Typhi</i> / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 viva	+	+-	+-	-
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 / <i>S.cerevisiae</i> A- UFMG 905 morta	+	++	+	-	<i>S. Typhi</i> / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 morta.	+	+	+	-
<i>S. Typhimurium</i> origem humana / <i>S. boulardii</i> viva	++	-	-	-	<i>E. coli</i> ATCC 25723 / <i>S. boulardii</i> viva	++	++	++	-
<i>S. Typhimurium</i> origem humana / <i>S. boulardii</i> morta	++	+	+	-	<i>E. coli</i> ATCC 25723 / <i>S. boulardii</i> morta	++	++	++	-
<i>S. Typhimurium</i> origem humana / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 viva	++	++	++	-	<i>E. coli</i> ATCC 25723 / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 viva	++	++	++	-
<i>S. Typhimurium</i> origem humana / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 morta	++	++	+	-	<i>E. coli</i> ATCC 25723 / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 morta	++	+	+	-

- ausência de aglutinação após 3 h.

+ presença de aglutinação após 1 h.

++ presença de uma aglutinação rápida (15 min).

V.4.2 Ensaio com ácidos biliares

Os micro-organismos probióticos, além de serem ingeridos vivos, devem chegar viáveis ao intestino proporcionando benefícios ao hospedeiro, sendo capazes de resistir a brusca variação de pH no trato gastrointestinal, a ação de sucos enzimáticos e de sais biliares. O objetivo deste experimento foi observar se a presença de sais biliares, em duas concentrações (1 e 3%), durante o crescimento ou após o crescimento, influenciaria significativamente na capacidade de adesão patógeno-levedura. Quando os micro-organismos foram tratados com oxgall a 1% (Tabela 8), houve certa perda da capacidade de adesão entre as leveduras e patógenos, mais pronunciada quando os micro-organismos foram cultivados na presença dos sais biliares (4 dos 8 experimentos) do que quando o contato foi após o crescimento (2 dos 8 experimentos). Quando os micro-organismos foram expostos ou crescidos em meio contendo oxgall 3% (Tabela 9) houve também perda de adesão entre bactérias e leveduras, sendo total quando os micro-organismos foram cultivados na presença de sais biliares. Contudo, esses dados foram de alguma maneira de difícil interpretação, já que para uma combinação não houve perda de adesão na cultura em presença de sais biliares, mas foi observado à perda de adesão na exposição posterior à cultura, e o inverso foi observado para outras combinações.

Nossos dados em altas concentrações de sais biliares são similares aos observados no trabalho de GUGLIELMETTI *et al.* (2009), no qual os autores identificaram perda da capacidade de adesão entre a bactéria *B. bifidum* MIMBb75 e as células Caco-2 na presença de oxgall, sendo a redução duas vezes maior na concentração de 3%. Nós também observamos uma perda maior na capacidade de adesão quando os micro-organismos foram colocados na presença de oxgall a 3%.

Tabela 8. Ensaio de adesão na presença de oxgall 1%. Os valores são expressos em log₁₀ de UFC/mL.

Micro-organismos ressuspensos em meio com oxgall 1%			Micro-organismos crescidos em meio com oxgall 1%	
Associações	Contagem dos patógenos*	P	Contagem dos patógenos*	P
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	7,31		7,11	
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 / <i>S. bouldarii</i>	6,20	P < 0,001	6,74	P < 0,05
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905	5,98	P < 0,01	6,84	P > 0,05
<i>S. Typhimurium</i> origem humana	7,03		6,92	
<i>S. Typhimurium</i> origem humana / <i>S. bouldarii</i>	7,17	P > 0,05	6,43	P < 0,05
<i>S. Typhimurium</i> origem humana / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905	5,78	P < 0,01	6,49	P > 0,05
<i>S. Typhi</i>	7,38		5,84	
<i>S. Typhi</i> / <i>S. bouldarii</i>	6,55	P < 0,01	5,89	P > 0,05
<i>S. Typhi</i> / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A- 905	5,17	P < 0,001	5,94	P > 0,05
<i>E. coli</i> ATCC 25723	7,33		6,76	
<i>E. coli</i> ATCC 25723 / <i>S. bouldarii</i>	6,19	P < 0,01	6,23	P < 0,01
<i>E. coli</i> ATCC 25723 / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A- 905	5,94	P < 0,001	6,43	P > 0,05

Media dos valores para os tempos 0, 15, 30, 60 e 120 min. Em negrito, os grupos que apresentaram diferença significativa quando foram comparados com o grupo controle. Para detalhes, ver Anexo 5

Tabela 9. Ensaio de adesão na presença de oxgall 3%. Os valores são expressos em log₁₀ de UFC/mL.

Micro-organismos ressuspensos em meio com oxgall 3%			Micro-organismos crescidos em meio com oxgall 3%	
Associações	Contagem dos patógenos	P	Contagem dos patógenos	P
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	6,75		6,73	
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 / <i>S. boulardii</i>	6,49	P > 0,05	6,41	P > 0,05
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905	6,55	P > 0,05	6,20	P > 0,05
<i>S. Typhimurium</i> origem humana	6,59		6,11	
<i>S. Typhimurium</i> origem humana / <i>S. boulardii</i>	6,40	P > 0,05	6,05	P > 0,05
<i>S. Typhimurium</i> origem humana / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905	6,04	P < 0,001	5,91	P > 0,05
<i>S. Typhi</i>	5,87		5,63	
<i>S. Typhi</i> / <i>S. boulardii</i>	5,35	P < 0,01	5,31	P > 0,05
<i>S. Typhi</i> / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905	5,47	P < 0,05	5,40	P > 0,05
<i>E. coli</i> ATCC 25723	6,78		6,44	
<i>E. coli</i> ATCC 25723 / <i>S. boulardii</i>	5,87	P < 0,001	5,88	P > 0,05
<i>E. coli</i> ATCC 25723 / <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905	6,06	P < 0,05	6,04	P > 0,05

Em negrito, os grupos que apresentam diferença significativa. Para detalhes ver anexo 6.

V.4.3 Avaliação da influencia do pH na adesão

A primeira barreira que um microrganismo deve atravessar após ser ingerido é o pH extremamente baixo do conteúdo estomacal. Esse conteúdo ácido apresenta uma barreira enzimática que é letal à maioria dos micro-organismos ingeridos durante a digestão (MARTINS *et al.*, 2005c). O objetivo deste experimento foi avaliar se a variação de pH interferiria na capacidade de adesão entre os patógenos e as leveduras.

Os resultados obtidos demonstraram que todas as situações analisadas apresentaram diferença estatística significativa ($P < 0,05$ pelo teste t de Student) quando comparadas com o grupo controle (Tabela 10). Podemos observar que as bactérias aderem às leveduras entre as faixas de pH 4 a 8. Observamos que pH mais ácido ou mais básico não interferiram na capacidade de adesão entre os micro-organismos, fazendo-os sedimentar mais rapidamente levando a uma queda da concentração da bactéria no sobrenadante. Experimentos realizados por Ambrosini *et al.* (1999) relataram que *Lactobacillus casei* CRL 431 apresentou prejuízo nas sua capacidade de adesão com as células epiteliais com a variação de pH, ao contrário dos dados que observamos entre as bactérias e as leveduras testadas.

MARTINS *et al.* e colaboradores (2005) demonstraram que leveduras *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG A-905 foram capazes de resistir a condições adversas como ambientes ácidos e à presença de sais biliares. CZERUCKA *et al.* (2007) relataram que as leveduras podem ser encontradas no estômago e no colón e que em condições estressantes a *S. boulardii* superexpressa genes relacionados com a síntese de proteína permitindo e melhorando o crescimento da levedura em meio ácido. A capacidade de sobrevivência das leveduras em condições tão diversas pode ser explicada pela sua resistência à variação de pH proporcionada pela sua parede. E assim como CZERUCKA *et al.* (2007) nós observamos que as leveduras cresceram tanto em ambientes ácidos, pH 4, quando em básicos, pH 8.

Estes resultados confirmam que a levedura apresentam boas características probióticas, uma vez que ao serem ingeridas são resistentes não só à alta temperatura e aos sais biliares, como também a uma variação de pH sem alterar suas características de adesão às bactérias patogênicas.

Tabela 10. Contagem de patógenos do grupo controle e do grupo associado com as leveduras *S.boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG A-905 em diferentes condições de pH. Os resultados estão expressos em Log₁₀ de UFC/mL.

Associações	Contagem*	P	Associações	Contagem*	P
<i>S. enterica</i> sor. Typhimurium ATCC 14028	6,19		<i>S. Typhi</i>	7,19	
<i>S. enterica</i> sor. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. boulardii</i> pH 4	5,62	0,011	<i>S. Typhi</i> associada a <i>S. boulardii</i> pH 4	5,7	<0,001
<i>S. enterica</i> sor. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. boulardii</i> viável pH 5	5,44	0,004	<i>S. Typhi</i> associada a <i>S. boulardii</i> viável pH 5	5,35	<0,001
<i>S. enterica</i> sor. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. boulardii</i> pH 6	5,55	<0,001	<i>S. typhi</i> associada a <i>S. boulardii</i> pH 6	5,59	<0,001
<i>S. enterica</i> sor. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. boulardii</i> pH 8	5,6	<0,001	<i>S. Typhi</i> associada a <i>S. boulardii</i> pH 8	5,65	0,009
<i>S. enterica</i> sor. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 pH 4	5,74	0,029	<i>S. Typhi</i> 14028 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 pH 4	6,21	<0,001
<i>S. enterica</i> sor. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 pH 5	5,24	0,006	<i>S. Typhi</i> associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 pH 5	5,75	<0,001
<i>S. enterica</i> sor. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 pH 6	5,27	<0,001	<i>S. Typhi</i> associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 pH 6	5,61	<0,001
<i>S. enterica</i> sor. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 pH 8	5,52	<0,001	<i>S. Typhi</i> associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 pH 8	5,73	<0,001
<i>S. enterica</i> sor. Typhimurium origem humana	6,29		<i>E. coli</i> ATCC 25723	6,37	

Continuação Tabela 10

Associações	Contagem*	P	Associações	Contagem*	P
<i>S. enterica</i> sor. Typhimurium origem humana associada a <i>S. boulardii</i> pH 4	5,22	0,001	<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S. boulardii</i> pH 4	5,03	<0,001
<i>S. enterica</i> sor. Typhimurium origem humana associada a <i>S. boulardii</i> viável pH 5	5	0,003	<i>E. coli</i> ATCC 25723 humana associada a <i>S. boulardii</i> viável pH 5	5,4	0,007
<i>S. enterica</i> sor. Typhimurium origem humana associada a <i>S. boulardii</i> pH 6	4,93	0,002	<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S. boulardii</i> pH 6	5,79	<0,001
<i>S. enterica</i> sor. Typhimurium origem humana associada a <i>S. boulardii</i> pH 8	5,69	0,006	<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S. boulardii</i> pH 8	6,09	0,005
<i>S. enterica</i> sor. Typhimurium origem humana associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 pH 4	5,70	0,026	<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 pH 4	5,72	0,002
<i>S. enterica</i> sor. Typhimurium origem humana associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 pH 5	5,50	0,002	<i>E. coli</i> ATCC 25723 humana associada a <i>S.cerevisiae</i> A-UFMG 905 pH 5	5,77	0,011
<i>S. enterica</i> sor. Typhimurium origem humana associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 pH 6	5,66	0,005	<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 pH 6	5,77	<0,001
<i>S. enterica</i> sor. Typhimurium origem humana associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMGA- 905 pH 8	5,63	0,010	<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 pH 8	5,9	0,013

*Média dos valores para os tempos 0, 15, 30, 60 e 120 min (cada um em triplicata), todos os grupos apresentaram diferença estatística significativa. Em negrito estão os grupos controle.

Para detalhes ver anexo 7.

V.4.4 Avaliação da influencia de minerais na adesão

A adesão bacteriana tem um importante papel na sobrevivência da bactéria no ambiente natural e esta adesão pode também ser influenciada pela presença de sais minerais no meio. O objetivo deste experimento foi observar se a presença de sais (Ca, Ke P) nas concentrações 5%, após o crescimento, influenciaria significativamente na capacidade de adesão patógeno-levedura. Observamos perda do fenômeno de adesão com a *S. boulardii* associada a todos os patógenos testados na presença do fosfato e *S. cerevisiae* UFMG A-905 associada a *E. coli* na presença de fosfato de potássio. (Tabela 11). Já a presença de fosfato de cálcio inibiu somente a adesão entre *S. cerevisiae* UFMG A-905 associada a *S. Typhimurium* de origem humana.

GUGLIELMETII *et al.* (2009) observaram que sais como metaperodato de sódio (NaIO_4), iodato de potássio (KIO_3) e cloreto de cálcio (CaCl_2) não afetou a capacidade de adesão da célula. AMBROSINI *et al.* (1999) relatou que adição de Ca não interferiu na adesão entre *L. casei* CRL 431e as células intestinais de camundongos. Nós também observamos que a presença de fosfato de cálcio não afetou o processo de adesão entre a grande maioria das bactérias testadas e as leveduras. No entanto, o processo de adesão foi prejudicado entre a *S. boulardii* e os patógenos na presença de fosfato de potássio. Interessantemente observamos que o fenômeno de adesão de *S. cerevisiae* UFMG A-905 com os patógenos testados foi bem menos prejudicado na presença de sais minerais em comparação com a *S. boulardii*, mostrando sofrer menos interferência na presença de sais minerais.

O prejuízo do processo de adesão estaria mais relacionado com desequilíbrio osmótico das bactérias, que seriam mais sensíveis à variação de sais. Estes dados se assemelham aos resultados encontrados no experimento com sais biliares, item V.4.2, no qual também houve perda de adesão entre bactérias e leveduras na presença de sais biliares na concentração de 3%.

Tabela 11. Contagem de patógenos do grupo controle e do grupo associado com as leveduras *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 na presença de fosfato de cálcio (Ca) e fosfato de potássio (K). Os resultados estão expressos em Log₁₀ de UFC/mL.

Associações	Contagem dos patógenos*	P	Associações	Contagem dos patógenos*	P
<i>S. enterica</i> sor. Typhimurium ATCC 14028	5,99	0,004	<i>S. Typhi</i>	6,21	0,001
<i>S. enterica</i> sor. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. boulardii</i> na presença de Ca	5,06		<i>S. Typhi</i> associada a <i>S. boulardii</i> na presença de Ca	5,33	
<i>S. enterica</i> sor. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. boulardii</i> na presença de K	6,31	0,447	<i>S. Typhi</i> associada a <i>S. boulardii</i> na presença de K	6,09	0,612
<i>S. enterica</i> sor. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905 na presença de Ca	5,29	0,030	<i>S. Typhi</i> associada a <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905 na presença de Ca	5,44	P<0,001
<i>S. enterica</i> sor. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905 na presença de K	4,51	0,003	<i>S. Typhi</i> associada a <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905 na presença de K	4,8	P<0,001
<i>S. enterica</i> sor. Typhimurium origem humana	5,95	P<0,001	<i>E. coli</i> ATCC 25723	6,08	0,003
<i>S. enterica</i> sor. Typhimurium origem humana associada a <i>S. boulardii</i> na presença de Ca	5,05		<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S. boulardii</i> na presença de Ca	5,22	
<i>S. enterica</i> sor. Typhimurium origem humana associada a <i>S. boulardii</i> na presença de K	5,95	1,00	<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S. boulardii</i> na presença de K	6,31	0,077
<i>S. enterica</i> sor. Typhimurium origem humana associada a <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905 na presença de Ca	5,57	0,061	<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905 na presença de Ca	5,05	0,013
<i>S. enterica</i> sor. Typhimurium origem humana associada a <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905 na presença de K	4,7	P<0,001	<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905 na presença de K	6,32	0,4

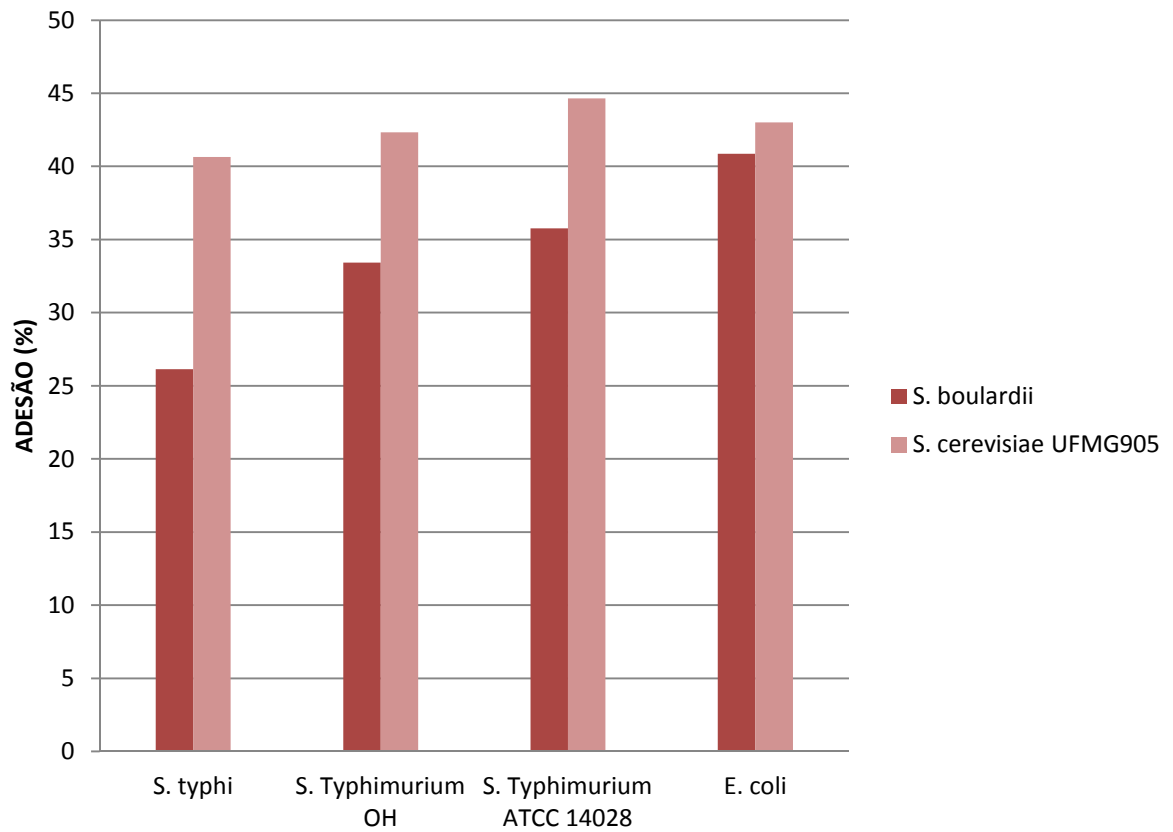
Em negrito os grupos que apresentaram diferença estatística significativa. *Média dos valores para os tempos 0, 15, 30, 60 e 120 min. Para detalhes ver anexo 8.

V.5 Flocculação entre bactérias e leveduras

As bactérias têm a habilidade de aderir nas leveduras formando flocos. PENG e colaboradores (2001) observaram o fenômeno de flocculação entre bactérias e células de leveduras livres no sobrenadante. Eles observaram que a *E. coli* aderiu as leveduras *Dekkera bruxellensis* e *S. cerevisiae*.

O resultado do ensaio de bactérias com leveduras livres no sobrenadante da cultura pode ser visto no Gráfico 1. Confirmando os dados anteriores, as bactérias testadas apresentaram coagregação com as leveduras *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905, com uma intensidade maior para as células da *S. cerevisiae* UFMG A-905, uma vez que observamos uma maior porcentagem no processo de adesão (*S. Typhimurium* ATCC 14028 46%, *S. Typhimurium* origem humana 46,38%, *S. Typhi* 44% e *E. coli* 45,11%), quando comparado às células da levedura *S. boulardii* (*S. Typhimurium* ATCC 14028 33,13%, *S. Typhimurium* origem humana 36,03%, *S. Typhi* 18,11% e *E. coli* 40,79%). Este experimento mostra a capacidade das bactérias de se aderirem em mais de um tipo de levedura, entretando apresenta uma afinidade maior pela *S.cerevisiae* UFMG 905.

Gráfico 1 . Floculação entre as leveduras e bactérias



V.6 Adesão *in vitro* visualizada por MEV

A Figura 5A mostra novamente a adesão entre a *S. boulardii* e *S. Typhimurium* ATCC 14028. A Figura 5B confirma também os dados obtidos nos ensaios de adesão e de sedimentação (Tabela 5), observando-se que para *S. cerevisiae* W 303 em presença de *S. Typhimurium* ATCC 14028 (controle negativo) não ocorreu o fenômeno de adesão. Nas Figuras 5C, 5D, 5E, 5F, além de visualizarmos o fenômeno de adesão, observam-se fenômenos de agregação e co-agregação. Estes dados são similares aos encontrados por GOLOWCZYC *et al.* (2009), os quais observaram forte interação superficial entre *Saccharomyces lipolytica* e *Lactobacillus kefir* isolados de grãos de kefir (GOLOWCZYC *et al.*, 2009). Nas Figuras 6A e 6B também pode ser notada a interação das fímbrias de *S. Typhimurium* ATCC 14028 com a parede celular da levedura, reforçando os achados de PÉREZ-SOLETO *et al.* (2005) que sugeriam que a fímbria do tipo 1 podia estar envolvida na ligação bactéria-levedura (PÉREZ-SOLETO *et al.*, 2005). E, finalmente, a Figura 6C mostra a adesão entre *E. coli* e *S. cerevisiae* UFMG A-905. A adesão da *E. coli* também é mediada pelas fímbrias, reforçando mais uma vez a importância desta estrutura na adesão, tanto nas células epiteliais intestinais quanto na parede da levedura.

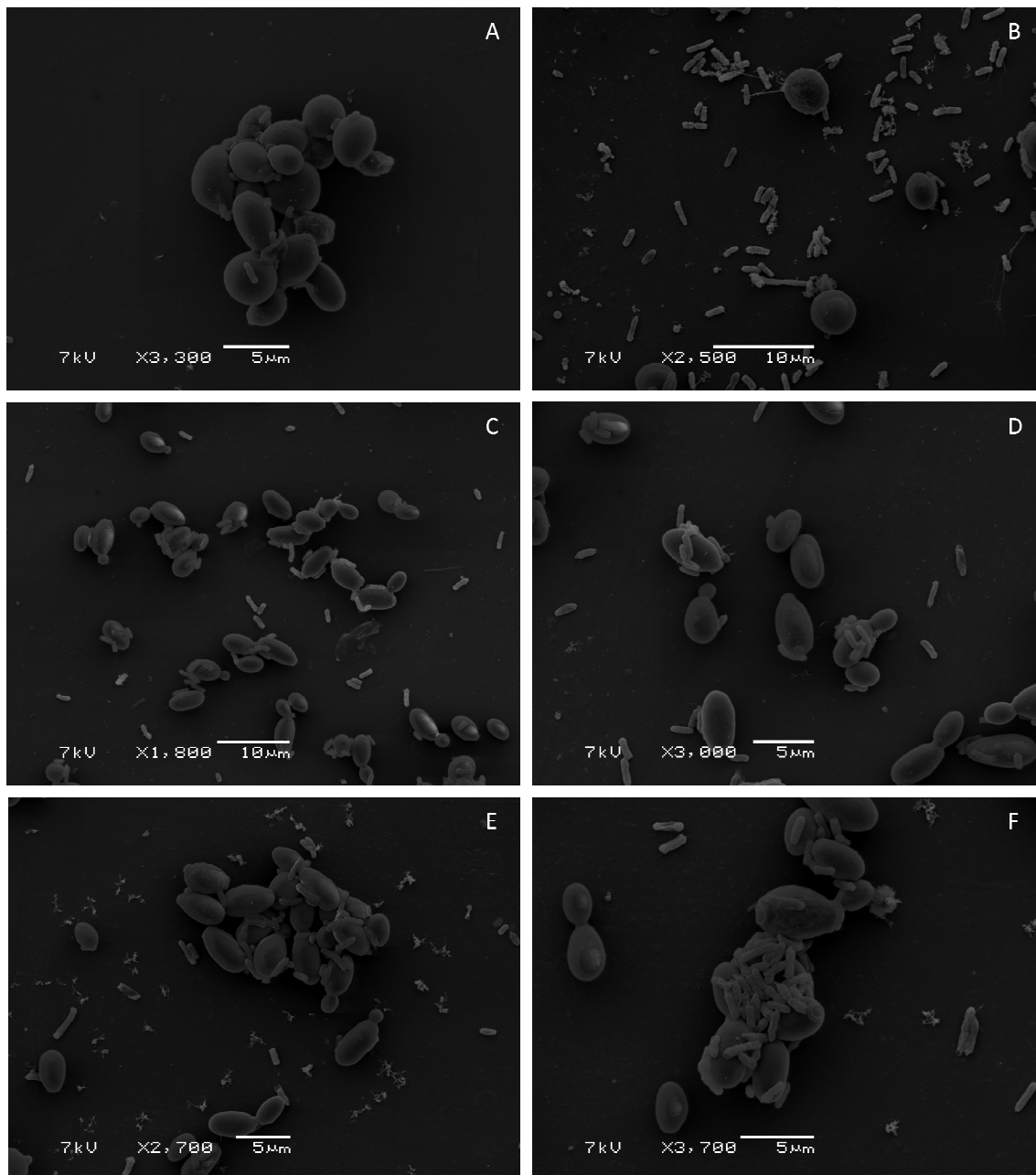
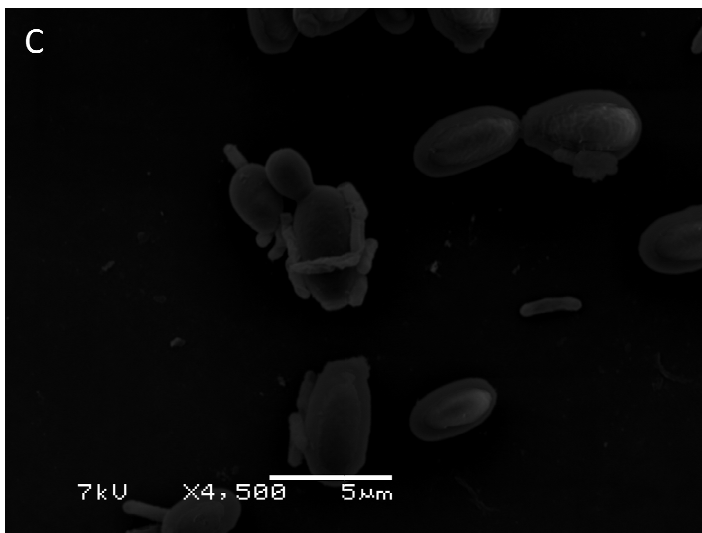
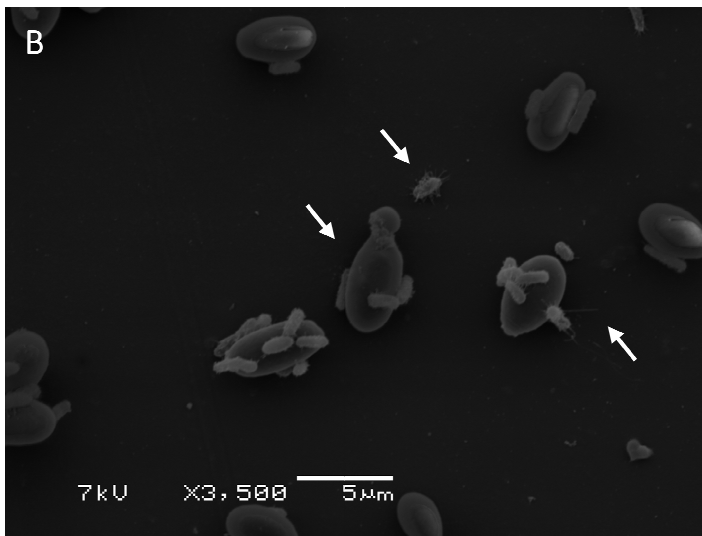
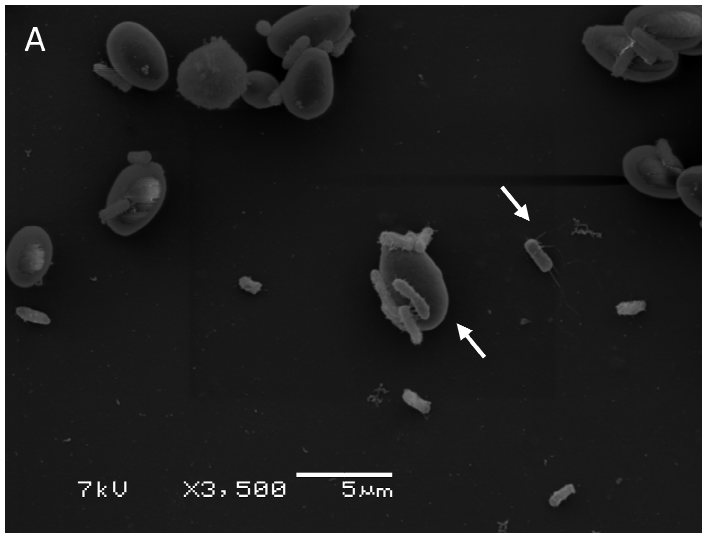


Figura 5 – (A) *S. boulardii* associada a *S. Typhimurium* ATCC 14028. (B) *S. cerevisiae* W 303 associada a *S. Typhimurium* ATCC 14028. (C, D, E e F) *S. cerevisiae* UFMG A-905 associada a *S. Typhimurium* ATCC 14028.



· (A e B) *S.*
 UFMG A-905
 3. Typhimurium
 3. A seta branca
 e ligação da
 bactéria aderida
 levedura. (C) *S.*
 UFMG A-905
 3. *coli*.

V.7 Adesão *in vivo* visualizada por MEV

Trabalho realizado por MARTINS *et al.* (2010a) com células T84, infectadas com *S. Typhimurium* na presença ou não de *S. boulardii*, mostrou sob MEV que a levedura atraía para a sua superfície a bactéria quando ambos micro-organismos se encontravam na monocamada celular. Como descrito acima, o presente estudo confirmou *in vitro* (suspensão) este fenômeno para *S. boulardii*, e também para *S. cerevisiae* UFMG A-905. Experimentos realizados demonstraram que esta ligação específica das salmonelas com as leveduras ocorrem *in vivo* também. Podemos observar que no trato digestivo de camundongos gnotoxênicos, assim como na cultura de células T84 e *in vitro*, as leveduras também foram capazes de aderir à bactéria patogênica quando no epitélio intestinal, e isto vale tanto para *S. boulardii* quanto para *S. cerevisiae* UFMG A-905 (Figuras 7 e 8). Interessantemente, observamos que as salmonelas tendem a se co-agregarem em regiões onde se encontram as leveduras, formando glómeros de micro-organismos, o que pode ser visto claramente nas fotomicrografias (Figuras 7E, 7F, 8B e 8C). As bactérias possuem a capacidade de se agregarem em microcolônias, no entanto, no grupo controle, este fenômeno foi bem menos evidenciado em relação aos grupos com levedura, uma vez que observamos as bactérias mais disribuidas no tecido intestinal (Figuras 7A, 7B, 7C, 7D).

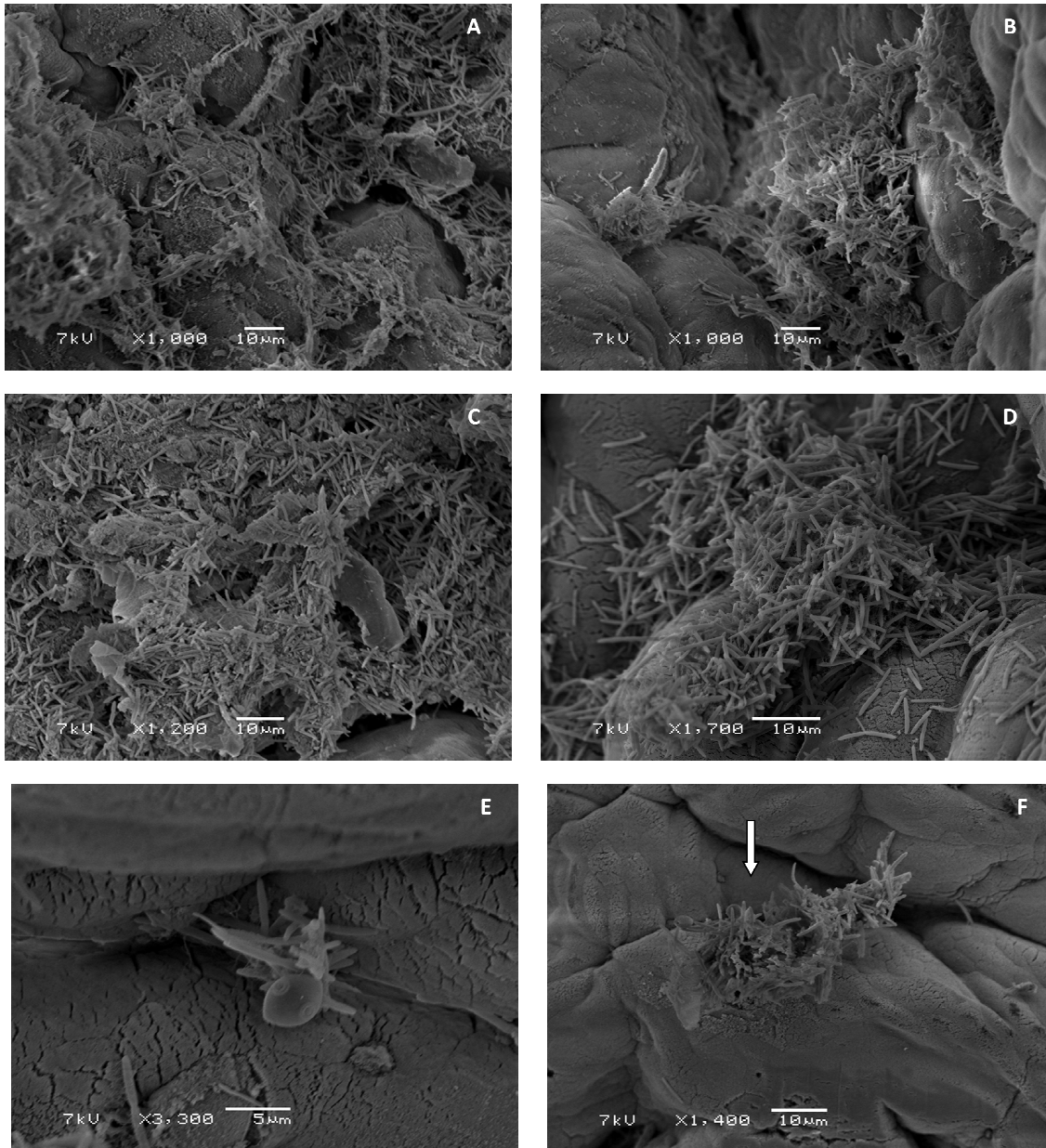


Figura 7 – (A, B, C, D) *S. Typhimurium* ATCC 14028 aderidas no epitelial do ceco de animais NIH gnotobióticos (grupo controle). (E, F) - *S. boulardii* associada a *S. Typhimurium* ATCC 14028. Podemos observar a aderência da bactéria nas leveduras e a formação de aglomerados (seta branca).

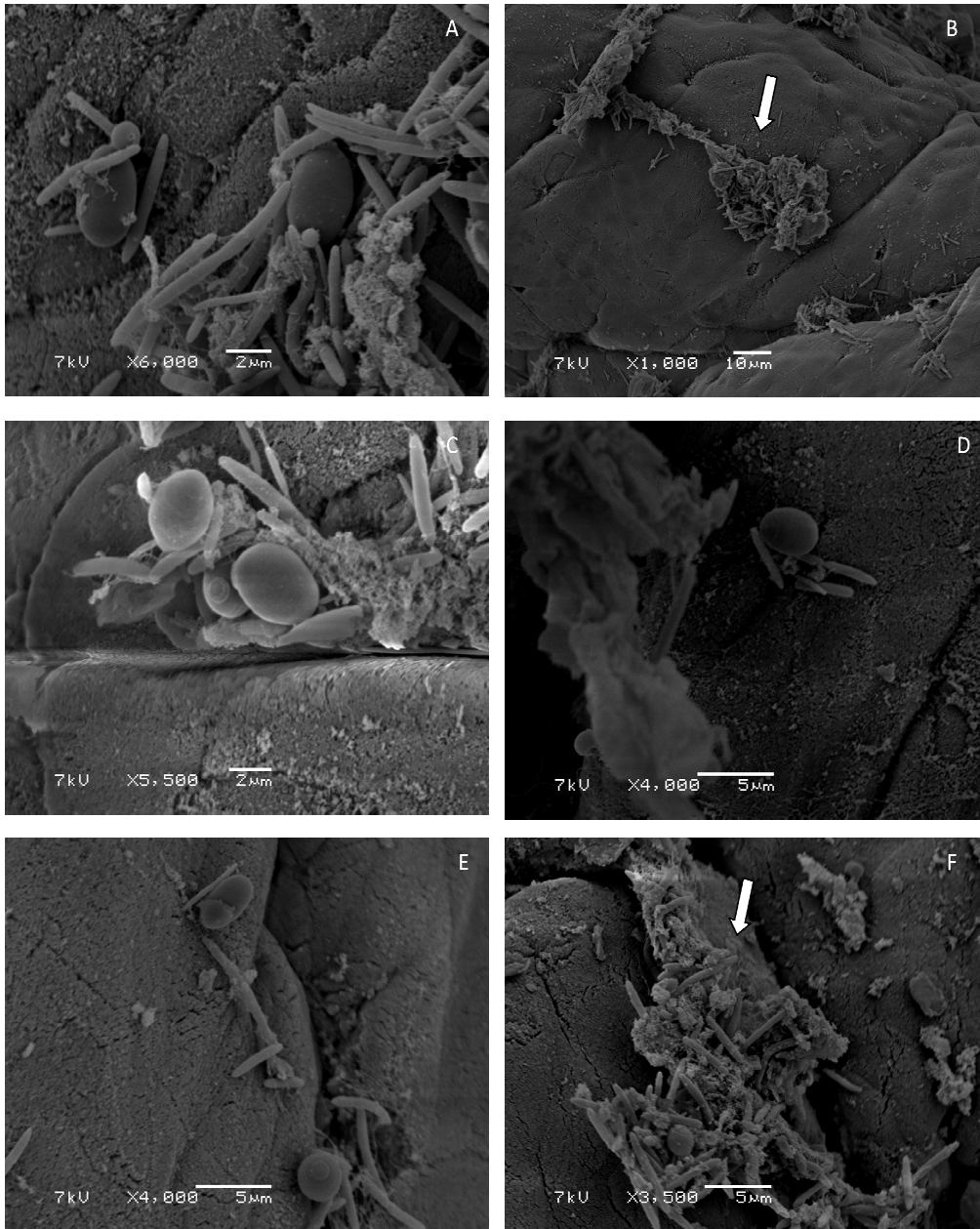


Figura 8 – (A, B) *S. boulardii* associada a *S. Typhimurium* ATCC 14028. (C, D, E, F) – *S. cerevisiae* UFMG A-905 associada a *S. Typhimurium* ATCC 14028. Pode ser observado em todos os casos a adesão das bactérias nas leveduras. Estruturas de co-agregação (glomeros) estão indicados pelas setas brancas.

V.8 Experimentação de quimiotaxia

Grande maioria das bactérias é móvel durante pelo menos uma parte do seu ciclo de vida. A locomoção confere uma vantagem de sobrevivência as bactérias, permitindo as permitindo as se locomoverem para ambiente mais favorável, ou se afastar dos desfavoráveis. A movimentação dos microrganismos está intimamente ligado à quimiotaxia, a capacidade de se orientar ao longo de gradientes químicos. No caso das bactérias patogênicas intestinais, a combinação de mobilidade e quimiotaxia permite às bactérias detectarem e buscarem nutrientes, além de nichos adequados à sua sobrevivência (PONTIER-BRES *et al.*, 2012). ADLER, em 1972, já relatava que os micro-organismos móveis podem ser atraídos ou repelidos por algumas substâncias químicas ou mesmo outros micro-organismos. Logo queríamos observar se as leveduras *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG A-905 funcionariam como quimioatraentes para a *S. Typhimurium* ATCC 14028.

Os resultados obtidos demonstram que a contagem de *S. Typhimurium* ATCC 14028 dentro dos capilares imerso com as leveduras *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG A-905 apresentaram diferença estatisticamente significativa ($P = 0,005$ e $P = 0,034$, respectivamente, pelo teste t de Student) quando comparadas com o grupo controle (capilares imersos no meio YPG) (Tabela 12). Logo podemos concluir que a bactéria se moveu em direção às leveduras, sendo então, as leveduras quimioatraentes para as células bacterianas. Com a finalidade de mostrar que a movimentação da *S. Typhimurium* não ocorreu simplesmente por movimentação aleatória, nós refizemos os experimentos utilizando uma bactéria também móvel *Pseudomonas aeruginosa* 25853. Observamos que não houve quimiotaxia da *P. aeruginosa* em direção às leveduras, visto que a contagem dos patógenos dentro do capilar não foi estatisticamente significativo quando comparado com o grupo controle. PONTIER-BRES *et al.* (2012) observaram que a *S. Typhimurium* na presença de *S. boulardii* modifica sua trajetória. Quando as células T84 foram infectadas com *S. Typhimurium*, estas bactérias apresentavam movimentos lineares. Já quando a *S. Typhimurium* era associada com *S. boulardii* sua trajetória se modificava para movimentos rotacionais, seguido pela diminuição na invasão das células T84 (PONTIER-BRES *et al.*, 2012).

Escherichia coli e *S. Typhimurium* apresentam proteínas quimotáticas aceptores de metil, proteínas essas transmembrana envolvidas na percepção e resposta ao quimioatrante. Essas proteínas transmembrana incluem receptores de serina (tsr),

aspartato e maltose (tar) e ribose e galactose (trg) (HELMAN & CHAMBERLIN, 1987).

Tabela 12. Presença ou ausência do fenômeno de quimiotaxia da *S. Typhimurium* ATCC 14028 e *P.aeruginosa* na presença das levedua *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905.

Associações	Tempo (minutos)	
	Contagem dos patógenos*	P
Meio de cultura YPG + <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	6,84	
<i>Sacharomyces boulardii</i> + <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	7,70	0,005
<i>S. boulardii</i> + <i>P. aeruginosa</i>	6,38	0,221
<i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905 + <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	7,37	0,034
<i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905 + <i>P. aeruginosa</i>	7,05	0,689

*Média dos valores para os tempos 0, 15, 30, 60 e 120 min. Em negrito grupos que apresentaram diferença significativa quando foram comparados com o grupo controle. Para detalhes, ver Anexo 9.

V.9 Avaliação da capacidade de ligação dos patógenos à parede celular da *S. cerevisiae* BY4741

A habilidade da levedura BY4741 de se aglutinar em bactérias patogênicas também foi testada de acordo com PEREZ-SOLETO (2005). Primeiramente foi realizado o experimento de aglutinação, conforme descrito no item **IV. 3** sendo observada a formação de glómeros, indicando a adesão dos patógenos testados na parede da levedura (Tabela 13). Para a confirmação do dado observado anteriormente foi realizado o experimento de sedimentação, conforme descrito no item **IV. 5**. Foi observada ocorrência de sedimentação acelerada para patógenos testados (*S. Typhi*, *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Typhimurium* origem humana e *E. coli* ATCC 25723), indicando a adesão à parede celular da levedura *S. cerevisiae* BY4741 (Tabela 14). Posteriormente foram analisadas as leveduras mutantes quanto à capacidade de formarem aglomerados, quanto associadas a bactérias patogênicas. Para isto foi realizado o experimento de aglutinação. Foi observado que dentre as 46 leveduras mutantes de parede testadas apenas cinco não foram capazes de se aglutinarem aos quatro patógenos testados: YJL158C, YKL096W-A, YMR306W, YKL163W e YGR279C (Tabela 15). Todos esses genes estão relacionados com a estabilidade da parede celular, sendo os dois primeiros sintetizam estruturas de manose na parede. A Figura 9 mostra o fenômeno de adesão em MEV entre a levedura *S. cerevisiae* BY4741 e *S. Typhimurium*. A Figura 10 mostra o fenômeno de adesão de uma levedura representante das leveduras mutantes que não perderam a capacidade de adesão (Fig10 A e B - *S. cerevisiae* YGL032C) e um representante das leveduras que perderam essa capacidade (Fig 10c - *S. cerevisiae* YGR 279C). Logo levantamos a hipótese de que os genes CIS3, CWP1, FKS3, PIR3 e SCW4 seriam essenciais na parede da levedura para que ocorre de forma efetiva a adesão das enterobactérias.

Tabela 13. Ensaio de adesão entre a levedura *S. cerevisiae* BY4741 e enteropatógenos.

Micro-organismos	<i>S. Typhi</i>	<i>S. Typhimurium</i> (origem humana)	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	<i>E. coli</i> ATCC 25723
<i>S. cerevisiae</i> BY4741	+	++	++	++

++ presença de aglutinação até 15 min
+ presença de aglutinação até 3 h

Tabela 14. Ensaio de sedimentação com a levedura *S. cerevisiae* BY4741. Os resultados são expressos em log₁₀ UFC/mL

Associações	Contagem dos patógenos*	P
S. Typhimurium ATCC 14028	6,19	
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 / <i>S.cerevisiae</i> BY 4741 viva	5,61	P < 0,001
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 / <i>S.cerevisiae</i> BY4741 morta	5,67	P < 0,001
S. Typhimurium origem humana	6,26	
<i>S. Typhimurium</i> origem humana / <i>S.cerevisiae</i> BY4741 viva	5,72	P < 0,001
<i>S. Typhimurium</i> origem humana / <i>S.cerevisiae</i> BY4741 morta	5,45	P < 0,001
S. Typhi	5,58	
<i>S. Typhi</i> / <i>S.cerevisiae</i> BY4741 viva	4,92	P < 0,05
<i>S. Typhi</i> / <i>S.cerevisiae</i> BY4741 morta	4,77	P < 0,01
<i>E. coli</i>	6,21	
<i>E. coli</i> ATCC 25723 / <i>S.cerevisiae</i> BY 4741 viva	5,12	P < 0,001
<i>E. coli</i> ATCC 25723 / <i>S.cerevisiae</i> BY 4741 morta	5,27	P < 0,001

*Media dos valores para os tempos 0, 15, 30, 60 e 120 min. Para detalhes, ver Anexo 10. Em negrito estão os grupos controles.

Tabela 15. Teste de adesão das leveduras mutantes de parede celular para *S.cerevisiae* BY4741.

Número de acesso	Nome sistemático	<i>E. coli</i> ATCC 4238	<i>S. Typhimurium</i> m ATCC 14028	<i>S. Typhimurium</i> O.H.	<i>S. Typhi</i>
Y04400	YGL032C	++	+	-	-
Y05934	YGR282C	++	++	++	-
Y07107	YLR110C	++	++	++	+
Y01837	YOR061W	+	++	++	-
Y01267	YJL158C	-	-	-	-
Y04819	YGR189C	++	++	+	-
Y04162	YLR213C	+	+	-	-
Y04395	YGL027C	+	+	++	-
Y04945	YKL096 W	+	+	+	+
Y07026	YKL096W-A	-	-	-	-
Y04895	YKL046C	++	++	++	+
Y00824	YMR238W	++	++	++	-
Y02836	YHR143W	-	+	+	+
Y05210	YLR300W	++	++	-	++
Y03620	YDR261C	++	++	++	-
Y07200	YCR089W	++	++	-	++
Y04368	YDR534C	+	+	+	-
Y01679	YOR382W	+	+	++	+
Y06450	YMR306W	-	-	-	-
Y06870	YAR050W	++	+	+	+
Y06107	YER109C	-	+	+	-
Y07106	YKR102W	++	++	++	-
Y06979	YGR032W	++	++	++	++
Y04256	YDR420W	++	++	++	++
Y03746	YDL049C	+	+	-	-
Y05574	YPR159W	+	+	+	+
Y02355	YOR099W	+	+	-	-
Y01361	YJL062W	+	+	+	+
Y04624	YGL257C	+	+	-	+
Y05013	YKL163W	-	-	-	-
Y03991	YDR055W	++	++	++	+

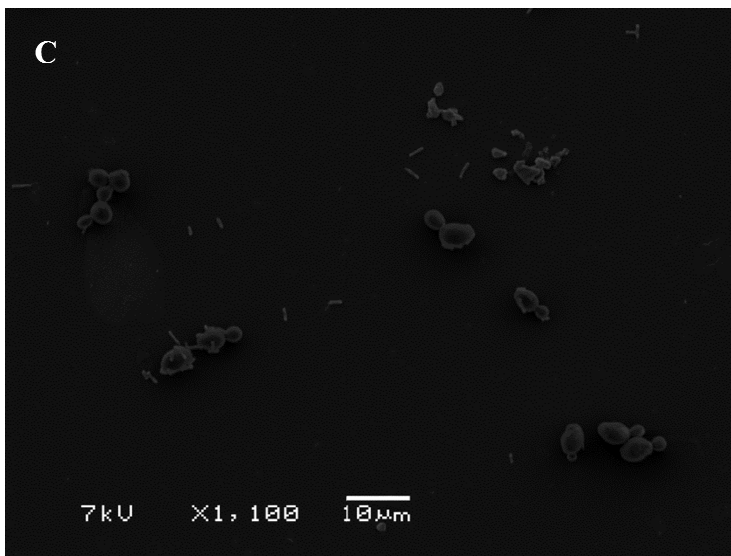
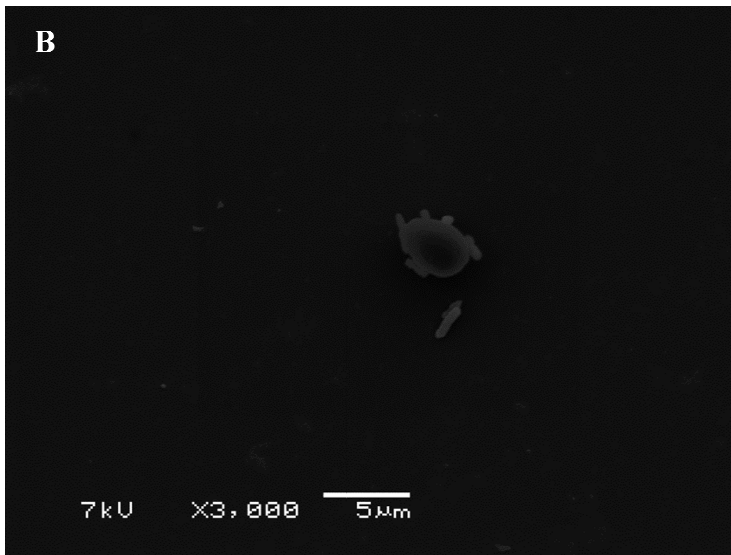
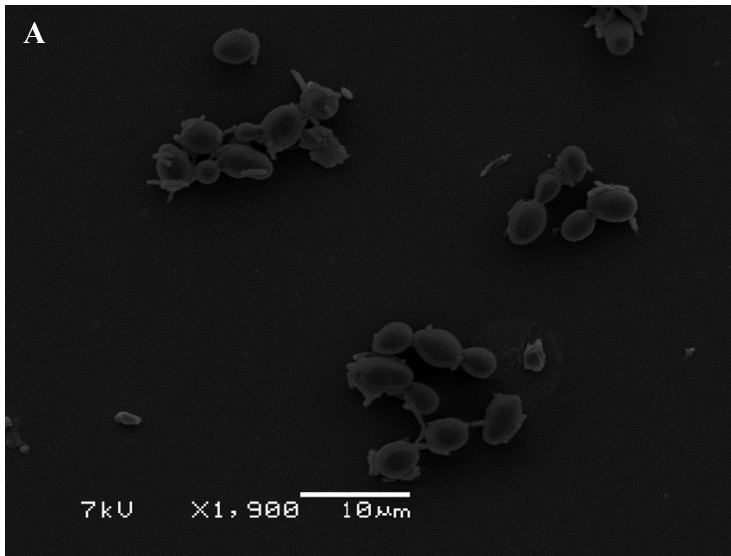
Continuação da Tabela 15

Número de acesso	Nome Sistemático	<i>E. coli</i> ATCC 4238	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	<i>S. Typhimurium</i> origem humana	<i>S.</i> Typhi
Y03369	YBR229C	++	++	++	-
Y05931	YGR279C	-	-	-	-
Y00894	YMR305C	++	++	++	+
Y04396	YGL028C	++	++	++	++
Y04595	YGL228W	++	++	++	-
Y04773	YGR143W	-	+	+	-
Y05473	YPR054W	++	++	++	-
Y06147	YER150W	++	++	++	++
Y02446	YOR190W	-	++	++	-
Y02503	YOR247W	++	++	++	-
Y07214	YNL066W	+	++	+	-
Y00281	YEL040W	++	++	++	-
Y02731	YLR120C	+	++	++	++
Y02732	YLR121C	++	++	++	-

- ausência de aglutinação após 3 h

+ presença de aglutinação após 45 min

++ presença de aglutinação até 15 min



9 – Nas figuras
: C ilustram a
entre a levedura
isiae BY4741 e
imurium ATCC

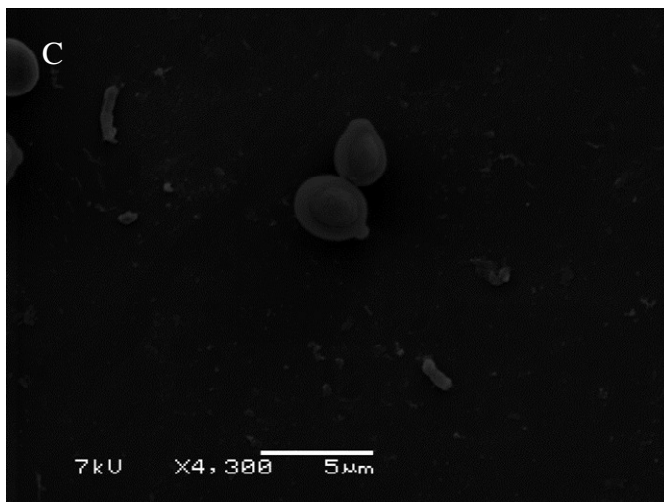
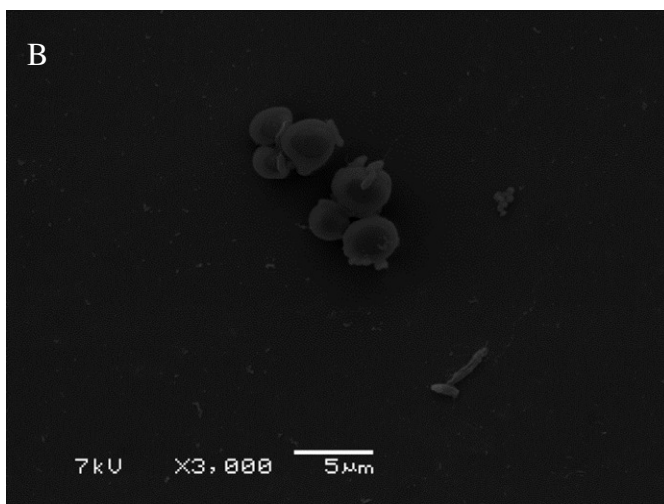
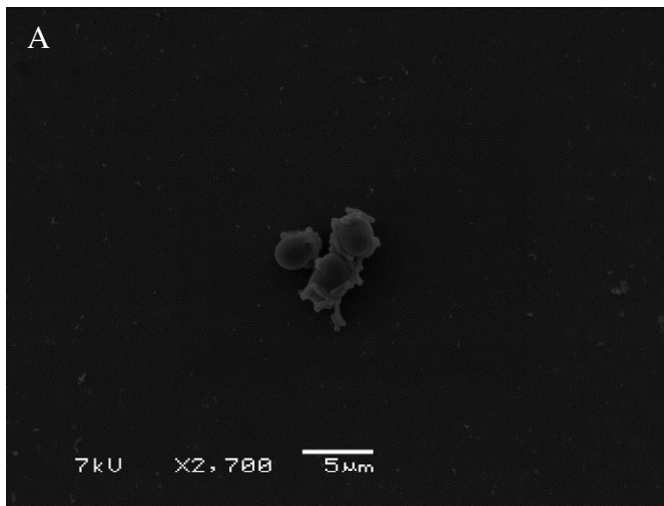


Figura 10 – (A, B) Fenômeno de adesão entre *S. cerevisiae* mutante YGL032C e *S. Typhimurium* ATCC 14028. (C) Ausência de adesão entre *S. cerevisiae* mutante YGR 279C e *S. Typhimurium* ATCC 14028 levedura.

V.10 Ensaio de sedimentação dos patógenos com os mutantes BY4741 negativos para adesão

Para confirmarmos a importância dos genes CIS3, CWP1, FKS3, PIR3 e SCW4 no processo de adesão, realizamos o experimento de sedimentação, conforme descritos no item IV.5, utilizando as cinco leveduras mutantes que não foram capazes de se aglutinarem aos patógenos testados (tabela 15). Os dados da tabela 16 demonstram que não houve diferença estatística significativa entre os grupos experimentais e controle, corroborando com os dados obtidos na tabela 15, ou seja, os componentes expressados pelos genes: CIS3 (YJL158C), CWP1 (YKL096W-A), FKS3 (YMR306W), PIR3 (YKL163W) e SCW4 (YGR279C) são fundamentais para a ocorrência do fenômeno de adesão. São genes importantes na constituição, morfologia da parede celular, sendo o CIS3 responsável por sintetizar resíduos de manose que constituem a glicoproteína da parede celular, sendo que na sua ausência a resistência a pH ácido diminui. O gene CWP1 sintetiza uma manoproteína da parede celular presente nas cicatrizes deixadas pela liberação das células filhas. Mutantes deste gene apresentam a morfologia da parede anormal e também diminuição da resistência a pH ácido. O gene PIR3 sintetiza uma proteína glicosilada ligada covalentemente a proteínas da parede celular necessária à sua estabilidade. Na ausência deste gene, a levedura além de apresentar uma desestruturação da parede, também apresenta uma diminuição na sua capacidade de competição. O gene SCW4 sintetiza uma proteína solúvel da parede celular e sua deleção acarreta diminuição da viabilidade da célula. E, por último, o gene FKS3 sintetiza proteínas que estão intimamente relacionadas com a montagem da parede nos esporos, sendo que sua ausência gera formação anormal da parede esporica e, conseqüentemente, uma diminuição na sua termotolerância. Como podemos observar todos esses genes estão diretamente relacionados com a estrutura da parede celular, sendo dois destes responsáveis por estruturas de manose na parede (CIS3 e CWP1).

HIRAYAMA *et al.* (2012) observaram que a ausência do gene MNN2 impossibilitou o fenômeno de co-agregação entre *S. cerevisiae* e *Lactobacillus plantarum* ML 11-11, e concluíram que estruturas da parede constituídas de resíduos de manose são importantes para essa co-agregação, uma vez que a proteína de superfície do *L. plantarum* ML 11-11 reconhece resíduos de manose da parede celular da levedura. Estes achados estão de acordo com os nossos dados uma vez que observamos que não só a morfologia da parede é importante, dando resistência a condições de estresse, como

também a presença de manose é necessária para que ocorra adesão. KATAKURA *et al.* (2010) também relataram co-agregação entre *Lactococcus lactis* e *S. cerevisiae*, que ocorreria pela proteína DnaK em bactérias lácticas e por polissacarídeos de manose em células de levedura. No entanto, não se sabe ainda como a estrutura de manose e os genes essenciais de leveduras estão envolvidos na co-agregação.

Tabela 16. Contagem de patógenos do grupo controle e do grupo associado com as leveduras mutantes BY4741 negativas no teste de aglutinação. Os resultados estão expressos em Log₁₀.

Associações	Contagem dos patógenos*	P	Associações	Contagem dos patógenos*	P
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028	7,73		<i>S. Typhi</i>	8,29	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YKL096W	7,92	0,363	<i>S. typhi</i> associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YKL096W	7,73	0,274
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YJL158C	8,32	0,151	<i>S. typhi</i> associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YJL158C	8,20	0,818
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YKL163W	6,98	0,095	<i>S. typhi</i> associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YKL163W	8,41	0,785
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YGR279C	6,91	0,095	<i>S. typhi</i> associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YGR279C	7,89	0,325
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YMR306W	7,41	0,171	<i>S. typhi</i> associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YMR306W	7,60	0,112
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana	7,36		<i>E. coli</i> ATCC 25723	7,19	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YKL096W	7,09	0,203	<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S.cerevisiae</i> mutante YKL096W	7,28	0,306
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YJL158C	7,15	0,236	<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S.cerevisiae</i> mutante YJL158C	6,56	0,098
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YKL163W	6,89	0,095	<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S.cerevisiae</i> mutante YKL163W	7,04	0,583
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YGR279C	7,55	0,294	<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S.cerevisiae</i> mutante YGR279C	7,31	0,540
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YMR306W	7,34	0,897	<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S.cerevisiae</i> mutante YMR306W	7,48	0,067

*Media dos valores para os tempos 0, 15, 30, 60 e 120 min. Em negrito os grupos controles Para detalhes, ver Anexo 11.

V.11 Ensaio de sedimentação com micro-organismos da microbiota indígena

O objetivo do experimento foi observar a possibilidade de adesão das leveduras entre os micro-organismos representantes da microbiota gastrointestinal indígena, vários deles sendo também probióticos estudados ou já comercializados.

Com a exceção da associação de *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 com *S. cerevisiae* UFMG 905, nenhuma outra apresentou diferença estatística significativa entre as contagens do grupo controle e experimentais (tabela 17), seja a levedura aderente ou não nos testes anteriores. Isto pode ser a consequência de características intrínsecas como ausência de mobilidade, não expressão de fímbrias ou outras diferenças estruturais. GROZDANOV *et al.* (2004) observou que a *E. coli* Nissle 1917 apresenta um padrão específico de fatores de colonização, mas não apresentam fatores de virulência que possam contribuir para a sua invasão e sobrevivência no corpo do hospedeiro, conferindo o efeito probiótico desta linhagem no sítio intestinal. A *E. coli* Nissle 1917 não é capaz de se aderir às células intestinais e, como observado em nossos experimentos, também não foi capaz de se aderir as células leveduriformes (GROZDANOV *et al.*, 2004).

Bifidobactérias são bactérias Gram-positivo, imóveis, anaeróbicas estritas que pertencem à microbiota normal humana dominante. Assim como *E. coli* Nissle 1917, a capacidade de adesão, atividades metabólicas e capacidade de sobreviver no colón de *B. longum* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* dependem de uma variedade de características fisiológicas dos diferentes sorotipos (MARTINS *et al.*, 2010b). Um dos principais mecanismos de algumas linhagens de *Bifidobacterium* se aderirem às células intestinais são pelas lipoproteínas (GUGLIELMETTI *et al.*, 2008). GUGLIELMETTI *et al.* (2009) observaram que a *B. bifidum* M1MBb75 possui um forte fenótipo adesivo, sugerindo que além da presença de lipoproteínas na parede, chamadas BopA, também apresentam adesinas adicionais na superfície celular, dando uma ótima habilidade de se aderirem às células epiteliais (GUGLIELMETTI *et al.*, 2009). No entanto, esses mecanismos de adesão parecem ser específico para bactéria-célula epitelial intestinal do hospedeiro, uma vez que não observamos o fenômeno de adesão entre a *B. longum* e as leveduras testadas (Tabela 17).

HIRAYAMA *et al.* (2012) relatou a co-agregação entre *L. plantarum* ML 11-11, *L. lactis* e *S. cerevisiae*, e esta ligação estaria sendo mediada pelas manoses presentes na célula da *S. cerevisiae* e proteínas na superfície dos lactobacilos. Bactérias lácticas

possuem vários determinantes de superfície que estão envolvidos na interação com as células epiteliais, sendo que seu processo de adesão inclui força passiva, interações eletrostáticas, hidrofóbicas e estruturas específicas, como apêndices de lectina (SERVIN & COCONNIER, 2003). Não observamos a capacidade de adesão entre *L. delbrueckii* H2b20 às leveduras. Provavelmente o *L. delbrueckii* H2b20 teria a capacidade de se co-agregarem, mas não seria de forma significativa, uma vez que não houve diferença estatística significativa no teste de sedimentação.

Tabela 17. Contagem de bactérias representantes da microbiota quando associadas com *S. boulardii*, *S. cerevisiae* UFMG 905, *S. cerevisiae* BY4741, uma *S. cerevisiae* mutante de BY4741 positiva no teste de adesão (YGL032C) e uma *S. cerevisiae* mutante de BY4741 negativa no teste de adesão (YMR306W). Os resultados estão expressos em log₁₀ UFC/mL.

ASSOCIAÇÕES	CONTAGEM*	P	ASSOCIAÇÕES	CONTAGEM*	P
<i>E.coli</i> Nissle 1917	6,51		<i>Bifidobacterium longum</i>	6,78	
<i>E.coli</i> Nissle associada a <i>S. boulardii</i>	6,74	0,2820	<i>Bifidobacterium longum</i> associada a <i>S. boulardii</i>	6,77	0,961
<i>E.coli</i> Nissle associada a <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905	6,26	0,4610	<i>Bifidobacterium longum</i> associada a <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905	7,36	0,280
<i>E.coli</i> Nissle associada a <i>S. cerevisiae</i> BY 4741	6,94	0,0940	<i>Bifidobacterium longum</i> associada a <i>S. cerevisiae</i> BY 4741	7,25	0,187
<i>E.coli</i> Nissle associada a <i>S. cerevisiae</i> BY 4741 controle positivo	7,12	0,0240	<i>Bifidobacterium longum</i> associada a <i>S. cerevisiae</i> BY 4741 controle positivo	6,67	0,868
<i>E.coli</i> Nissle associada a <i>S. cerevisiae</i> BY 4741 controle negativo	6,77	0,4220	<i>Bifidobacterium longum</i> associada a <i>S. cerevisiae</i> BY 4741 controle negativo	7,13	0,267
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	7,28		<i>Lactobacillus delbrueckii</i> H2b20	6,73	
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285 associada a <i>S. boulardii</i>	7,19	0,4530	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> H2b20 associada a <i>S. boulardii</i>	7,08	0,346
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285 associada a <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905	6,65	0,002	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> H2b20 associada a <i>S. cerevisiae</i> UFMG 905	6,91	0,582
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285 associada a <i>S. cerevisiae</i> BY 4741	7,06	0,199	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> H2b20 associada a <i>S. cerevisiae</i> BY 4741	7,23	0,301
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285 associada a <i>S. cerevisiae</i> BY 4741 controle positivo	7,35	0,619	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> H2b20 associada a <i>S. cerevisiae</i> BY 4741 controle positivo	6,70	0,9450
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285 associada a <i>S. cerevisiae</i> BY 4741 controle negativo	7,11	0,4080	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> H2b20 associada a <i>S. cerevisiae</i> BY 4741 controle negativo	6,86	0,6990

*Média dos valores para os tempos 0, 15, 30, 60 e 120 min. Para detalhes ver anexo 12. Em negrito os grupos controle.

V.12 Extração e amplificação por PCR do DNA da levedura *S. cerevisiae* BY4741

Tendo em mão o resultado dos genes cruciais para a ocorrência do fenômeno de adesão entre levedura e bactérias patogênicas, o próximo passo foi à realização da extração do DNA cromossômico e posterior amplificação destes cinco genes de parede (CIS3, CWP1, FKS3, PIR3 e SCW4) para a realização de futuras clonagens destes genes em seus respectivos mutantes (YJL158C, YKL096W-A, YMR306W, YKL163W e YGR279C) com o objetivo de verificar se estas leveduras recuperariam a capacidade de adesão. A extração foi realizada de acordo como o item **IV. 12** e em seguida realizada a amplificação com iniciadores específicos desenhados especificamente para cada gene (Tabela 17).

Para observar se houve uma correta amplificação dos genes de interesse foi feita uma eletroforese em gel de agarose (Fig. 11) e quantificação do DNA. Os genes foram armazenados para estudos futuros.

Tabela 18. Iniciadores específicos dos mutantes

	Iniciador	Sequência
YKL163W	PIR 3 (Forward)	<u>CCCAAGCTT</u> ATGCAATATAAAAAGCCATTAGTCG
	PIR 3 (Reverse)	<u>GCTCTAGA</u> - TCAACAGTCAATTAAATCTATAGCT
YGR279C	SCW4 (Forward)	CG <u>GAATTC</u> -ATGCGTCTCTCTAACCTAATTG
	SCW4 (Reverse)	<u>GCTCTAGA</u> - TTATTCATTGGATAGAATACCCC
YKL096W-A	CWP2 (Forward)	<u>CCCAAGCTT</u> - ATGCAATTCTCTACTGTGCGCTTC
	CWP2 (Reverse)	<u>GGAATTC</u> - TTATAACAACATAGCAGCAGCAGC
YJL158C	CIS3 (Forward)	<u>CCCAAGCTT</u> - ATGCAATTCAAAAACGTCGCCC
	CIS3 (Reverse)	<u>GCTCTAGA</u> - TTAACAGTCGACCAAAGAAACAG
YMR306W	FKS3 (Forward)	<u>CCCAAGCTT</u> -ATGGATTTTATGAGTCCCAAGT
	FKS3 (Reverse)	<u>GCTCTAGA</u> -CTATGCGACAGTCCTAAAGGT

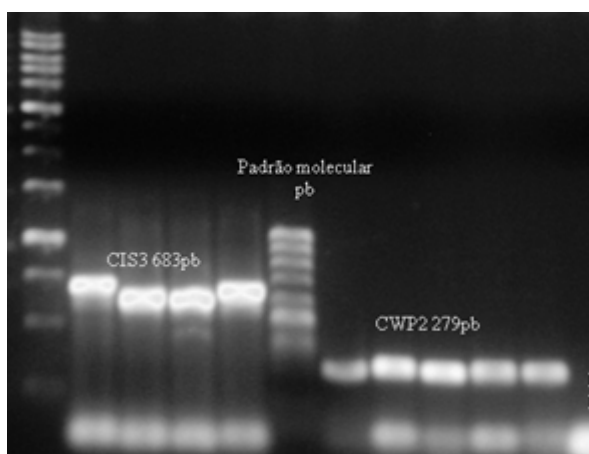
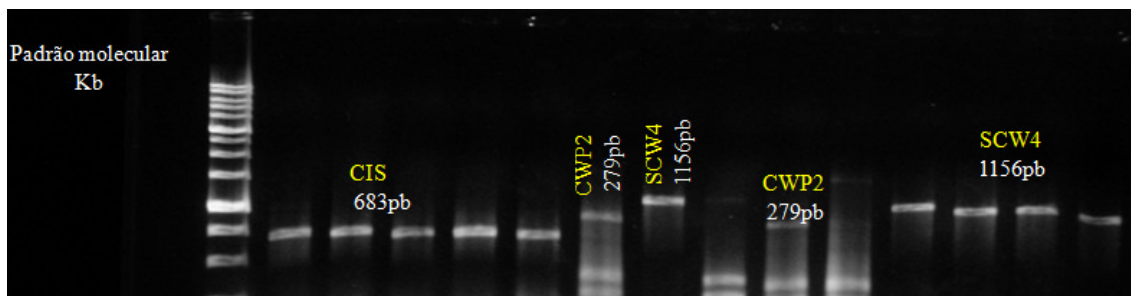


Figura 11. Gel de agarose dos produtos de PCR dos genes da Tabela 14.

VI. RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho podem ser resumidos como se segue:

- As leveduras *S. cerevisiae* UFMG A-905, *S. boulardii* e *S. cerevisiae* BY4741 *mating a* apresentaram uma capacidade de fixar na sua superfície celular *S. Typhimurium* e *E. coli*, e em menor intensidade *S. Typhi*, como demonstrado por testes de aglutinação em microscopia ótica, adesão, sedimentação e floculação. A levedura *S. cerevisiae* W303 não apresentou essa capacidade, o que permitiu seu uso como controle negativo.
- Alguns representantes da microbiota gastrointestinal humana (inclusive alguns usados como probióticos) não apresentaram a capacidade de aderir à parede celular das leveduras.
- A adesão descrita acima não depende da viabilidade das leveduras, mas é influenciada pela fase da cultura na qual as células de levedura foram recuperadas (log ou estacionária) e é inibida pela presença de manose, sais biliares, fosfato de cálcio e fosfato de potássio.
- O fenômeno de adesão entre as bactérias e leveduras foi confirmado e detalhado por visualização em microscopia eletrônica de varredura, mostrando ocorrer tanto *in vitro* quanto *in vivo* (trato digestivo de camundongos gnotoxênicos). Foi possível visualizar também o envolvimento de fímbrias no fenômeno de adesão.
- O encontro entre as leveduras e as bactérias patogênicas que aderem parece não ser aleatório, mas dependente de quimiotaxia.
- Dentro dos 46 mutantes de parede celular da linhagem parental *S. cerevisiae* BY4741 *mating a* que foram testados, cinco perderam a capacidade de adesão com as bactérias (YJL158C, YKL096W-A, YMR306W, YKL163W e YGR279C). Sendo os três últimos genes responsáveis pela estabilidade da parede e os dois primeiros responsáveis pela presença de resíduos de manose.
- O pH não influenciou o fenômeno de adesão entre as leveduras *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 e as bactérias patogênicas testadas, pelo menos na faixa testada.

- O fenômeno de adesão entre as bactérias e levedura BY4741 pode ser confirmado e visualizado em microscopia eletrônica de varredura, assim como a ausência de adesão entre *S. Typhimurium* ATCC 14028 e o mutante YGR279C, corroborando com os dados anteriormente observados.

Esses resultados permitem concluir que algumas bactérias enteropatogênicas podem ser fixadas na superfície de certas leveduras, sendo este um dos possíveis mecanismos que explicariam o efeito probiótico de linhagens como *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG A-905, interferindo na adesão desses patógenos a receptores epiteliais intestinais específicos e conseqüentemente a posterior infecção. No entanto este fenômeno de adesão pode ser prejudicado na presença de manose e de altas concentrações sais.

S. cerevisiae UFMG 905 apresenta boas características probióticas, uma vez que sua capacidade de adesão resiste a diversas condições de estresse presente no trato gastrointestinal.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, J. A method for measuring chemotaxis and use of the method to determine optimum conditions for chemotaxis by *Escherichia coli*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 74, p. 77-91, 1972.

ADLERBERTH, I.; AHRNÉ, S.; JOHANSSON, M.; MOLIN, G.; HANSONI, L.A.; WOLD, A. E. A manose-specific adherence mechanism in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to the human colonic cell HT-29. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 2244-2251, 1996.

AMBROSINI, V.I.M., GONZALES, S.N.; OLIVER, G. Study of adhesion of *Lactobacillus casei* CRL 431 to ileal intestinal cells of mice. **J. Food Prot.**, v. 62, p. 1430-1434, 1999.

ARKOWITZ, R.A. Responding to attraction: chemiotaxis and chemotropism in *Dictyostelium* and yeast. **Trends Cell Biol.**, v. 9, p. 20-27, 1999.

ARMUZZI, A.; CREMONINI, F.; OJETTI, V.; BARTOLOZZI, F.; CANDUCCI, F.; CANDELLI, M.; SANTARELLI, L.; CAMMAROTA, G.; DE LORENZO, A.; POLA, P.; GASBARRINI, G. 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.

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.

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

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.

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.

BOIN, M.A.; AUSTIN, M.J.; HÄSE, C.C. Chemiotaxis in *Vibrio cholerae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 239, p. 1-8, 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.

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.

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

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.

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.

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.

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.

CEBRA, J.J. Influences of microbiota on intestinal immune system development. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 69, p. 1046s-1051s, 1999.

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.

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

CLEGG, S.; GERLACH, G.F. Enterobacterial fimbriae. **J. Bacteriol.**, p. 934-938, 1987.

CONWAY, P.L. and KJELLEBERG, S. Protein mediated adhesion of *Lactobacillus fermentum* strain 737 to mouse stomach squamous epithelium. **J. Gen. Microbiol.**, v. 135, p.1175–1186, 1989.

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.

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, 1989.

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.; RAMPAL, P. Effect of *Saccharomyces boulardii* on cAMP - and Ca²⁺ - dependent Cl⁻ secretion in T84 cells. **Dig. Dis. Sci.**, v. 44, p. 2359-2368, 1999.

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

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

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. *Saccharomyces boulardii* inhibits inflammatory bowel disease by trapping T cells in mesenteric lymph nodes. **Gastroenterol.**, v. 131, p. 1812-1825, 2006.

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.

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

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. 1301-1314, 1998.

FARTHING, M.J.G. Bugs and the gut: an unstable marriage. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 18, p. 233-239, 2004.

FAO/WHO. **Working Group. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**, London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002.

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., 1995.

FIETTO, J. L.R; ARAÚJO, R. S.; VALADÃO F. N.; FIETTO, L. G.; BRANDÃO, R. L. ; NEVES M. J.; GOMES, F. C.O.; 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.

FILHO-LIMA, J.V.M.; VIEIRA, E.C.; NICOLI, J.R. Antagonistic effect of *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* and *Escherichia coli* combinations against experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella enteridis* subsp. Typhimurium in gnotobiotic mice. **J. Appl. Microbiol.**, v. 88, p. 365-370, 2000.

FLORASTOR, 2006. Disponível em <http://www.florastor.com>. Acesso em 20 de maio de 2006.

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.

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

GARCÍA-HERNÁNDEZ Y.; RODRÍGUEZ Z.; BRANDÃO L. R.; ROSA C. A.; NICOLI J. R.; ELÍAS IGLESIAS A.; PERÉZ-SANCHEZ T.; SALABARRÍA R. B.; HALAIHEL N. Identification and in vitro screening of avian yeasts for use as probiótico. **Res Vet Sci.**, 2011.

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

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.

GENEROSO, S. V.; VIANA, M.; SANTOS, R.; MARTINS, F. S.; MACAHDO, J. A.N.; ARANTES, R. M. E.; NICOLI, J. R.; CORREIA, M. I. T. D.; CARDOSO, V. N. *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 protects against bacterial translocation, preserves gut barrier integrity and stimulates the immune system in a murine intestinal obstruction model. **Arch. Microbiol.**, n. 192, p. 477-484, 2010.

GIBSON, G.R. PROBERT, H.M.; VAN LOO, J. A.E.; RASTALL, R. A.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotic. **Nutr. Res. Rev.**, v. 17, p. 259-275, 2004.

GIETZ, R. D. & WOODS, R. A. Transformation of yeast by the LiAc/SS carrier DNA/PEG. **Method. Enzymol.**, v.350, p. 87-96, 2002.

GILL, H.S., GUARNER, F. Probiotics and human health: a clinical perspective. **Postgrad. Med. J.**, v. 80, p. 516-526, 2004.

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.

GOLOWCZYC, M., A.; MOBILI, P.; GARROTE, G. L.; SERRADELL M. A.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Interaction between *Lactobacillus kefir* and *Saccharomyces lipolytica* isolated from kefir grains: evidence for lectin-like activity of bacterial surface proteins. **J. Dairy Res.**, v. 76, p. 111-116, 2009.

GORBACH S.L.; GOLDIN B.R. The intestinal microflora and the colon cancer connection. **Rev. Infect. Dis.**, v. 12 (sup.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.

GROZDANOV, L.; RAASCH, C.; SCHULZE J.; SONNENBORN, U.; GOTTSCHALK, G.; HACKER, J.; DOBRINDT, U. Analysis of the Genome Structure of the Nonpathogenic Probiotic *Escherichia coli* Strain Nissle 1917. **J. of Bacteriol.**, v. 186, n.16, p. 5432–5441, 2004.

GUARNER, F.; MALAGELADA, JR. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v. 8, p. 512-519, 2003.

GUGLIELMETTI, S.; TAMAGNINI I.; MORA, D.; MINUZZO, M.; SCARAFONI, A.; ARIOLI, HELLMAN, J.; KARP, M.; PARINI, C. Implication of an outer surface lipoprotein in adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to Caco-2 cells. **Appl. Environ Microbiol.**, v. 74, p4695-4702, 2008.

GUGLIELMETTI, S.; TAMAGNINI I.; MINUZZO, M.; ARIOLI, S.; PARINI, E.C.; COMELI, E.; MORA, D. Study of the adhesion of *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 to human intestinal cell lines. **Curr. Microbiol.**, v. 59, p. 167-172, 2009.

GUO, B.; STYLES, C.A.; FENG, Q.; FINK, G.R. A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. **Proc. Natl. Acad. Sci, USA**, v. 97, p. 1-6, 2000.

GUSLANDI, M.; MEZZI, G.; SORGHI, 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.; 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.

GUSTAFSSON, B.E.; COATES, M.E. **The Germ-free Animal in Biomedical Research**. Laboratory animal LTD, London, p. 442, 1984.

HAZELBAUER, G.L.; FALKE, J.J.; PARKINSON, J.S. Bacterial chemoreceptors: high-performances signaling in networked arrays. **Trends Biochem. Sci.**, v. 33, p. 9-19, 2007.

HEINE, F.; STAHL, F.; STRAUBER H.; WIACEK, C.; BENNDORF, D.; REPENNING, C.; SCHMIDT, F.; SCHEPER, T.; BERGEN, M.; HARMS, H; MÜLLER, S. Prediction of flocculation ability of brewing yeast inoculates by flow cytometry, proteome analysis and mrna profiling. **Cytometry Part A**, vol 75A, p. 140-147, 2009.

HELMANN, J.D.; CHAMBERLIN, M.J. DNA sequence analysis suggests that expression of flagellar and chemotaxis genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is controlled by an alternative sigma factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 6422-6424, 1987.

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.; ÇECPOMTRE. 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.

HIRAYAMA, S.; FURUKAWA, S.; OGIHARA, H.; MORINAGA, Y. Yeast mannan structure necessary for co-aggregation with *Lactobacillus plantarum* ML 11-11. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, n. 419, p. 652-655, 2012.

HOLDMAN, L.V.; CATO, E.P.; MOORE, W.E.C. **Anaerobe Laboratory Manual**. The Virginia Polytechnic Institute and State. University Anaerobe Laboratory, 156p., 1977.

ISOLAURI, E.; SALMINEN S.; OUWEHAND, A.C. Probiotics. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v.18, p. 299-313, 2004.

KATAKURA, Y.; SANO, R.; HASHIMOTO, T.; NINOMIYA, K.; SHIOYTA, S. Acid bacteria display on the cell surface cytosolic protein that recognize yeast mannan. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, n 86, p. 319-326, 2010.

KELESIDIS, T.; POTHOUAKIS, C. Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. **Therap. Adv. Gastroenterol.**, n. 5, p. 111-125, 2012.

KENTHER, D.; SOURJIK, V. Spatial organization of the bacterial chemotaxis system. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 9, p. 619-624, 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.

KITAGAKI, H.; WU, H.; SHIMOI, H.; ITO, K. Two homologous genes, *DCWI* (*YKL046c*) and *DFG5*, are essential for cell growth and encode glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins required for cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Microb.**, v. 46, p. 1011-1022, 2002.

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.

KLEMM, P. Two regulatory *fim* gene, *fimB* and *fimE*, control the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. **EMBO J.**, v. 5, p. 1389-1393, 1986.

KLOTZ, S.A.; GAUR, N.K.; LAKE, D.F.; CHAN, V.; RAUCEO, J.; LIPKE, P.N. Degenerate peptide recognition by *Candida albicans* adhesins AIs5p and AIs1p. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 2029-2034, 2004.

KOGAN, G.; KOCHER A. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. **Livestock Sci.**, v. 109, p. 161-165, 2007.

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

LEBLANC, B.W.; ALBINA, J.E.; REICHNER, J.S. The effect of PGG- β -glucan on neutrophil chemotaxis *in vivo*. **J. Leuc. Biol.**, v. 79, p. 667-675, 2006.

LESAGE, G; BUSSEY, H. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 70, p. 317-343, 2006.

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.

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

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.

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.

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.

MANSOUR-GHANAELI, F.; DEHBASHI, N.; YAZDANPARAST, K. AND SHAFAGHI, A. 2003. Efficacy of *Saccharomyces boulardii* with antibiotics in acute amoebiasis. **World J. Gastroenterol.** v 9, p. 1832-1833, 2003.

MARTEAU, P.R.; VRESE, M.; SÉLLER, C.J., SCHREZNMEIR, J. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. **Clin. Nutr.**, v. 73, p. 430s-436s, 2001.

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*. **Rev. Bras. Med.**, v. 62, p. 151-155, 2005a.

MARTINS, F.S.; NARDI, R.M.D.; ARANTES, R.M.E.; ROSA, C.A.; NEVES, M.J.; 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, p. 83-92, 2005b.

MARTINS, F. S.; BARBOSA, F. H. F.; PENNA, F. J.; ROSA, C. A.; NARDI, R. M. D.; NEVES, M. J.; NICOLI, J. R. Estudos do potencial probiótico de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* através de testes *in vitro*. **Rev. Biol. Cienc. Ter.**, v. 5, n. 2, 2005c.

MARTINS, F.S.; RODRIGUES, A.C.P.; TIAGO, F.C.P.; PENNA, F.J.; ROSA, C.A.; ARANTE, R.M.E. ; NARDI, R.M.D.; PENNA, F.J.; 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. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, p. 352-359, 2007.

MARTINS, F.S. ; CASTRO, I.M. ; 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. **Braz. J. Microbiol.**, v. 39, p. 50-55, 2008.

MARTINS, F.S.; DALMASSO, G.; ARANTES, R. M. E.; DOYE, A.; LEMICHEZ, E.; LAGADEC, P.; IMBERT, V.; PEYRON, J.F.; RAMPAL, P.; NICOLI, J. R.; CZERUCKA, D. Interacion of *Saccharomyces boulardii* with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium protects mice and modifies T84 cell response to infection. **Plos One**, v. 5, p.1-12, 2010 a.

MARTINS, A.K.S.; MARTINS, F.S.; GOMES, D.A.; ELIAN, S. D. A.; VIEIRA, A. T.; TEIXEIRA, M.M.; CARA, D.C.; NARDI, R. M.D.; NICOLI, J.R. Evaluation of *in vitro* antagonism and of *in vivo* immune modulation and protection against pathogenic experimental challenge of two probiotic strains of *Bifidobacterium animalis* var. *lactis*. **Arch. Microbiol.**, v. 192, p. 995-1003, 2010 b.

MARTINS F. S.; ELIAN S. D.; VIEIRA A.T.; TIAGO F.C.; MARTINS A. K.; SILVA F. C.; SOUZA E.L.; SOUSA L. P.; ARAÚJO H.R.; PIMENTA P.F.; BONJARDIM C.A.; ARANTES R. M.; TEIXEIRA M.M.; NICOLI J. R. Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune responses and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in a murine model of typhoid fever. **Int. J. Med. Microbiol.**, n.4, p. 359-364, 2011.

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.

MCCULLOUGH, M.J.; CLEMONS, K.V.; MCCUSKER, J.H.; STEVENS, D.A. Species identification and virulence attributes of *Saccharomyces boulardii*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 2613-2617, 1998.

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. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. **W. j. gastroent.**, v. 16, n. 18, p. 2202-2222, 2010.

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.

METCHNIKOFF, T. **The Prolongation of Life**. Heineman, London, UK, 1907.

NARDI, R.D.; SANTOS, A.R.M.; CROCCO-AFONSO, L.C.; SILVA, M.E.; BAMBIRRA, E.A.; ANDRADE, A.M.V.; NICOLI, J.R. Bacteriological and immunological aspects of conventional and germ-free mice infected with *Salmonella typhimurium*. **Rev. Latinoam. Microbiol.**, v. 31, p. 239-243, 1991.

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.

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.

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.; 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. Normal gastrointestinal microbiota in domestic animals and human beings. **Enferm. Infec. Microbiol.**, v. 15, p. 183-190, 1995.

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.

PALLERONI, NORBERTO J. Chamber for bacterial chemotaxis experiments. **Appl Environ Microbiol.**, v.32, n. 5, p. 729-730, 1976.

PARKINSON, J.S.; AMES P.; STUDDERT, C.A. Collaborative signaling by bacterial chemoreceptors. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 8, p. 116-121, 2005.

PELLETIER, C.; BOULEY, C.C.; BOUTTIER, S.; BOURLIOUX, P.; BELLON-FONTAINE, M-N. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Appl. Environm. Microbiol.**, v. 63, p. 1725-1731, 1997.

PENG, X.; SUN, J.; ISERENTANT, D.; MICHIELS, C. Flocculation and coflocculation of bacteria by yeast. **APPL. Microbiol. Biotechnol.**, v. 55, p. 777-781, 2001.

PENNA, F.J.; FILHO, L.A.P.; CALÇADO, A.C.; JUNIOR, H.R.; NICOLI, J.R. Up-to-date clinical and experimental basis for the use of probiotics. **J. Pediat.**, v. 76 (Supl. 2), p. s209-s217, 2000.

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.

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.

PÉREZ, P.; MINAARD, Y.; DISALVO, E.; DE ANTONI, G. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. **Appl. Environm. Microbiol.**, v. 64, p. 21-26, 1998.

PÉREZ-SOTELO L.S.; TALAVERA-ROJAS M.; MONROY-SALAZAR H.G.; LAGUNAS-BERNABÉ S.; CUARÓN-IBARGÜENGOYTIA J.A.; JIMENEZ R.M.; VÁZQUEZ-CHAGOYÁN 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.

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.

PIMENTA, PF, DE SOUZA W. Fine structure and cytochemistry of the endoplasmic reticulum and its association with the plasma membrane of *Leishmania mexicana amazonensis*. **J. Submicrosc Cytol.**, v.17, p. 413-419, 1985.

PIMENTA, PF, DE SOUZA W. Cytochemical localization of acid phosphatase in *Leishmania mexicana amazonensis*. **J. Submicrosc. Cytol.**, v.18, p. 127-132, 1986.

PONTIER-BRES, R.; PRODON, F.; MUNRO, P.; RAMPAL, P.; LEMICHEZ, E.; PEYRON, J.F.; CZERUCKA, D. Modification of *Salmonella* Typhimurium motility by the probiotic yeast strain *Saccharomyces boulardii*. **PLoS one**, v. 7, p. 1-10, 2012.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

ROSENBERG, M.; GUTNICK, D.; ROSEMBERG, E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 9, p. 29-33, 1983.

ROTIMI, V.O.; DUERDEN, B.I. The development of the bacterial flora in normal neonates. **J. Med. Microbiol.**, v. 14, p. 51-62, 1981.

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.

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 Diseases**, 4th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md., 1995.

SAVAGE, D.C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 31, p. 107-133, 1977.

SCARPIGNATO, C.; RAMPAL, P. Prevention and treatment of traveler's diarrhea: a clinical pharmacological approach. **Chemotherapy**, v. 41, p. 48-81, 1995.

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.

SERVIN, A.L.; COCONNIER, M.H. Adhesion of probiotic strain to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. **Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 5, p. 741-754, 2003.

SOURJIK, V. Receptor clustering and signal processing in *E. coli* chemotaxis. **Trends Microbiol.**, v. 12, p. 569-576, 2004.

SPANGLER, B.D. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Microbiol. Rev.**, v. 56, p. 622-647, 1992.

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, 1989.

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.

SURAWICZ, C.M. Probiotics, antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* diarrhoea in humans. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 17, p. 775-783, 2003.

TARP, B.; GLERUP, H.; THYGESEN, J. B. *Saccharomyces boulardii* fungemia caused by treatment with a probioticum. **BMJ Case Reports**, 2012.

TEITELBAUM, J.E.; WALKER, W.A. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. **Ann. Rev. Nutr.**, v. 22, p. 107-138, 2002.

TIAGO F. C. P.; MARTINS F. S.; ROSA C. A., NARDI R. M. D.; CARA D. C.; NICOLI J. R. Physiological characterization of non-*Saccharomyces* yeasts from agro-industrial and environmental origins with possible probiotic function. **World J Microbiol. Biotechnol.**, n. 25, p. 657-666, 2009.

TREXLER, P.C. A rationale for the development of gnotobiotics. **Lab. Anim.**, v. 12, p. 257-262, 1978.

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.

VAUGHAN, E.E.; HEILIG, H.G.H.J.; BEN-AMOR, K.; DE VOS, W.M. Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 29, p. 477-490, 2005.

VIELA, E. G.; FERRARI, M. L. A.; TORRES, H. O. G.; PINTO, A. G.; AGUIRRE, A. C. C.; MARTINS, F. P.; GOULART, E. M. A.; CUNHA, A. S. Influence of *Saccharomyces boulardii* on the intestinal permeability of patients with Crohn's disease in remission. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 43,n. 7, p. 842-848, 2008.

VERSTREPEN, K.J.; KLIS, F.M. Flocculation, adhesion and biofilm-formation in yeasts. **Mol. Microbiol.**, v. 60, p. 5-15, 2006.

VIELA, E. G.; FERRARI, M. L. A.; TORRES, H. O. G.; PINTO, A. G.; AGUIRRE, A. C. C.; MARTINS, F. P.; GOULART, E. M. A.; CUNHA, A. S. Influence of *Saccharomyces boulardii* on the intestinal permeability of patients with Crohn's disease in remission. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 43,n. 7, p. 842-848, 2008.

VIEIRA, L.Q.; OLIVEIRA, M.R.; NEUMANN, E.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, E.C. Parasitic infections in germ-free 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.

WALLACE, T. C. GUARNER, F.; MASEN, K.; CABANA, M. D.; GIBSON G.; HENTGES, E.; SANDERS, M. E. Human gut microbiota and its relationship to health and disease. **Nutr. Clin. Car.**, v 69, p. 392-403, 2011.

WESTERLUND-WIKSTRÖN, B.; KORHONEM, T.K. Molecular structure of adhesion domains in *Escherichia coli* fimbriae. **Int. J. Med.Microbiol.**, v. 295, p. 479-486, 2005.

WIXON, J. Pathogen special: *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Xylella fastidiosa*. **Yeast**, v. 17, p. 307-313, 2000.

WOSTMANN, B.S. **Germfree and Gnotobiotic Animal Models: Background and Applications**. Editora CRC PRESS, Boca Raton, Flórida, p. 208, 1996.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeast. **The Yeasts: A Taxonomic Study**. 4th ed. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1998.

YIN, Q.Y.; GROOT, P. W. J.; JONG, L.; KLIS, F.M.; KOSTER, C.G. Mass spectrometric quantitation of covalently bound cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res**, v. 7, p. 887-896, 2007.

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.

VIII. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO

VIII.1 Atividades desenvolvidas

VIII.1.1 Disciplinas cursadas

- DIP MIC808- Seminários em Microbiologia (Conceito A)
- DIP MIC82- Bacteriologia de Anaeróbios (Conceito A)
- DIP MIC 836 -TOP. Esp. em Microbiologia (Conceito A)
- DIP MIC 837 -TOP. Esp. em Microbiologia (Conceito A)
- DIP MIC 843-Citologia e Fisiologia de Micro-organismos (Conceito A)
- DIP MIC 848- Bacteriologia de Aeróbios (Conceito A)
- DIP MIC 851- Micologia Geral (Conceito A)
- DIP MIC 855-Biossegurança e Bioética (Conceito A)
- DIP MIC 850 Biologia de Leveduras (Conceito A)
- DIP MIC 856- Treinamento Didático em Microbiologia I (Conceito A)
- DIP FAE 914 – Didática do Ensino Superior (conceito A)
- DIP MIC852 - Micologia Médica (conceito A)

VIII.1.2 Trabalhos apresentados em congressos

Tiago, F.C.P.; Martins, F.S.; Cara, Denise C.; Rosa, Carlos A.; Nicoli. Estudo da utilização de leveduras ambientais na prevenção de diarreia associada a antibiótico. In: IV Congresso Latino Americano e X Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimento, III Encontro Nacional de Centros de Controle de Zoonoses e II Encontro do Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Ambiental, Florianópolis, 2009.

Tiago, F.C.P.; Martins, Flaviano S. ; Cara, Denise C. ; Rosa, C.A. ; Nicoli, J.R. Triagem *in vitro* de leveduras não patogênicas e não *Saccharomyces*, avaliando a capacidade de produção de substâncias antagonistas contra enteropatógenos. In: IV Congresso Latino Americano e X Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimento, III Encontro Nacional de Centros de Controle de Zoonoses e II Encontro do Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Ambiental; Florianópolis 2009.

Tiago, F.C.P., Martins, F.S., Cara, D. C., Nicoli, J. R. Seleção por ensaios *in vitro* de leveduras brasileiras para uso como probióticos. In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Porto de Galinhas, 2009.

Souza, E.L.S., **Tiago, F.C.P.**, Nicoli, J.R. Teste de colonização, sobrevivência e proteção *in vivo* das leveduras mutantes BY 4741. In: XVIII Semana de Iniciação Científica da UFMG, Belo Horizonte, 2009.

Tiago, F. C. P.; Araújo, H. R. C.; Martins, F. S.; Souza, E. L. S, Pimenta, P. F. P. ; Nicoli, J. R. Binding capacity of pathogens on the surface of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 cell. In: International Microscopy Congress, Rio de Janeiro, 2010.

VIII.1.3 Artigos publicados e aceitos à publicação (Anexo 13)

Tiago, F.C.P.; Martins, Flaviano S.; Rosa, Carlos A.; Nardi, Regina M. D.; Cara, Denise C.; Nicoli, Jacques R.. Physiological characterization of non-*Saccharomyces* yeasts from agro-industrial and environmental origins with possible probiotic function. **Wrld J Microbiol Biotechnol**, v. 25, p. 657-666, 2009.

Flaviano S. Martins, Samir D. A. Elian, Angélica T. Vieira, **Fabiana C. P. Tiago**, Ariane K. S. Martins, Flávia C. P. Silva, Éricka L. S. Souza, Lirlândia P. Sousa, Helena R. Araújo, Paulo F. Pimenta, Cláudio A. Bonjardim, Rosa M. E. Arantes, Mauro M. Teixeira and Jacques R. Nicoli. Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune responses and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in murine model of typhoid fever. **Int J Med Microbiol.**, v.301, p. 359-364, 2011.

Tiago, F.C.P.; Martin^s, F.S.;Souza, E.L.S.; Pimenta, P.F.P.; Araujo, H.R.C; Castro, I.M.; Brandão, R.L and Jacques R. Nicoli. Adhesion on yeast cell surface as a trapping mechanism of pathogenic bacteria by *Saccharomyces* probiotics. **J. Med. Microbiol.**, 2012.

Flaviano S Martins, Angélica T Vieira, Samir D A Elian, Rosa M E Arantes, **Fabiana C P Tiago**, Lirlândia P Sousa, Helena R C Araújo, Paulo F Pimenta, Cláudio A Bonjardim, Jacques R Nicoli, Mauro M Teixeira. *Saccharomyces boulardii* prevents *Salmonella* infection via inhibition of bacterial translocation and tissue inflammation. **FEMS Immunology & Medical Microbiology. (submetido)**

VIII.1.4 Participação em eventos:

International Microscopy Congress, 2010, Rio de Janeiro.

VI Fórum de Microbiologia Prof. Ênio Cardillo Vieira. 2010, Belo Horizonte.

V Fórum de Microbiologia, promovido pelo programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, no dia 24 de Junho de 2009, Belo Horizonte.

25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009. Porto de Galinhas.

IV Congresso Latino Americano e X Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos
III Encontro Nacional de Centros de Controle de Zoonoses II Encontro do Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal. 2009, Florianópolis.

V Fórum de Microbiologia. 2009.

VIII.1.5 Participação em cursos

Aspectos microbiológicos, tecnológicos e funcionais de bactérias probióticas. (carga horária: 08 horas). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Curso Ecologia de Micro-organismos. (carga horária: 4 horas). 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia.

IV Curso Interativo de Antimicrobianos. (carga horária: 14 horas). Sociedade Mineira de Infectologia.

Formação em Docência do Ensino Superior (carga horária: 60 horas/aula). Giz – Rede de Desenvolvimento de Práticas de Ensino Superior. Universidade Federal de Minas Gerais.

IX. Anexos

Anexo 1 Contagem de patógenos do grupo controle e do grupo associado com leveduras vivas (fase estacionária e logarítmica) e mortas. Os resultados estão expressos em Log₁₀.

Patógenos	Tempo (minutos)					P
	0	15	30	60	120	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028	6,29	6,18	6,09	6,17	6,26	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. boulardii</i> viável (fase estacionária)	5,68	5,59	5,66	5,56	5,61	P <0,001
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. boulardii</i> viável (fase logarítmica)	6,76	6,93	6,93	6,85	6,53	P <0,001
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. boulardii</i> inviável	5,43	5,40	4,60	4,70	5,04	P = 0,008
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG 905 viável (fase estacionária)	6,01	5,80	5,76	5,77	5,58	P <0,001
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG 905 viável (fase logarítmica)	6,82	6,78	6,71	6,92	7,13	P <0,001
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG 905 inviável	5,58	5,73	6,10	5,69	5,32	P = 0,004
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana	6,31	6,63	6,47	6,36	6,37	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S. boulardii</i> viável (fase estacionária)	5,81	5,75	5,76	5,84	5,67	P <0,001
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S. boulardii</i> viável (fase logarítmica)	5,76	5,93	5,93	5,85	5,92	P <0,001
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S. boulardii</i> inviável	5,58	6,06	5,11	5,58	5,83	P = 0,008
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG 905 viável (fase estacionária)	5,94	5,75	5,85	5,86	5,93	P <0,001
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG 905 viável (fase logarítmica)	5,92	5,74	5,67	6,03	6,05	P <0,001
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG 905 inviável	5,65	5,80	5,61	5,63	5,85	P = 0,008

Continuação anexo 1

Patógenos	Tempo (minutos)					P
	0	15	30	60	120	
<i>S. Typhi</i>	7,45	7,32	6,95	7,44	7,66	
<i>S. Typhi</i> associada a <i>S. boulardii</i> viável (fase estacionária)	6,48	6,60	7,04	6,78	6,70	P = 0,003
<i>S. Typhi</i> associada a <i>S. boulardii</i> viável (fase logarítmica)	6,15	6,00	6,11	5,48	4,00	P = 0,003
<i>S. Typhi</i> associada a <i>S. boulardii</i> inviável	5,46	5,74	5,61	5,54	5,69	P <0,001
<i>S. Typhi</i> associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG 905 viável (fase estacionária)	6,74	6,70	6,02	6,18	6,90	P = 0,003
<i>S. Typhi</i> associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG 905 viável (fase logarítmica)	5,70	5,78	5,30	6,12	5,95	P <0,001
<i>S. Typhi</i> associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG 905 inviável	5,34	5,44	5,45	5,57	5,34	P <0,001
<i>E. coli</i> ATCC 25723	6,57	6,38	6,26	6,47	6,60	
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S. boulardii</i> viável (fase estacionária)	5,59	5,45	5,51	5,29	5,40	P <0,001
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S. boulardii</i> viável (fase logarítmica)	5,48	6,23	6,00	5,30	5,95	P = 0,007
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S. boulardii</i> inviável	6,12	5,00	5,54	5,55	5,82	P = 0,002
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG 905 viável (fase estacionária)	6,00	5,74	5,88	5,66	5,87	P <0,001
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG 905 viável (fase logarítmica)	5,51	5,40	5,44	5,50	5,65	P <0,001
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG 905 inviável	5,54	5,48	5,51	5,50	5,67	P <0,001
<i>S. typhi</i>	7,45	7,32	6,95	7,44	7,66	
<i>S. typhi</i> associada a <i>S. boulardii</i> viável (fase estacionária)	6,48	6,60	7,04	6,78	6,70	P = 0,003
<i>S. typhi</i> associada a <i>S. boulardii</i> viável (fase logarítmica)	6,15	6,00	6,11	5,48	4,00	P = 0,003
<i>S. typhi</i> associada a <i>S. boulardii</i> inviável	5,46	5,74	5,61	5,54	5,69	P <0,001
<i>S. typhi</i> associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG 905 viável (fase estacionária)	6,74	6,70	6,02	6,18	6,90	P = 0,003
<i>S. typhi</i> associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG 905 viável (fase logarítmica)	5,70	5,78	5,30	6,12	5,95	P <0,001

Continuação do anexo 1

Patógenos	Tempo (minutos)					P
	0	15	30	60	120	
<i>S. typhi</i> associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG 905 inviável	5,34	5,44	5,45	5,57	5,34	P <0,001
<i>E. coli</i> ATCC 25723	6,57	6,38	6,26	6,47	6,60	
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S. boulardii</i> viável (fase estacionária)	5,59	5,45	5,51	5,29	5,40	P <0,001
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S. boulardii</i> viável (fase logarítmica)	5,48	6,23	6,00	5,30	5,95	P = 0,007
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S. boulardii</i> inviável	6,12	5,00	5,54	5,55	5,82	P = 0,002
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG 905 viável (fase estacionária)	6,00	5,74	5,88	5,66	5,87	P <0,001
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG 905 viável (fase logarítmica)	5,51	5,40	5,44	5,50	5,65	P <0,001
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG 905 inviável	5,54	5,48	5,51	5,50	5,67	P <0,001

Anexo 2. Quadro comparativo entre a fase Logarítmica e estacionária das leveduras associadas ao patógeno. Presença de diferença estatística significativa (em negrito) entre o grupo controle do patógeno e o grupo associado à levedura.

Patógenos	Tempo (minutos)					P
	0	15	30	60	120	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. boulardii</i> viável (fase estacionária)	5,68	5,59	5,66	5,56	5,61	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. boulardii</i> viável (fase logarítmica)	6,76	6,93	6,93	6,85	6,53	P <0,001
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 viável (fase estacionária)	6,01	5,80	5,76	5,77	5,58	P <0,001
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 viável (fase logarítmica)	6,82	6,78	6,71	6,92	7,13	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S. boulardii</i> viável (fase estacionária)	5,81	5,75	5,76	5,84	5,67	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S. boulardii</i> viável (fase logarítmica)	5,00	7,12	6,35	6,53	6,88	P = 0,151
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 viável (fase estacionária)	5,94	5,75	5,85	5,86	5,93	P <0,001
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG 905 viável (fase logarítmica)	6,52	6,28	6,41	6,37	6,37	
<i>S. Typhi</i> associada a <i>S. boulardii</i> viável (fase estacionária)	6,48	6,60	7,04	6,78	6,70	P = 0,023
<i>S. Typhi</i> associada a <i>S. boulardii</i> viável (fase logarítmica)	6,15	6,00	6,11	5,48	4,00	
<i>S. Typhi</i> associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 viável (fase estacionária)	6,74	6,70	6,02	6,18	6,90	
<i>S. Typhi</i> associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 viável (fase logarítmica)	5,70	5,78	5,30	6,12	5,95	P = 0,010
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S. boulardii</i> viável (fase estacionária)	5,59	5,45	5,51	5,29	5,40	
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S. boulardii</i> viável (fase logarítmica)	5,48	6,23	6,00	5,30	5,95	P = 0,093
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 viável (fase estacionária)	6,00	5,74	5,88	5,66	5,87	
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 viável (fase logarítmica)	6,29	6,41	6,04	6,20	6,34	P = 0,001

Anexo 3. Contagem de patógenos grupo controle e associado com a levedura *S. cerevisiae* W 303. Os resultados estão expressos em Log₁₀.

Patógenos	Tempo (minutos)					P
	0	15	30	60	120	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028	8,05	7,65	7,75	7,67	7,58	P = 0,269
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. cerevisiae</i> W303	7,54	7,59	7,67	7,70	7,68	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana	6,78	7,97	7,96	7,91	7,96	P = 0,151
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S.cerevisiae</i> W 303	7,38	7,10	7,40	7,66	7,59	
<i>S. Typhi</i>	5,72	7,29	7,39	7,33	7,37	P = 0,151
<i>S. Typhi i</i> associada a <i>S.cerevisiae</i> W 303	6,81	6,82	6,62	6,04	6,99	
<i>E. coli</i> ATCC 25723	7,90	7,45	7,62	7,34	6,08	P = 1,000
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S.cerevisiae</i> W 303	7,90	7,45	7,62	7,34	6,08	

Não houve diferença estatística significativa entre o grupo controle do patógeno e o grupo associado à levedura *S. cerevisiae* W303.

Anexo 4.

Quadro comparativo entre o grupo controle dos patógenos e associados ao sobrenadante da cultura da levedura *S. cerevisiae* UFMG 905.

Sobrenadante	Tempo (minutos)					P
	0	15	30	60	120	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028	6,51	6,40	6,59	6,75	6,58	P = 0,076
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada ao Sobrenadante	7,36	7,32	6,64	6,59	6,74	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana	6,48	6,52	5,95	6,59	6,46	P = 0,421
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada ao Sobrenadante	7,61	6,94	7,80	6,08	5,95	
<i>S. Typhi</i>	7,28	7,19	6,30	7,26	7,17	P = 0,151
<i>S. Typhi</i> associada ao Sobrenadante	6,60	6,86	6,75	6,86	6,78	
<i>E. coli</i> ATCC 25723	7,28	7,34	6,26	5,41	7,32	P = 0,767
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada ao Sobrenadante	6,53	6,48	6,86	6,56	6,58	

Anexo 5 Ensaio de adesão. Leveduras na presença de oxgall 1%. Em destaque observa-se os grupos que apresentaram diferença estatística significativa entre o controle e o grupo experimental.

Micro-organismos ressuspendidos em meio com oxgall 1%							Micro-organismos crescidos em meio com oxgall 1%						
Patógenos associado a leveduras	Tempo (minutos)					P	Patógenos associado a leveduras	Tempo (minutos)					P
	0	15	30	60	120			0	15	30	60	120	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028	7,28	7,25	7,19	7,40	7,45		<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028	7,38	7,23	7,14	6,88	6,92	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. boulardii</i>	6,38	6,18	6,09	6,16	6,21	P <0,001	<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. boulardii</i>	7,05	6,78	6,82	6,64	6,43	P = 0,031
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905	6,33	6,19	6,25	4,90	6,23	P = 0,008	<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A- 905	7,15	6,77	6,80	6,64	6,82	P = 0,063
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana	7,09	7,18	6,79	7,14	6,94		<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana	7,05	6,88	6,77	6,74	7,15	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S. boulardii</i>	7,54	7,43	7,51	7,15	6,20	P = 0,605	<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S. boulardii</i>	6,31	6,82	6,39	6,29	6,36	P = 0,032
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905	6,39	6,20	5,18	5,25	5,88	P = 0,008	<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMGA- 905	6,36	7,29	6,62	7,19	5	P = 0,690
<i>S. Tyhi</i>	7,45	7,32	6,95	7,5	7,66		<i>S. Tyhi</i>	6,80	6,22	5,73	5	5,43	
<i>S. Tyhi</i> associada a <i>S. boulardii</i>	6,65	6	6,60	6,52	7	P = 0,003	<i>S. Tyhi</i> associada a <i>S. boulardii</i>	6,36	6,02	6,49	5,30	5,30	P = 0,885
<i>S. Tyhi</i> associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905	4,6	5,07	5,48	5,49	5,20	P <0,001	<i>S. Tyhi</i> associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905	5,60	6,51	6,08	5,30	6,20	P = 0,794
<i>E. coli</i> ATCC 25723	7,45	7,44	7,25	7,09	7,44		<i>E. coli</i> ATCC 25723	6,78	6,71	6,81	6,77	6,72	
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S. boulardii</i>	6,08	6,04	6,17	6,18	6,48	P <0,001	<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S. boulardii</i>	6,47	6,26	6,27	5,78	6,36	P = 0,008
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905	5,68	5,91	5,91	6,19	6,03	P <0,001	<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905	5,87	7,03	6,37	6,46	6,44	P = 0,151

Anexo 6 Ensaio de adesão. Leveduras na presença de oxgall 3%. Em negrito observa-se os grupos que apresentaram diferença estatística significativa. entre o controle e o grupo experimental.

Micro-organismos ressuspensos em meio com oxgall 3%							Micro-organismos crescidos em meio com oxgall 3%						
Patógenos associado a leveduras	Tempo (minutos)					P	Patógenos associado a leveduras	Tempo (minutos)					P
	0	15	30	60	120			0	15	30	60	120	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028	6,79	7,10	6,64	6,61	6,59		<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028	6,45	6,57	6,26	7,67	6,70	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. boulardii</i>	6,32	6,46	6,54	6,48	6,67	P = 0,053	<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. boulardii</i>	6,23	6,20	6,15	6,73	6,74	P = 0,291
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905	6,51	6,49	6,59	6,46	6,69	P = 0,086	<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905	7,02	6,04	6,18	6	5,78	P = 0,095
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana	6,61	6,79	6,54	6,53	6,46		<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana	6,52	5	6,32	6,20	6,53	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S. boulardii</i>	6,32	6,15	6,08	6,08	7,38	P = 0,151	<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S. boulardii</i>	5,85	6,08	6,91	6,08	5,32	P = 0,863
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905	6,20	6,04	5,78	5,90	6,26	P <0,001	<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905	5,85	5,85	5,78	6,04	6,04	P = 0,151
<i>S. Tyhi</i>	5,95	5,92	5,85	5,85	5,77		<i>S. Tyhi</i>	6,26	5,70	5,48	5,70	5,	
<i>S. Tyhi</i> associada a <i>S. boulardii</i>	5,48	5	5	5,70	5,58	P = 0,008	<i>S. Tyhi</i> associada a <i>S. boulardii</i>	5	5,30	5	5,30	5,95	P = 0,273
<i>S. Tyhi</i> associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905	5	5,48	5,78	5,48	5,60	P = 0,016	<i>S. Tyhi</i> associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905	5,60	5	5,60	5,48	5,30	P = 0,352
<i>E. coli</i> ATCC 25723	6,70	6,89	6,83	6,83	6,67		<i>E. coli</i> ATCC 25723	6,61	5,48	6,57	6,86	6,68	
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S. boulardii</i>	6,43	5,95	5,70	5,78	5,48	P <0,001	<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S. boulardii</i>	6,08	5,95	6,23	5	6,14	P = 0,095
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905	6,26	6,08	5,85	5,48	6,61	P = 0,008	<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMGA- 905	5,85	6,15	5,78	6,23	6,20	P = 0,151

Anexo7

Contagem de patógenos do grupo controle e do grupo associado com as leveduras *S.boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 em diferentes pH. Os resultados estão expressos em Log₁₀.

Patógeno	Tempo (minutos)					P
	0	15	30	60	120	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028	6,3220	5,9171	6,1312	6,3908	6,1638	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. boulardii</i> pH 4	5,6532	5,2999	5,2976	5,8125	6,0591	0,011
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. boulardii</i> viável pH 5	5,1761	5,7853	5,3424	5,8633	5,0414	0,004
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. boulardii</i> pH 6	5,7946	5,5726	5,3778	5,5269	5,4994	<0,001
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. boulardii</i> pH 8	5,5911	5,5911	5,6128	5,5315	5,7160	<0,001
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 pH 4	5,6958	5,4009	5,9645	5,4536	6,1698	0,029
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 pH 5	5,6721	4,9031	5,1139	4,6021	5,9191	0,006
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 pH 6	5,3802	5,3010	5,3010	5,2041	5,1761	<0,001
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 pH 8	5,4949	5,5162	5,2928	5,7081	5,6017	<0,001
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana	6,4065	6,0792	5,9956	6,8573	6,1038	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S. boulardii</i> pH 4	5,5563	5,4472	5,2788	4,6628	5,1461	0,001
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S. boulardii</i> viável pH 5	5,2041	4,0000	5,0414	5,3617	5,4150	0,003
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S. boulardii</i> pH 6	5,1139	4,9031	5,0792	4,0000	5,5441	0,002
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S. boulardii</i> pH 8	5,6902	5,6021	5,7993	5,6232	5,7243	0,006
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 pH 4	5,5604	6,1242	5,9203	5,6324	5,2838	0,026
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 pH 5	5,2723	5,4839	5,5891	5,4868	5,6576	0,002
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 pH 6	5,5911	5,6812	5,5911	5,6812	5,7782	0,005
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 pH 8	5,5960	5,4957	5,5622	6,0753	5,4421	0,010

S. Typhi	7,1875	7,1072	7,1271	7,2989	7,2227	
<i>S. Typhi</i> associada a <i>S. boulardii</i> pH 4	5,6721	6,1523	5,5185	5,5315	5,6335	<0,001
<i>S. Typhi</i> associada a <i>S. boulardii</i> viável pH 5	5,5185	5,4314	5,4472	5,5682	4,7782	<0,001
<i>S. Typhi</i> associada a <i>S. boulardii</i> pH 6	5,5185	5,2041	5,5911	5,4624	6,1847	<0,001
<i>S. Typhi</i> associada a <i>S. boulardii</i> pH 8	5,5185	5,3424	7,0607	6,0043	4,3010	0,009
<i>S. Typhi</i> 14028 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 pH 4	6,2624	6,2443	6,1104	6,2360	6,1919	<0,001
<i>S. typhi</i> associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 pH 5	5,7579	5,5490	5,4586	6,1203	5,8853	<0,001
<i>S. typhi</i> associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 pH 6	5,8686	5,7317	4,9225	5,5999	5,9243	<0,001
<i>S. typhi</i> associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 pH 8	5,6577	5,6562	5,6574	5,6351	6,0220	<0,001
<i>E. coli</i> ATCC 25723	6,5640	6,3906	6,1833	6,4713	6,2608	
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S. boulardii</i> pH 4	4,6990	5,0000	5,5798	4,7782	5,0792	<0,001
<i>E. coli</i> ATCC 25723 humana associada a <i>S. boulardii</i> viável pH 5	5,5051	5,4914	6,0755	5,4624	4,4771	0,007
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S. boulardii</i> pH 6	5,8111	5,9959	5,8143	5,8208	5,5277	<0,001
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S. boulardii</i> pH 8	6,1541	6,1242	6,0606	5,9857	6,1151	0,005
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 pH 4	5,8834	5,9451	5,6409	5,8900	5,2488	0,002
<i>E. coli</i> ATCC 25723 humana associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG 905 pH 5	5,6499	5,3076	6,2345	6,0827	5,5841	0,011
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 pH 6	5,7509	5,9488	5,5390	5,9460	5,6702	<0,001
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 pH 8	5,5456	5,9039	6,2629	6,0994	5,6725	0,013

Contagem dos micro-organismos nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 min (cada um em triplicata), todos os grupos apresentaram diferença estatística significativa.

ANEXO 8

Contagem de patógenos do grupo controle e do grupo associado com as leveduras *S.boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 na presença de fostato de cálcio e fosfato de potássio. Os resultados estão expressos em Log₁₀. Em negrito os grupos com diferença estatística significativa.

Patógenos	Tempo (minutos)					P
	0	15	30	60	120	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028	6,47	5,95	6,50	5,52	5,52	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. boulardii</i> na presença de Ca	4,96	4,97	4,92	5,35	5,08	0,004
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. boulardii</i> na presença de K	7,22	5,91	7,06	5,73	5,65	0,447
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 na presença de Ca	5,85	5,00	5,13	5,13	5,37	0,030
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 na presença de K	5,3	4	4,3	4	4,95	0,003
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana	5,90	5,95	6,38	5,79	5,74	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S. boulardii</i> na presença de Ca	5,16	4,87	5,07	4,99	5,15	P<0,001
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S. boulardii</i> na presença de K	5,9	5,95	6,38	5,79	5,74	1,00
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 na presença de Ca	5,76	5,10	5,85	5,43	5,71	0,061
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG A-905 na presença de K	6,54	6,06	6,18	6,18	6,09	P<0,001
<i>S. Typhi</i>	6,54	6,06	6,18	6,18	6,09	
<i>S.Typhi</i> associada a <i>S. boulardii</i> na presença de Ca	4,91	5,22	5,21	5,90	5,43	0,001
<i>S. Typhi</i> associada a <i>S. boulardii</i> na presença de K	6,477	5,58	6,26	6,57	5,54	1,00
<i>S. Typhi</i> associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG 905 na presença de Ca	5,59	5,21	5,63	5,71	5,07	P<0,001
<i>S. Typhi</i> associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG 905 na presença de K	4,7	4,85	5	4,85	4,6	P<0,001
<i>E. coli</i> ATCC 25723	5,60	5,90	6,24	6,12	6,54	
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S. boulardii</i> na presença de Ca	5,50	5,20	4,72	5,28	5,42	0,003
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S. boulardii</i> na presença de K	6,97	6,61	5,95	6,49	6,72	0,077
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG 905 na presença de Ca	4,3	4,95	4,60	5,78	5,6	0,013
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S.cerevisiae</i> UFMG 905 na presença de K	5,92	6,81	5,7	6,48	6,66	0,4

Anexo 9

Presença ou ausência do fenômeno de quimiotaxia da *S. Typhimurium* ATCC e *Pseudomonas* na presença das levedua *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG A-905.

Associações	Tempo (minutos)				P
	5	15	30	45	
Meio de cultura YPG + <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	6,60	6,95	6,48	7,32	
<i>Sacharomyces boulardii</i> + <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	7,67	7,83	7,64	7,63	0,005*
<i>Sacharomyces boulardii</i> + <i>Pseudomonas</i>	7,2	6	6	6,35	0,221
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> UFMG 905 + <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	7,32	7,43	7,41	7,30	0,034*
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> UFMG 905 + <i>Pseudomonas</i>	7,38	-	6	7,78	0,689

*grupos que apresentaram diferença significativa quando foram comparados com o grupo controle.

Anexo 10

Contagem de patógenos do grupo controle e associado com a levedura *S. cerevisiae* BY4741. Os resultados estão expressos em Log₁₀.

Micro-organismos	Tempo (minutos)					P
	0	15	30	60	120	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028	6,24	6,18	6,28	6,26	6,01	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S.cerevisiae</i> BY4741 ativa	5,60	5,63	5,69	5,48	5,66	P <0,001
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S.cerevisiae</i> BY4741 inativa	5,70	5,43	5,97	5,59	5,65	P <0,001
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana	6,27	6,42	6,27	6,15	6,17	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S.cerevisiae</i> BY4741 ativa	5,78	5,74	5,71	5,65	5,72	P <0,001
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S.cerevisiae</i> BY4741 inativa	5,24	5,74	5,46	5,29	5,54	P <0,001
<i>S. typhi</i>	5,20	5,32	6,11	5,71	5,54	
<i>S. typhi</i> associada a <i>S.cerevisiae</i> BY4741 ativa	5,11	5,23	5,23	5,04	4	P = 0,049
<i>S. typhi</i> associada a <i>S.cerevisiae</i> BY4741 inativa	4,85	4,56	4,64	5,32	4,48	P = 0,006
<i>E. coli</i>	6,04	6,16	6,08	6,61	6,20	
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S.cerevisiae</i> BY4741 ativa	5,36	5,57	5,56	5,56	5,51	P <0,001
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S.cerevisiae</i> BY4741 inativa	5,26	5,23	5,33	5,31	5,23	P <0,001

Anexo 11

Contagem de patógenos do grupo controle e do grupo associado com as leveduras mutantes BY 4741 negativas no teste de aglutinação. Os resultados estão expressos em Log₁₀.

Patógeno	Tempo (minutos)					P
	0	15	30	60	120	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028	7,7584	7,6583	7,8817	7,5904	7,7590	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YKL096W	7,1987	8,0128	7,9243	8,2095	8,2504	0,363
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YJL158C	8,6138	8,5172	7,1761	8,6222	8,6884	0,151
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YKL163W	6,4314	6,9243	7,7752	6,8451	6,9395	0,095
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YGR279C	7,8129	6,6021	6,6902	6,7924	6,6721	0,095
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium ATCC 14028 associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YMR306W	7,1060	7,0732	7,2196	7,4995	8,1723	0,171
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana	7,5129	7,4381	6,7713	7,5824	7,5118	
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YKL096W	6,7361	6,9425	7,1692	7,0844	7,5144	0,203
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YJL158C	7,2399	7,3137	7,1989	7,1205	6,8616	0,236
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YKL163W	6,8651	6,6042	6,8878	6,8733	7,2015	0,095
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YGR279C	7,3133	7,5811	7,4838	7,6116	7,7663	0,294
<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium origem humana associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YMR306W	7,3683	7,3537	7,0181	7,5050	7,4567	0,897
<i>S. Typhi</i>	6,7782	8,6107	8,6990	8,7782	8,5977	
<i>S. Typhi</i> associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YKL096W	6,6021	8,2945	7,9085	7,9731	7,8751	0,274
<i>S. Typhi</i> associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YJL158C	8,0682	8,3181	8,4900	7,9777	8,1461	0,818
<i>S. Typhi</i> associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YKL163W	8,5740	7,7634	8,5563	8,5705	8,5821	0,785
<i>S. Typhi</i> associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YGR279C	7,9956	7,8692	7,8573	7,8808	7,8633	0,325
<i>S. Typhi</i> associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YMR306W	7,3617	7,7709	7,7324	7,6128	7,5315	0,112
<i>E. coli</i> ATCC 25723	7,3692	7,2041	7,2122	7,1584	7,0170	
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YKL096W	7,1300	7,3983	7,1444	7,3348	7,4071	0,306
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YJL158C	6,6628	6,5185	7,6628	6,3802	5,6021	0,098
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YKL163W	6,6232	7,5647	6,5911	6,6812	7,7559	0,583
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YGR279C	7,0842	6,8193	7,7577	7,2515	7,6310	0,540
<i>E. coli</i> ATCC 25723 associada a <i>S. cerevisiae</i> mutante YMR306W	7,1178	7,7045	7,2560	7,7112	7,5929	0,067

Anexo 12

Contagem de bactérias representantes da microbiota associado com as leveduras *S. boulardii*, *S. cerevisiae* A UFMG 905, *S. cerevisiae* BY 4741, *S. cerevisiae* mutante BY4741 positiva no teste de aglutinação, *S. cerevisiae* mutante BY4741 negativas no teste de aglutinação (YMR306W). Os resultados estão expressos em Log10.

Micro-organismos da Microbiota	Tempo (minutos)					P
	0	15	30	60	120	
<i>E.coli</i> Nissle 1917	6,8141	6,4434	6,4049	6,3517	6,5462	
<i>E.coli</i> Nielsen associada a <i>S. boulardii</i>	6,5786	6,5562	6,2475	7,1633	7,1636	0,2820
<i>E.coli</i> Nielsen associada a <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905	6,2041	6,9445	6,9912	5,5185	5,6628	0,4610
<i>E.coli</i> Nielsen associada a <i>S. cerevisiae</i> BY4741	6,6812	6,5315	6,6128	7,3054	7,5911	0,0940
<i>E.coli</i> Nielsen associada a <i>S. cerevisiae</i> BY4741 controle positivo	7,7704	7,4029	6,7708	6,8540	6,7824	0,0240
<i>E.coli</i> Nielsen associada a <i>S. cerevisiae</i> BY4741 controle negativo	6,5051	6,5911	5,9031	7,3365	7,5185	0,4220
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	7,2520	7,1648	7,0514	7,6502	7,2743	
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285 associada a <i>S. boulardii</i>	7,3007	7,0926	7,1951	7,2260	7,1579	0,4530
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285 associada a <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905	6,4771	6,4150	6,9823	6,7160	6,6812	0,002
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285 associada a <i>S. cerevisiae</i> BY4741	6,7414	7,0207	7,3798	7,2689	6,8997	0,199
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285 associada a <i>S. cerevisiae</i> BY4741 controle positivo	7,5009	7,1829	7,3866	7,0990	7,5741	0,619
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285 associada a <i>S. cerevisiae</i> BY4741 controle negativo	7,2459	6,6028	6,9609	7,5874	7,1608	0,4080
<i>Bifidobacterium longum</i>	6,3778	7,5601	6,7204	6,2473	7,0246	
<i>Bifidobacterium longum</i> associada a <i>S. boulardii</i>	6,3597	7,1064	6,5158	6,6897	7,1857	0,9610
<i>Bifidobacterium longum</i> associada a <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905	8,4393	8,3874	6,6435	6,5441	6,7709	0,2800
<i>Bifidobacterium longum</i> associada a <i>S. cerevisiae</i> BY 4741	6,6990	6,7297	7,6434	7,5482	7,6382	0,1870
<i>Bifidobacterium longum</i> associada a <i>S. cerevisiae</i> BY 4741 controle positivo	5,0000	8,5514	7,4150	6,1761	6,2304	0,8680
<i>Bifidobacterium longum</i> associada a <i>S. cerevisiae</i> BY 4741 controle negativo	6,9243	6,9152	7,5558	7,5059	6,7538	0,2670
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> H2b20	5,8368	6,1431	7,1883	7,4515	7,0168	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> H2b20 associada a <i>S. boulardii</i>	6,9487	7,1910	6,9262	7,6780	6,6721	0,3460
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> H2b20 associada a <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905	6,7993	6,7993	6,9191	6,7782	7,2765	0,5820
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> H2b20 associada a <i>S. cerevisiae</i> BY 4741	8,0359	7,4809	6,0335	7,3875	7,2104	0,3010
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> H2b20 associada a <i>S. cerevisiae</i> BY 4741 controle positivo	6,7899	6,8581	6,6785	6,5356	6,6615	0,9450
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> H2b20 associada a <i>S. cerevisiae</i> BY 4741 controle negativo	7,2324	6,7427	6,8607	6,7268	6,7305	0,6990

Em negrito grupos controles.

Anexo 13 – Artigos publicados e aceitos