

SIMONE DE VASCONCELOS GENEROSO

**LEVEDURAS PROBIÓTICAS NO PROCESSO DE
TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA EM MODELO
EXPERIMENTAL DE OBSTRUÇÃO INTESTINAL
EM CAMUNDONGOS**

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2010

SIMONE DE VASCONCELOS GENEROSO

**LEVEDURAS PROBIÓTICAS NO PROCESSO DE
TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA EM MODELO
EXPERIMENTAL DE OBSTRUÇÃO INTESTINAL
EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso
Co-Orientador: Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2010

Aos meus pais e ao meu irmão,
amores da minha vida...

AGRADECIMENTOS

Eis a tese pronta! E uma conclusão: escrever os agradecimentos talvez seja tão difícil quanto elaborá-la... Tantas pessoas colaboraram direta ou indiretamente nestes quatro anos de intenso trabalho, algumas com sugestões e discussões, outras com o apoio, carinho e paciência (talvez mais importante). Gostaria de citar algumas dessas pessoas:

Ao Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso - FAFAR/UFMG, meu orientador, pelos ensinamentos, paciência, confiança, e estímulos necessários para a construção e viabilização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli – ICB/UFMG, meu co-orientador, pela presença constante, discussão de idéias, sugestões e pelo intenso apoio.

A Prof. Dra. Isabel Correia – Faculdade de Medicina/UFMG, minha admiração de longa data, pelo incentivo, aprendizagem, pelos preciosos conselhos e pelo apoio nos congressos.

A minha família: mãe, pai e irmão, pelo amor incondicional, apoio, paciência e incentivos sempre.

A Prof. Dra. Simone Diniz – FAFAR/UFMG por toda a ajuda e disponibilização de materiais para a realização das pesquisas.

Aos colegas do Laboratório de Radioisótopos/ FAFAR em especial Luciene Mota e André Luiz pelas idéias, discussões e amizade.

MINHAS MÃOS DIREITAS, amigas, colegas de trabalho, companheiríssimas: Mirelle Lomar Viana, Rosana das Graças e Iara Quirino. Sem vocês nada disso seria possível.

Aos colegas de trabalho do laboratório de Microbiologia do ICB/ UFMG, em especial ao Dr. Flaviano Martins, pelo apoio, presença constante e ajuda preciosa em todos os momentos.

A Prof. Dra. Rosa Arantes, Laboratório de Patologia do ICB/UFMG, pelas análises histológicas além de suas idéias e discussões construtivas.

Ao Prof. José Augusto, Programa de Pós Graduação da Santa Casa, pela ajuda nas análises imunológicas.

Ao Prof. Dr. Roberto Junqueira pela sua atenção e ajuda nas análises estatísticas.

A médica veterinária Adelaide e ao funcionário do biotério Batista, por toda sua paciência e disposição em ajudar.

Ao meu namorado, Rafael, pelo carinho, apoio, paciência e ajuda. Minha amiga Bia, sempre presente, por todo apoio e pela sua amizade. A minha amiga Isabella, a minha vó, tias, tios, primos, Kel, Camila, e minha madrinha, apoio constante!

Ao CNP e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

A todos que de certa forma contribuíram para a execução deste trabalho.

*“Suba o primeiro degrau.
Não é necessário que você veja
toda a escada. Apenas dê o
primeiro passo”
(Martin Luther King)*

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	09
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 Microbiota Intestinal.....	17
2.1.1 Considerações Gerais.....	17
2.1.2 Estabelecimento da microbiota intestinal.....	17
2.1.3 Fatores relacionados à colonização do trato gastrointestinal.....	19
2.1.4 Ações da microbiota sob o hospedeiro.....	20
2.2 Probióticos.....	22
2.2.1 Definição.....	22
2.2.2 Tipos de probióticos.....	22
2.2.3 Viabilidade dos probióticos.....	23
2.2.4 Mecanismos de ação dos probióticos.....	24
2.2.5 Efeitos benéficos dos probióticos.....	26
2.2.6 A levedura <i>Saccharomyces boulardii</i>	28
2.2.6.1 Considerações gerais.....	28
2.2.6.2 Benefícios da levedura na saúde humana	29
2.2.7 A levedura UFMG 905.....	31
2.3 Translocação Bacteriana.....	33
2.3.1 Considerações gerais.....	33
2.3.2 Mecanismos da translocação bacteriana.....	34
2.3.2.1 Crescimento bacteriano exagerado.....	35
2.3.2.2 Alterações na barreira intestinal.....	36
2.3.2.2.1 Permeabilidade intestinal.....	36

2.3.2.3 Resposta imunológica.....	38
2.3.3 Probióticos e translocação bacteriana.....	41
2.4 Obstrução Intestinal.....	43
2.4.1 Definição.....	43
2.4.2 Fisiopatologia.....	43
2.4.3 Obstrução intestinal e translocação bacteriana.....	44
2.5 Isótopo Radioativo.....	45

CAPITULO I - O tratamento com células viáveis e não viáveis de <i>Saccharomyces boulardii</i> preserva a integridade intestinal e reduz a translocação bacteriana num modelo de obstrução intestinal em camundongos.....	46
---	-----------

RESUMO.....	46
--------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO.....	47
--------------------------	-----------

2 MÉTODOS.....	48
-----------------------	-----------

2.1 Microrganismos.....	48
-------------------------	----

2.2 Camundongos.....	48
----------------------	----

2.3 Delineamento experimental.....	49
------------------------------------	----

2.4 Procedimento cirúrgico.....	49
---------------------------------	----

2.5 Procedimento de marcação da <i>E. coli</i>	49
--	----

2.6 Determinação da translocação bacteriana.....	50
--	----

2.7 Determinação da permeabilidade intestinal.....	50
--	----

2.8 Análise histológica.....	51
------------------------------	----

2.9 Determinação da IL-10 e INF- γ	52
---	----

2.10 Dosagem de sIgA.....	52
---------------------------	----

2.11 Análises estatísticas.....	52
---------------------------------	----

3 RESULTADOS.....	53
--------------------------	-----------

3.1 Ingestão alimentar e ganho de peso.....	53
---	----

3.2 Avaliação da translocação bacteriana.....	53
---	----

3.3 Permeabilidade intestinal.....	54
------------------------------------	----

3.4 Avaliação da histologia intestinal.....	54
---	----

3.5 Análise dos níveis séricos de IL-10 e INF- γ	57
---	----

3.6 Análise dos níveis intestinais de sIgA.....	58
4 DISCUSSÃO.....	60
CAPITULO II - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG 905 protege contra a translocação bacteriana, preserva a integridade da barreira intestinal e estimula o sistema imunológico em modelo de obstrução intestinal em camundongos.....	65
RESUMO.....	65
1 INTRODUÇÃO.....	66
2 MÉTODOS.....	67
2.1 Microrganismos.....	67
2.2 Camundongos.....	67
2.3 Delineamento experimental.....	67
2.4 Procedimento cirúrgico.....	68
2.5 Procedimento de marcação da <i>E. coli</i>	68
2.6 Determinação da translocação bacteriana.....	69
2.7 Determinação da permeabilidade intestinal.....	69
2.8 Determinação da IL-10 e INF- γ	70
2.9 Dosagem de sIgA.....	70
2.10 Análise histológica.....	70
2.11 Análises estatísticas.....	70
3 RESULTADOS.....	71
3.1 Avaliação da ingestão e ganho de peso.....	71
3.2 Efeito do probiótico no processo de translocação bacteriana.....	71
3.3 Avaliação da permeabilidade intestinal.....	72
3.4 Níveis séricos de IL-10 e INF- γ	73
3.5 Níveis intestinais de sIgA.....	74
3.6 Análise histológica.....	75
4 DISCUSSÃO.....	77
3 CONCLUSÕES INTEGRADAS.....	82
4 PERSPECTIVAS.....	83
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	84

LISTA DE TABELAS

[REVISÃO BIBLIOGRÁFICA]

- | | | |
|---|--|----|
| 1 | Gêneros e espécies predominantes de bactérias que colonizam o intestino do lactente..... | 18 |
| 2 | Microrganismos com propriedades de probióticos..... | 23 |

[CAPÍTULO I]

- | | | |
|-----|--|----|
| I.1 | Biodistribuição da ^{99m}Tc - <i>E.coli</i> | 53 |
|-----|--|----|

[CAPITULO II]

- | | | |
|------|--|----|
| II.1 | Biodistribuição da ^{99m}Tc - <i>E.coli</i> | 71 |
|------|--|----|

LISTA DE FIGURAS

[REVISÃO BIBLIOGRÁFICA]

1	Fatores que regulam a colonização e a estabilidade da microbiota intestinal..	19
2	Representação esquemática da interação entre probióticos e a mucosa intestinal.....	25
3	Visão microscópica da levedura <i>Saccharomyces boulardii</i>	29
4	Mecanismos de translocação bacteriana.....	34
5	Diagrama simplificado mostra como células imunológicas podem reagir ao conteúdo luminal via receptores de antígenos específicos de células T	37
6	Mecanismos da resposta imunológica na TB.....	40

[CAPITULO I]

I.1	Permeabilidade intestinal.....	54
I.2	Cortes histológicos da mucosa do intestino delgado de animais.....	56
I.3	Níveis de citocinas IL-10 no plasma dos animais.....	57
I.4	Níveis de citocinas INF- γ no plasma dos animais.....	58
I.5	Níveis de slgA no fluido intestinal dos animais.....	59

[CAPITULO II]

II.1	Permeabilidade intestinal.....	72
II.2	Níveis de citocinas IL-10 no plasma dos animais.....	73
II.3	Níveis de citocinas INF- γ no plasma dos animais.....	74
II.4	Níveis de slgA no fluido intestinal dos animais.....	75
II.5	Cortes histológicos da mucosa do intestino delgado de animais.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TB	- Translocação bacteriana
OI	- Obstrução Intestinal
<i>S.b</i>	- <i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>S.c</i>	- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFMG 905
<i>E.coli</i>	- <i>Escherichia coli</i>
DTPA	- Ácido dietilenotriaminopentacético
^{99m} Tc	- 99m-Tecnécio
^{99m} Tc - <i>E.coli</i>	- <i>Escherichia coli</i> marcada com tecnécio
^{99m} Tc - DTPA	- Ácido dietilenotriaminopentacético marcado com tecnécio
<i>S. boulardii</i>	- <i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>S. cerevisiae</i>	- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 905
LMN	- Linfonodos mesentéricos
IFN-γ	- Interferon- γ
IL-10	- Interleucina-10
slg A	- Imunoglobulina A secretória
TGI	- Trato gastrointestinal
UFC	- Unidade formadora de colônia
LPS	- Lipopolissacarídeo
<i>V.cholerae</i>	- <i>Vibrio cholerae</i>
<i>C. difficile</i>	- <i>Clostridium difficile</i>
GALT	- Tecido linfóide associado à mucosa gastrintestinal
Ig A	- Imunoglobulina A
IL-1	- Interleucina-1
IL-4	- Interleucina-4
IL-5	- Interleucina-5
IL-6	- Interleucina-6
IL-12	- Interleucina-12
IL-13	- Interleucina-13
TNF-α	- Fator de necrose tumoral –α
NK	- <i>Natural Killer</i>
RNA _m	- Ácido Ribonucleico
TGF-β	- Fator de transformação do crescimento beta
CD	- Células dendríticas
CO ₂	- Gás carbônico
MBq	- Megabequerel
⁹⁹ Mo	- 99-Molibidênio
CPM	- Contagem por minuto

RESUMO

Existem evidências dos efeitos benéficos dos probióticos na proteção da barreira intestinal e modulação da função imunológica, reduzindo a translocação bacteriana (TB). O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos das células viáveis e não viáveis dos probióticos, *Saccharomyces boulardii* (Sb) e *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 (Sc) na TB induzida em modelo murino de obstrução intestinal (OI), assim como os mecanismos de ação. Foram utilizados 6 grupos de animais. Grupo I: Sham; Grupo II: OI; Grupo III: OI + Sb; Grupo IV: OI + Sb não viável, Grupo V: OI + Sc ; Grupo VI: OI + Sc não viável. Os animais receberam durante 10 dias por gavagem solução salina (grupos I e II) ou tratamento com células viáveis ou não viáveis dos respectivos probióticos os (III a VI). No décimo dia, todos os camundongos foram submetidos a OI, exceto o grupo I. A TB que foi determinada por meio da captação de ^{99m}Tc-*Escherichia coli* no sangue, linfonodos mesentéricos, fígado, baço e pulmões e foi significativamente maior no grupo II em relação ao grupo I. Os tratamentos com ambas as leveduras, com células viáveis e não viáveis, reduziram a TB para o sangue e todos os órgãos investigados, além de inibirem o aumento da permeabilidade intestinal, conforme determinado pela captação no sangue do ^{99m}Tc-DTPA. Esses dados foram coerentes com o exame histológico intestinal que mostrou lesões mais graves no grupo II quando comparado aos grupos I e tratados com probióticos. Além disso, os tratamentos com probióticos foram capazes de aumentar significativamente ($p < 0,05$) os níveis de IL-10, e tiveram o mesmo efeito sobre os níveis de sIgA quando comparados com os animais do grupo II. O grupo VI foi o único a não apresentar aumento significativo nos níveis de sIgA. Concluindo, os tratamentos com os dois probióticos viáveis ou não foram capazes de impedir a TB, provavelmente por imunomodulação e pela manutenção da integridade da barreira intestinal. No caso da levedura *S. cerevisiae* UFMG 905 alguns de seus efeitos, como estímulo à produção de sIgA, parecem depender de sua viabilidade.

Palavras-chaves: probióticos, translocação bacteriana, *Escherichia coli* marcada com tecnécio- 99m, permeabilidade intestinal, resposta imunológica, *Saccharomyces*.

ABSTRACT

There is evidence of the beneficial effects of probiotics in the intestinal mucosa protection and modulation of immune function, reducing bacterial translocation (BT). The aim of this study was to evaluate the effects of viable cells and nonviable probiotics, *S. boulardii* and *S. cerevisiae* (UFMG 905) in BT as well as its means of action in model intestinal obstruction (IO) in mice. We used 6 groups. Group I: Sham operated, Group II: intestinal obstruction (IO), Group III: IO+Sb and Group IV: IO+not viable Sb, Group V: IO+Sc, Group VI: IO+ not viable Sc. Animals in groups I and II were given for 10 days, gavage saline, and the animals in other groups received their treatments by gavage with probiotics. In 10 day all mice underwent the operation for the promotion of IO, except the Sham group. BT was determined by uptake of ^{99m}Tc -*E.coli* in the blood, lymph nodes, liver, spleen and lungs was significantly higher in group II than in group Sham. Treatment with both yeasts, with both viable and non viable cells, reduced BT in the blood and all organs investigated, in addition to inhibiting the increase in intestinal permeability, as determined by uptake in the blood of ^{99m}Tc -DTPA. These data were confirmed by histology as intestinal histopathological lesions were more severe in the IO group compared to Sham and treated groups. Furthermore, treatments with probiotic were able to significantly increase the levels of IL-10 ($p < 0.05$) and had the same effect on the levels of sIgA compared with the animals in group IO. The group IO+not viable Sc, was an exception since they were not observed significant increases in the levels of sIgA. In conclusion, treatments with both probiotics were able to prevent BT probably through immunomodulation and maintaining the integrity of the intestinal barrier. In the case of the yeast *S. cerevisiae* UFMG 905 some of its effects as stimulating the production of sIgA seem to depend on their viability.

KEYWORDS: probiotics, bacterial translocation, *Escherichia coli* labeled with technetium-99m, intestinal permeability, immune response, *Saccharomyces*.

1 INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal (TGI) desempenha outras funções além do simples processo de digestão, absorção e excreção dos alimentos (ISOLAURI et al., 2004; MACFIE et al., 2006). Ele é considerado o maior órgão imunológico do corpo, atuando também como barreira contra patógenos e antígenos do lúmen intestinal (GATT et al., 2007). Além disso, abriga complexo e diverso ecossistema de microrganismos que interagem entre si e com o hospedeiro mantendo uma relação de simbiose (RESTALLENERT & BARRETT et al., 2003).

Existem, porém alguns fatores que podem interferir na homeostase do TGI, rompendo o equilíbrio entre a barreira intestinal e o conteúdo presente no lúmen, promovendo a passagem de microrganismos através da barreira, para os linfonodos mesentéricos (LMN) e outros órgãos, evento conhecido como translocação bacteriana (TB) (GATT et al., 2007).

Os possíveis mecanismos envolvidos na TB são: supercrescimento microbiano, deficiência do sistema imunológico e aumento da permeabilidade ou danos na barreira da mucosa intestinal (WIEST & RATH, 2003; GATT et al., 2007). A translocação de bactérias e endotoxinas através da mucosa intestinal pode ser responsável pela liberação de mediadores e ativação de células imunológicas que contribuem para o desenvolvimento de inflamação sistêmica e falência múltipla de órgãos (TIMMERMAN et al., 2007).

A prevalência da TB é em torno de 15% nos pacientes submetidos a cirurgias eletivas e ocorre mais frequentemente em pacientes com alterações intestinais, como obstrução e isquemia intestinal, câncer de cólon retal, uso de nutrição parenteral ou antibioticoterapia. Pode ocorrer também em pacientes em choque, com pancreatite ou icterícia obstrutiva, desnutridos ou imunossuprimidos (WIEST & RATH, 2003; MACFIE, 2004). Esses pacientes normalmente apresentam alteração da barreira intestinal, aumento da permeabilidade e resposta inflamatória sistêmica podendo evoluir para sepse e óbito (TIMMERMAN et al., 2007).

Devido ao potencial efeito benéfico da microbiota na função intestinal e imunológica, tornou-se crescente o interesse na utilização de probióticos na medicina clínica para prevenção e tratamento de várias patologias (KELLY et al., 2007). Há evidências convincentes de que a terapia direcionada ao intestino melhora os resultados clínicos de vários pacientes críticos (DEITCH, 2002; MCNAUGHT et al.,

2005). Sendo assim, a manutenção de balanço ecológico estável no trato gastrointestinal seria o maior mecanismo de defesa na prevenção da TB (SALZEDAS-NETTO et al., 2006).

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Embora essa definição enfatize a necessidade da viabilidade dos probióticos, alguns autores têm demonstrado que mesmo mortos pelo calor ou por raios ultravioletas, os componentes destes microrganismos, como a parede das suas células, também podem ser eficazes mantendo os mesmos efeitos benéficos das células viáveis (KATARIA et al., 2009; MAEDA et al., 2009; ADAMS et al., 2010). Foram evidenciados vários benefícios com a utilização dos probióticos na promoção da saúde e prevenção de doenças. Eles têm sido utilizados com eficácia na diminuição da gravidade e duração da diarreia por rotavírus e outros agentes patológicos, alergias, dermatite atópica, e algumas doenças inflamatórias do trato gastrointestinal (KATARIA et al., 2009; LI et al., 2009; NG et al., 2009). Contudo, os mecanismos pelos quais os probióticos exercem seus efeitos benéficos ainda não foram completamente identificados. Existem evidências de que eles podem interferir na modulação do sistema imunológico tanto por via sistêmica quanto local (na mucosa intestinal), e atuar na preservação da barreira e da permeabilidade intestinal. Além disso, sabe-se, que há diferenças significativas nos mecanismos de ação e nos benefícios entre as diferentes espécies de probióticos (NG et al., 2009).

Saccharomyces boulardii é uma levedura não patogênica utilizada como probiótico, sendo praticamente a única levedura comercializada em medicina. Entretanto, outras leveduras de origem ambiental ou agroindustrial com propriedades bioterapêuticas similares ou até melhores, certamente existem, principalmente considerando a rica biodiversidade encontrada nos ecossistemas microbianos brasileiros (MARTINS et al., 2005b). Baseado nessas evidências, o Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais isolou nova linhagem de probiótico, *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 com características semelhantes ao *S. boulardii* demonstradas em estudos *in vitro* e *in vivo* (MARTINS et al., 2005b; MARTINS et al., 2007).

Alguns trabalhos prévios mostraram a capacidade do *S. boulardii*, em reduzir a TB (HEREK et al., 2004; GEYIK et al., 2006) assim como MARTINS et al. (2007) demonstraram a proteção do probiótico *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 contra a

translocação da *Salmonella* Typhimurium. Porém, o modo como essas leveduras agem na proteção da TB ainda não foi completamente elucidado.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o papel dos probióticos *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 na TB utilizando modelo experimental de obstrução intestinal em camundongos. Além disso, foram avaliados os possíveis mecanismos de ação desses probióticos pela determinação da permeabilidade intestinal, avaliação dos aspectos histológicos da mucosa intestinal e do comportamento imunológico, seja por resposta local (determinação de sIgA no fluido intestinal) ou sistêmica (determinação das citocinas IL-10 e INF- γ , no soro) além da análise da viabilidade celular para ambos os probióticos. Ressalta-se que, para estudos de permeabilidade intestinal empregou-se método inovador, desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Radioisótopos da Faculdade de Farmácia da UFMG, utilizando o ácido dietilenotriaminopentácetico (DTPA) marcado com o isótopo radioativo tecnécio-99m.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Microbiota Intestinal

2.1.1 Considerações Gerais

O trato gastrointestinal dos mamíferos abriga uma comunidade microbiana que é extremamente densa e diversa, estimada em 10^{14} unidades formadoras de colônias (UFC) de microrganismos, número que supera em dez vezes o total de células eucariontes que constituem o corpo humano (MOUNTZOURIS & GIBSON, 2005; BRANDT et al., 2006).

As bactérias estão distribuídas em todo o trato gastrointestinal (TGI), porém de forma heterogênea (BRANDT et al., 2006). Estima-se que o número de espécies bacterianas diferentes no TGI esteja em torno de 700 a 1000, embora estudos mais recentes indiquem que somente 30 a 40 destas espécies conseguem atingir níveis dominantes, desempenhando funções para o hospedeiro que as aloja. A microbiota intestinal varia qualitativamente, quantitativamente e metabolicamente, dependendo da porção anatômica colonizada, da espécie animal e da idade do hospedeiro (MARTINS et al., 2005a).

2.1.2 Estabelecimento da microbiota intestinal

Logo após o nascimento, o intestino que era estéril, começa a ser colonizado por bactérias anaeróbias facultativas e anaeróbias estritas. O primeiro contato do hospedeiro com bactérias ocorre no canal vaginal durante o nascimento. Fatores como a microbiota do trato vaginal da mulher; condições sanitárias, técnicas obstétricas (parto cesáreo ou vaginal) e tipo de alimentação (amamentação no seio ou por fórmula) têm efeitos sobre a quantidade e a variedade de espécies que vão colonizar o intestino da criança (KELLY et al., 2007; ISOLAURI et al., 2004).

Durante a primeira semana de vida, bactérias anaeróbias facultativas, tais como enterobactérias e enterococos são as colonizadoras iniciais do intestino. Elas são seguidas por bactérias mais estritamente anaeróbias como bifidobactérias. A colonização inicial do intestino por bactérias anaeróbias facultativas leva a uma

redução do potencial redox no lúmen intestinal que por sua vez, acredita-se ser o pré-requisito para subsequente colonização por bactérias anaeróbias estritas (MOUNTZOURIS & GIBSON, 2005; KELLY et al., 2007).

Os gêneros e espécies de bactérias predominantes isolados das fezes de lactentes estão representados na TAB. 1.

TABELA 1 - Gêneros e espécies predominantes de bactérias que colonizam o intestino do lactente

Anaeróbias facultativas		Anaeróbias estritas	
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. breve</i> <i>B. longum</i> <i>B. adolescentis</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. infantis</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>B. fragilis</i> <i>B. distasonis</i> <i>B. vulgatus</i> <i>B. ovatus</i> <i>B. thetaiotaomicron</i> <i>B. uniformis</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	<i>Clostridium</i>	<i>C. perfringens</i> <i>C. difficile</i> <i>C. butyricum</i> <i>C. tertium</i> <i>C. paraputrificum</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. brevis</i> <i>L. salivarius</i> <i>L. plantarum</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>E. aerofaciens</i> <i>E. lentum</i> <i>E. rectale</i> <i>V. parvula</i>
<i>Proteus</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>Veillonellae</i>	<i>P. saccharolyticus</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i>	<i>Peptococcus</i>	<i>P. productus</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>P. anaerobius</i>

FONTE: MOUNTZOURIS & GIBSON, 2005.

2.1.3 Fatores relacionados à colonização do trato gastrointestinal

A colonização do trato gastrointestinal pela microbiota é um processo complexo e multifatorial, que envolve fatores ambientais, alimentares, associados aos microrganismos e relacionados ao hospedeiro (FIG. 1) (MOUNTZOURIS & GIBSON, 2005; BRANDT et al., 2006; KELLY et al., 2007).

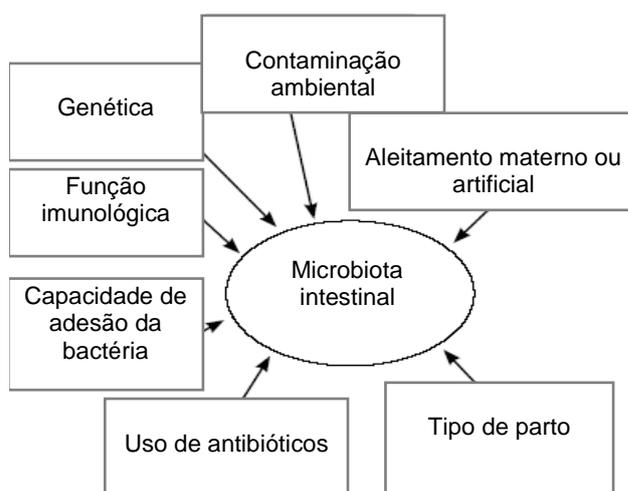


FIGURA 1. Fatores que regulam a colonização e a estabilidade da microbiota intestinal (BRANDT et al., 2006).

Para que ocorra a colonização do cólon, as bactérias têm que encontrar um habitat apropriado para adesão ao intestino. Quatro habitats bacterianos característicos foram descritos no intestino: o lúmen intestinal, a camada de muco, as criptas intestinais, e as superfícies das células epiteliais (MOUNTZOURIS & GIBSON, 2005; LUTGENDORFF et al., 2008).

O estômago e o intestino delgado são ambientes desfavoráveis para a colonização e proliferação bacteriana pela ação do suco gástrico, da bile, da secreção pancreática e pelo intenso peristaltismo do intestino delgado. O íleo é um sítio de transição bacteriológica, entre a escassa população bacteriana do jejuno e a densa microbiota do cólon. No cólon as bactérias encontram condições favoráveis para sua proliferação devido ao peristaltismo lento e abundante suprimento nutricional (BRANDT et al., 2006; LUTGENDORFF et al., 2008).

A colonização do trato gastrointestinal é influenciada também, pela capacidade de ligação das bactérias em receptores denominados sítios de adesão na mucosa intestinal. As espécies com esta característica tendem a colonizar de forma permanente o trato gastrointestinal, sem necessidade de reintrodução periódica, e constituem a denominada microbiota autóctone. Por outro lado, espécies alóctones são aquelas externas ao ecossistema intestinal, sem adequada capacidade de aderir a mucosa, e que transitam no local num determinado instante (BRANDT et al., 2006; LUTGENDORFF et al., 2008).

As superfícies microbianas que estão em contato com as células do hospedeiro devem ser aceitas imunologicamente pelo hospedeiro para evitar o desencadeamento de reações inflamatórias danosas. Para continuar no intestino, os microrganismos colonizadores devem ser capazes de sobreviver às condições físicoquímicas do intestino (fluxo intestinal para a digestão, pH e potencial redox) e competir de forma bem sucedida, com as espécies já estabelecidas e outras que estejam tentando ocupar os mesmos sítios intestinais (MOUNTZOURIS & GIBSON, 2005).

A microbiota intestinal autóctone modifica-se durante a infância, antes de tornar-se mais estável em relação às espécies bacterianas e nível populacional ao longo do tempo, acompanhando o indivíduo durante toda a vida (CHAPMAN & SANDERSON, 2005; BRANDT et al., 2006).

2.1.4 Ações da microbiota sob o hospedeiro

Nos últimos anos, estudos clínicos e experimentais têm evidenciado que a interação microrganismo-hospedeiro pode influenciar favoravelmente a saúde humana de diversas maneiras (ISOLAURI et al., 2004; OHASHI & USHIDA, 2009).

HOOPER & GORDON (2001), investigaram extensivamente o papel da microbiota sobre a função intestinal. Em modelo de camundongo gnotobiótico (isento de germes colonizado com bactérias conhecidas), esses pesquisadores conseguiram demonstrar mudanças e maturação na função intestinal medidas pela expressão dos genes de uma série de marcadores relacionados com a nutrição, com a função de barreira, com angiogênese e com a diferenciação celular intestinal relacionada a função imunológica.

Podem-se definir alguns benefícios propiciados pela microbiota como: funções antibacterianas, metabólicas, nutricionais e imunomoduladoras (ISOLAURI et al., 2004; BRANDT et al., 2006)

Função antibacteriana → as bactérias autóctones exercem proteção ecológica intestinal, impedindo o estabelecimento das bactérias patogênicas. A resistência à colonização é a primeira linha de defesa contra a invasão por patógenos oportunistas. Isto acontece por meio da produção de bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, produção de ácidos orgânicos, competição por nutrientes e, por sítios de adesão na mucosa (SULLIVAN & NORD, 2005; BRANDT et al., 2006).

Função nutricional e metabólica → a ação das bactérias sob determinados nutrientes permite o estabelecimento de funções bioquímicas e digestivas, destacando-se: recuperação de energia devido à fermentação de carboidratos e proteínas da dieta que alcançam intactas o colón; e síntese de vitaminas do complexo B e vitamina K. Os ácidos graxos de cadeia curta podem exercer efeito antimicrobiano por diminuir o pH da luz intestinal, facilitando também a absorção de água e sais no colón (MOUNTZOURIS et al., 2002; ISOLAURI et al., 2004). Há outras atividades metabólicas da microbiota cuja consequência para o organismo humano ainda é pouco compreendida como a conversão do colesterol em coprostanol, de bilirrubina em urobilina e a inativação da tripsina (BRANDT et al., 2006).

Função imunológica → além das funções antimicrobianas, bioquímicas e digestivas no seu hospedeiro, a microbiota indígena desempenha papel imunológico extremamente importante. A microbiota interage com as células do epitélio do hospedeiro provocando modulação contínua do sistema imunológico. Nos estudos realizados em modelos de animais isentos de germes, observou-se que a mucosa intestinal apresentou baixa densidade de células linfóides, baixo número de placas de Peyer com dimensões reduzidas e mínima concentração de imunoglobulinas circulantes. Após a colonização destes animais com microrganismos observou-se desenvolvimento do sistema imunológico local, com aumento das placas de Peyer, dos linfócitos intraepiteliais e das imunoglobulinas circulantes (BRANDT et al., 2006). Assim, a colonização bacteriana do trato gastrointestinal é importante para o desenvolvimento da homeostase do sistema imunológico do hospedeiro (OHASHI & USHIDA, 2009).

2.2 Probióticos

2.2.1 Definição

O termo “probiótico” foi utilizado pela primeira vez em 1965, em contraste com a palavra antibiótico e definido como uma substância secretada por microrganismo que estimula o crescimento de outro (TEITELBAUM & WALKER, 2002). Recentemente, probióticos foram definidos pela FAO/WHO como “microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefício à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002).

Para que um microrganismo seja considerado probiótico ele deve ser inócuo, manter-se viável durante a estocagem e transporte, sobreviver ao pH do lúmen gástrico, à ação da bile e das secreções pancreática e intestinal. Além disto, não transportar genes transmissores de resistência a antibióticos, competir por sítios de adesão, impedindo aderência de outros microrganismos patógenos e exercer benefícios ao sistema imunológico e a saúde em geral do hospedeiro (COPPOLA & GIL-TURNES, 2004; OHASHI & USHIDA, 2009).

2.2.2 Tipos de probióticos

Atualmente, vários microrganismos são utilizados como probióticos (TAB. 2) (COPPOLA & GIL-TURNES, 2004). A maioria das preparações com probióticos utiliza o grupo de bactérias designadas como do “ácido láctico” (ex. lactobacilos, estreptococos, enterococos) ou produtoras de ácido láctico (bifidobactérias) que são constituintes importantes e habituais da microbiota do TGI de humanos. Grande parte destas espécies não produz apenas ácido láctico, mas também outras substâncias antimicrobianas como peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (SULLIVAN & NORD, 2005). Entretanto, outros microrganismos como a levedura *Saccharomyces boulardii*, que não são encontrados usualmente no TGI também têm sido estudados ou comercializados (PENNER et al., 2005).

Uma vez que o probiótico não coloniza permanentemente o intestino, ele deve ser consumido diariamente em quantidades suficientes (cerca de 1×10^9 a 1×10^{10} UFC/dia), pois para exercer efeitos benéficos ao hospedeiro, seu nível populacional

intestinal após diluição pelas secreções deve ser da ordem de 10^7 UFC/g de conteúdo fecal (DUGGAN et al., 2002).

TABELA 2 – Microrganismos com propriedades probióticas.

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Outras bactérias ácido lácticas	Bactérias não ácido lácticas
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> cepa nissle
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconstoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pedicoccus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. johnssonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

FONTE: COPPOLA & GIL-TURNES, 2004.

2.2.3 Viabilidade dos probióticos

Atualmente têm-se questionado a segurança quanto à utilização de células viáveis de probióticos, uma vez que a administração oral desses microrganismos, especialmente em populações de riscos, como imunossuprimidos e prematuros, não é ausente de perigos potenciais (KATARIA et al., 2009). Os probióticos podem translocar

do lúmen intestinal para a corrente sanguínea gerando aumento acentuado da resposta inflamatória e, em alguns casos como de leveduras probióticas podem desencadear fungicemia (KATARIA et al., 2009; ADAMS et al., 2010).

Portanto, é de extremo interesse determinar se os mesmos benefícios para a saúde observados com a utilização de células viáveis de probióticos poderiam ser alcançados com suas células não viáveis (KATARIA et al., 2009).

Vários estudos têm demonstrado que mesmo mortos pelo calor ou por raios ultravioletas os probióticos manteriam os efeitos benéficos para o hospedeiro, uma vez que seus componentes, como a parede celular, continuariam a atuar de forma eficaz (KATARIA et al., 2009; ADAMS et al., 2010).

Em recente trabalho LI et al. (2009) mostraram que tanto células viáveis como não viáveis do probiótico *Lactobacillus rhamnosus GG* foi capaz de diminuir mediadores pró-inflamatórios induzidos por LPS e, também, contribuiu para aumentar os mediadores anti-inflamatórios.

Efeitos benéficos utilizando células não viáveis de probióticos também foram observados por LIM et al. (2009). Estes pesquisadores avaliaram o papel do probiótico morto no processo alérgico e observaram que os mesmos foram capazes de atuar como imunomoduladores, podendo ser utilizados na prevenção secundária ou tratamento de doenças alérgicas respiratórias.

2.2.4 Mecanismos de ação dos probióticos

O modo de ação dos probióticos ainda não foi completamente esclarecido, embora tenham sido sugeridos vários mecanismos que podem atuar independentemente ou associados (LUTGENDORFF et al., 2008; OHASHI & USHIDA, 2009). Eles podem influenciar a microbiota intestinal, a função da barreira intestinal e o sistema imunológico da mucosa (FIG. 2), exercendo seus efeitos sobre vários tipos de células envolvidas na resposta imunológica inata e adaptativa, tais como macrófagos, células B, células T, e células NK (NG et al., 2009)

Pode-se observar que os mecanismos de ação dos probióticos, assim como seus efeitos, são bastante semelhantes àqueles propostos para a microbiota intestinal autóctone (MARTINS et al., 2005a).

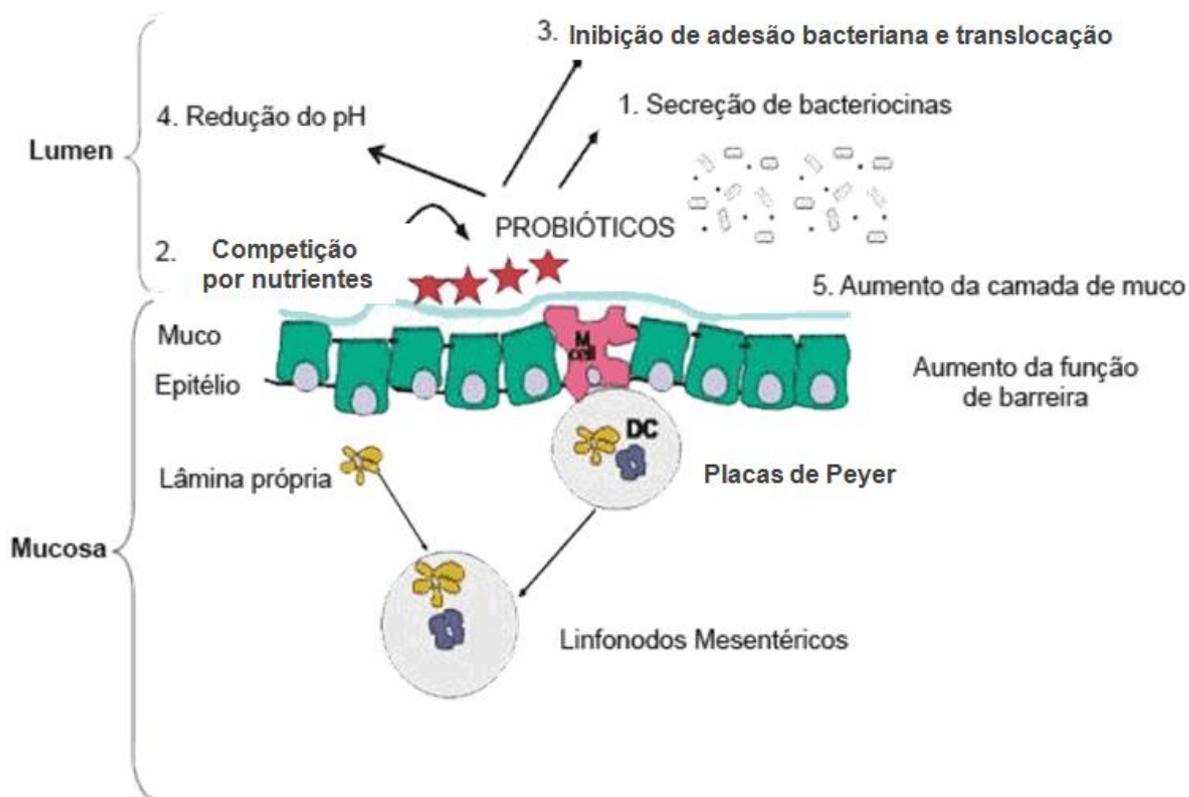


FIGURA 2. Representação esquemática da interação entre probióticos e a mucosa intestinal. Atividade antimicrobiana dos probióticos incluem a (1) produção de (2) competição por nutrientes, (3) inibição da aderência bacteriana ou translocação, e (4) redução do pH luminal. As bactérias probióticas podem também aumentar a função de barreira intestinal, por (5) aumento da produção de muco (NG et al., 2009).

Um destes mecanismos é a exclusão por competição, em que o probiótico compete com os patógenos por sítios de fixação e nutrientes, impedindo sua ação transitoriamente. A exclusão competitiva explica a necessidade da administração continuada de elevadas doses dos probióticos, para manifestar seus efeitos (COPPOLA & GIL-TURNES, 2004; NG et al., 2009).

Os probióticos podem também afetar patógenos pela síntese de bacteriocinas, de ácidos orgânicos voláteis e de peróxido de hidrogênio ou atuar sobre o metabolismo celular, reduzindo a concentração de amônia no organismo e liberando enzimas como a lactase (COPPOLA & GIL-TURNES, 2004; NG et al., 2009).

Além desses mecanismos, vários estudos têm proposto a relação dos probióticos com o aumento da defesa imunológica da mucosa, mediando o balanço da resposta inflamatória por regulação da produção de citocinas pró e antiinflamatórias (ISOLAURI et al., 2004; OHASHI & USHIDA, 2009; NG et al., 2009). O mecanismo de ação dos probióticos relacionados com o sistema imunológico ainda não foi completamente esclarecido, mas sabe-se que alguns probióticos são fagocitados pelas células especializadas no reconhecimento de antígeno (células M). Estas células por sua vez apresentam esses antígenos às células T que são estimuladas a produzirem citocinas. Além disso, elas estimulam os linfócitos B a produzirem anticorpos, especialmente sIgA, ativando dessa forma o sistema imunológico (OHASHI & USHIDA, 2009). Outro mecanismo de ação proposto seria de que as bactérias patogênicas ativam o fator de transcrição NF- κ B induzindo desta forma, resposta inflamatória nas células epiteliais intestinais. Em contrapartida, os probióticos atuam atenuando essa resposta inflamatória por bloquear a via de transcrição do NF- κ B (NG et al., 2009).

Alguns outros estudos sugerem que os probióticos também podem atuar em outros tipos de defesa que não imunológicos. Vários mecanismos de ação dos probióticos têm sido propostos para descrever seu efeito protetor na barreira intestinal e conseqüentemente na TB, como fortalecimento das junções intestinais do tipo *tight* e aumento da secreção de muco (RESTA-LENERT & BARRETT, 2003; LUTGENDORFF et al., 2008; NG et al., 2009).

Tanto a função do transporte, de barreira, da diferenciação e do *turnover* epitelial são conhecidas por regular em parte o sinal de transdução, evento originado do receptor de fator de crescimento epidérmico. A ativação deste fator causa redistribuição dos filamentos de actina para a zona apical do epitélio e incita alterações nas junções e no citoesqueleto que são associadas ao aumento da resistência transepitelial e, portanto com aumento da função de barreira. Há evidências de que os probióticos atuam nesse mecanismo diminuindo assim, a permeabilidade intestinal (RESTA-LENERT & BARRETT, 2003; NG et al., 2009).

2.2.5 Efeitos benéficos dos probióticos

Vários estudos têm demonstrado o potencial dos probióticos em contribuir para a saúde do hospedeiro (MADDEN et al., 2005; SULLIVAN & NORD, 2005; NG et al., 2009). Os principais benefícios evidenciados com o uso dos probióticos são: aumento

da tolerância à lactose; prevenção e tratamento de diarreias (induzida por antibioticoterapia; radioterapia; infecção pelo *Clostridium difficile*) e de doenças inflamatórias intestinais e gastroenterites (MARTEAU & BOUTRON-ROUULT, 2002; SULLIVAN & NORD, 2005); controle da infecção por *Helicobacter pylori* (MADDEN et al., 2005); redução de colesterol sanguíneo, prevenção de alguns tipos específicos de câncer (TEITELBAUM & WALKER, 2002) e diminuição da alergia, principalmente em recém-nascidos, por alteração do padrão de resposta imunológica do tipo Th2 para Th1 (DUGGAN et al., 2002).

Há cada vez mais evidências sobre os benefícios dos probióticos ligados a modulação da função imunológica como: aumento da produção de anticorpos; aumento da atividade das células NK; modulação da função das células dendríticas; alteração da produção de citocinas; indução da regulação das células T levando a um tônus imunológico na proporção adequada e modulação da apoptose (PENNER et al., 2005; BERMAN et al., 2006; OHASHI & USHIDA, 2009; NG et al., 2009).

MCNAUGHT et al. (2005) em um trabalho envolvendo 103 pacientes críticos, divididos em grupo controle (recebendo terapia convencional), e grupo tratado (recebendo probiótico mais terapia convencional), observaram diminuição dos níveis de IL-6 no 15º dia nos pacientes do grupo tratado. Este fato atenuou a resposta imunológica e, conseqüentemente, a resposta inflamatória sistêmica desses pacientes.

BERMAN et al. (2006), demonstraram a relação dos probióticos com o aumento da função imunológica inata. Neste estudo, 10 voluntários saudáveis utilizaram uma mistura de probióticos por oito semanas. Durante este período amostras de sangue foram coletadas para investigar a atividade fagocitária. Os resultados obtidos mostraram um significativo aumento na atividade fagocitária de monócitos e neutrófilos no decorrer do tratamento, tendo seu ponto máximo no oitavo dia.

IMAOKA et al. (2008) em um estudo *in vitro* utilizando modelo de colite, observaram um aumento na produção de IL-10 quando houve tratamento com probiótico. LI et al. (2009) tiveram resultados semelhantes, porém utilizando modelo *in vivo* de inflamação induzida pela *E. coli*. Eles verificaram que animais tratados com probióticos tiveram uma menor expressão de marcadores pró-inflamatórios induzidos pelo LPS e um aumento dos mediadores antiinflamatórios.

Os benefícios dos probióticos relacionados à proteção da mucosa intestinal também têm sido estudados nos últimos anos. Alguns trabalhos têm evidenciado o potencial dos probióticos em aumentar a função da barreira epitelial, a glicosilação das células epiteliais e a produção de sIgA. Todos esses efeitos estariam relacionados com

aumento da defesa da barreira, diminuição da permeabilidade intestinal e conseqüente proteção contra TB (ISOLAURI et al., 2004; PENNER et al., 2005; ZAREIE et al., 2006).

RESTA-LENERT & BARRETT (2003) realizaram um estudo *in vitro* utilizando linhagens de células intestinais expostas a *E. coli* e a probióticos (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus acidophilus*). Os resultados obtidos demonstraram que as células expostas aos probióticos tiveram aumento na resistência transepitelial e, que este aumento foi acompanhado por alterações no citoesqueleto levando ao aumento da resistência das junções *tight* e diminuição da permeabilidade celular.

Em estudo mais recente RESTA-LENERT & BARRETT (2006) analisaram o papel do sistema imunológico sobre a mucosa, utilizando células intestinais expostas a citocinas (IFN- γ ou TNF- α) por 48 horas e outro grupo de células intestinais expostas às mesmas citocinas mais probióticos. Os resultados demonstraram que ambas as citocinas aumentaram a permeabilidade intestinal, e que esse efeito foi minimizado pelo tratamento com probióticos.

CABALLERO-FRANCO et al. (2007) mostraram que a administração oral de probiótico em ratos, aumentou o conteúdo luminal basal de mucina em 60%. Além disso, houve aumento na expressão do RNAm e secreção de mucina extracelular, inibindo a adesão de *E. coli* enteropatogênica a células epiteliais intestinais. Este fato sugere papel protetor dos probióticos via secreção de muco.

2.2.6 *Saccharomyces boulardii*

2.2.6.1 Considerações gerais

A levedura *Saccharomyces boulardii* é um dos poucos microrganismos utilizados como probióticos que não são de origem humana (MARTINS et al., 2005a). Foi descoberta em 1920, na Indochina, onde Henri Boulard, um microbiologista francês, estava à procura de uma linhagem de levedura que fosse capaz de suportar altas temperaturas na produção de vinho. Na mesma época houve epidemia de cólera em uma das vilas que ele visitava e ele foi informado que a população local preparava um chá com a casca de uma fruta da região (lichia) para aliviar e até mesmo parar a diarreia. Posteriormente, verificou-se que a fruta estava recoberta por uma levedura, e que a eficácia contra a diarreia devia-se a ela. A levedura então descoberta foi chamada de *Saccharomyces boulardii* (MCFARLAND & BERNASCONI, 1993).

A *S. boulardii* (FIG.3) é uma levedura não patogênica, termotolerante (cresce à temperatura de 37°C) e atualmente, seu uso está muito difundido em medicina principalmente, na Europa (MARTINS et al., 2005a; CZERUCKA et al., 2007).

Destaca-se ainda que, a levedura é insensível à ação dos sucos digestivos e drogas antibacterianas. Sua administração deve ser realizada de maneira repetida e regular, pois ela não coloniza o trato gastrointestinal (GAON et al., 2003; MARTINS et al., 2005a), embora seja capaz de atingir rapidamente altas concentrações no cólon. Dois a cinco dias após a descontinuação do seu uso ela não é mais encontrada nas fezes. (MARTINS et al., 2005a).



FIGURA 3. Visão microscópica da levedura *Saccharomyces boulardii*.

Disponível em : <http://www.bioplanet.net/magazine/bio_mayjun_2000> Acesso em 03 outubro 2006.

2.2.6.2 Benefícios da levedura na saúde humana

Diversos estudos têm demonstrado alguns mecanismos de ação específicos da *S. boulardii* como: secreção de protease que cliva as toxinas produzidas pelo *C. difficile*; secreção de proteínas que exercem efeitos anti-secretórios no caso da toxina do *Vibrio cholerae*; adesão de alguns patógenos na levedura; (MARTINS et al. 2010); inibição de perdas de água, sódio e potássio induzidas pela toxina do *V. cholerae* e de *E. coli* em células epiteliais intestinais (MARTINS et al., 2005a) e adesão da toxina em receptores específicos na levedura (BRANDÃO et al., 1998).

No caso de infecções do TGI, benefícios clínicos significantes em humanos têm sido demonstrados com a utilização de *S. boulardii* como: 1. prevenção da diarreia associada à infecção por *Clostridium difficile* (SURAWICZ, 2003); 2. prevenção de

diarréia associada à antibioticoterapia (D'SOUZA et al., 2002); 3. redução de diarréias persistentes em crianças (GAON et al., 2003); e prevenção e tratamento da diarréia do viajante (MARTINS et al., 2005a).

Estudos com animais demonstraram que administração de *S. boulardii* propiciou proteção contra lesões intestinais causadas por diarréia induzida por patógenos (CZERUCKA et al., 2000). Administração de *S. boulardii* em camundongos gnotobióticos e convencionais demonstrou que a levedura protege esses animais contra infecções por *Salmonella typhimurium* e *Shigella flexneri*. (RODRIGUES et al., 1996).

Outros mecanismos de ação da levedura também evidenciados incluem: preservação da função da barreira intestinal, por meio do aumento da resistência transepitelial e imunomodulação (CZERUCKA et al., 2000), diminuição da permeabilidade intestinal (VILELA et al., 2008), além de efeitos diretos na mucosa intestinal levando a aumento da produção de sIgA (DALMASSO et al., 2006b). Todos estes mecanismos contribuem para o aumento da proteção da mucosa e conseqüente prevenção da TB.

CZERUCKA et al. (2000) realizaram estudo, *in vitro*, utilizando células humanas do colón T84, infectadas com *E. coli* e tratadas com *S. boulardii*. Os resultados obtidos demonstraram que *S. boulardii* preveniu a diminuição da resistência transepitelial causada pela infecção por *E. coli*, e preservou as junções intra-epiteliais, favorecendo a manutenção da barreira intestinal. A levedura não modificou o número de bactérias aderidas, mas reduziu em 50% o número de bactérias intracelulares, importante via para a TB.

Em um trabalho mais recente VILELA et al. (2008), avaliaram o papel do *S. boulardii* na permeabilidade intestinal em pacientes com doença de Crohn. Os resultados obtidos mostraram que os pacientes tratados com a levedura obtiveram resultados benéficos, apresentando diminuição na permeabilidade intestinal.

DALMASSO et al. (2006b) avaliaram a ação da levedura nas células inflamatórias utilizando modelo de doença infamatória intestinal. Estes autores concluíram que o *S. boulardii* age na inflamação por alteração específica do comportamento migratório das células T, que se acumulam nos linfonodos mesentéricos. Portanto, o tratamento *S. boulardii* limitaria a infiltração de células T-helper 1 em células do cólon inflamado e a inflamação induzida pela produção de citocinas pró-inflamatórias.

A influência do *S. boulardii* na secreção de citocinas de linfócitos intra-epiteliais infectados com *E. coli* e *Candida albicans* foi investigada *in vitro* por FIDAN et al. (2009). Eles observaram que a secreção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 estava diminuída nos linfócitos infectados e incubados com *S. boulardii*. Porém houve um aumento da secreção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10. Estes resultados demonstram que *S. boulardii* pode atuar reduzindo a resposta pró-inflamatória.

Alguns estudos *in vivo*, demonstraram também a capacidade do *S. boulardii* em reduzir a TB (HEREK et al., 2004; GEYIK et al., 2006). GEYIK et al. (2006), realizaram um estudo com 60 ratos em um modelo de icterícia obstrutiva. Os animais foram tratados por sete dias com salina ou *S. boulardii*, sendo observada uma redução significativa na translocação no grupo tratado com a levedura.

2.2.7 A levedura UFMG 905

Poucas leveduras têm sido estudadas como possíveis probióticos e agentes bioterapêuticos, sendo a *S. boulardii* uma das primeiras e praticamente a única comercializada e utilizada em medicina. Porém, outras *Saccharomyces* spp. ou linhagens de outros gêneros de leveduras provavelmente devem possuir atividade probiótica similar, ou melhor, que a *S. boulardii* (MARTINS et al., 2005b).

Por ser uma das maiores do mundo, a biodiversidade brasileira representa uma fonte de grande potencial para microrganismos candidatos ao uso como probióticos. Neste contexto, o Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais propôs estudar espécies de leveduras ambientais e agroindustriais isoladas no país como possíveis agentes terapêuticos (MARTINS et al., 2005b). Doze linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de diferentes fontes (insetos, frutos tropicais, queijos, estuário e alambique de cachaça) foram testadas *in vitro* e *in vivo* para avaliar uma possível capacidade probiótica. As leveduras foram testadas quanto à capacidade de sobreviver no trato digestivo de mamíferos e de proteção contra patógenos. Os dados obtidos demonstraram que a levedura *S. cerevisiae* UFMG 905, derivada da produção da cachaça, foi a única que mostrou melhores dados em relação à sobrevivência no trato digestivo e proteção contra o desafio experimental com *Salmonella* Typhimurium e *Clostridium difficile* em camundongos (MARTINS et al.,

2005b e c). Adicionalmente, os animais tratados tiveram melhor preservação dos tecidos do fígado e menor infiltrado inflamatório quando comparado com o grupo controle. Melhor preservação do trato intestinal também foi observada nos animais tratados (MARTINS et al., 2005b). Dados recentes mostraram também um efeito imunomodulador da levedura (MARTINS et al., 2007).

Estes dados sugerem que esta levedura pode inibir ou reduzir a translocação de patógenos, porém tornam-se necessários mais estudos *in vivo*, assim como a avaliação da sua função imunomoduladora e proteção da barreira intestinal, a fim de concretizar o seu possível uso como probiótico.

2.3 Translocação bacteriana

2.3.1 Considerações Gerais

O termo translocação bacteriana (TB) é definido como a passagem de microrganismos viáveis ou não e de seus produtos, como endotoxinas, do lúmen intestinal para os linfonodos mesentéricos, assim como para outros órgãos mais internos, levando a estimulação do sistema imunológico (LICHTMAN, 2001; WIEST & RATH, 2003; GATT et al., 2007). Foi evidenciado que as bactérias Gram negativas anaeróbias facultativas translocam mais facilmente que as anaeróbias estritas e as Gram positivas (WIEST & RATH, 2003), isto porque o oxigênio sanguíneo inibe o crescimento de bactérias entéricas anaeróbias (LICHTMAN, 2001).

Há várias evidências de que a TB está associada ao aumento da incidência de complicações sépticas (MACFIE et al., 1999; WIEST & RATH, 2003). A relação entre TB e sepse foi demonstrada por O'BOYLE et al., (1998), que avaliaram a TB em 448 pacientes cirúrgicos submetidos à laparotomia. Neste estudo foi realizada a cultura dos linfonodos mesentéricos e sangue dos pacientes. Os resultados obtidos mostraram que a translocação ocorreu em 15,4% dos pacientes, e que o microrganismo mais comum identificado foi *E. coli*. Além disso, 41% dos pacientes que tiveram translocação desenvolveram sepse, comparado com os 14% dos pacientes que apresentaram cultura negativa. Estes dados demonstram que a TB está associada com significativo aumento do desenvolvimento de sepse pós-operatória em pacientes cirúrgicos..

Em um trabalho mais recente MACFIE et al. (2006) avaliaram a TB em 927 pacientes e observaram sua prevalência em 14%, além de forte relação com aumento da sepse pós - operatória.

A TB também pode ocorrer em indivíduos saudáveis. Há evidências de que o processo de TB, desde que em nível baixo, possa ser um importante evento fisiológico para alertar e preparar o sistema imunológico do hospedeiro. Em recente estudo SALZEDAS-NETTO et al. (2006) demonstraram, uma redução significativa da TB quando os animais utilizados (ratos) foram previamente desafiados com a mesma bactéria utilizada para a indução da TB. Sendo assim, é possível que a TB ocorra para que o TGI possa expor amostras de antígenos do interior do lúmen, gerando células imunocompetentes, processo conhecido como tolerância oral (GATT et al., 2007).

2.3.2 Mecanismos da translocação bacteriana

Os principais mecanismos envolvidos na promoção da TB são: 1. alterações na microbiota gastrointestinal resultando em crescimento microbiano exagerado; 2. alterações físicas da barreira intestinal (por exemplo: injúria dos enterócitos devido a radiação ou a toxinas ou por redução do fluxo sanguíneo para o intestino); 3. deficiência da resposta imunológica do hospedeiro (FIG. 4) (BERG, 2001; LICHITMAN, 2001; WIEST & RATH, 2003).

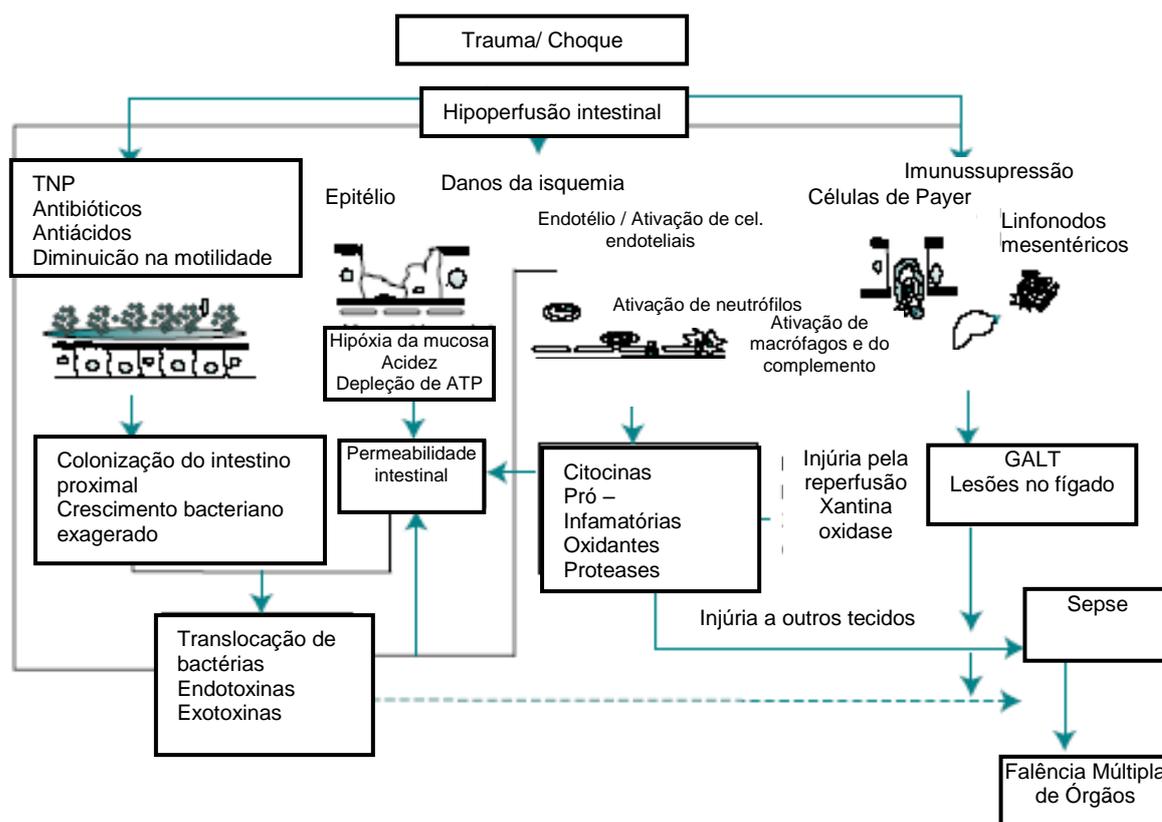


FIGURA 4. Mecanismos de translocação bacteriana. A hipoperfusão intestinal pode provocar isquemia levando a danos no epitélio, aumentando a permeabilidade intestinal. O crescimento bacteriano exagerado e alterações na barreira intestinal também contribuem para translocação. A imunossupressão contribui essencialmente para a propagação das bactérias e de seus produtos levando aos estágios de sepse e falência múltipla de órgãos (WIEST & RATH, 2003).

2.3.2.1 Crescimento bacteriano exagerado

O trato gastrointestinal é um órgão dinâmico podendo influenciar direta ou indiretamente a translocação intestinal de partículas (WIEST & RATH, 2003). Toda vez que ocorre desequilíbrio no balanço ecológico, ou seja, alteração na microbiota intestinal influenciado por antibioticoterapia, acidez gástrica, diminuição da produção de muco, icterícia obstrutiva e alterações na motilidade intestinal, o crescimento bacteriano exagerado é favorecido, levando a um aumento na colonização do trato gastrointestinal facilitando a TB (NAABER et al., 2000; BERG, 2001; WIEST e RATH, 2003).

Somente alguns tipos de bactérias intestinais são capazes de translocar para os linfonodos mesentéricos, estes incluem *E. coli*; *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococci*, e alguns *Streptococci* (WIEST & RATH, 2003).

Recentemente, tem sido demonstrado que a capacidade para translocar é melhor em algumas espécies específicas, sendo atribuída à melhor aderência e facilidade de penetração no muco e na camada epitelial quando comparado com as espécies não patogênicas. Além disso, diferença da virulência entre as espécies, adicionada à resistência do hospedeiro são fatores que determinam a sobrevivência e a propagação das espécies mais virulentas (WIEST & RATH, 2003).

A relação entre a colonização intestinal e a TB foi demonstrada por MACFIE et al. (1999), em estudo prospectivo com 279 pacientes cirúrgicos, nos quais aspirações nasogástricas foram retiradas, colocadas em meio de cultura e comparadas com as culturas obtidas do linfonodo mesentérico retirado dos mesmos durante a laparotomia. Além disso, o curso do pós-operatório de todos os pacientes foi monitorado utilizando culturas de sangue e urina, para confirmação de sepse pós-operatória. A TB foi confirmada quando as culturas dos linfonodos foram positivas. Os resultados desse estudo indicaram que a colonização bacteriana ocorreu mais freqüentemente nos pacientes idosos com enfermidades gástricas ou intestinais que necessitaram de operação de urgência. Os dados também mostraram que a colonização predispôs à translocação. A TB ocorreu em 21% dos pacientes e foi significativamente mais frequente naqueles que tiveram cultura da aspiração nasogástrica positiva. Este estudo confirma que a colonização intestinal proximal, comum em pacientes críticos, está associada com aumento da TB e da morbidade séptica.

2.3.2.2 Alterações na barreira intestinal

2.3.2.2.1 Permeabilidade intestinal

A defesa do hospedeiro contra a invasão de microrganismos consiste, principalmente, na barreira mucosa intestinal. Ela é composta por numerosos fatores locais como: muco, ácido gástrico, enzimas pancreáticas, bile, barreira celular epitelial com junções intracelulares, motilidade intestinal e bactérias que compõem a microbiota (MARCHIANDO et al., 2010).

Estruturalmente o epitélio intestinal é compreendido por camada única de células colunares organizadas entre vilosidades e criptas. A união entre os enterócitos ocorre por meio dos desmossomos, junções *tight* e Gap (WIEST & RATH, 2003). Entre os numerosos componentes da barreira intestinal, as junções paracelulares do tipo *tight* desempenham um papel essencial no controle da permeabilidade intestinal (CENAC et al., 2003). Elas permitem a comunicação intercelular e a passagem somente de pequenas moléculas, impedindo a passagem de bactérias e também de moléculas maiores, como lipolissacarídeos (WIEST & RATH, 2003).

As mucinas secretadas pelas células epiteliais criam um gel viscoso impedindo a penetração de bactérias patogênicas. O muco também age como lubrificante, reduzindo a abrasão física à mucosa e protegendo os danos induzidos por ácidos e outras toxinas luminiais. O transporte ativo de cloreto pelas células epiteliais promove um fluxo fluido intraluminal que lava os agentes danosos enquanto a bile atua diminuindo a internalização de patógenos pelo epitélio. (WIEST & RATH, 2003; MACFIE, 2004). A microbiota intestinal também atua na defesa do hospedeiro, competindo com bactérias patogênicas pelos sítios de adesão na mucosa impedindo que estas se liguem, secretando substâncias como bacteriocinas, além da competição direta por nutrientes (COPPOLA & GIL-TURNES, 2004).

Todos estes mecanismos ajudam a prevenir a ligação da bactéria ao epitélio, evento proposto como o primeiro passo para a penetração da bactéria nas células epiteliais, levando a TB (WIEST & RATH, 2003; MACFIE, 2004).

Além disso, há uma interação entre a barreira intestinal, a microbiota e o sistema imunológico que podem atuar promovendo ou impedindo doenças (FIG.5). A barreira epitelial normalmente restringe a passagem do conteúdo da luz intestinal, incluindo microrganismos e seus produtos, mas uma pequena fração desses materiais consegue passar gerando uma ativação benéfica do sistema imunológico. Porém, em situações

de desequilíbrio pode haver perda da função da barreira intestinal promovendo maior passagem do conteúdo luminal, levando a uma superativação do sistema imunológico.

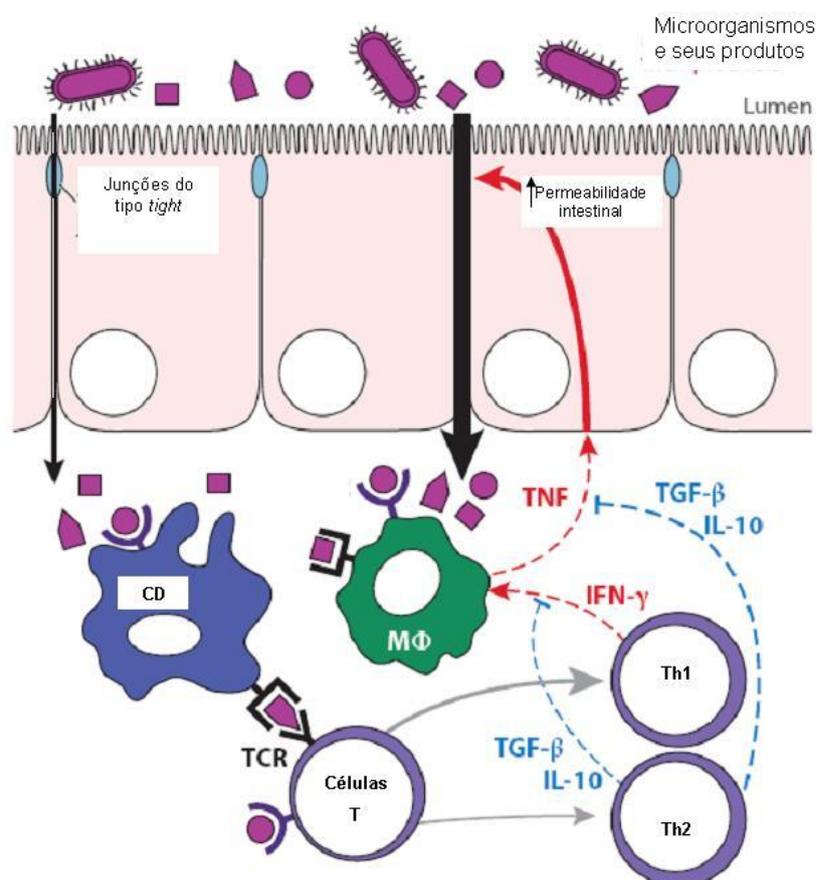


FIGURA 5 Diagrama simplificado mostra como células dendríticas (CD), macrófagos (M), e células T podem reagir ao conteúdo luminal via receptores de antígenos específicos de células T (TCR). A célula T responde a estímulos antigênicos tornando-se Th1 e Th2. Estas adaptações do sistema imunológico inato levam a liberação de citocinas que exercem efeitos inflamatórios (TNF- e IFN- γ) e antiinflamatórios (IL-10, TGF- β). Na ausência de adequada imunoregulação as citocinas pro - inflamatórias sobressaem levando a ativação de sinal de transdução e com isso, afrouxamento das junções do tipo *tight* e disfunção de barreira, o que permite um aumento na quantidade de material luminal levando a um ciclo de auto-amplificação (MARCHIANDO et al., 2010).

A avaliação das alterações na permeabilidade intestinal pode ser feita por meio de testes especificamente designados para medir a função da barreira intestinal, como a determinação da passagem paracelular de moléculas grandes como açúcares e

fármacos, do intestino para o plasma e conseqüentemente para urina (LICHITMAN, 2001; KATOUZIAN et al., 2005).

Os testes mais comuns empregados na análise da permeabilidade intestinal utilizam a medida de moléculas de polissacarídeos (ex. lactulose/ramnose), que resistem à degradação pelas dissacaridasas, na urina de 24 horas (BJARNASON, et al., 1995; KATOUZIAN et al., 2005). Porém, apesar de ser um método sensível ele apresenta algumas desvantagens como a necessidade de um volume grande de urina e por ser método caro em estudos com animais devido à utilização de gaiolas metabólicas. Além disso, sendo um açúcar ele é contra-indicado em modelos com supercrescimento microbiano, pois pode ser fermentado levando a uma leitura errada do resultado (KATOUZIAN et al., 2005).

Atualmente, substâncias marcadas com isótopos radioativos, como ^{99m}Tc -EDTA e ^{99m}Tc -DTPA também têm sido utilizadas, como alternativa, no estudo da permeabilidade intestinal tanto na urina como no plasma obtendo bons resultados (JORGENSEN et al., 2006; VARELLA et al., 2006). Em recente trabalho VIANA et al. (2009) avaliaram a permeabilidade intestinal de camundongos, submetidos a obstrução intestinal, por meio da determinação do percentual de ^{99m}Tc -DTPA encontrado no sangue dos animais, mostrando uma boa sensibilidade do método em avaliar alterações na permeabilidade celular.

2.3.2.3 Resposta imunológica

O trato intestinal é um órgão imunológico ativo, contendo todos os tipos de elementos envolvidos na resposta imunológica (BERG, 2001). O tecido linfático associado ao intestino (GALT) é o maior órgão imunológico do corpo, contendo 25% da massa das células imunológicas da mucosa. Este órgão abrange o epitélio, o interior da submucosa e da lâmina própria, incluindo mais da metade das células linfóides, placas de Peyer, epitélio folicular associado (constituído de células M), linfócitos intra-epiteliais, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (WIEST & RATH, 2003).

As células M são importante componente do GALT, pois muitas vezes constituem a defesa inicial contra os microrganismos do lúmen intestinal para o epitélio. As células M são um tipo não usual de células epiteliais, pois não possuem em sua superfície microvilosidades ou glicocálix. Elas têm citoplasma bastante prolongado com extensões para dentro da lâmina própria formando uma bolsa, onde antígenos são

fagocitados por macrófagos, e então penetram nas placas de Peyer. As placas de Peyer são formadas por folículos linfóides que liberam linfócitos após o processamento de antígenos (SAWAI et al., 2001).

Quando este sistema (FIG. 6) atua, os antígenos são transportados pelas células M até as células apresentadoras de antígenos (macrófago e células dendríticas) presentes nos linfonodos mesentéricos. Ocorre então o processamento e apresentação dos antígenos aos linfócitos T CD4⁺ e células B inativas. Estes apresentam a segunda linha de defesa contra a translocação e iniciam a produção de citocinas. Os linfócitos T induzem a produção de citocinas TH1 e TH2. Citocinas TH1 (IL-2, INF- γ e TNF- α) estimulam a imunidade celular, resultando em ativação de macrófagos, neutrófilos e linfócitos T, principalmente linfócitos TCD8⁺. As citocinas TH2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) são responsáveis pela ativação de linfócitos B, regulando deste modo a produção de anticorpos (KUDSK, 2002).

É largamente aceito que os níveis de citocinas após um insulto inflamatório, como por LPS (lipopolissacarídeos), são caracterizados por aumento inicial e subsequente diminuição do TNF- α , seguido por IL-1, IL-6 e IL-10 respectivamente. Entretanto muitos pacientes com sepse exibem elevações constantes nos níveis de TNF- α , IL-1 e IL-6 até sua morte (MARCHIANDO et al., 2010).

A presença da imunoglobulina sIgA aumenta fortemente a função de barreira do intestino, desempenhando papel fundamental na formação da resposta imunológica à colonização microbiana (RODRIGUES et al., 2000).

A sIgA é considerada um dos principais mecanismos de proteção à mucosa, pois ela se liga aos microrganismos patógenos reduzindo a associação destes com o epitélio e diminuindo assim sua penetração (BERG, 1995). SAWAI et al. (2001), em um estudo sobre os efeitos da sIgA no processo de TB sugeriram que esta imunoglobulina se liga diretamente a *E. coli*, impedindo sua aderência a superfície epitelial. Baixas concentrações de sIgA intestinal estão de fato associadas com aumento da aderência bacteriana à mucosa.

O papel das células T foi examinado em camundongos isentos de CD4⁺ ou CD8⁺, por injeção intraperitoneal de anticorpos monoclonais anti-T. A completa depleção de CD4⁺ ou CD8⁺ ou ambos no epitélio intestinal, lâmina própria e linfonodos promoveu translocação de *E.coli*. Além disto, a transferência de CD4⁺ ou CD8⁺ ou ambos para os camundongos depletados reduziu a TB. Estes resultados evidenciam que as células T desempenham importante papel na defesa do hospedeiro contra a TB (BERG, 1995).

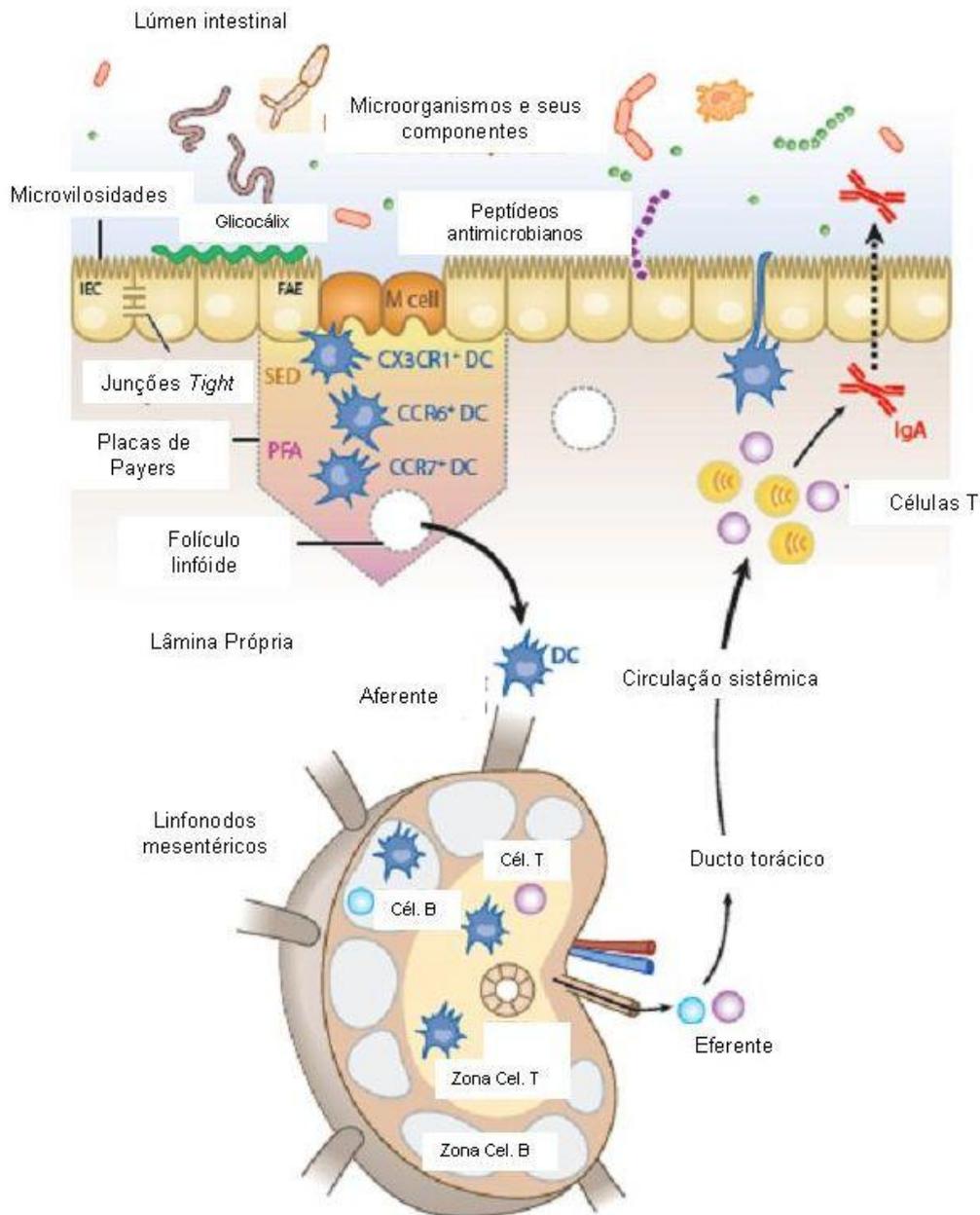


FIGURA 6. Mecanismos da resposta imunológica na TB. Células dendríticas (CD) medeiam o transporte de bactérias comensais para interior das células intestinais. As células M do epitélio intestinal podem trazer bactérias para dentro do GALT onde as CD englobam os microorganismos. CD apresenta os antígenos capturados para os linfócitos T e B localizados no GALT, ou nos linfonodos mesentéricos. A apresentação do antígeno para os linfócitos B desencadeia a produção de IgA responsável por prevenir a adesão das bactérias a mucosa (KRAEHENBUULH & CORBETT, 2004).

2.3.3 Probióticos e Translocação Bacteriana

Atualmente, o aumento de evidências sobre os benefícios da manutenção e promoção da microbiota intestinal humana tem levado ao aumento de estudos envolvendo o tratamento de diversas enfermidades, incluindo a TB, com probióticos e prebióticos (SCHMIDT & MARTINDALE, 2003). A utilização dos probióticos na prevenção da TB é uma terapia alternativa e atua na manutenção do balanço da microbiota intestinal, assim como na modulação do sistema imunológico (SALZEDAS-NETTO, 2006).

RAYES et al. (2002) realizaram estudo com 95 pacientes submetidos a transplante hepático. Estes foram divididos em três grupos: o grupo 1 recebeu fórmula enteral padrão mais descontaminação intestinal com antibióticos; o grupo 2 recebeu fórmula enteral com fibras mais probióticos vivos; e o grupo 3 recebeu fórmula enteral com fibras mais probióticos mortos. Os resultados obtidos demonstraram redução significativa de infecção bacteriana no grupo tratado com probióticos vivos (13%) quando comparado com o grupo controle (48%) e com o grupo tratado com probióticos inativos (34%). Além disso, o grupo tratado com probióticos vivos apresentou menor tempo de terapia medicamentosa e de internação hospitalar.

EIZAGUIRRE et al. (2002) determinaram os efeitos da administração de probióticos na TB no modelo de intestino curto em ratos. No seu estudo, os animais foram divididos em três grupos: grupo 1 – simulado (Sham); grupo 2 – cirurgia com 80% de ressecção intestinal; grupo 3 - o mesmo procedimento cirúrgico mais com pretratamento por 10 dias com probióticos inoculados por gavagem. Os resultados mostraram que a incidência de TB foi significativamente menor no grupo tratado com probiótico (50%) quando comparado com o grupo não tratado (87%). E ainda, os animais do grupo tratado com probióticos apresentaram ganho de peso maior e mais rápido quando comparado com o grupo não tratado, apesar dos valores não terem diferido estatisticamente.

SEEHOFER et al. (2004) também encontraram efeitos benéficos com a utilização de probióticos no processo de TB. Neste estudo 68 ratos foram divididos em sete grupos: grupo 1 - Sham; o grupo 2 - os animais passaram por operação para remoção de 70% do fígado; grupo 3 - sofreu anastomose colônica; grupo 4 - os animais tiveram 30% do fígado removido mais anastomose colônica; grupo 5 - passou pelo mesmo procedimento mais tratamento com uma combinação de probióticos e fibras administrados por gavagem dois dias antes e depois da operação; o grupo 6 - os

animais tiveram 70% do fígado removido mais anastomose colônica; grupo 7 - passou pelo mesmo procedimento mais tratamento com uma combinação de probióticos e fibras administrados por gavagem dois dias antes e depois da operação. A TB ocorreu em todos os grupos, porém foi maior nos grupos que passaram pela ressecção parcial do fígado mais anastomose colônica. A administração de probióticos levou a redução do número total de bactérias que colonizaram o ceco, especialmente as Gram negativas e enterococos e aumentou o número de lactobacilos. A administração de probióticos também reduziu significativamente a TB nos linfonodos mesentéricos. Houve redução da TB para fígado e baço a diferença não foi estatisticamente significativa.

2.4 Obstrução Intestinal

2.4.1 Definição

Obstrução intestinal (OI) é definida como a interrupção total ou parcial do fluxo do conteúdo intestinal devido obstáculo mecânico ou à interferência de um mecanismo funcional, podendo ocorrer súbita ou progressivamente (DANI & CASTRO, 1993).

Há vários critérios para classificá-la quanto: ao nível (delgado alto e baixo ou cólon), ao grau (completa, incompleta - suboclusão ou “alça fechada”), ao estado de circulação sangüínea (simples ou estrangulada), ao tipo de evolução (aguda ou crônica) e à natureza da obstrução (mecânica, vascular ou funcional) (VIDAL, 2005).

Ao que se verifica, em torno de 20% das cirurgias por quadros de abdome agudo são de pacientes com OI. As principais causas são: adesões pós-cirúrgicas (correspondem a 40% dos casos de OI), hérnias (12%), tumores (15%) e doenças inflamatórias intestinais, como a doença de Crohn obstrutiva (15%) (MACUTKIEWICZ & CARLSON 2005; BROWN & ADAMS 2002).

Pelo fato da maioria das operações ser de urgência, as complicações pós-operatórias são freqüentes. As mais observadas são: infecção de parede, íleo prolongado, sepse e complicações pulmonares (VIDAL, 2005).

Porém, recentemente, com a evolução dos métodos de diagnóstico e dos tipos de tratamentos, o índice de mortalidade devido OI está em torno de 10% (BROWN & ADAMS 2002; CHANG et al., 2001).

2.4.2 Fisiopatologia

A OI resulta em alterações significantes da fisiologia intestinal. Uma vez que o intestino é obstruído, há uma interrupção total ou parcial do fluxo intestinal levando ao acúmulo de gases e de secreções intestinais e diminuição do peristaltismo, provendo distensão abdominal. Todos esses fatores associados favorecem o crescimento bacteriano exagerado, além de alterações na função imunológica. Essas bactérias provocam um aumento da fermentação e, conseqüentemente, um aumento da produção de gases e da pressão osmótica intraluminal. O aumento da pressão intraluminal por sua vez promove a saída de eletrólitos dos capilares para o lúmen

intestinal e leva a redução da perfusão no intestino podendo gerar isquemia e necrose (SAGAR et al., 1995; AKIN et al., 2002; CHANG et al., 2001)

Ainda, durante a hipoperfusão, ocorre acidose da mucosa devido ao aumento da concentração de CO₂. Em conjunto, esses eventos favorecem alterações da permeabilidade intestinal e podem levar a TB (SAGAR et al., 1995; AKIN et al., 2002; CHANG et al., 2001)

2.4.3 Obstrução Intestinal e Translocação Bacteriana

Diversos trabalhos têm estudado as alterações provocadas pela OI (CHANG et al., 2001; AKIN et al., 2002; OLIVEIRA et al.; 2006; QUIRINO et al.; 2007).

Os efeitos da OI na mucosa endotelial e na TB em ratos foram avaliados por CHANG et al. (2001). Os resultados obtidos neste estudo mostraram diminuição do número das vilosidades intestinais, e aumento do escore do dano à mucosa, além do aumento da TB nos ratos obstruídos quando comparados com o grupo controle.

AKIN et al. (2002) verificaram a presença de TB utilizando o modelo de OI em ratos. A obstrução foi induzida por ligadura do íleo distal a 5 cm da válvula íleo cecal, e após 24 horas foi observado um significativo aumento da população de bactérias no intestino, além da sua presença nos linfonodos mesentéricos, fígado, pulmão e sangue.

QUIRINO et al. (2007) e VIANA et al. (2009) também verificaram a presença de TB no modelo de OI em ratos utilizando ^{99m}Tc-*E. coli*. Os níveis de TB no sangue, fígado, baço, pulmão e linfonodos mesentéricos foram significativamente maiores nos ratos obstruídos quando comparados com o grupo Sham.

2.5 Isótopo Radioativo

O ^{99m}Tc (Tecnécio) é um radionúcleo artificial originado da desintegração radioativa do ^{99m}Mo (Molibdênio), isótopo proveniente da fissão nuclear do urânio (DINIZ, et al., 1999). Por ser um metal deficiente em elétrons, o ^{99m}Tc reage principalmente com grupos doadores de elétrons como aminas, amidas, tióis, sulfidrilas e isonitrilas. Essa propriedade é utilizada para a marcação de fármacos como o DTPA e bactérias. Na marcação de bactérias, o mais provável é que o ^{99m}Tc reaja principalmente com estruturas protéicas, já que estas possuem grupos doadores de elétrons. Esta reação pode ocorrer com proteínas que constituem a parede celular bacteriana e/ou com proteínas citoplasmáticas. A célula bacteriana permanece preservada após o procedimento de marcação (DINIZ et al., 1999).

Normalmente os estudos que investigam a TB utilizam o método de cultura dos linfonodos mesentéricos para quantificá-la (WIEST & RATH, 2003). Entretanto, essa técnica pode subestimar os níveis de TB, uma vez que não detecta fragmentos de bactérias e bactérias não viáveis, que também estimulam a resposta imunológica podendo desencadear sepse (WHITE et al., 2006). Além disso, é um método extremamente trabalhoso exigindo condições assépticas. (WIEST & RATH, 2003).

Diversos trabalhos têm utilizado bactéria marcada com radioatividade como método de identificação da translocação, obtendo-se bons resultados (OLIVEIRA et al. 2006; WHITE et al., 2006; QUIRINO et al, 2007; VIANA et al., 2009). Este método apresenta a vantagem de não necessitar de condições assépticas, pois não utiliza cultivo bacteriano e é mais rápido que o método convencional.

CAPÍTULO I

O tratamento com células viáveis e não viáveis de *Saccharomyces boulardii* preserva a integridade intestinal e reduz a translocação bacteriana num modelo de obstrução intestinal em camundongos

Resumo

Existem evidências de que probióticos podem proteger o TGI contra episódios patológicos ou infecciosos. Os efeitos do tratamento oral com células viáveis ou não viáveis de *S. boulardii* (*Sb*) sobre a TB, permeabilidade intestinal, e alguns aspectos da histologia do íleo e do sistema imunológico foram avaliados em modelo de OI em camundongos. Quatro grupos de animais foram utilizados: Grupo I – Sham (camundongos submetidos apenas a laparotomia); Grupo II – OI (camundongos submetidos à OI); Grupo III – OI+*Sb* (camundongos submetidos à OI após tratamento prévio com células viáveis da levedura); Grupo V – OI+*Sb* não viável (camundongos submetidos a OI após tratamento prévio com células não viáveis da levedura). A TB, permeabilidade intestinal e lesões histológicas intestinais foram significativamente maiores no grupo OI quando comparado ao grupo Sham. Pré-tratamento com células viáveis e não viáveis de *S. boulardii* impediram estes aumentos e os dados obtidos para estes grupos foram semelhantes aos observados no grupo Sham. Os níveis sanguíneos de IL-10 e intestinais de sIgA foram maiores nos animais que receberam os tratamentos com probióticos quando comparados com o grupo OI. Conclusão: O tratamento oral com células viáveis ou não viáveis de *S. boulardii* reduz a permeabilidade intestinal, a TB e as lesões intestinais, com modulação do sistema imunológico em modelo murino de OI. Este efeito protetor independe da viabilidade da célula.

PALAVRAS-CHAVES: translocação bacteriana, *S. boulardii*, IL-10, sIgA, histologia

1 INTRODUÇÃO

Existem evidências significativas que suportam a idéia de que a microbiota intestinal equilibrada confere funções importantes para a saúde do hospedeiro, tal como a proteção contra bactérias patogênicas. Em condições normais, a composição da microbiota é estável, mas pode ser alterada devido a vários fatores como: mudanças na dieta, medicamentos e estados de estresse (SOETERS, 2008). Nessas situações, a microbiota normal é rapidamente substituída pela proliferação de microrganismos patogênicos, além do aumento simultâneo na permeabilidade intestinal (CORREIA & NICOLI 2006; WATKINSON et al., 2007). Disfunções na barreira intestinal podem permitir a penetração de antígenos luminiais, como bactérias e suas toxinas, evento conhecido como translocação bacteriana (TB) (GATT, et al., 2007). A translocação de bactérias e endotoxinas através da mucosa pode ser responsável pela liberação de mediadores e pela ativação de células imunológicas que contribuem para o desenvolvimento de inflamação sistêmica e insuficiência múltipla de órgãos (GATT et al., 2007; TIMMERMAN et al., 2007; WATKINSON et al., 2007). Três mecanismos estão envolvidos na TB: crescimento excessivo de bactérias intestinais, deficiências nas defesas imunológicas, e aumento da permeabilidade ou dano da barreira da mucosa intestinal (LICHTMAN, 2001; WIEST & RATH, 2003; GATT et al., 2007). Aumento da permeabilidade intestinal e TB são comumente observados após choque, queimadura, icterícia, lesão obstrutiva, ressecção intestinal, transplante hepático ou obstrução intestinal (OI) e sua prevalência é em torno de 15% nos pacientes submetidos a situações clínicas descritas acima (MACFIE et al., 2006; GATT et al., 2007).

O tratamento ou prevenção de alterações na mucosa do intestino utilizando probióticos tem sido relatado (GEYIK et al., 2006; ZAREIE et al., 2006; MOGILNER et al., 2007). Probióticos são definidos como microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Embora essa definição enfatize a necessidade da viabilidade dos probióticos, alguns autores têm demonstrado que seus componentes estruturais, principalmente presentes em suas paredes também seriam eficazes, levando a concluir que preparações utilizando células não viáveis de probióticos poderiam ser benéficas (LI et al., 2009; ADAMS et al., 2010).

Saccharomyces boulardii é uma levedura não patogênica utilizada com eficácia no tratamento de variedade de doenças diarréicas. Esta levedura tem sido usada com

sucesso para a prevenção e/ou tratamento de diarreia associada a antibióticos, gastroenterite aguda em crianças e adultos e diarreia associada ao *Clostridium difficile* (BEAUGERIE et al., 2001; TIMMERMAN et al., 2007; WATKINSON et al., 2007; SOETERS, 2008). No entanto, existem poucos estudos sobre o efeito do *S. boulardii* na TB e seus mecanismos de ação ainda não estão totalmente esclarecidos (HEREK et al., 2004; GEYIK et al., 2006). Há evidências de que ela atue na modulação do sistema imunológico sistêmico como local (mucosa intestinal), além de atuar na preservação da barreira intestinal (DALMASSO et al., 2006b; MARTINS et al., 2010). Sendo assim, o presente estudo avaliou o efeito de células viáveis ou não viáveis de *S. boulardii* na TB, permeabilidade e integridade da barreira intestinal e sistema imunológico em modelo de OI em camundongos.

2 METÓDOS

2.1 Microrganismos

Células viáveis de *Saccharomyces boulardii* de uma preparação liofilizada comercial (Floratil®, Merck SA, Rio de Janeiro, Brasil) foram utilizadas após seu isolamento em ágar Sabouraud dextrose (Difco, Sparks, E.U.A.). Para a utilização das células da levedura não viável, uma suspensão de *S. boulardii* foi autoclavada a 121°C por 15 minutos e em seguida, uma alíquota foi repicada em ágar Sabouraud para a confirmação da não viabilidade da levedura. *Escherichia coli* ATCC 10536 foi obtida da American Type Culture Collection (Rockville, E.U.A.).

2.2 Camundongos

Neste trabalho foram utilizados camundongos *Swiss* machos, pesando entre 25 e 35 g. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, recebendo água e ração *ad libitum*. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA / UFMG).

2.3 Delineamento experimental

Para cada experimento (determinação da TB, permeabilidade, histologia intestinal e análises imunológicas) os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: I. Grupo Sham (gavagem com 0,1 ml de solução salina; simulação da operação); II. Grupo OI (gavagem com 0,1 ml de solução salina; laparotomia e ligadura do íleo); III. Grupo OI+Sb (gavagem com 0,1 ml de uma suspensão contendo 10^9 unidades formadoras de colônias (UFC) / ml de *S. boulardii*; laparotomia e ligadura do íleo); IV. Grupo OI+Sb não viável (gavagem com 0,1 ml de uma suspensão contendo 10^9 células não viáveis de *S. boulardii*, laparotomia e ligadura do íleo). Durante dez dias, todos os animais receberam água e comida *ad libitum* e gavagem diária com os respectivos tratamentos. Os camundongos foram monitorados diariamente com relação à ingestão alimentar e ganho de peso corporal.

2.4 Procedimento cirúrgico

No décimo dia, após o tratamento com os probióticos, como descrito acima, os animais foram anestesiados, intraperitonealmente, com solução de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Dopazen®) e cloridrato de ketamina (Dopalen®) nas concentrações de 8 mg/Kg e 60 mg/kg, respectivamente. Realizou-se laparotomia mediana de aproximadamente 3 cm, com exposição do ceco e íleo terminal. Em seguida, o íleo terminal sofreu ligadura com nó simples utilizando-se fio de nylon 5.0 (BRASTURE, SP, Brasil). A sutura foi realizada com fio cuticular 5.0. Todos os grupos passaram pelo mesmo processo, exceto o grupo Sham que sofreu apenas laparotomia mediana com posterior sutura do abdômen, simulando o estresse cirúrgico (OLIVEIRA et al., 2006; QUIRINO et al., 2007).

2.5 Procedimento de marcação da *E. coli*

Para avaliação da TB foi utilizado a ^{99m}Tc -*E.coli* como radiotraçador sendo necessário inicialmente, a marcação da referida bactéria com o isótopo radioativo. Este procedimento foi realizado conforme descrito por DINIZ et al. (1999). De uma cultura-mãe de *E. coli* foi feito o repique em agar tripticaseína (Merck). Após 18 horas de

crescimento a 37°C a bactéria foi transferida, para solução salina estéril e sua concentração ajustada espectrofotometricamente em 31% de transmitância a 580 nm, correspondente a 10⁸ UFC/ml. Posteriormente, uma alíquota dessa suspensão bacteriana (2 ml) foi incubada em tubos contendo 1 ml de solução de cloreto estano (580 mM, pH 7,0) a 37° C por 10 min. Após a incubação, 37,0-55,5 MBq de ^{99m}Tc-99m-tecnécio (^{99m}Tc), obtido por eluição do gerador ⁹⁹Mo/^{99m}Tc estéril (IPEN / Brasil) foi adicionado e a preparação foi mantida em 37° C por 10 min. Os tubos foram então centrifugados a 3.000 x g por 25 min. Este procedimento foi repetido três vezes. Após a última centrifugação, a radioatividade do sobrenadante e precipitado foi medida em calibrador de dose (CRC[®]-25R Dose Calibrator, Capintec, Ramsey, E.U.A.) e o percentual de ^{99m}Tc incorporado nas células bacterianas foi determinada utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ marcação} = \frac{\text{cpm (precipitado)}}{\text{cpm (precipitado + sobrenadante)}} \times 100$$

Onde cpm é a contagem por minuto.

2.6 Determinação da translocação bacteriana

No décimo dia após os tratamentos descritos acima, 0,1 ml de suspensão contendo 1,8 MBq de ^{99m}Tc-*E.coli* foram administrados por gavagem a todos os animais. Após 90 minutos, os camundongos (8 animais por grupo) foram submetidos ao procedimento cirúrgico supracitado. Dezoito horas após a operação, os animais foram novamente anestesiados, utilizando-se a mesma técnica, para retirada de sangue, LMN, fígado, baço e pulmões. Estes foram pesados e colocados em tubos apropriados para a determinação da radioatividade (OLIVEIRA et al. 2006; QUIRINO et al., 2007). As amostras foram contadas em um contador com cristal NaI (TI) (ANSR-Abbott, Chicago, E.U.A.). Os valores foram expressos em cpm/g ou ml.

2.7 Determinação da permeabilidade intestinal

A permeabilidade intestinal foi avaliada pela determinação da radioatividade no sangue após a administração oral de ^{99m}Tc- DTPA. Quatro grupos de cinco animais, por período de tempo, foram tratados como descrito acima. No décimo dia após o

tratamento, todos os camundongos receberam, por gavagem, 0,1 ml de solução contendo 18,5 MBq de ^{99m}Tc -DTPA. Após 90 min, foram submetidos ao procedimento cirúrgico como descrito anteriormente. Quatro, oito e 18 horas após a OI, os animais foram anestesiados novamente e 500 μl de sangue foram coletados e colocados em tubos apropriados para a determinação da radioatividade (VIANA et al., 2009). Os dados foram expressos em dose%, utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ dose} = \frac{\text{cpm (sangue)}}{\text{cpm (dose administrada)}} \times 100$$

Onde cpm é a contagem por minuto.

2.8 Análise Histológica

Dezoito horas após o procedimento cirúrgico, quatro animais de cada grupo descrito acima foram sacrificados. Três anéis do íleo na área adjacente à intervenção cirúrgica foram obtidos, fixados em formol a 4% e processados para inclusão em parafina. De cada amostra, pelo menos 3 seções histopatológicas (4-5 μm) foram coradas com hematoxilina e eosina (H & E), codificadas e analisadas por microscopia óptica por um único patologista, que desconhecia as condições experimentais de cada grupo. Escore intestinal com base em critérios descritos por CHIU et al. (1970) foi determinado para cada amostra. O sistema de classificação de CHIU é composto por cinco subdivisões de acordo com as mudanças de vilosidades e glândulas da mucosa intestinal da seguinte forma: grau 0: mucosa normal, grau 1: desenvolvimento do espaço subepitelial de *Gruenhagen* na ponta da vilosidade; grau 2: extensão do espaço com elevação epitelial moderada; grau 3: elevação epitelial maciça com poucas vilosidades; grau 4: ulceração de vilosidades com capilares expostos; e grau 5: desintegração da lâmina, e hemorragia. Cada seção foi marcada por animal e por grupo. O resultado foi expresso como a média da avaliação de quatro animais por grupo.

2.9 Determinação de IL-10 e INF- γ

Dezoito horas após a cirurgia, 05 animais por grupo foram sacrificados. O sangue foi coletado do plexo axilar e centrifugado a 1.000 x *g* por 10 minutos para separação do soro, que foi estocado a -70°C até o uso. Posteriormente, os níveis de IL-10 e INF- γ foram avaliados pela técnica de ELISA, utilizando kits comerciais específicos (Biosource International, Camarillo, CA, USA). Os resultados foram expressos em pg/ml.

2.10 Dosagem da sIgA

Decorridas 18 horas da cirurgia, 05 animais por grupo foram sacrificados. A determinação de sIgA no fluido intestinal foi feita pela técnica de ELISA com descrita por RODRIGUES et al. (2000). Todos os anticorpos foram obtidos da Sigma (St. Louis, EUA). Os resultados obtidos foram expressos em $\mu\text{g/mL}$.

2.11 Análises Estatísticas

Os experimentos foram realizados em duplicata. Os dados da TB foram avaliados com o teste de *Kruskall-Wallis*, análise de variância e uma análise *post hoc* pelo teste de *Dunn*. Permeabilidade intestinal, escore da histologia e resultados imunológicos foram comparados por meio do teste *T Student*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa *BioEstat* versão 3.0 (Sociedade Civil Mamirauá / MCT - CNPq).

3 RESULTADOS

3.1 Ingestão alimentar e ganho de peso

A ingestão alimentar e o ganho de peso foram semelhantes entre os quatro grupos durante os dez dias de tratamento experimental.

3.2 Avaliação da translocação bacteriana

De acordo com os resultados mostrados na TAB.I.1, a OI provocou um aumento significativo na TB, como demonstrado pela captação de *E. coli*-^{99m}Tc no sangue, LMN, fígado, baço e pulmões dos animais do grupo OI quando comparado com os do grupo Sham ($p < 0,05$). A administração do probiótico *S. boulardii* reduziu a TB no sangue e todos os órgãos investigados, quando comparado com o grupo OI ($p < 0,05$). Resultados semelhantes foram obtidos quando os animais foram tratados com células não viáveis do probiótico. Esses valores não diferiram estatisticamente aos obtidos no grupo Sham ($p > 0,05$)

TABELA I.1- Biodistribuição da ^{99m}Tc- *E.coli*

Órgão/Sangue	Sham	OI	OI+Sb	OI+Sb não viável
LMN	85,22 ^a	845,83 ^b	160,41 ^a	190,21 ^a
Baço	23,75 ^a	676,25 ^b	193,33 ^a	213,00 ^a
Fígado	473,26 ^a	1794,14 ^b	649,69 ^a	691,38 ^a
Pulmão	152,08 ^a	629,58 ^b	252,09 ^a	251,00 ^a
Sangue	140,80 ^a	465,81 ^b	184,33 ^a	171,25 ^a

a, b Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis, análise de variância e análise *post hoc* pelo teste de Dunn. Dados expressos em mediana. N = 8.

3.3 Permeabilidade intestinal

A FIG.I.1 mostra aumento da permeabilidade intestinal no grupo OI quando comparado ao grupo Sham ao longo de todos os tempos investigados ($p < 0,05$). Pré-tratamento com *S. boulardii* reduziu a permeabilidade intestinal, mesmo quando as células não viáveis foram utilizadas ($p < 0,05$) e os valores foram semelhantes ao observado no grupo Sham.

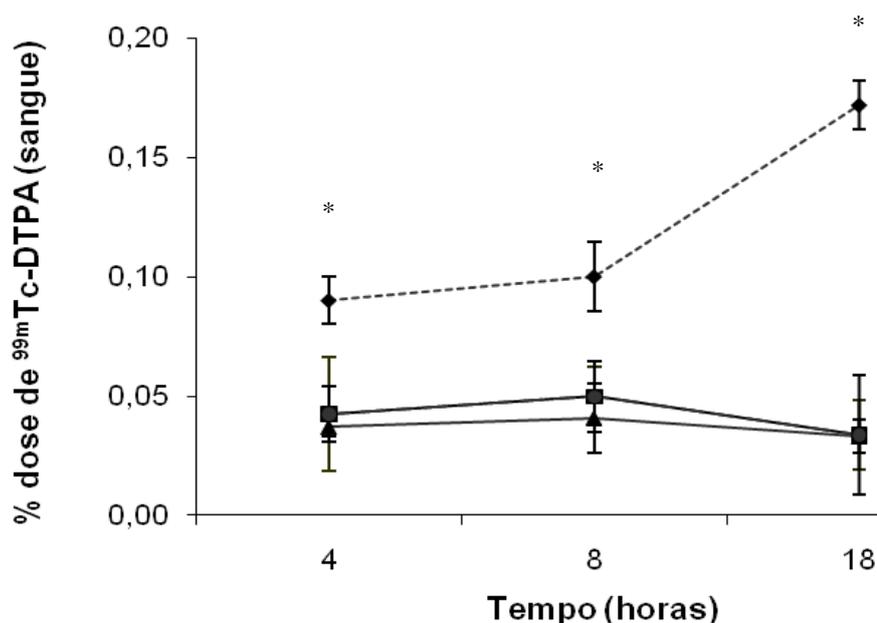


FIGURA I.1 Permeabilidade intestinal.

Grupos Sham (●), OI (◆), OI+Sb (■) e OI+Sb não viável (▲). Barras de erros mostram o desvio padrão. *Indica diferença estatisticamente significativa. Teste T ($p < 0,05$). Dados expressos em média. N = 5.

3.4 Avaliação da histologia intestinal

Os aspectos histológicos são representados na FIG.I.2. As amostras obtidas a partir do grupo Sham não apresentaram alterações histológicas (pontuação $0,25 \pm 0,5$) (FIG.I.2 A, B). Por outro lado, as porções do intestino delgado dos animais submetidos a OI mostraram erosão focal da superfície do epitélio associada a edema intenso e

congestão vascular da parede intestinal, principalmente na lâmina própria (FIG.I.2 C, D). Perturbação da arquitetura da mucosa intestinal também foi observada, caracterizada por um aumento da celularidade e vilosidades ampliadas apresentando redução de altura. Além disso, foram observados presença de espaço subepitelial de *Gruenhagen* no topo das vilosidades e elevação epitelial com vilosidades destruídas. O escore intestinal do grupo OI ($4,0 \pm 0,0$) foi estatisticamente maior do que observado no grupo Sham ($0,25 \pm 0,5$) ($p < 0,05$).

Em contrapartida, os animais que receberam o tratamento com *S. boulardii* apresentaram edema discreto e uma arquitetura estrutural preservada da mucosa intestinal (FIG.I.2 E, F). Aspectos semelhantes foram observados quando os animais foram tratados com células não viáveis de *S. boulardii*. Neste caso, o aumento de celularidade da lâmina própria e redução discreta da altura das vilosidades intestinais foram também observados, mas não houve presença de espaço subepitelial de *Gruenhagen* na ponta da vilosidade ou elevação epitelial com vilosidades destruídas em qualquer uma das amostras avaliadas neste grupo (FIG.I.2 G, H). Para ambos os tratamentos com a levedura o escore intestinal foi significativamente menor ($0,25 \pm 0,5$) quando comparado ao grupo OI ($p < 0,05$).

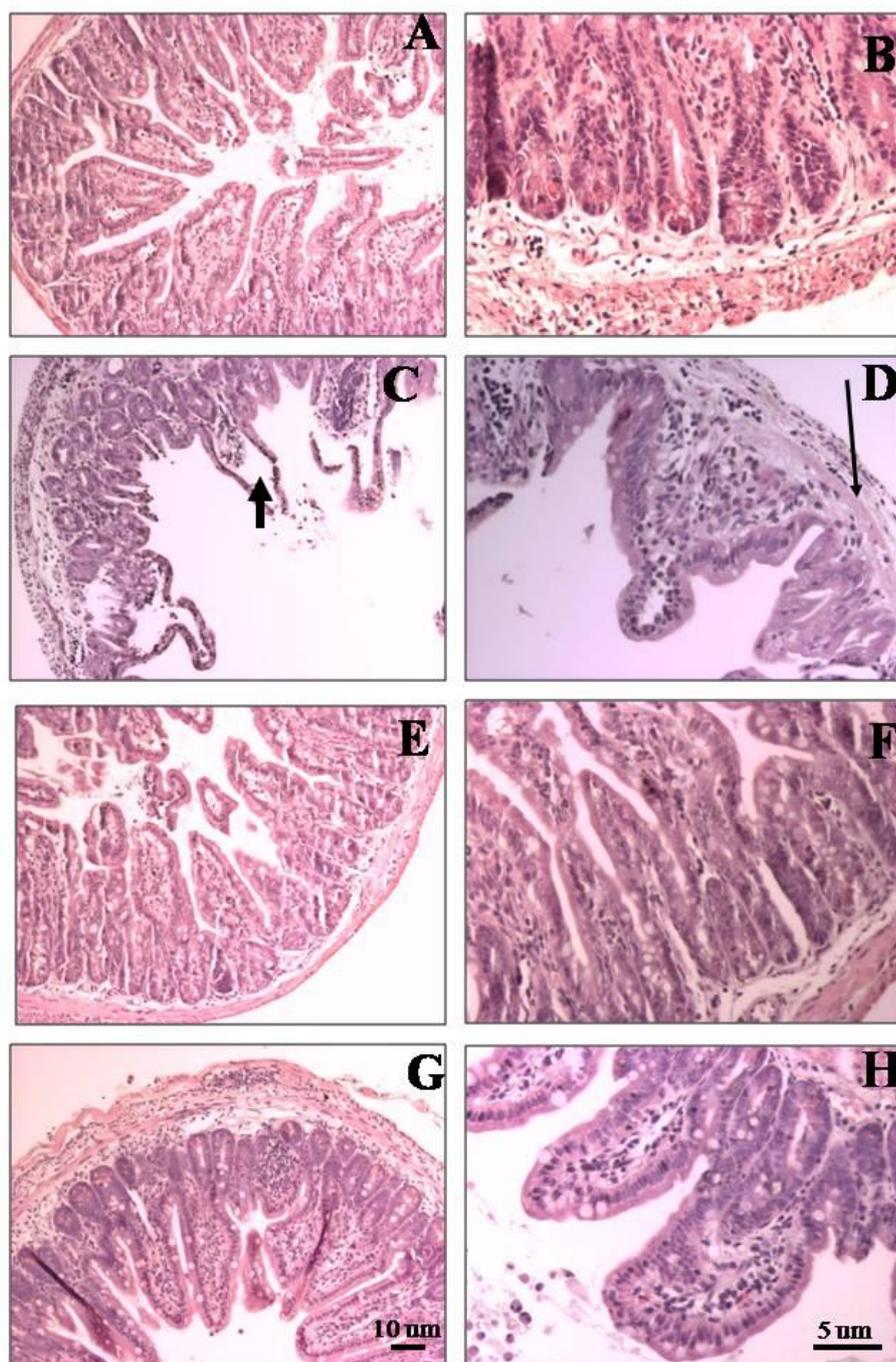


FIGURA I.2 Cortes histológicos da mucosa do intestino delgado de animais.

(A, B) grupo Sham: aspecto normal do epitélio ileal e da parede intestinal, correspondente ao escore <1. (C, D) grupo OI: observa-se alterações epiteliais e vasculares importantes com dilatação do espaço sub-epitelial na ponta da vilosidade por edema (seta), vilosidades rebaixadas, com capilares expostos, edema da submucosa (seta longa) o que corresponde a pontuação 4. (E, F) grupo OI+Sb e (G, H) grupo OI+Sb não viável: significativa preservação do aspecto estrutural da mucosa do íleo, correspondendo ambos a pontuação <1. H & E, aumento original para A, C, E, G: 10X, B, D, F, H: 20X. N = 5.

3.5 Análise dos níveis séricos de IL-10 e INF- γ

Os níveis de IL-10 dos animais que receberam ambos os tratamentos com a levedura viável e não viável foram de 160,0 pg/ml e 159,9 pg/ml, respectivamente. Estes resultados estavam estatisticamente aumentados quando comparado com o grupo OI (50,75 pg/ml) e o grupo Sham (29,58 pg/ml) ($p < 0,05$) (FIG.1.3).

A FIG.1.4 mostra que os níveis de INF- γ são similares entre o grupo OI (159 pg/ml) e os grupos tratados (160 pg/ml e 159,9 pg/ml, respectivamente) ($p > 0,05$).

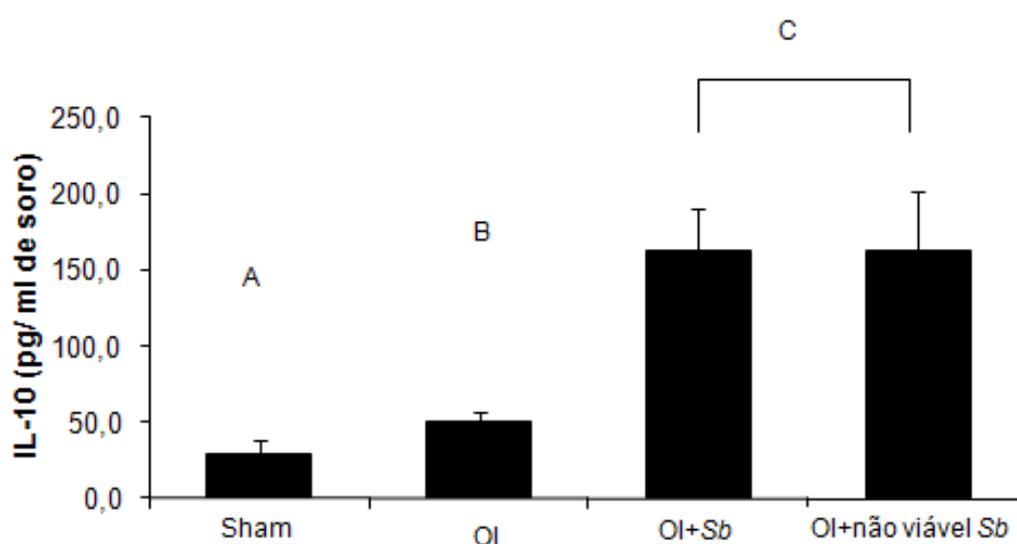


FIGURA I.3 Níveis de citocinas IL-10 no plasma dos animais.

Grupos Sham, OI, OI+Sb e OI+Sb não viável. Barras de erros mostram o desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. Teste T ($p < 0,05$). Dados expressos como média. N = 5.

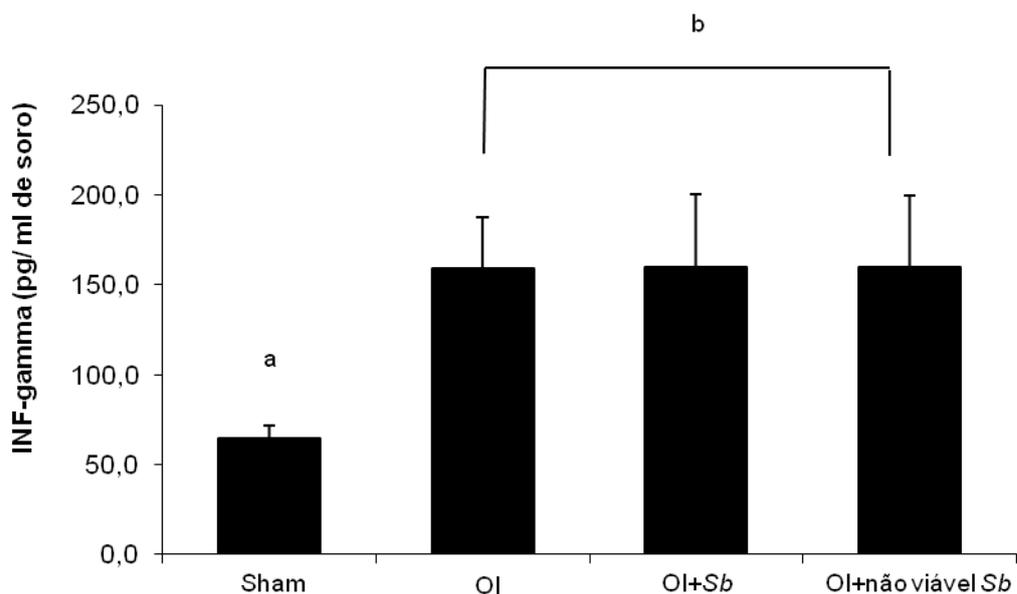


FIGURA I.4 Níveis de citocinas INF- γ no plasma dos animais.

Grupos Sham, OI, OI+Sb e OI+Sb não viável. Barras de erros mostram o desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. Teste T ($p < 0,05$). Dados expressos como média. N = 5.

3.6 Análise dos níveis intestinais de IgA

A FIG.I.5 mostra que os níveis de IgA foram similares no grupo OI quando comparado ao grupo Sham (742,0 mg/g e 736,0 mg/g, respectivamente) ($p > 0,05$). O tratamento com ambas as células viáveis e não viáveis do probiótico aumentaram significativamente os níveis de IgA (1390,0 mg/g e 1139,0 mg/g, respectivamente) quando comparado ao grupo OI ($p < 0,05$).

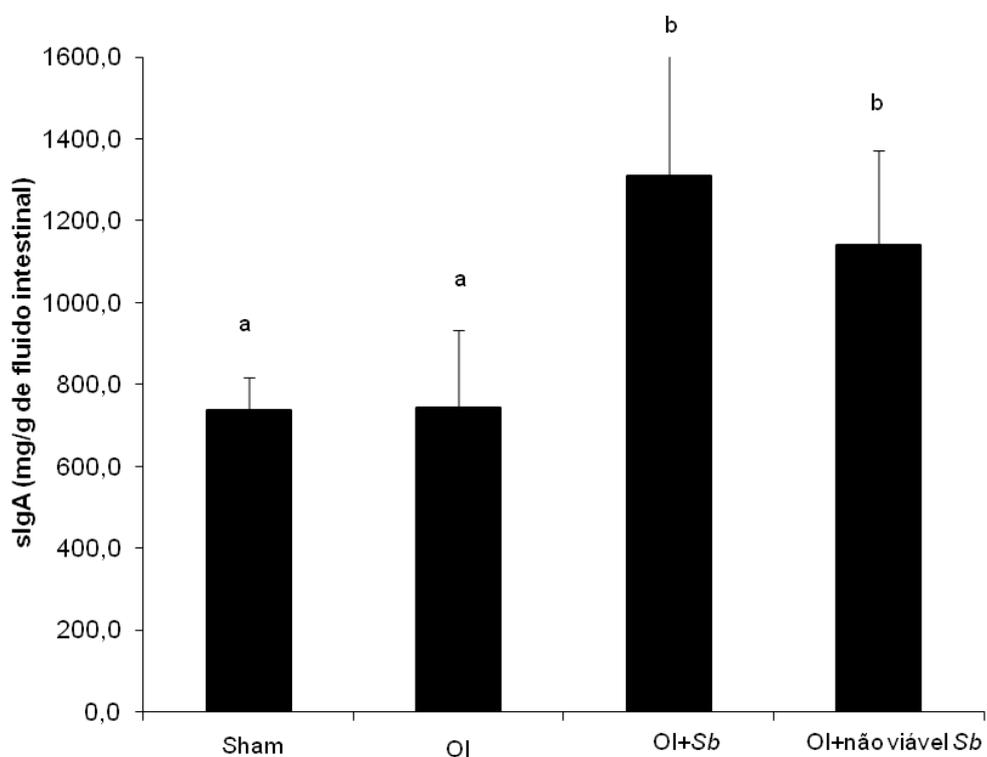


FIGURA I.5 Níveis de sIgA no fluido intestinal dos animais.

Grupos Sham, OI, OI+Sb, e OI+Sb não viável. Barras de erros mostram o desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. Teste T ($p < 0,05$). Os dados estão expressos como média. N = 5.

4 DISCUSSÃO

A função da barreira intestinal descreve a habilidade do epitélio intestinal em separar o conteúdo luminal potencialmente prejudicial, por conter bactérias e endotoxinas, do ambiente interno do corpo. Por conseguinte, qualquer prejuízo ao intestino contribui para a translocação de bactérias e de endotoxinas para a circulação portal e sistêmica (MACFIE et al., 2006; GATT et al., 2007).

Devido ao potencial efeito benéfico da microbiota intestinal na integridade da barreira e na função imunológica tornou-se crescente o interesse na utilização de probióticos na medicina clínica para prevenção e tratamento de diversas patologias (KELLY et al., 2007). Há evidências convincentes de que essa terapia direcionada ao intestino melhora os resultados clínicos de vários pacientes em estado crítico (DEITCH, 2002; MCNAUGHT et al., 2005). Assim, a manutenção do equilíbrio ecológico estável no trato gastrintestinal seria o maior mecanismo de defesa na prevenção da TB (SALZEDAS-NETTO et al., 2006).

O presente estudo utilizou tratamento oral com suspensão de células viáveis e não viáveis de *S. boulardii* para verificar seu potencial impacto na TB e na manutenção da integridade da barreira intestinal, além do seu papel no sistema imunológico em modelo de OI em camundongos.

Para analisar a influência de *S. boulardii* na TB utilizou-se a técnica de marcação de *E. coli* com radioisótopo ^{99m}Tc -tecnécio. Poucos estudos têm sido realizados para avaliar essa influência, e a maioria optam pelo método por cultura microbiana (HEREK et al., 2004; GEYIK et al., 2006). Este método apresenta algumas desvantagens uma vez que pode subestimar níveis de TB, pois não detecta fragmentos de bactérias e bactérias não-viáveis que também podem provocar estímulo excessivo da resposta imunológica, além de ser uma técnica laboriosa exigindo condições assépticas para sua aplicação (WIEST & RATH, 2003; WHITE et al., 2006). Por outro lado, o método que emprega a ^{99m}Tc -*E. coli*, é rápido, direto e simples para a determinação da TB. O mesmo não requer condições assépticas e detecta a presença de fragmentos assim como células inteiras de bactéria não-viáveis e viáveis em diversos compartimentos internos do organismo (WIEST & RATH, 2003; WHITE et al., 2006).

Os resultados mostraram maior captação de ^{99m}Tc -*E. coli* no sangue, LMN, fígado, baço e pulmões dos animais do grupo OI quando comparado aos do grupo Sham ($p < 0,05$) (TAB.I.1). Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores em que a OI também promoveu aumento da TB (OLIVEIRA et al., 2006; QUIRINO et

al., 2007). Os possíveis mecanismos responsáveis por essa situação provavelmente estão relacionados com perturbação do equilíbrio ecológico da microbiota, dano da barreira intestinal por lesão direta aos enterócitos e/ou suas junções devido a fisiopatologia da OI (ALDEMIR et al., 2002; WHITE et al., 2006). Pré-tratamento com células viáveis ou não viáveis da levedura foi capaz de reduzir significativamente os níveis de TB ($p < 0,05$) (TAB.I.1). HEREK et al. (2004) e GEYIK et al. (2006) encontraram resultados semelhantes usando *S. boulardii* na prevenção da TB, em modelos experimentais de queimaduras e icterícia obstrutiva, respectivamente.

Segundo LICHTMAN (2001) e MACFIE et al. (2006), baixos níveis de TB é considerado fenômeno fisiológico necessário para a maturação e manutenção de sistema imunológico gastrointestinal competente. Os resultados obtidos no grupo Sham corroboram para a afirmação de translocação fisiológica (TAB.I.1).

Os prováveis mecanismos de proteção do *S. boulardii* na redução da TB podem estar relacionados à sua ação na barreira intestinal e na resposta imunológica. Sabe-se que o aumento da permeabilidade intestinal é caracterizado pela passagem de moléculas maiores que 150 Daltons do lúmen para a corrente sanguínea (ARRIETA et al., 2006). Neste estudo, a permeabilidade intestinal foi avaliada por meio da determinação da radioatividade no sangue após a administração oral de ^{99m}Tc -DTPA. O DTPA é um complexo trissódico com peso molecular de 549 Daltons. Este composto é atóxico, solúvel em água, não é metabolizado no estômago e apresenta filtração quantitativa pelos rins, além de ser facilmente detectável (ARRIETA et al., 2006). A OI induziu aumento da permeabilidade intestinal, como observado na FIG.I.1. Conforme mostrado na mesma figura, ambos os tratamentos reduziram a permeabilidade intestinal para níveis fisiológicos, ou seja, com valores similares àqueles observados para o grupo Sham durante todo o experimento ($p > 0,05$). Diminuição na permeabilidade intestinal também foi observada em modelos *in vitro*, utilizando a levedura e cultura de células T84 infectadas com *E. coli* enteropatogênica e *Salmonella* Typhimurium. Nestes estudos *E. coli* enteropatogênica (DAHAN et al., 2003) e *Salmonella* Typhimurium (MARTINS et al., 2010) aumentaram a permeabilidade intestinal e estes autores observaram que *S. boulardii* foi capaz de impedir este aumento. Em estudo clínico recente, VILELA et al. (2008) observaram alterações importantes da integridade da mucosa intestinal em pacientes com doença de Crohn em remissão. Esses mesmos pesquisadores mostraram que o tratamento oral com *S. boulardii* foi capaz de reduzir a permeabilidade intestinal.

Os mecanismos que poderiam explicar a manutenção da integridade epitelial pela levedura não são bem conhecidos. No entanto, a capacidade do *S. boulardii* de modular a transdução de vias envolvidas no controle da estrutura de junção celulares durante processos infecciosos poderia ser uma explicação (DAHAN et al., 2003). Além disso, como demonstrado pelas análises histopatológicas (FIG.1.2), a obstrução intestinal está associada com várias lesões graves. Entretanto, animais tratados com *S. boulardii* apresentaram boa preservação do epitélio intestinal mesmo em situação extrema como a OI (FIG.1.2E e G). Este fato indica que a manutenção da barreira intestinal com o uso de probiótico pode justificar a diminuição significativa dos níveis de TB. Resultados semelhantes foram relatados por ALDEMIR et al. (2002) e GEYIK et al. (2006) que observaram maior altura das vilosidades em camundongos tratados com *S. boulardii* e submetidos à obstrução da alça intestinal, quando comparado ao grupo controle.

Os probióticos podem interferir também, no sistema imunológico atuando de forma sinérgica com a barreira intestinal. Sabe-se que um desequilíbrio nas respostas TH1/TH2, com predomínio da resposta TH1 leva a estimulação excessiva na produção de citocinas pró-inflamatórias, como INF- γ , ativando sinal de transdução que afrouxa as junções do tipo *tight* alterando a função de barreira. Esse evento conduz a aumento na passagem do conteúdo luminal promovendo maior ativação do sistema imunológico. Na ausência de imunorregulação adequada, esta ativação pode causar aumento ainda maior da produção de citocinas pró-inflamatórias e perda de barreira, resultando em um ciclo de auto-amplificação, que pode resultar em sepse (MARCHIANDO et al., 2010). No presente estudo os níveis da citocina pró-inflamatória INF- γ foram estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$) nos grupos tratados tanto com células viáveis como não viáveis da levedura quando comparado ao grupo OI (FIG.1.3). Em contrapartida, o pré- tratamento com ambas as leveduras elevaram os níveis da citocina IL-10 quando comparado com o grupo OI ($p < 0,05$) (FIG.1.4).

A IL-10 é uma citocina do tipo TH2 produzida principalmente por monócitos e, em menor quantidade pelos linfócitos, apresentando efeitos sobre imunorregulação, levando a diminuição da inflamação. A influência do *S. boulardii* na secreção de citocinas em linfócitos intra-epiteliais infectados com *E. coli* e *Candida albicans* foi investigado *in vitro* por FIDAN et al. (2009). Estes autores observaram que a secreção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10 foi aumentada em linfócitos infectados, mas incubados com *S. boulardii*. IMAOKA et al., (2008) em estudo *in vitro* utilizando modelo de colite, observaram aumento na produção de IL-10 quando houve tratamento

com probiótico. Portanto, esses dados estão de acordo com os resultados obtidos para IL-10, indicando que *S. boulardii* pode atuar modulando a resposta imunológica, contribuindo desta forma para a redução dos níveis de translocação bacteriana.

Outro importante mecanismo de ação do probiótico é o aumento da produção de sIgA. Sabe-se que a sIgA tem propriedade de impedir a adesão das bactérias presentes no lúmen à mucosa intestinal, sendo este um passo inicial necessário para a posterior translocação (RODRIGUES et al.; 2000). As baixas concentrações de sIgA intestinal estão associadas com aumento da aderência bacteriana na mucosa e da TB (RODRIGUES et al., 2000; MARTINS et al., 2005; DALMASSO et al., 2006a). Assim, os níveis aumentados de sIgA nos animais que receberam os dois tipos de tratamento, leveduras viáveis e não viáveis, poderiam também ter contribuído para a redução da translocação bacteriana para estes grupos (FIG.1.5).

Todos os probióticos, sejam bactérias ou leveduras, apresentam mais de um mecanismo para explicar o seu efeito protetor. Combinações de produção de compostos antagônicos, competição por nutrientes ou sítios de adesão, imunomodulação do hospedeiro e fixação de toxinas de bactérias patogênicas ou das próprias bactérias são os mecanismos mais freqüentemente citados (CORREIA & NICOLI, 2006). Alguns destes mecanismos dependem da viabilidade dos probióticos como, produtos antagonistas ou anti-inflamatórios provenientes do metabolismo. Outros, tais como imunomoduladores ou moléculas receptoras da estrutura celular, por sua vez, não dependem da viabilidade dos probióticos (KATARIA et al., 2009). Os resultados obtidos mostraram que tanto as células viáveis como não-viáveis do *S. boulardii* apresentaram efeito protetor na TB, levando a hipótese de que os mecanismos que medeiam tal efeito estariam relacionados com componentes estruturais, provavelmente da parede celular da levedura. De acordo com ADAMS (2010) os mesmos efeitos utilizando células viáveis dos probióticos também são observados no tratamento com células não viáveis. MAEDA et al. (2009) observaram aumento da capacidade fagocítica de macrófagos quando tratados com células não viáveis de probióticos. LI et al. (2009) também observaram que tanto células viáveis como não viáveis de probiótico tiveram efeitos similares na indução da produção de fatores anti-inflamatórios.

Os dados obtidos neste trabalho mostraram que o tratamento prévio com células viáveis e não viáveis de *S. boulardii* foi capaz de reduzir a translocação bacteriana para níveis fisiológicos, provavelmente devido a combinação de fatores tais como manutenção da integridade da barreira intestinal, modulação da resposta imunológica

com aumento expressivo dos níveis de sIgA. Os dados obtidos sugerem que esses efeitos benéficos foram oriundos de mecanismos que envolvem mais a estrutura da célula do que seu metabolismo.

CAPÍTULO II

***Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 protege contra a translocação bacteriana, preserva a integridade da barreira intestinal e estimula o sistema imunológico em modelo de obstrução intestinal em camundongos**

RESUMO

Probióticos são definidos como preparação contendo microrganismos vivos que conferem efeitos benéficos para o hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas. O presente trabalho avaliou se o tratamento oral com células viáveis ou não viáveis da levedura *S. cerevisiae* (UFMG 905) é capaz de impedir a translocação bacteriana (TB), preservar a integridade da barreira intestinal e estimular a imunidade sistêmica e local, em modelo murino de obstrução intestinal (OI). Quatro grupos foram utilizados: Grupo I – Controle (Sham); Grupo II – OI; Grupo III – OI+Sc; Grupo V – OI+Sc não viável. A TB que foi determinada por meio da captação de ^{99m}Tc -*E. coli* no sangue, LMN, fígado, baço e pulmões foi significativamente maior no grupo OI em relação ao grupo Sham. Ambos tratamentos com as leveduras reduziram a TB no sangue e em todos os órgãos investigados, além de reduzirem a permeabilidade intestinal, conforme determinado pela captação do ^{99m}Tc -DTPA no sangue. Dados imunológicos demonstraram que ambos os tratamentos foram capazes de aumentar significativamente os níveis séricos de IL-10, mas apenas as células viáveis da levedura tiveram o mesmo efeito sobre os níveis intestinais de sIgA. Lesões histopatológicas no intestino foram mais graves no grupo de OI quando comparados aos grupos Sham e tratados. Concluindo, tanto as células viáveis como não viáveis da levedura foram capazes de impedir a TB, provavelmente por imunomodulação e pela manutenção da integridade da barreira intestinal. Apenas a estimulação da produção de sIgA parece depender da viabilidade levedura.

PALAVRAS-CHAVES: translocação bacteriana, permeabilidade intestinal, IL-10, sIgA, histologia, *S. cerevisiae* (UFMG 905).

1 INTRODUÇÃO

Probióticos são definidos como microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Embora essa definição enfatize a necessidade da viabilidade das células dos probióticos, alguns autores têm demonstrado que mesmo mortos pelo calor ou por raios ultravioletas esses microrganismos mantêm seus efeitos benéficos, uma vez que seus componentes, como a parede celular, atuam de forma eficaz (KATARIA et al., 2009).

Lactobacilos e bifidobactérias são bactérias probióticas freqüentemente encontradas em produtos para humanos (TANNOCK, 2005), assim como a levedura *Saccharomyces boulardii* (CZERUCKA & RAMPAL, 2002). Esta levedura não patogênica foi isolada do fruto da lichia na Indochina e tem sido utilizada como uma opção ao tratamento para diferentes tipos de diarreia, como diarreia associada a antibióticos, pelo *Clostridium difficile* e também nas doenças intestinais (CZERUCKA & RAMPAL, 2002; SURAWICZ, 2003).

Poucas leveduras têm sido estudadas como possíveis probióticos e agentes bioterapêuticos, sendo a *S. boulardii* uma das primeiras e praticamente a única comercializada e utilizada em medicina. Ela é geneticamente semelhante a *Saccharomyces cerevisiae*, mas muito diferente metabolicamente (FIETTO et al. 2004). Isso leva à questão de saber se outras leveduras também possuiriam propriedades bioterapêuticas similares, ou melhores, que a *S. boulardii* (MARTINS et al., 2005b). Neste contexto, professores do Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG propuseram a estudar espécies de leveduras ambientais e agroindustriais, isoladas no Brasil, como possíveis agentes terapêuticos. Neste sentido, a *S. cerevisiae*, linhagem UFMG 905, isolada da cana-de-açúcar foi a única capaz de colonizar ou sobreviver com mais eficiência, no trato gastrointestinal de camundongos *germ-free* ou convencional. Além disso, mostrou capacidade para proteger os animais contra infecção por *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium e *C. difficile* (MARTINS et al., 2005b). Resultados adicionais mostraram que a *S. cerevisiae* UFMG 905 foi capaz, também, de reduzir a translocação bacteriana (TB) de *S. Typhimurium* e de estimular o sistema imunológico em camundongos (MARTINS et al., 2007).

O objetivo deste estudo foi avaliar o papel de células viáveis e não viáveis da levedura *S.cerevisiae* UFMG 905 no processo de translocação bacteriana, com ênfase

na barreira intestinal e na modulação da resposta imunológica local e sistêmica em modelo experimental de obstrução intestinal.

2 METÓDOS

2.1 Microrganismos

Células viáveis de *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 foram utilizadas e isoladas em ágar Sabouraud dextrose (Difco, Sparks, E.U.A.). Para a utilização das células da levedura não viáveis, uma suspensão de *S. cerevisiae* UFMG 905 foi autoclavada a 121 °C por 15 minutos. Em seguida, uma alíquota foi repicada em ágar Sabouraud para a confirmação da não viabilidade da levedura. *Escherichia coli* ATCC 10536 foi obtida a partir da American Type Culture Collection (Rockville, E.U.A.).

2.2 Camundongos

Neste trabalho foram utilizados camundongos *Swiss* machos, pesando entre 25 e 35 g. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, recebendo água e ração *ad libitum*. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA / UFMG).

2.3 Delineamento experimental

Para cada experimento (determinação da TB, permeabilidade e histologia intestinal e análises imunológicas) os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: I. Grupo Sham (gavagem com 0,1 ml de solução salina; simulação da operação); II. Grupo OI (gavagem com 0,1 ml de solução salina; laparotomia e ligadura do íleo); III. Grupo OI+Sc (gavagem com 0,1 ml de suspensão contendo 10⁹ UFC / ml de *S. cerevisiae* UFMG 905; laparotomia e ligadura do íleo); IV. Grupo OI+Sc não viável (gavagem com 0,1 ml de suspensão contendo 10⁹ células não viáveis de *S. cerevisiae* UFMG 905, laparotomia e ligadura do íleo). Durante dez dias, todos os animais receberam água e ração *ad libitum*. Os respectivos tratamentos foram

realizados, diariamente, por gavagem. Os camundongos foram, durante o período dos experimentos, monitorados com relação à ingestão alimentar e ganho de peso corporal.

2.4 Procedimento cirúrgico

No décimo primeiro dia, após o tratamento descrito acima, os animais foram anestesiados, intraperitonealmente, com solução de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Dopazen®) e cloridrato de ketamina (Dopalen®) nas concentrações de 8 mg/Kg e 60 mg/kg, respectivamente. Realizou-se laparotomia mediana de aproximadamente 3 cm, com exposição do ceco e íleo terminal. Em seguida, o íleo terminal sofreu ligadura com nó simples utilizando-se fio de nylon 5.0 (BRASURE, SP, Brasil). A sutura foi realizada com fio cuticular 5.0. Todos os grupos passaram pelo mesmo processo, exceto o grupo Sham que sofreu apenas laparotomia mediana com posterior sutura do abdômen, simulando o estresse cirúrgico (OLIVEIRA et al., 2006; QUIRINO et al., 2007).

2.5 Procedimento de marcação da *E. coli*

Este procedimento foi realizado conforme descrito por Diniz et al. (1999). De uma cultura-mãe de *E. coli* foi feito o repique em ágar tripticaseína (Merck). Após 18 horas de crescimento a 37°C a bactéria foi transferida para solução salina estéril e sua concentração ajustada espectrofotometricamente em 31% de transmitância a 580nm, correspondente a 10⁸ UFC/ml. Posteriormente, uma alíquota dessa suspensão bacteriana (2 ml) foi incubada em tubos contendo 1 ml de solução de cloreto estano (580 mM, pH 7,0) a 37°C por 10 min. Após a incubação, 37,0-55,5 MBq de ^{99m}Tecnécio (^{99m}Tc), obtido por eluição do gerador ⁹⁹Mo/^{99m}Tc estéril (IPEN / Brasil) foi adicionado e a preparação foi mantida em 37°C por 10 min. Os tubos foram então centrifugados a 3.000 x g por 25 min. Este procedimento foi repetido três vezes. Após a última centrifugação, a radioatividade do sobrenadante e precipitado foi medida em calibrador de dose (CRC®-25R Dose Calibrator, Capintec, Ramsey, E.U.A.) e o percentual de ^{99m}Tc incorporado nas células bacterianas foi determinado utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ marcação} = \frac{\text{cpm (precipitado)}}{\text{cpm (precipitado + sobrenadante)}} \times 100$$

Onde cpm é a contagem por minuto.

2.6 Determinação da translocação bacteriana

Quatro grupos de oito animais cada foram tratados conforme descrito acima (item 2.3). Após dez dias de tratamento, 0,1 ml de suspensão contendo 1,8 MBq de $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ foi administrada por gavagem a todos os animais. Após 90 minutos, os camundongos foram submetidos ao procedimento cirúrgico supracitado. Dezoito horas após a operação, os animais foram novamente anestesiados, utilizando-se a mesma técnica.

O sangue, linfonodos mesentéricos (LMN), fígado, baço e pulmões foram removidos, pesados e colocados em tubos apropriados para a determinação da radioatividade (OLIVEIRA et al., 2006; QUIRINO et al., 2007). As amostras foram contadas em um contador com cristal NaI (TI) (ANSR-Abott, Chicago, E.U.A). Os valores foram expressos em cpm/g ou ml.

2.7 Determinação da permeabilidade intestinal

Quatro grupos de cinco animais, por período de tempo, foram tratados como descrito acima (item 2.3). A permeabilidade intestinal foi avaliada no 10^o dia após administração, por via oral, de 18,5 MBq de $^{99m}\text{Tc-DTPA}$. Transcorridos 90 min da administração do $^{99m}\text{Tc-DTPA}$, os camundongos foram submetidos ao procedimento cirúrgico como descrito anteriormente. Quatro, oito e 18 horas após a OI, os animais foram anestesiados novamente e 500 µl de sangue foi coletado e colocado em tubos apropriados para a determinação da radioatividade (VIANA et al., 2009). Os dados foram expressos em percentual de dose (% dose) utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ dose} = \frac{\text{cpm (sangue)}}{\text{cpm (dose administrada)}} \times 100$$

Onde cpm é a contagem por minuto.

2.8 Determinação de IL-10 e INF- γ

Dezoito horas após a cirurgia, 05 animais por grupo foram sacrificados. O sangue foi coletado do plexo axilar e centrifugado a 1.000 x g por 10 minutos para separação do soro, que foi estocado a -70°C até o uso. Posteriormente, os níveis de IL-10 e INF- γ foram avaliados no soro pela técnica de ELISA, utilizando kits comerciais específicos (Biosource International, Camarillo, CA, USA). Os resultados foram expressos em pg/mL.

2.9 Dosagem da slgA

Decorridas 18 horas da cirurgia, 05 animais por grupo foram sacrificados. A determinação de slgA no fluido intestinal foi feita pela técnica de ELISA com descrita por RODRIGUES et al. (2000). Todos os anticorpos foram obtidos da Sigma (St. Louis, EUA). Os resultados obtidos foram expressos em mg/mL.

2.10 Análise Histológica

As amostras de intestino delgado de cinco animais por grupo conforme citado acima foram retiradas para análise histológica 18 h após a operação de OI. Um anel de 1 cm do íleo distal, adjacente à OI foi ressecado, fixado em 4% formol, desidratados, limpos, embebidos em parafina, cortado em secções de 4-5 mm de espessura, corados pela hematoxilina e eosina (H & E), e codificados e analisados por microscopia óptica por um único patologista que desconhecia as condições experimentais para cada grupo.

2.11 Análises Estatísticas

Os experimentos foram realizados em duplicata. Os dados da TB foram avaliados com o teste de *Kruskall-Wallis*, análise de variância e uma análise *post hoc* pelo teste de *Dunn*. Permeabilidade intestinal e resultados imunológicos foram comparados por meio do teste *T Student*. As diferenças foram consideradas

estatisticamente significativas para $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa *BioEstat* versão 3.0 (Sociedade Civil Mamirauá / MCT - CNPq).

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação da ingestão e ganho de peso

Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os quatro grupos em termos de ingestão alimentar e ganho de peso corporal (dados não mostrados).

3.2 Efeito do probiótico no processo de translocação bacteriana

Os dados apresentados na TAB.II.1 mostram maior captação de $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ em todos os órgãos investigados e sangue dos animais do grupo OI, quando comparados com os animais do grupo Sham ($p < 0,05$). Os resultados também mostraram que os animais tratados com células viáveis ou não viáveis de *S. cerevisiae* UFMG 905 apresentaram redução significativa na contagem de $^{99m}\text{Tc-E.coli}$ no sangue e nos órgãos investigados, quando comparado ao grupo OI ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística entre o grupo Sham, grupo OI+Sc e OI+Sc não viável ($p > 0,05$).

TABELA II.1- Biodistribuição da $^{99m}\text{Tc-E.coli}$

	Sham	OI	OI + Sc	OI+ Sc não viável
LMN	85.22 ^a	845.83 ^b	88.44 ^a	98.70 ^a
Baço	23.75 ^a	676.25 ^b	151.13 ^a	220.00 ^a
Fígado	473.26 ^a	1794.14 ^b	856.23 ^a	959.44 ^a
Pulmão	152.08 ^a	629.58 ^b	122.75 ^a	112.32 ^a
Sangue	140.80 ^a	465.81 ^b	279.11 ^a	273.53 ^a

a, b Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis, análise de variância e análise *post hoc* pelo teste de Dunn. Dados expressos como mediana. N = 8.

3.3 Avaliação da permeabilidade intestinal

A FIG.II.1 mostra que a permeabilidade intestinal no grupo de OI foi significativamente maior do que a observada no grupo Sham durante todos os tempos investigados ($p < 0,05$). O pré-tratamento com células viáveis ou não viáveis de *S. cerevisiae* UFMG 905 protegeu contra o aumento da permeabilidade intestinal, e os valores obtidos foram similares aos observados no grupo Sham ($p > 0,05$).

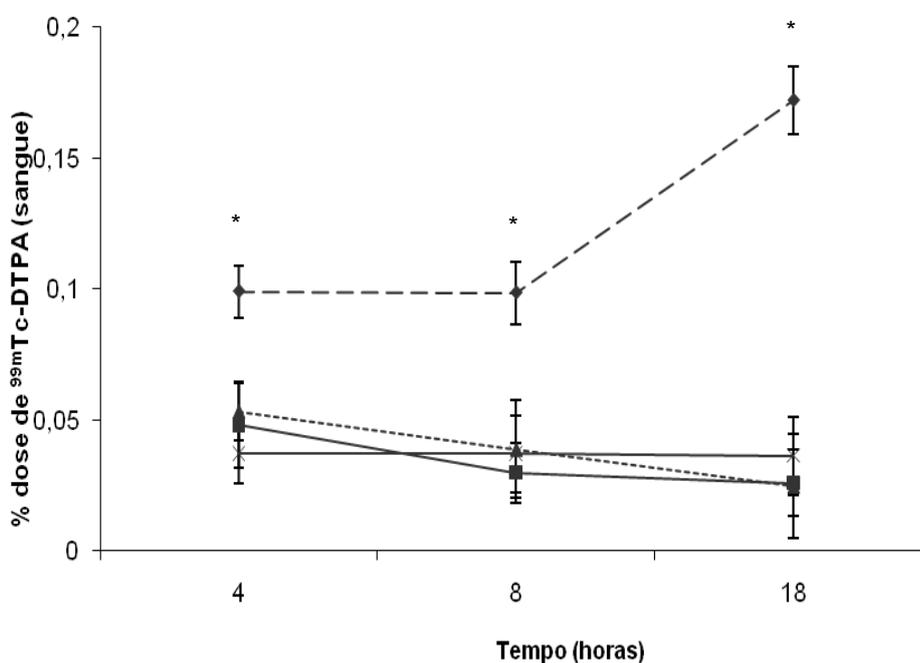


FIGURA II.1 Permeabilidade intestinal

Grupos Sham (■), OI (◆), OI+Sc (▲) e OI+Sc não viável (x). Barras de erros mostram o desvio padrão. *Indica diferença estatisticamente significativa. Teste T ($p < 0,05$). Dados expressos como média. N = 5

3.4 Níveis séricos de IL-10 e INF- γ

A FIG.II.2 mostra que os níveis de IL-10 foram estatisticamente maiores nos animais do grupo OI (50,75 pg/ml), quando comparado ao grupo Sham (29,58 pg/ml) ($p < 0,05$). Ambos os tratamentos aumentaram significativamente os níveis de IL-10, apresentando valores de 102 e 104 pg/ml para os grupos OI+Sc e OI+ Sc não viável, respectivamente. Esses valores foram estatisticamente maiores do que àqueles observados para os grupos Sham e OI ($p < 0,05$).

Pela FIG.II.3 observam-se níveis significativamente mais elevados de IFN- γ no grupo OI (159 pg/ml), quando comparado ao grupo Sham (65 pg/ml) ($p < 0,05$). Tratamento com células viáveis (175 pg/ml) ou não viáveis (169 pg/ml) de *S. cerevisiae* UFMG 905 não alterou os níveis de IFN- γ em relação aos animais do grupo OI ($p > 0,05$).

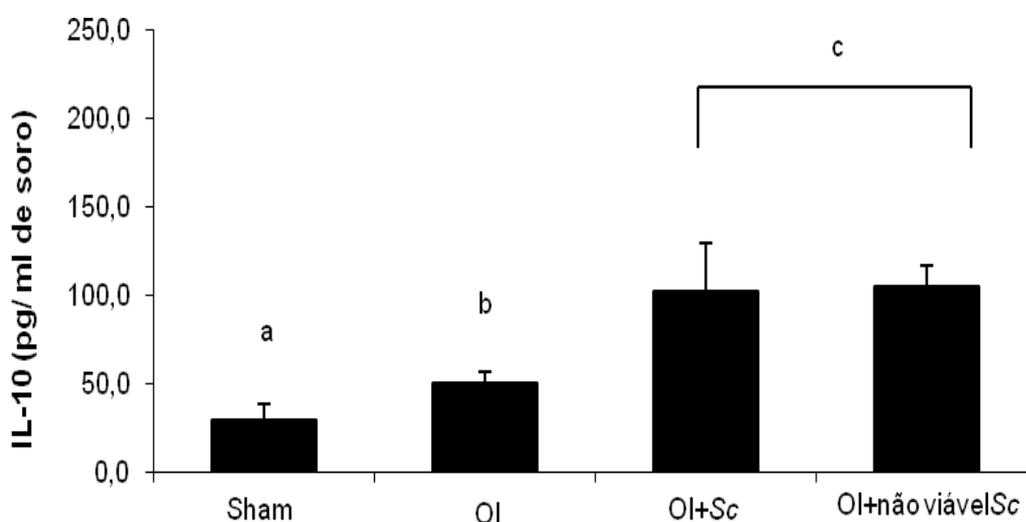


FIGURA II.2 Níveis de citocinas IL-10 no plasma dos animais.

Grupos Sham, OI, OI+Sc e OI+ Sc não viável. Barras de erros mostram o desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. Teste T ($p < 0,05$). Dados expressos como média. N = 5.

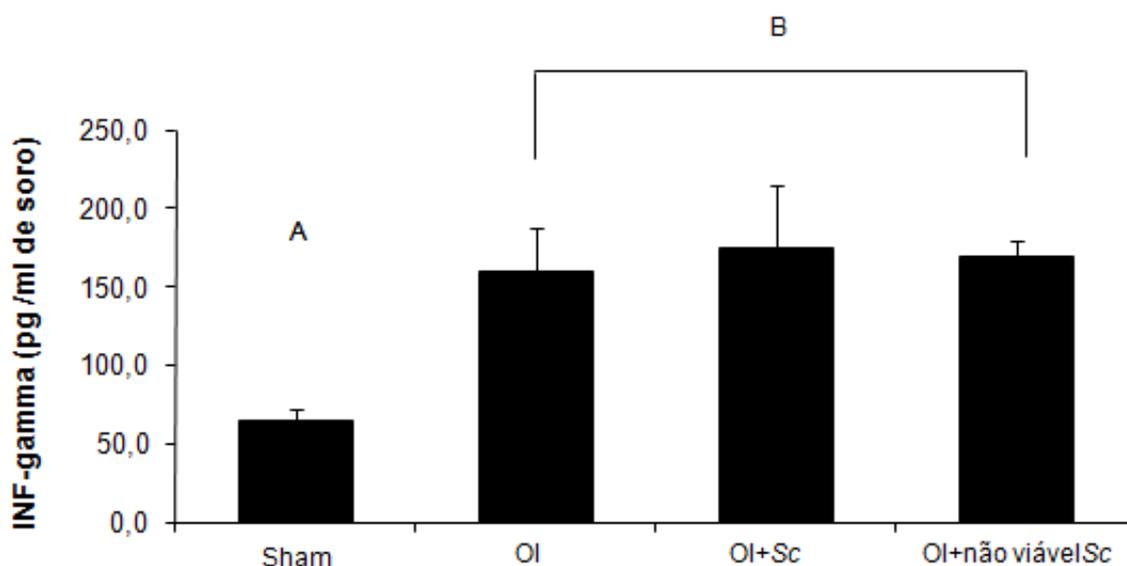


FIGURA II.3 Níveis de citocinas INF- γ no plasma dos animais.

Grupos Sham, OI, OI+Sc e OI+ Sc não viável. Barras de erros mostram o desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. Teste T ($p < 0,05$). Dados expressos como média. N = 5.

3.5 Níveis intestinais de sIgA

Observa-se pela FIG.II.4 que os níveis de sIgA foram estatisticamente iguais para os grupos Sham (736 mg/g), OI (742 mg/g) e OI+Sc não viável (973 mg/g) ($p > 0,05$). O tratamento com células viáveis da levedura aumentaram significativamente os níveis de sIgA (1248,0 mg/g), quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$).

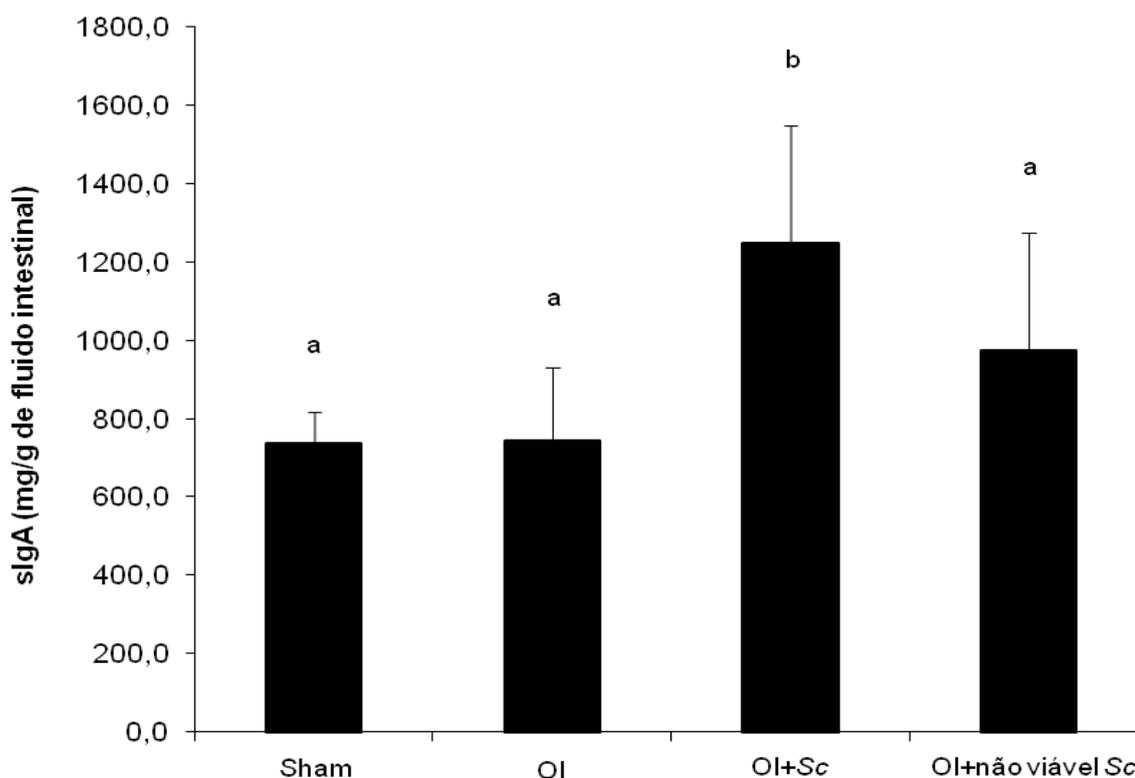


FIGURA II.4 Níveis de sIgA no fluido intestinal dos animais.

Grupos Sham, OI, OI+Sc e OI+Sc não viável. Barras de erros mostram o desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa. Teste T ($p < 0,05$). Dados expressos como média. N=5.

3.6 Análise histológica

A FIG.II.5 mostra que as lesões histopatológicas da mucosa do intestino delgado dos camundongos foram mais graves no grupo OI (FIG.II.5A-B) quando comparado ao grupo Sham (FIG.II.5C-D). Estas lesões foram caracterizadas por áreas de encurtamento intenso das vilosidades, alargamento e edema da lâmina própria. Por outro lado, a mucosa dos animais tratados com ambas as células viáveis (FIG.II.5E-F) ou não viáveis de *S. cerevisiae* UFMG 905 (FIG.II.5G-H) mostrou aspecto similar ao padrão normal, inclusive com presença de células caliciformes, exceto para o edema focal na mucosa e submucosa da lâmina própria.

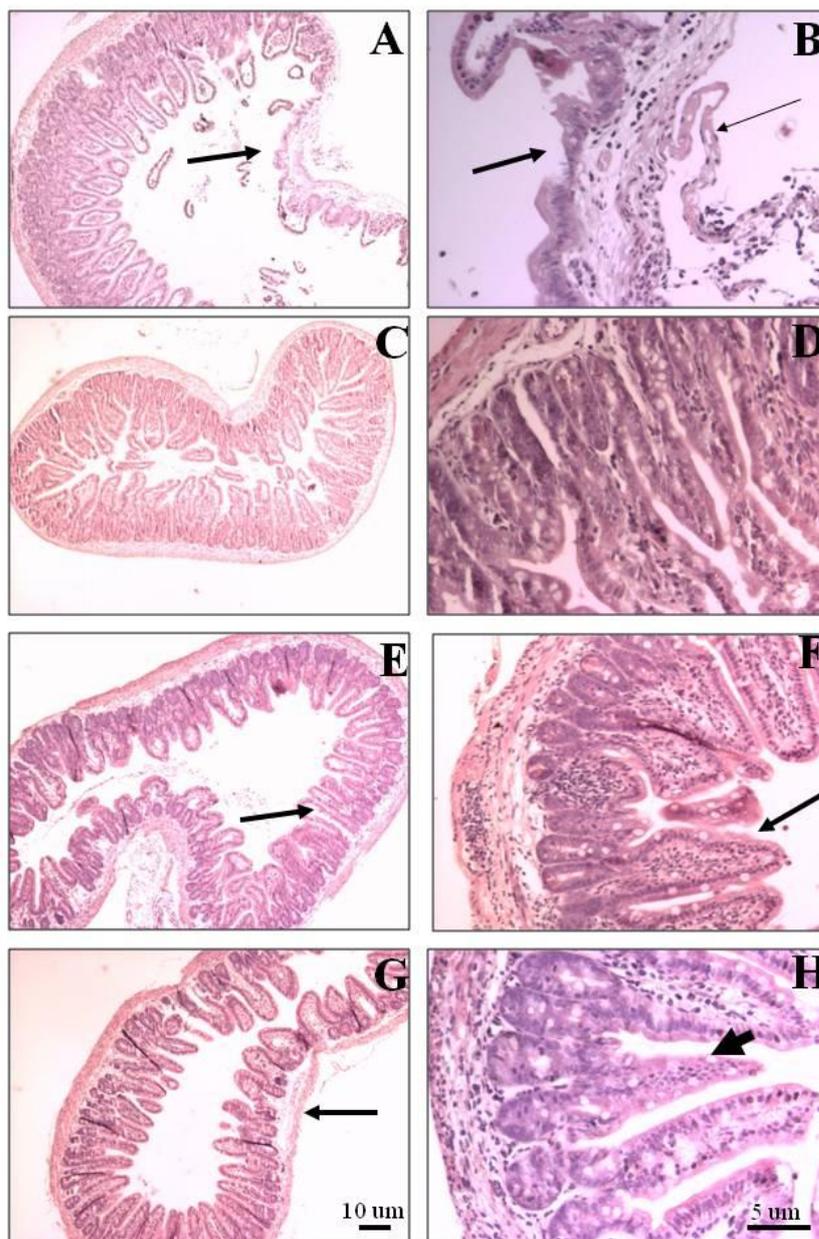


FIGURA II.5 Cortes histológicos da mucosa do intestino delgado de animais.

Grupos OI (A, B), Sham (C, D), OI + Sc (E, F), e OI+Sc não viável (G, H). Anéis do intestino representam a parede do íleo de diferentes grupos, com áreas de erosão superficial e encurtamento das vilosidades (setas longas, A, B). Necrose da camada muscular e submucosa (seta fina, B). Recuperação parcial do aspecto viloso (setas, E, F), presença de células caliciformes (seta larga, H), exceto para o edema focal na sub-mucosa da lâmina própria (seta longa, G). H & E; Em (A, C, E, G) Barra representa 10µ. No grupo B, D, F, H, barra representa 5µ.

4 DISCUSSÃO

Poucas cepas de leveduras têm sido estudadas como possíveis agentes bioterapêuticos. *S. boulardii* é uma das primeiras e, atualmente, a única levedura comercializada em medicina humana. No entanto, outras *Saccharomyces* ssp. ou membros de outros gêneros de leveduras, como *Kluyveromyces* ssp. (KUMURA et al., 2004) e *Pichia* spp. (TIAGO et al., 2009), provavelmente podem possuir atividade probiótica semelhante, ou melhor, à do *S. boulardii*. Neste contexto, o Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG isolaram da cachaça a levedura *S. cerevisiae*, linhagem UFMG 905. Após estudos *in vitro* e *in vivo* observaram que a mesma apresentou diversas características de um probiótico (MARTINS et al., 2005b; MARTINS et al., 2007).

Assim, o presente trabalho avaliou o tratamento oral com suspensão de células viáveis ou não viáveis de *S. cerevisiae* UFMG 905, no processo de translocação bacteriana com ênfase na barreira intestinal e na resposta imunológica local e sistêmica.

A TB foi avaliada por meio da captação de ^{99m}Tc -*E. coli* em diversos órgãos e sangue. Trata-se de método rápido, direto e simples, capaz de detectar bactérias vivas, mortas e seus fragmentos, além de não requerer condições assépticas. Já os métodos de cultura microbiana são muito trabalhosos e requerem ambientes assépticos e, ainda, detectam somente bactérias vivas (LITCHMAN, 2001; GATT et al., 2007). Segundo GATT et al. (2007) tanto bactérias vivas como seus fragmentos e subprodutos, presentes na corrente sanguínea podem desencadear estímulos a resposta inflamatória.

Em circunstâncias normais, a mucosa intestinal é a maior barreira para impedir que as bactérias invadam os tecidos e órgãos sistêmicos. Entende-se por translocação bacteriana a passagem de bactérias viáveis endógenas e seus produtos através da mucosa intestinal intacta para os linfonodos mesentéricos, cavidade peritoneal, baço, fígado e corrente sanguínea (ALDEMIR et al., 2002). A maioria dos microrganismos que translocam são posteriormente sujeitos a fagocitose por macrófagos, mas alguns ainda são encontrados livres na corrente sanguínea e vasos linfáticos (LITCHMAN, 2001; WIEST & RATH 2003, GATT et al., 2007).

Os resultados do presente trabalho mostraram que o modelo de obstrução intestinal promoveu aumento significativo da TB para o sangue e todos os órgãos

investigados nos animais do grupo OI, quando comparados aos camundongos do grupo Sham (TAB.II.1). Na obstrução intestinal há interrupção total ou parcial do fluxo intestinal levando ao acúmulo de gases, secreções e diminuição do peristaltismo. Estas alterações promovem proliferação bacteriana e alteração da permeabilidade intestinal, eventos descritos como desencadeadores da TB (CHANG et al., 2001; AKIN et al., 2002). Por outro lado, os animais tratados previamente com células viáveis ou não viáveis de *S. cerevisiae* UFMG 905 mostraram diminuição significativa da captação da ^{99m}Tc -*E.coli* para sangue e todos os órgãos em relação ao grupo OI. Estes resultados estão em conformidade com os observados com estudos com a levedura *S. boulardii* (HEREK et al., 2004). MARTINS et al. (2007) também observaram uma redução dos níveis de TB para *Salmonella* Typhimurium em camundongos tratados com *S. cerevisiae* UFMG 905, mas em modelo experimental de infecção com este agente patogênico.

Além disso, a TB nos animais tratados com as leveduras diminuiu para níveis semelhantes ao grupo Sham. Os baixos níveis de ^{99m}Tc -*E. coli* no sangue e órgãos de camundongos controle indicam uma TB basal, sem qualquer disfunção aparente. De acordo com dados da literatura, baixos níveis de TB caracteriza-se como processo fisiológico essencial para modular o sistema imunológico de forma local e sistêmica, levando a indução de tolerância aos antígenos em contato com a mucosa epitelial (LICHTMAN, 2001; DEITCH, 2002).

Os mecanismos envolvidos na redução da TB por probióticos ainda não estão totalmente elucidados, várias hipóteses têm sido sugeridas. No caso da levedura, ela pode competir com as bactérias para o receptor específico sobre o epitélio intestinal e/ou aumentar a produção de sIgA, uma vez que ambos os mecanismos podem interferir na aderência da bactéria, passo inicial necessário para a sua posterior translocação. Além disso, bactérias que produzem fimbria tipo I, *E. coli* e *Salmonella*, são capazes de se ligar a resíduos de manose presentes na parede celular de levedura (GEDEK, 1999). Assim, a ligação de *E. coli* na *S. cerevisiae* UFMG 905 no intestino dos camundongos pode inibir a adesão dessa bactéria no epitélio intestinal e translocação. Outro mecanismo possível é que a levedura poderia preservar a integridade da mucosa intestinal e permeabilidade, que são afetadas durante os episódios infecciosos e patológicos, além de interferir no sistema imunológico.

No presente estudo, a permeabilidade intestinal foi avaliada utilizando a permeação do ^{99m}Tc -DTPA do intestino para o sangue. A análise da alteração na permeabilidade intestinal pode ser feita por meio de testes especificamente designados

para avaliar a função da barreira intestinal, como passagem paracelular de moléculas grandes (> 150 Daltons) ex. açúcares e fármacos, do intestino para o plasma e, conseqüentemente, para a urina (LICHITMAN, 2001; KATOUZIAN et al., 2005). Os padrões de alteração da permeabilidade intestinal podem apresentar-se como processo temporário e reversível dentro de algumas horas, como por exemplo, em situações de estresse. Ou, por outro lado, processo de longo prazo que pode ser irreversível ou reversível, como em casos de inflamação, efeito de toxinas, desnutrição, citocinas pró-inflamatórias e hormônios (SUN et al., 2000). O $^{99m}\text{Tc-DTPA-CaNa}_3$ é um complexo trissódico com peso molecular de 549 Daltons que satisfaz os critérios descritos acima, além de ser facilmente detectável. Segundo JORGENSEN et al. (2006) $^{99m}\text{Tc-DTPA-CaNa}_3$ é um método válido para avaliar as alterações da permeabilidade intestinal. O pré-tratamento com células viáveis e não viáveis de *S. cerevisiae* UFMG 905 impediu o aumento da permeabilidade intestinal, e os valores obtidos foram similares aos observados no grupo Sham, durante todo o período experimental (FIG.II.1). Estes resultados mostraram que independentemente da viabilidade das células, a levedura foi capaz de manter a integridade do epitélio intestinal sendo este um possível mecanismo de proteção contra a TB. Estes dados estão de acordo com os encontrados por MIYAUCHI et al. (2009). Estes pesquisadores mostraram que tanto probióticos viáveis ou não viáveis foram capazes de proteger contra o aumento da permeabilidade da mucosa, em modelo de colite induzida. Este evento pode ser parcialmente explicado pelo aumento da expressão de zônula ocludência-1 e quinase de cadeias leves de miosina em células epiteliais intestinais tratadas com probióticos. Essas estruturas atuam aumentando a força do citoesqueleto, diminuindo assim a permeabilidade intestinal.

Reforçando estes dados, a análise histológica (FIG. II.5A, B) mostrou que a OI foi associada com lesões intensas da mucosa do intestino delgado, resultando em dano celular e arquitetônico que provavelmente promoveu TB. OI representa modelo de curto espaço de tempo por lesão sub-isquêmica do íleo. Amostras dos anéis da parede do íleo afetado pela OI mostraram lesão da mucosa caracterizada por edema, dano epitelial, erosão superficial e alterações de arquitetura representada pelo encurtamento e alargamento das vilosidades. Tratamento prévio com células viáveis e não viáveis de *S. cerevisiae* UFMG 905 foi capaz de preservar o epitélio intestinal (FIG.II.5E-H). Resultados semelhantes foram relatados por ALDEMIR et al. (2002) e GEYIK et al. (2006) que observaram maior altura das vilosidades em ratos tratados com *S. boulardii* e submetidos à obstrução da alça intestinal, quando comparados ao grupo

controle. A proteção é claramente demonstrada na vista panorâmica das amostras representativas de OI+Sc e OI+Sc não viável (FIG.II.5 E-H), que mostrou aspecto preservado das vilosidades, apesar da persistência de edema e congestão vascular na lâmina própria. Pode-se especular que nestas condições tanto o epitélio quanto a lâmina própria das vilosidades do íleo foram capazes de resistir à lesão sub-isquêmica, como ficou demonstrado pelo aspecto mais preservado de vilosidades. No presente trabalho, células viáveis e não viáveis de *S. cerevisiae* UFMG 905 tiveram efeitos benéficos sobre a integridade da barreira intestinal, estes dados estão de acordo com aqueles observados por LI et al. (2009), mas com bactérias probióticas.

Além da importante função de barreira, sabe-se que o trato gastrointestinal possui densa população de células imunológicas e que os probióticos poderiam atuar na imunomodulação regulando a quantidade e tipo de citocina a ser produzida por essas células (HILL & ARTIS, 2010; FINK, 2010). Os níveis e o tipo de citocinas circulantes são preditores de injúria ou infecção. Os efeitos dos linfócitos TH1 e TH2 são contra-regulatórios. As citocinas TH1, tais como o INF- γ e TNF- α , aumentam a imunidade mediada por células, o que resulta em ativação, crescimento e diferenciação de linfócitos T e B, bem como macrófagos, aumentando a capacidade fagocitária dos mesmos, porém em excesso é responsável por danos a barreira intestinal e aumento da permeabilidade (HILL & ARTIS, 2010; FINK, 2010). Em concordância, no presente estudo foi observado aumento da produção da citocina INF- γ em todos os grupos submetidos a OI quando comparado com o grupo Sham (FIG.II.3). Já a produção da citocina IL-10 foi estatisticamente maior nos grupos tratados com a levedura viável ou não viável, quando comparado ao grupo OI. (FIG.II.2). Esta citocina exerce regulação negativa na expressão de citocinas TH1 e antígenos MHC classe II. Também aumenta a sobrevivência das células B e a proliferação e produção de anticorpos. Estudos em camundongos *Knock-out* sugeriram que a função da IL-10 como imunorreguladora é essencial no trato intestinal (GRIMBALDESTON et al., 2007). Este efeito estimulador da IL-10 por leveduras confirma os resultados similares obtidos por MARTINS et al. (2010) com *S. boulardii*. Estes resultados também são semelhantes aos encontrados por IMAOKA et al. (2008) e LI et al. (2009) que observaram aumento da produção de IL-10 após os tratamentos com probióticos viáveis ou não viáveis, mostrando dessa forma o papel imunorregulador da levedura e, que este não depende da sua viabilidade.

Outro mecanismo importante na proteção da TB seria o fato da levedura induzir a um aumento na produção de sIgA. Esta é uma imunoglobulina presente na primeira

linha de defesa imunológica do intestino, atuando como uma barreira contra a adesão de patógenos à mucosa intestinal (HAJISHENGALLIS et al., 1992). No presente estudo, pode-se observar aumento da produção de sIgA intestinal após o tratamento com células viáveis de *S. cerevisiae* UFMG 905, mas este efeito não ocorreu quando os animais foram tratados com células não viáveis da levedura (FIG.II.4).

Sabe-se que o aumento da produção de sIgA está relacionado à estímulos dados por componentes da parede celular, mecanismo independente da viabilidade das células (RODRIGUES et al., 2000; SAWAI et al., 2001). Entretanto, os níveis intestinais de sIgA obtidos utilizando células não viáveis *S. cerevisiae* UFMG 905 não mostraram aumento significativo, sugerindo que o estímulo à produção desta imunoglobulina seria mediado pelo metabolismo da levedura. Esta hipótese pode ser respaldada por BUTS & DE KEYSER (2006). Estes autores observaram que a estimulação da produção de sIgA poderia ser alternativamente associada à substâncias secretadas pelas leveduras, como as poliaminas, que são potentes mediadores de resposta trófica intestinal.

Concluindo, os resultados do presente estudo demonstraram que células viáveis, bem como não viáveis de *S. cerevisiae* UFMG 905 foram capazes de reduzir a TB e lesões histológicas, provavelmente por imunomodulação sistêmica e pela manutenção da integridade da barreira intestinal. Apenas a estimulação da produção de sIgA parece depender da viabilidade da levedura.

3 CONCLUSÕES INTEGRADAS

- O tratamento oral prévio com células viáveis e não viáveis de ambas as leveduras foi capaz de exercer efeito protetor na barreira intestinal, reduzindo os danos provocados na mucosa, diminuindo os níveis de translocação bacteriana.

- As células viáveis e não viáveis de *S.boulardii* e *S. cerevisiae* UFMG 905 exerceram efeitos imunomoduladores na resposta sistêmica, mantendo os níveis da citocina pró-inflamatória INF- γ e aumentando os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10.

- O estímulo para a produção da imunoglobulina sIgA depende da viabilidade celular para a levedura *S. cerevisiae* UFMG 905. O mesmo não foi verificado para *S.boulardii*.

- Os resultados obtidos mostraram que a diminuição da permeabilidade e a manutenção arquitetura intestinal além da, imunomodulação sistêmica e redução dos níveis de translocação bacteriana independem da viabilidade celular, para ambas as leveduras.

4 PERSPECTIVAS

- Avaliar os níveis das citocinas pró e anti- inflamatórias na mucosa intestinal na região da obstrução intestinal;
- Investigar os mecanismos pelos quais os probióticos exercem ação na redução da permeabilidade intestinal;
- Investigar a razão pela qual as células não viáveis do *S. cerevisiae* UFMG 905 não estimularam a produção de sIgA.
- Realizar ensaios clínicos utilizando ambas as leveduras.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, C. A. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutr Res Rev.*, v.23, p. 37-46, 2010
- AKIN, M. L.; ULUUTKU, H.; ERENOGLU, C.; ILICAK, E. N.; ELBUKEN, E.; ERDEMOGLU, A.; CELENK, T. Hyperbaric oxygen ameliorates bacterial translocation in rats with mechanical intestinal obstruction. *Dis Colon Rectum.*, v. 45, p. 967-972, 2002.
- ALDEMIR, M.; KÖKOGLU, O. F.; GEYIK, M. F.; BÜYÜKBAYRAM, H. Effects of octreotide acetate and *Saccharomyces boulardii* on bacterial translocation in an experimental intestinal loop obstruction model of rats. *Tohoku J Exp Med.*, v. 198, p.1-9, 2002.
- ARRIETA, M. C.; BISTRITZ, L.; MEDDINGS, J. B. Alterations in intestinal permeability. *Gut.*, v. 55, p.1512-1520, 2006.
- BEAUGERIE, L.; FLAHAUT, A.; BARBUT, F.; ATLAN, P.; LALANDE, V.; COUSIN, P.; CADILHAC, M.; PETIT, J. C. Antibiotic associated diarrhoea and *Clostridium difficile* in the community. *Aliment Pharmacol Ther.*, v. 17, v.905-12, 2001.
- BERG, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends Microbiol.*, v.3, p. 149-154, 1995.
- BERG, R. D. Mechanisms promoting bacterial translocation from the gastrointestinal tract. In: *Old Herborn University Seminar Monograph*. Herborn-Diel: Department of Microbiology and Immunology, p. 31-33, 2001.
- BERMAN, S. H.; EICHELSDOERFER, P.; YIM, D.; ELMER, G. W.; WENNER, C. A. Daily ingestion of a nutritional probiotic supplement enhances innate immune function in healthy adults. *Nutr Res.*, v.26, p. 454-459, 2006.

- BJARNASON, I.; MACPHERSON, A.; HOLLANDER, D. Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology.*, v.108, p.1566-81, 1995.
- BRANDÃO, R. L.; CASTRO, I. M.; BAMBIRRA, E. A.; AMARAL, S. C.; FIETTO, L. G.; TROPIA, M. J.; NEVES, M. J.; DOS SANTOS, R. G.; GOMES, N. C.; NICOLI, J. R. Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 64, p. 564-568, 1998.
- BRANDT, K. G.; SAMPAIO, M. M. S. C.; MIUKI, C. J. Importância da microflora intestinal. *Pediatrics* (São Paulo), v. 28, p. 117-127, 2006.
- BROWN, S. R.; ADAMS, I. J. Intestinal obstruction. *Acute Abdomen.*; p. 157-164, 2002.
- BUTS, J. P.; DE KEYSER, N. Effects of *Saccharomyces boulardii* on intestinal mucosa. *Dig Dis Sci.*, v. 51, p.1485-1492, 2006.
- CABALLERO-FRANCO, C.; KELLER, K.; DE SIMONE, C.; CHADEE, K. The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, v.292, p.315-322, 2007.
- CENAC, N.; GARCIA-VILLAR, R.; FERRIER, L.; LARAUCHE, M.; VERGNOLLE, N.; BUNNETT, N. W.; COELHO, A. M.; FIORAMONTI, J.; BUENO, L. Proteinase-activated receptor-2-induced colonic inflammation in mice: possible involvement of afferent neurons, nitric oxide, and paracellular permeability. *J Immunol.*, v. 15, p.4296-300, 2003.
- CHANG, T. M. C.; LU, R. H.; TSAI, L. M. Glutamine ameliorates mechanical obstruction-induced intestinal injury. *J. Surg. Res.*, v. 95, p.133-140, 2001.
- CHAPMAN, M. H.; SANDERSON, I. R. A microbiota intestinal e o sistema imune de mucosa. *In: Anais Nestlé*, v. 64, p. 14-25, 2005.
- CHIU, C. J.; MCARDLE, A. H.; BROWN, R.; SCOTT, H. J.; GURD, F. N. Intestinal mucosal lesion in low flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg.*, v. 101, p.478-483, 1970.

- COPPOLA, M. M.; GIL-TURNES, C. Probiotics and immune response. *Cienc. Rural*, vol.34, 2004.
- CORREIA, M. I. T. D.; NICOLI, J. R. The role of probiotics in gastrointestinal surgery. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.*, v. 9, p.618-621, 2006.
- CZERUCKA, D.; DAHAN, S.; MOGRABI, B.; ROSSI, B.; RAMPAL, P. *Saccharomyces boulardii* preserves the barrier function and modulates the signal 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.733-9, 2002.
- CZERUCKA, D.; PICHE, T.,; RAMPAL, P. Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. *Aliment Pharmacol Ther.*, v. p. 767-78, 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.; LOUBAT, A.; DAHAN, S.; CALLE, G.; RAMPAL, P.; CZERUCKA, D. *Saccharomyces boulardii* prevents TNF- α induced apoptosis in EHEC-infected T84 cells. *Res. Microbiol.*, v.157, p.456-65, 2006a.
- DALMASSO, G.; COTTREZ, F.; IMBERT, V.; LAGADEC, P.; et al. *Saccharomyces boulardii* inhibits inflammatory bowel disease by trapping T cells in mesenteric lymph nodes. *Gastroenterol.*, v. 131, p.1812–1825, 2006b.
- DANI, R.; CASTRO, L. P. *Gastroenterologia Clínica*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., v. 1, p.579, 1993.
- DEITCH, E. A. Bacterial translocation or lymphatic drainage of toxic products from the gut: What is important in human beings? *Surgery.*, v. 131, p. 241-244, 2002.

- DINIZ, S. O. F.; RESENDE, B. M.; NUNAN, E. A.; SIMAL, C. J. R.; CARDOSO, V. N.
^{99m}Techneium labeled *Escherichia coli*. *Appl. Radiat. Isot.*, v. 51, p.33-36, 1999.
- D´SOUZA, A. L.; RAJKUMAR, C.; COOKE, J.; BULPITT, C. J. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta analysis. *B M J.*, v. 324, p.1-6, 2002.
- DUGGAN, C.; GANON, J.; WALKER, W. A. Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 75, p. 789-808, 2002.
- EIZAGUIRRE, I.; URKIA, N. G.; ASENSIO, A. B.; ZUBILLAGA, P.; VIDALES, C.; GARCIA-ARENZANA, J. N.; ALDAZABAL M. Probiotic supplementation reduces the risk of bacterial translocation in experimental short bowel syndrome. *J Pediatr Surg.*, v. 37, p.699-702, 2002.
- FAO/WHO Food and Agricultural Organization/World Health Organization *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. London, Ontario, Canada. 11 p. April 30 and May 1, 2002.
- FIDAN, I.; KALKANCI, A.; YESILYURT, E.; YALCIN, B.; ERDAL, B.; KUSTIMUR, S.; IMIR, T. Effects of *Saccharomyces boulardii* on cytokine secretion from intraepithelial lymphocytes infected by *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Mycoses*, v. 52, p.29-34, 2009.
- FIETTO, J. L.; ARAÚJO, R. S.; VALADÃO, F. N.; FIETTO, L. G.; BRANDÃO, R. L.; NEVES, M. J.; GOMES, F. C.; NICOLI, J. R.; CASTRO, I. M. Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. *Can J Microbiol*, v. 50, p.615-621, 2004.
- FINK, L. N. Induction of regulatory T cells by probiotics: potential for treatment of allergy? *Clin Exp Allergy.*, v.40, p.:5-8, 2010.
- GAON, D. ; GARCIA, H. ; WINTER, L. ; RODRIGUES, N. ; QUINTAS, R.; GONZALES,

- S. N.; OLIVER, G. Effects of *Lactobacillus* strains and *Saccharomyces boulardii* in persistent diarrhea in children. *Medicina (Buenos Aires)*, v. 63, p. 293-298, 2003.
- GATT, M.; REDDY, B.S.; MACFIE, J. Review article: bacterial translocation in the critically ill - evidence and methods of prevention. *Aliment Pharmacol.*, v. 25, p. 741-757, 2007.
- GEYIK, M. F.; ALDEMIR, M.; HOSOGLU, S.; AYAZ, C.; SATILMIS, S.; BUYUKBAYRAM, H. et al. The effects of *Saccharomyces boulardii* on bacterial translocation in rats with obstruction jaundice. *Ann Rev Surg Engl.*, v.88, p.178-180, 2006.
- GRIMBALDESTON, M.; NAKAE, S.; KALESNIKOFF, J.; TSAI, M.; GALLI, S. J. Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. *Nat Immunol.*, v. 8, p.1095-1104, 2007.
- HAJISHENGALLIS, G.; NIKOLOVA, E.; RUSSEL, M.W. Inhibition of *Streptococcus mutans* adherence to saliva-coated hydroxyapatite by human secretory immunoglobulin A antibodies to cell surface protein antigen I/II: reversal by IgA 1 protease cleavage. *Infect Immun.*, v. 60, p.5057-5064,1992.
- HEREK, O.; KARA, I. G.; KALELI, I. Effects of antibiotics and *Saccharomyces boulardii* on bacterial translocation in burn injury. *Surg Today.*, v. 34, p.256-260, 2004.
- HILL, D. A.; ARTIS D. Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. *Annu Rev Immunol.*, v.28, p.623-67, 2010.
- HOOPER, L. V.; GORDON, J. L. Commensal host-bacterial relationship in the gut. *Science.*, v. 292, p. 1115-8, 2001.
- IMAOKA, A.; SHIMA, T.; KATO, K., MIZUNO, S.; UEHARA, T.; MATSUMOTO, S.; SETOYAMA, H.; HARA, T.; UMESAKI, Y. Anti-inflammatory activity of probiotic *Bifidobacterium*: enhancement of IL-10 production in peripheral blood

mononuclear cells from ulcerative colitis patients and inhibition of IL-8 secretion in HT-29 cells. *World J Gastroenterol.*, v. 16, p. 2511-6, 2008.

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

JORGENSEN, B.; KELLER, A.; RADVANSKA, E.; RITTIG, S.; TAAGEHOJ-JENSEN, F.; FROKIAER, J.; JORGENSEN, T.; PEDERSEN, M. Reproducibility of contrast enhanced magnetic resonance renography in adolescents. *J Urol.*, v. 176, p.1171-1176, 2006.

KATARIA, J.; LI, N.; WYNN, J.L.; NEU, J. Probiotic microbes: do they need to be alive to be beneficial? *Nutr Rev.*, v. 67, p.546-50, 2009.

KATOUZIAN, F.; SBLATTERO, D.; TARCISIO, N.; TOMMASINI, A.; GIUSTO, E.; MEIACCOA, D.; et al. Dual sugar gut-permeability testing on blood drop in animal models. *Clin Chem Acta.*, v. 352, p.191-197, 2005.

KELLY, D.; KING, T.; AMINOV, R. Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity. *Mutat Res.*, v. 622, p.58-69, 2007.

KUDSK, K. A. Current aspects of mucosal immunology and its influence by nutrition. *Am J Surg.*, v. 183, p. 390-398, 2002.

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

LICHTMAN, S.M. Bacterial translocation in humans. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, v. 33, p. 1-10, 2001.

LI, N.; RUSSELL, W. M.; DOUGLAS-ESCOBAR, M.; HAUSER, N.; LOPEZ, M.; NEU, J. Live and heat-killed *Lactobacillus rhamnosus* GG: effects on proinflammatory and anti-inflammatory cytokines/chemokines in gastrostomy-fed infant rats. *Pediatr Res.*, v. 66, p. 203-7, 2009.

- LIM, L. H.; LI, H. Y.; HUANG, C. H.; LEE, B. W.; LEE, Y. K.; CHUA, K. Y. The effect of heat-killed wild-type *Lactobacillus casei* shirota on allergic immune responses in an allergy mouse. *Int Arch Allergy Immunol*, v. 148, p.297-304, 2009.
- LUTGENDORFF, F.; AKKERMANS, L. M. A.; SÖDERHOLM, J. D. The role of microbiota and probiotics in stress-induced gastrointestinal damage. *Curr Mol Med.*, v. 8, p.282-298, 2008.
- MACFIE, J.; O'BOYLE, C.; MITCHELL, C. J.; BUCKLEY, P. M.; JOHNSTONE, D.; SUDWORTH, P. Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity. *Gut*, v.45, p.223-228, 1999.
- MACFIE, J. Current status of bacterial translocation as a cause of surgical sepsis. *Br. Med. Bull*, v. 71, p. 1-11, 2004.
- MACFIE, J.; REDDY, B. S.; GATT, M.; JAIN, P. K.; SOWDI, R.; MITCHELL, C. J. Bacterial translocation studied in 927 patients over 13 years. *Br. J. Surg.*, v. 93, p. 87-93, 2006.
- MCNAUGHT, C. E.; WOODCOCK, N. P.; ANDERSON, A. D.; MACFIE, J. A prospective randomized trial of probiotics in critically ill patients. *Clin Nutr.*, v. 24, p. 211-219, 2005.
- MACUTKIEWICZ, C., CARLSON, G.L. Acute abdomen: intestinal obstruction. *Surgery.*, v. 23 p. 208-212, 2005.
- MADDEN, J. A.; PLUMMER, S. F.; TANG, J.; GARAIOVA, I.; PLUMMER, N. T.; HERBISON, M.; HUNTER, J. O.; SHIMADA, T.; CHENG, L.; SHIRAKAWA, T. Effects of probiotics on preventing disruption of intestinal microflora following antibiotic therapy: A double-blind, placebo-controlled pilot study. *Int Immunopharmacol.*, v.5, p. 1091-1097, 2005.

- MAEDA, N.; NAKAMURA, R.; HIROSE, Y.; MUROSAKI, S.; YAMAMOTO, Y.; KASE, T.; YOSHIKAI, Y. Oral administration of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 enhances protection against influenza virus infection by stimulation of type I interferon production in mice. *Int Immunopharmacol.*, v. 9, p.1122-5, 2009.
- MARCHIANDO, A. M.; GRANHAM, W. V.; TURNER, J. R. Epithelial barriers in homeostasis and disease. *Annu Rev Pathol*, v.5, p. 119-44, 2010.
- MARTEAU, P.; BOUTRON-RUAULT, M. C. Nutritional advantages of probiotics and prebiotics. *Br J Nutr.*, v. 87, p. 153-157, 2002.
- MARTINS, F. S.; TIAGO, F. C. P.; BARBOSA, F. H. F.; PENNA, F. J.; ROSA, A. C.; NARDI, R. M. D.; NEVES, M. J.; NICOLI, J. R. Utilização de leveduras como probióticos. *Rev. Biol. Ciências Terra*. v.5, p.1519-1530, 2005a.
- MARTINS, F. S.; NARDI, R. M. D.; ARANTES, R. M. E.; ROSA, C. A.; NEVES, M. J.; NICOLI, J. R. Screening of yeasts 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. Estudo do potencial probiótico de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* através de testes *in vitro*. *Rev. Biol. Ciência Terra*. 5. 2005c.
- MARTINS, F. S.; RODRIGUES, A. C. P.; TIAGO, F. C. P.; PENNA, F. J.; ROSA, C. A.; ARANTES, R. M. E.; NARDI, R. M. D.; NEVES, M. J.; NICOLI, J. R. *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. *J. Med. Microbiol.*, v. 56, p. 352-359, 2007.
- MARTINS, F. S.; DALMASSO, G.; ARANTES, M. R.E.; DOYE A, LEMICHEZ, E.; LAGADEC, P. et al. Interaction of *Saccharomyces boulardii* with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium protects mice and modifies T84 cell response to the infection. *PLoS ONE.*, v. 5, p.e8925, 2010.

- MIYAUCHI, E.; MORITA, H.; TANABE, S. *Lactobacillus rhamnosus* alleviates intestinal barrier dysfunction in part by increasing expression of zonula occludens-1 and myosin light-chain kinase in vivo. *J Dairy Sci.*, v. 92, p.2400-2408, 2009.
- MOGILNER, J. G.; SRUGO, I.; LURIE, M.; SHAOUL, R.; CORAN, A.G.; SHILONI, E. et al. Effect of probiotics on intestinal regrowth and bacterial translocation after massive small bowel resection in a rat. *J Pediatr Surg.*, v. 42, p.1365-1371, 2007.
- MOUNTZOURIS, K. C.; MCCARTNEY, A. L.; GIBSON, G. R. Intestinal microflora of human infants and current trends for its nutritional modulation *Br J Nutr.*, v.87, p. 405-420, 2002.
- MOUNTZOURIS, K. C.; GIBSON, G. R. Colonização do trato gastrintestinal. *In: Anais Nestlé*, v. 64, p. 1-13, 2005.
- NAABER, P.; SMIDT, I.; TAMME, K.; LIIGANT, A.; TAPFER, H.; MIKELSAAR, M.; TALVIK, R. Translocation of indigenous microflora in an experimental model of sepsis. *J. Med. Microbiol.*, v.49, p.431-439, 2000.
- NG, S. C.; HART, A. L.; KAMM, M. A.; STAGG, A. J.; KNIGHT, S. C. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflamm Bowel Dis.*, v. 15, p.300-310, 2009
- O'BOYLE, C. J.; MACFIE J. C.; MITCHELL, J.; JOHNSTONE, D.; SAGAR, P. M.; SEDMAN, P. C. Microbiology of bacterial translocation in humans. *Gut.*, v. 42, P. 29-35, 1998.
- OHASHI, Y.; USHIDA, K. Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. *Anim Sci J.* v. 80, p. 361–371, 2009.
- OLIVEIRA, M. A.; LEMOS, D. L.; DINIZ, A. O. F.; COELHO, J.; CARDOSO, V. N. Prevention of bacterial translocation using glutamine: a new strategy of investigation. *Nutrition.*, v. 22, p. 419-424, 2006.
- PENNER, R.; FEDORAK, R. N.; MADSEN, K. Probiotics and nutraceuticals: non-

- medicinal treatments of gastrointestinal diseases. *Curr Opin Pharmacol.*, v. 5, p. 596-603, 2005.
- QUIRINO, I. E. P.; CORREIA, M. I. T. D.; CARDOSO, V. N. The impact of arginine on bacterial translocation in an intestinal obstruction model in rats. *Clin Nutr.*, v. 26, p.335-340, 2007.
- RAYES, N.; SEEHOFER, D.; HANSEN, S.; BOUCSEIN, K.; MULLER, A. R.; SERKE, S.; BENMGARK, S.; NEUHAUS, P. Early enteral supply of lactobacillus and fiber versus selective bowel decontamination: a controlled trial in liver transplant recipients. *Transplantation*, v. 74, p. 123-127, 2002.
- RESTA-LENERT, S.; BARRETT, K. E. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli*. *Gut*, v. 52, p. 988-997, 2003.
- RESTA-LENERT, S.; BARRETT, K. E. Probiotics and commensals reverse TNF- α and INF- γ induced dysfunction in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, v. 130, p. 731-746, 2006.
- RODRIGUES, A. C. P.; NARDI, R. M. D.; BAMBIRRA, E. A.; VIEIRA, E. C.; NICOLI J. R. Protective effect of *Saccharomyces boulardii* against experimental oral infection with *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* in gnotoxenic mice. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 81, p. 251-256, 1996.
- RODRIGUES, A. C. P.; CARA, D. C.; FRETEZ, S. H. G. G.; CUNHA, F. Q.; VIEIRA, E. C.; 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. 89, p. 404-414, 2000.
- SAGAR, P.M., MACFIE, J., SEDMAN, P., MAY, J., MANCEY-JONES, B., JOHNSTONE, D. Intestinal obstruction promotes gut translocation of bacteria. *Dis Colon Rectum.*, v. 38, p.640-644, 1995

- SALZEDAS-NETTO, A. A.; SILVA, R. M.; MARTINS, J. L.; MENCHACA-DIAZ, J. L.; BUGNI, G. M.; WATANABE, A. Y.; SILVA, F. J.; FAGUNDES-NETO, U.; MORAIS, M. B.; KOH, I. H. Can bacterial translocation be a beneficial event? *Transplant Proc.*, v. 38, p. 1836-1837, 2006.
- SAWAI, T.; GOLDSTONE, N.; DRONGOWSKI, R.A.; CORAN, A. G.; HARMON, C. M. Effect of secretory immunoglobulin A on bacterial translocation in an enterocyte-lymphocyte co-culture model. *Pediatr Surg Int*, v. 17, p. 275-279, 2001.
- SEEHOFER, D.; RAYES, N.; SCHILLER, R.; STOCKMANN, M.; MULLER, A.; SCHIRMEIER, A.; SCHAEFER, F.; TULLIUS, S. G.; BENGMARK, S.; NEUHAUS, P. Probiotics partly reverse increased bacterial translocation after simultaneous liver resection and colonic anastomosis in rats. *J Surg Res.*, v. 117, p. 262-271, 2004.
- SCHMIDT H.; MARTINDALE, R. The gastrointestinal tract critical illness: nutritional implication. *Cur Opin Clin Nutr Metab Care*, v. 6, p. 587-591, 2003.
- SOETERS, P.B. Probiotics: Did we go wrong, and if so, where? *Clin Nutr.*, v. 27, p.173-178, 2008.
- SULLIVAN, E. A., NORD, C. Probiotics and gastrointestinal diseases. *J. Intern. Med.*, v. 257, p. 78-92, 2005.
- SUN, Z.; WANG, X.; DENG, X.; BORJESSON, A.; WALLEN, R.; HALLBERG, E.; ANDERSSON, R. Phagocytic and intestinal endothelial and epithelial barrier function during the early stage of small intestinal ischemia and reperfusion injury. *Shock*, v. 13, p. 209-216, 2000.
- SURAWICZ, C, M. Probiotics antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* diarrhea in humans. *Best Pract Clin. Gastroenterol.*, v.17, p.775-783, 2003.
- TANNOCK, G. Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspects. 1st ed. Caister Academic Press, University of Otago, Dunedin, New Zealand, 2005.

- TEITELBAUM, J. E.; WALKER, W., A. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annu Rev Nutr.*, v. 22, p. 107-138, 2002.
- 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.*, v. 25, p.657-666, 2009.
- TIMMERMAN, H.M.; NIERS, L.E.M.; RIDWAN, B.U.; KONING, C.J.M.; MULDER, L.; AKKERMANS, L.M.A.; et al. Design of a multispecies probiotics mixtures to prevent infectious complications in critically ill patients. *Clin Nutr.*, v. 26, p.450-459, 2007.
- VARELLA, M. J. F. M.; ERNESTO, T. L.; GARCIA, C. P.; DO ROSÁRIO, D. L. U. M.; AFONSO, J. A.; VANNUCCHI, H. Intestinal permeability and oxidative stress in patients with alcoholic pellagra. *Clin Nutr.*, v.25, p.977-83, 2006.
- VIANA, M.; SANTOS, R.; GENEROSO, S.; ARANTES, R.; CORREIA, M.; CARDOSO, V. Pretreatment with arginine preserves intestinal barrier integrity and reduces bacterial translocation in mice. *Nutrition.*, v. 26, p.218-233, 2009.
- VIDAL, M. A. N. Obstrução intestinal: causas e condutas. *Rev Bras Coloproct.*, vol. 25, p. 332-338, 2005.
- VILELA, E. G.; DE ABREU FERRARI, M. L.; DE GAMA TORRES, H. O.; MARTINS, F. P.; GOULART, E. M.; LIMA, A. S.; DA CUNHA, A. S. Influence of *Saccharomyces boulardii* on the intestinal permeability of patients with Crohn's disease in remission. *Scand J Gastroenterol.*, v.43, p.842-848, 2008.
- WATKINSON, P. J.; BARBER, V. S.; DARK, P.; YOUNG, J. D. The use of pre-pro and synbiotics in adult intensive care unit patients: Systematic review. *Clin Nutr.*, v.26, p.182-192, 2007.

WHITE, J. S.; HOPER, R. W.; CLEMENTS, W. D. B.; DIAMOND, T. Patterns of bacterial translocation in experimental biliary obstruction. *J Surg Res.*, v. 132, p.80-84, 2006.

WIEST, R; RATH, H. C. Bacterial translocation in the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, v. 17, p. 397–425, 2003.

ZAREIE, M.; JOHNSON-HENRY, K.; JURY, I.; YANG, P.C.; NGAN, B.Y.; MCKAY, D.M. et al. Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress. *Gut.*, v.55, p.1553-1560, 2006.

APÊNDICE