

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial



DISSERTAÇÃO

**SINERGISMO DOS PROBIÓTICOS *Saccharomyces boulardii* E *Bacillus cereus*
var. *Toyoi* SOBRE A IMUNOMODULAÇÃO EM CAMUNDONGOS**

Regina Maria Castelli

Pelotas, 2011

Regina Maria Castelli

**SINERGISMO DOS PROBIÓTICOS *Saccharomyces boulardii* E *Bacillus cereus*
var. *Toyo* SOBRE A IMUNOMODULAÇÃO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência. (Área do conhecimento: Ciência e Tecnologia Agroindustrial).

Orientadores: Prof.^a Dr.^a Ângela Nunes Moreira
Prof. Dr. Fabricio Rochedo Conceição
Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Pelotas, 2011

Catálogo na Publicação:
Maria Fernanda Monte Borges
CRB-10/1011

C348s Castelli, Regina Maria

Sinergismo dos probióticos *Saccharomyces boulardii* E *Bacillus cereus* var. *Toyoi* sobre a imunomodulação em camundongos / Regina Maria Castelli ; orientadores Ângela Nunes Moreira, Fabricio Rochedo Conceição, Wladimir Padilha da Silva. – Pelotas, 2011.
59 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas.

1. Probióticos 2. Sinergismo de probióticos 3. Imunomodulação 4. *Saccharomyces boulardii* 5. *Bacillus cereus* var. *Toyoi* I. Moreira, Ângela Nunes (orient.) II. Conceição, Fabricio Rochedo (orient.) III. Silva, Wladimir Padilha da (orient.) IV. Título.

CDD 576.163

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Ângela Nunes Moreira – UFPel

Prof. Ph.D. Fabio Pereira Leivas Leite – UFPel

Dr.^a Daiane Hartwig – UFPel

Prof.Ph D. Alan John Alexander McBride – UFPel

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela vida, pela minha família e amigos, por me dar saúde, perseverança e fé.

Tenho a melhor mãe e pai do mundo. Ilsa e Mario, obrigada pelo amor que me devotaram, pelo incentivo, coragem e exemplo de vida.

Meus irmãos Clodoaldo, Izabel, Alvacir, Paulo, obrigada pelo amor, pelo apoio, pela força e pela torcida. Andriza, Nathan e Santiago, obrigada pelo sorriso que acalma. Obrigada a Fabieli, minha irmã do coração, que sempre esteve comigo.

Meu noivo Gilson, obrigada pelo amor, paciência, companherismo e força por fazer parte da minha vida e me fazer a cada dia mais feliz e completa.

Amigos queridos, obrigada pela torcida. Em especial a Anne que teve um papel “significativamente” importante nessa dissertação e em minha vida.

A Carol, Rodrigo, e Vanessa obrigada pela amizade, pelas risadas e pela ajuda, sem vocês não teria sido tão divertido. Amiga Carla e Marcelo obrigada pelo incentivo.

A Caroline Rizzi, Amilton, Vanessa Galli, Giselli, Patrícia, Carol Magalhães, Suely, Micheli, obrigada pela colaboração e ajuda.

Aos demais colegas do laboratório de Imunologia Aplicada, aos laboratórios 1,4 e 7, laboratório de Microbiologia de alimentos, ao CDTec e ao DCTA, obrigada pela colaboração.

Meus orientadores, Ângela Nunes Moreira, Fabricio Rochedo Conceição e Wladimir Padilha da Silva, obrigada pelo apoio e dedicação.

Obrigada aos colegas e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

Resumo

CASTELLI, Regina Maria. **SINERGISMO DOS PROBIÓTICOS *Saccharomyces boulardii* E *Bacillus cereus* var. Toyoi SOBRE A IMUNOMODULAÇÃO EM CAMUNDONGOS.** 2011. 59f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A associação entre probióticos pode gerar uma resposta superior ou similar a soma da resposta obtida individualmente por cada um deles, ou seja, proporcionar um efeito sinérgico. A levedura *Saccharomyces boulardii* e a bactéria *Bacillus cereus* var. Toyoi apresentam a propriedade benéfica de modular a resposta imune do hospedeiro. O objetivo desse trabalho foi avaliar a associação entre os probióticos *S. boulardii* e *B. Toyoi* sobre a resposta imune humoral e celular em camundongos, utilizando a proteína recombinante internalina A (rInIA) de *Listeria monocytogenes* como antígeno modelo. Primeiramente, foi avaliada a resistência desses micro-organismos associados às adversidades simuladas do trato gastrointestinal (TGI) de humanos e à passagem através do TGI de camundongos. Após, foi avaliada a capacidade da associação desses micro-organismos estimular a resposta imune humoral e celular de camundongos. Para isso, camundongos alimentados com ração contendo ambos os probióticos e com cada um dos probióticos individualmente foram imunizados com rInIA, amostras de sangue foram coletadas nos dias 0 e 29 após a imunização e os soros submetidos a ELISA indireto para a titulação de Ig totais, IgG1 e IgG2a específicas. Para avaliação da resposta celular, níveis de Inteferon γ (IFN γ) produzida pelos esplenócitos dos camundongos cultivados e estimulados com rInIA foi determinada. Ambos os probióticos avaliados individualmente e em associação apresentaram elevadas taxas de sobrevivência à simulação do TGI de humanos e ao TGI de camundongos. Os animais do grupo onde *S. boulardii* e *B. Toyoi* foram co-administrados apresentaram títulos de anticorpos Ig totais e soroconversões significativamente superiores ($p < 0,005$) as dos animais suplementados com cada um dos probióticos individualmente. E a imunização com rInIA estimulou maiores níveis de IgG1 em relação a IgG2a, sugerindo uma resposta predominantemente Th2, ou seja uma resposta humoral. Concluiu-se que os probióticos *S. boulardii* e *B. Toyoi* agiram em sinergismo, potencializando a resposta imune humoral específica contra o antígeno rInIA, e que eles podem ser usados em associação, pois não ocorreu antagonismo entre si quanto à sobrevivência ao TGI de mamíferos.

Palavras-chave: resposta imune humoral. resposta imune celular. internalina A de *L. monocytogenes*. resistência ao trato gastrointestinal. razão entre IgG1 e IgG2a. interferon γ .

Abstract

CASTELLI, Regina Maria. **SYNERGISM OF PROBIOTICS *Saccharomyces boulardii* AND *Bacillus cereus* var. Toyoi ON IMMUNOMODULATION IN MICE.** 2011. 59f. Dissertation (Master Degree) – Science and Agro industrial Technology Post -graduation Program. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The combination between probiotics can generate a response higher or similar to the sum of the response obtained by each of them alone, hence, providing a synergistic effect. The yeast *Saccharomyces Boulardii* and *Bacillus cereus* var. Toyoi bacterium have got the beneficial property to modulate the host immune response. The aim of this study was to evaluate the influence of the combination between the probiotics *S. Boulardii* and *B. Toyoi* on the humoral and cellular response in mice, making use of the recombinant protein internalin A (rInIA) of *L. Monocytogenes* as antigen model. Firstly, it was evaluated the resistance of these microorganisms co-administered to simulated adversities of gastrointestinal tract (GIT) of humans and to the passage through GI of mice. Later, it was evaluated the capacity of the combination of these microorganisms in stimulating the humoral and cellular response in mice. For this purpose, mice fed on diet containing both probiotics and alone were immunized with rInIA, blood samples were collected in the days 0 and 29 and sera submitted to ELISA indirect for the titration of specific total Ig, IgG1 and IgG2a. To evaluate cellular response, the concentration of interferon γ (IFN- γ) produced by splenocytes from the cultured and rInIA stimulated mice has been assessed. Both probiotics evaluated alone and in combination, showed high survival rates to the GI simulation of humans and to mice GIT. The animals from the group in which *S. Boulardii* and *B. Toyoi* were co-administered showed Ig total antibody titre and seroconversions significantly higher than the animals supplemented with each one of the probiotics alone. Besides, the immunization with rInIA stimulated higher levels of IgG1 related to IgG2, resulting mainly in TH2 response, humoral response. In conclusion, the probiotics *S. Boulardii* e *B. Toyoi* acted synergistically, enhancing the specific humoral immune response against the rInIA antigen, and they can be used in combination because there was no antagonism between themselves towards the survival to GIT of mammals.

Key-words: Humoral immune response. Cellular immune response. Internalin A of *L. Monocytogenes*. Resistance to the gastrointestinal tract. Ratio between IgG1 and IgG2. Interferon γ .

Lista de Figuras

- Figura 1.** Taxas de sobrevivência (%) às condições simuladas do Trato gastrointestinal de humanos dos probióticos *B. Toyoi* e *S. boulardii* administrados individualmente ou associados 35
- Figura 2.** Taxas de sobrevivência (%) ao TGI de camundongos dos probióticos *B. Toyoi* e *S. boulardii* administrados individualmente ou associados 36
- Figura 3.** Médias dos títulos de anticorpos Ig total rIna específicos dos soros dos camundongos alimentados somente com a ração (controle) ou com *S. boulardii* e *B. Toyoi* administrados individualmente ou associados..... 37
- Figura 4.** Médias dos títulos de anticorpos IgG1 e IgG2a rIna específicos dos soros dos camundongos alimentados somente com a ração (controle) ou com *S. boulardii* e *B. Toyoi* administrados isoladamente ou associados..... 38
- Figura 5.** Médias das concentrações de IFN- γ (pg.ml^{-1}) rInA específico dos camundongos alimentados somente com a ração (controle) ou com *S. boulardii* e *B. Toyoi* administrados individualmente ou associados..... 38

Lista de Abreviaturas e Siglas

μ L- Microlitros

B.T- *B. Toyoi*

C- Celsius

CDTec- Centro de Desenvolvimento Tecnológico

COBEA- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DCs- Células dendríticas

EHEC- *Escherichia coli* enterohemorrágica

ELISA - Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay

EPEC- *E. coli* enteropatogênica

ETEC- *E. coli* enterotoxigênica

FAO- Food and Agriculture Organization/World Health Organization

GALT- Gut-associated lymphoid tissue

h- Hora

HCl- Ácido Clorídrico

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HIV- Human immunodeficiency vírus

IFN- γ - Interferon Gama

IL- Interleucina

Inla A- internalina A

LB- Luria Bertaine

log- Logaritmo

LPS- Lipopolissacarídeo

MALT- Mucosa-associated lymphoid tissue

mg- Miligramas

mL- Mililitros

NaCl- Cloreto de sódio

NK – natural Killer

Nm- Nanômetro

OMS- Organização Mundial de Saúde

OPD - Ortofenilenodiamina

PAMPs- Pathogen-associated molecular patterns

PBS- Salina tamponada fosfatada

PLM - Phospholipomannan

PPM- Phosphopeptidomannan

PRRs - Padrões de reconhecimento de receptores

RPM - Rotações por minuto

S.b- S.boulardii

TGF- β - Fator transformador de crescimento beta

TGI- Trato gastrointestinal

Th- Linfócito T helper

TNF- α - Fator de Necrose tumoral alfa

UFC- Unidade Formadora de Colônia

UFPeI- Universidade Federal de Pelotas

WHO-World Health Organization

YPD- Yeast Peptone Dextrose

Sumário

1 Introdução	11
2 Objetivos	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. Revisão de Literatura	15
3.1 Probióticos	15
3.2 Bactérias e leveduras	17
3.3 <i>Bacillus cereus</i> var. Toyoi	18
3.4 <i>Sacharomyces boulardii</i>	20
3.5 Sinergismo de Probióticos	22
3.6 Sistema Imune	23
3.7 Probióticos e efeito imunomodulador	25
3.8 Internalina A (InIA)	27
4 Material e Métodos	29
4.1 Microrganismos	29
4.2 Condições de cultivo	29
4.2.1 Produção de <i>B. Toyoi</i>	29
4.2.2 Produção de <i>S. boulardii</i>	29
4.3 Preparo das rações contendo os probióticos	30
4.4 Animais	30
4.5 Resistências dos probióticos <i>B. Toyoi</i> e <i>S. boulardii</i> associados às condições simuladas do trato gastrointestinal (TGI) de humanos	30
4.6 Resistência dos probióticos <i>B. Toyoi</i> e <i>S. boulardii</i> associados ao TGI de camundongos	31
4.7 Avaliação do efeito imunomodulador da associação entre <i>S. boulardii</i> e <i>B. Toyoi</i> em camundongos	32
4.7.1 Avaliação da imunidade humoral	32
4.7.2 Avaliação de IFN- γ	33
4.8 Análise Estatística	34
5 Resultados	35
5.1 Resistência dos probióticos <i>B. Toyoi</i> e <i>S. boulardii</i> associados às condições simuladas do TGI de humanos	35
5.2 Resistência dos probióticos <i>B. Toyoi</i> e <i>S. boulardii</i> co-administrados ao TGI de camundongos	35
5.3 Avaliação do efeito imunomodulador da associação entre <i>S. boulardii</i> e <i>B. Toyoi</i> em camundongos	36
5.3.1 Avaliação da imunidade humoral	36
6 Discussão	39
7 Conclusões	46
Referências	47

1 Introdução

Probióticos podem ser definidos como micro-organismos vivos que, ao serem administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO-WHO, 2001). Para ser utilizado como probiótico, o micro-organismo deve ser inócuo, tolerar o baixo pH do suco gástrico, resistir à ação da bile e das secreções pancreáticas e intestinais, resistir ao processamento de alimentos e rações, mantendo-se viável por longo período durante a estocagem e transporte sem perder a funcionalidade, manter-se metabolicamente ativo no intestino e não transportar genes que conferem resistência a antibióticos (SAAD, 2006).

Um micro-organismo que apresenta potencial probiótico deve exercer efeito protetor ao hospedeiro contra enteropatógenos. Esse efeito protetor podem incluir a produção de substâncias antimicrobianas (VANDENBERGH, 1993), inibição da adesão dos patógenos à mucosa intestinal, (BERNET et al., 1994; CZERUCKA & RAMPAL, 2002), competição por nutrientes e inibição da produção ou ação de toxinas microbianas (CZERUCKA et al., 1994; BRANDÃO et al., 1998); estímulo do peristaltismo e da maturação e renovação das células epiteliais do cólon (MCFARLAND, 2000), e a modulação da microbiota intestinal ou do sistema imune do hospedeiro (KAILA et al., 1992).

Probióticos que apresentam efeito imunomodulador podem auxiliar na manutenção da barreira mucosa intestinal, assim como estimular a produção de anticorpos, a atividade de fagócitos e dos linfócitos natural killer (NK). Podem atuar também auxiliando o desenvolvimento e a maturação do sistema imune entérico e sistêmico (GALT e MALT) do hospedeiro, estimulando a expansão clonal de linfócitos e prevenindo sua apoptose, estimular o aumento da produção intestinal de citocinas anti-inflamatórias (interleucina 10 - IL-10 e fator transformador de crescimento beta - TGF- β) e reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral alfa - TNF- α , INF γ , IL-8) (PASCHOAL et al., 2010).

Leveduras e bactérias são os micro-organismos mais comumente utilizados como probióticos. Entretanto, eles apresentam diferentes mecanismos de ação, metabolismo e resistência a antibióticos. Dentre as espécies de leveduras do gênero *Saccharomyces*, único gênero de leveduras utilizado atualmente como probiótico,

uma das de maior destaque é *Saccharomyces boulardii* (MARTINS et al., 2010). As vantagens de se trabalhar com leveduras são que elas apresentam elevada produtividade a partir de substratos de baixo custo, são rapidamente eliminadas após interrupção da terapia, podem ser utilizadas como fonte de proteína em rações animais e não são afetadas pelo uso de antibacterianos (BLEHAUT et al., 1989; BODDY et al., 1991), o que permite a associação entre eles em terapias onde a utilização de antibióticos é indispensável como, por exemplo, no tratamento da infecção por *Helicobacter pylori* (ARMUZZI et al., 2001).

Estudos têm demonstrado que *S. boulardii* é capaz de melhorar a digestão e absorção de nutrientes (BUTS & KEYSER, 2006), de prevenir ou tratar desordens intestinais (ELMER & MCFARLAND, 2001; GUSLANDI et al., 2003), estimular a resposta imune humoral de camundongos a antígenos específicos (COPPOLA & TURNES, 2004) e aumentar significativamente as concentrações de IgA específicas (QAMAR et al., 2001).

Os gêneros de bactérias mais utilizados como probióticos são *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Bifidobacterium*. Entretanto, bactérias pertencentes a outros gêneros, como *Bacillus cereus* var. Toyoi, que foi isolada do solo e não produz enterotoxinas diarréicas ou eméticas (WILLIAMS et al., 2009), podem ser utilizadas. A principal vantagem de *B. Toyoi* sobre as bactérias ácido-lácticas na elaboração de probióticos reside em sua capacidade de esporular, o que lhe confere maior sobrevivência durante o trânsito estomacal e durante a elaboração, transporte e armazenamento das rações (HOA et al., 2001). Estudos têm demonstrado que esse probiótico é capaz de promover ganho de peso e controle de diarréias em animais (COPPOLA & TURNES, 2004), melhorar a conversão alimentar (WILLIAMS et al., 2009), reduzir a prevalência de salmonelas em aves (VILÀ et al., 2009), reverter parcialmente a supressão da imunidade de porcas no período gestacional, (SCHIERACK et al., 2009) e potencializar a resposta imunológica do hospedeiro (SCHIERACK et al., 2007)

A associação entre probióticos com efeitos benéficos conhecidos, a qual pode gerar uma resposta superior ou similar a soma da resposta obtida individualmente por cada um deles, ou seja, proporcionar um efeito sinérgico, vem sendo estudada e tem apresentado resultados positivos (TANASIEKO et al., 2005;

TROIS et al., 2007; MOORTHY et al., 2009; RANDHAWA et al., 2011). A levedura *S. boulardii* e esporos da bactéria *B. Toyoi* são eficientes moduladores da resposta vacinal e uma alternativa para melhorar a eficiência de vacinas comerciais (COPPOLA et al., 2005; ROSS et al., 2009). Além disso, segundo Roos (2009), eles estimulam um perfil distinto de citocinas, o que sugere que a modulação do sistema imune mediada por eles possui mecanismos distintos. No entanto, o efeito da associação entre eles sobre a imunomodulação ainda não foi avaliado.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a influência da associação entre os probióticos *S. boulardii* e *B. Toyoi* sobre a imunomodulação em camundongos, utilizando como antígeno modelo, a proteína recombinante internalina A (rInIA) de *Listeria monocytogenes*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a resistência de *S. boulardii* e *B. Toyoi* administrados simultaneamente a condições gastrointestinais simuladas e ao trato gastrointestinal de camundongos

- Avaliar a influência da associação entre os dois probióticos sobre a resposta imune humoral e celular específicas contra rInIA de *L. monocytogenes*.

3. Revisão de Literatura

3.1 Probióticos

O termo probiótico, que deriva do grego e significa “para a vida”, foi empregado de diversas formas. Inicialmente foi proposto para definir compostos ou extratos de tecidos capazes de estimular o crescimento microbiano (LILLY & STILLWELL, 1965). Parker, (1974) definiu probióticos como organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal. Havenaar & Huis in’t Veld, (1992) propuseram que os organismos probióticos são “micro-organismos viáveis (o que inclui bactérias lácticas e leveduras na forma de células liofilizadas ou de produto fermentado) que possuem efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro após a ingestão, devido à melhoria das propriedades da microbiota”. Por fim, as Nações Unidas e a Organização Mundial da Saúde (2002) definiram probióticos como "micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios a saúde do hospedeiro”.

As primeiras observações sobre os benefícios dos probióticos à saúde datam do início do século 20, quando o cientista russo Eli Metchnikoff atribuiu a longevidade dos camponeses da Bulgária ao consumo de leite fermentado contendo bactérias lácticas. Nos últimos anos, a pesquisa vem se intensificando nesta área e vários estudos têm demonstrado os benefícios dos probióticos à saúde e nutrição de humanos e animais, como reguladores da microbiota intestinal, promotores de crescimento, imunostimulantes (ROOS, 2009) e como alternativa à utilização de antibióticos na alimentação animal (COPPOLA & TURNES, 2004), entre outros.

Os micro-organismos que apresentam potencial probiótico devem possuir uma série de características físico-químicas intrínsecas, descritas em um relatório conjunto da FAO (Food and Agriculture Organization) com a OMS em 2002. Além de serem documentados cientificamente e validados clinicamente (SALIMINEN, 1998), eles devem cumprir alguns critérios, como serem inócuos, manterem-se viáveis por longo tempo durante a estocagem e transporte, tolerarem o baixo pH do suco gástrico, resistirem a ação da bile e das secreções pancreáticas e intestinais e não transportarem genes transmissores de resistência a antibióticos, assim como

resistirem a fagos e ao oxigênio (HOLZAPFEL & SHILLINGER et al., 2002) e possuírem propriedades tecnológicas desejáveis (SALIMINEN, 1998).

Outro critério importante para que um micro-organismo apresente potencial probiótico é o efeito protetor direto ou indireto contra enteropatógenos. Mecanismos de ação direta incluem a produção de substâncias antimicrobianas, que apresentam efeito inibitório ou letal para o patógeno (VANDENBERGH, 1993); inibição da adesão dos patógenos à mucosa intestinal, devido à co-agregação entre probiótico e patógeno ou por competição pelos sítios de adesão (BERNET et al., 1994; CZERUCKA & RAMPAL, 2002), competição por nutrientes e inibição da produção ou ação de toxinas microbianas (CZERUCKA et al., 1994; BRANDÃO et al., 1998). Mecanismos de ação indireta incluem a modulação da microbiota intestinal ou do sistema imune do hospedeiro (KAILA et al., 1992) e o estímulo do peristaltismo e da maturação e renovação das células epiteliais do cólon (MCFARLAND, 2000).

As bactérias que apresentam propriedades probióticas mais estudadas e utilizadas são algumas espécies do gênero *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus* e, entre as leveduras, as espécies *Sacharomyces cerevisiae* e *Sacharomyces boulardii* (HOZAFPEL, 2002).

Na medicina humana, probióticos são utilizados na regulação da microbiota intestinal e na prevenção de doenças e distúrbios gastrointestinais, como imunomoduladores e no tratamento de câncer, entre outros. Na medicina veterinária, probióticos são utilizados também como suplementos de rações para atuarem como promotores de crescimento em substituição aos antibióticos (COPOLLA & TURNES, 2004).

A microbiota intestinal é uma das primeiras linhas de defesa do hospedeiro contra patógenos de origem alimentar, e probióticos estão sendo amplamente estudados para auxiliar na manutenção dessa barreira. Probióticos melhoram as propriedades de auto-proteção do epitélio intestinal, devido ao estímulo da produção de mucinas (CABALLERO-FRANCO, 2007); melhoram a função imunológica da barreira mucosa do intestino delgado (ISOLAURI, 2005); e as camadas de células epiteliais são reforçadas (COMMANE, 2005), diminuindo a ruptura das junções *tight* por patógenos (JOHNSON-HENRY, 2008). Assim, probióticos têm sido utilizados no tratamento e prevenção de muitas formas de doenças diarréicas, como a diarreia

causada por rotavírus, a dos viajantes e a associada a antibióticos (CULLIGAN et al., 2009), da síndrome do intestino irritável e na prevenção de infecções pós-operatórias em pacientes submetidos à cirurgia abdominal (GRATZ et al., 2010). Além disso, o tratamento com probióticos pode diminuir a severidade dos sintomas de doenças inflamatórias intestinais, através da interação com o epitélio intestinal (PRISCIANDARO et al., 2009), de mudanças nos ácidos graxos de cadeia curta, redução da secreção de citocinas pró-inflamatórias, melhora da relação entre as respostas Th1 e Th2, e da eliminação de patógenos (MACPHERSON, 2004).

A resposta imune pode ser modulada por organismos probióticos. Estudos realizados com bactérias lácticas demonstraram a capacidade desses micro-organismos interagirem com as placas de Peyer e com as células epiteliais do intestino, estimulando os linfócitos B produtores de IgA e a migração de linfócitos T (PERDIGÓN et al., 1991), e favorecendo a atividade fagocítica de macrófagos (CROSS et al., 2002).

Os efeitos benéficos dos probióticos sobre a terapia do câncer se deve às propriedades anti-mutagênicas, à modulação da resposta imune, incluindo de células T, células NK e atividade de macrófagos, e à inibição de enzimas pró-carcinogênicas (KATO et al., 1988).

3.2 Bactérias e leveduras

Bactérias e leveduras são os micro-organismos mais comumente utilizados como probióticos. Entretanto, eles apresentam diferença nas respostas imunogênicas, mecanismos de ação no organismo, metabolismo e no perfil de resistência a antibióticos.

A população de bactérias na microbiota intestinal de humanos é de aproximadamente 10^{14} , (BERG, 1996), enquanto que a de leveduras é apenas uma porção residual de aproximadamente 0,1% da microbiota (GIULIANO et al., 1987). Além das diferenças quanto à concentração na microbiota, elas possuem diferenças na composição da parede celular.

Bactérias possuem em sua parede celular peptidoglicano. Bactérias Gram-negativas contêm até 20% de lipopolissacarídeo (LPS), enquanto que os organismos Gram-positivos apresentam muito menos lipídios, mas contêm ácido

lipoteicóico (LTA) (HAMANN et al.,1998). A parede celular de leveduras consiste em pelo menos duas camadas. A camada externa contém uma combinação de manose associada a proteína (phosphopeptidomannan, PPM) ou a lipídios (phospholipomannan, PLM). A camada interna é composta de quitina e 1,3- β e 1,6- β -glucano (CID et al., 1995).

A imunidade inata, que é a primeira linha de defesa contra a agressão microbiana, se baseia no reconhecimento de patógenos associados a padrões moleculares (PAMP) por padrões de reconhecimento de receptores (PRRs). Peptidoglicano, LPS e LTA, que estão presentes nas bactérias, e PLM, PPM e glicana, que estão presentes em leveduras, são PAMPs e são reconhecidos por PRRs diferentes e, portanto, podem ser responsáveis pelas diferentes respostas desses micro-organismos (JANEWAY, 2002).

As leveduras apresentam algumas vantagens em relação às bactérias, entre elas, não foi demonstrado que são afetadas pelo uso de antibacterianos. Esta é uma propriedade importante, pois algumas terapias associam a administração de probióticos ao uso de antibacterianos durante infecções gastrointestinais como, por exemplo, a causada por *Helicobacter pylori* (MARTINS et al., 2005b). Além disso, não foi demonstrado nenhum tipo de transferência de material genético entre bactérias e leveduras, tornando estas seguras para uso durante tratamentos com antibióticos (CZERUKCA et al., 2007). Outras vantagens das leveduras incluem a elevada produtividade a partir de substratos de baixo custo e o fato de serem rapidamente eliminadas após a interrupção da terapia e de poderem ser utilizadas como fonte de proteína em rações animais (BLEHAUT et al., 1989; BODDY et al., 1991). Já algumas bactérias, como *B. Toyoi* possuem a capacidade de esporular, o que confere maior sobrevivência durante o trânsito estomacal e durante a elaboração, transporte e armazenamento das rações (COPPOLA & TURNES, 2004).

3.3 *Bacillus cereus* var. *Toyoi*

B. Toyoi, uma variedade de *Bacillus cereus* isolada do solo (WILLIAMS et al., 2009), não é patogênico, não produz toxinas e não transmite resistência a antibióticos. Esporos viáveis de *B. Toyoi* são usados como probióticos em animais e

são considerados seguros para o uso em suínos, aves, bovinos e coelhos. (EUROPEAN COMMISSION-HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL, 2001). É utilizado sob a apresentação do produto comercial Toyocerin®, que apresenta como características ser um pó seco de cor branca a marrom-acinzentado, inodoro e com a função de estabilizar a microbiota intestinal, melhorar o desempenho e permite uma melhor digestão dos nutrientes oferecidos pela alimentação (RUBINUM ANIMAL HEALTH, 2010). Com relação à segurança do uso de Toyocerin® em humanos, em um ensaio clínico realizado durante oito dias de administração do produto a uma concentração de 6×10^{10} esporos da bactéria viável ao dia, não foram observados efeitos adversos em adultos saudáveis do sexo masculino (ISHIOKA, 1979).

Probióticos a base de *B.cereus* para o uso em humanos estão disponíveis no mercado através do produto BIOVICERIN® que é constituído exclusivamente por cultura viva da bactéria esporulada na proporção de 5 milhões de endósporos por flaconete. BIOVICERIN® atua através do mecanismo de antagonismo bacteriano, produzindo a substância antimicrobiana biocerina; competindo por nutrientes com os micro-organismos patogênicos causadores da diarreia; competindo por sítios de adesão na mucosa intestinal e modificando os receptores de toxinas. Através da produção de vitaminas do complexo B e enzimas, BIOVICERIN® favorece a reconstituição da microbiota necessária para o normal desempenho das funções intestinais (GEYER Medicamentos S.A.)

Diversos estudos têm avaliado os efeitos benéficos de *B. Toyoi*. Este micro-organismo auxiliou na redução da prevalência de salmonelas em aves e melhorou as variáveis de desempenho na idade de abate em frangos (VILÀ et al., 2009). Além disso, promoveu o ganho de peso, o controle de diarreias e uma redução da mortalidade perinatal em suínos (ZANI et al., 1998) e em frangos (RICHTER et al., 1999). Outros estudos também verificaram associação estatisticamente significativa entre a ingestão de *B. Toyoi* e o ganho de peso, melhor conversão alimentar e redução da incidência de fezes líquidas e diarreia pós-desmame em suínos (KERMAUNER E STRUKLE, 1998; KYRIAKIS et al, 1999, 2003.; ALEXOPOULOS et al, 2000; BAUM et al, 2002;. GEORGOULAKIS et al., 2004; STAMATI et al, 2006;. REITER et al, 2006; SCHIERACK et al, 2007; PINHEIRO et al, 2007;. LODEMANN et al, 2008). O uso de Toyocerin® foi associado à redução significativa da

mortalidade e do índice de risco sanitário em coelhos durante o período de engorda (PASCUAL et al., 2008), e à melhora da engorda e desempenho de frangos e perus (JADAMUS, 2000). Em suínos, foi verificado que a suplementação com *B. Toyoi* reverteu parcialmente a supressão da imunidade do período gestacional (SCHIERACK et al., 2009). Além disso, estudos evidenciaram que esta bactéria potencializou a resposta imunológica do hospedeiro (COPPOLA et al., 2005; SCHIERACK et al. 2007; 2009; ROSS et al., 2009). Entretanto, os mecanismos de ação de *B. Toyoi* ainda não foram elucidados e muitas dúvidas ainda permanecem sobre sua ação no organismo.

3.4 *Sacharomyces boulardii*

A levedura *S. boulardii* é um dos poucos micro-organismos utilizados como probióticos que não são de origem humana. Esta levedura não patogênica é termotolerante e é a única levedura disponível no mercado para uso como probiótico em seres humanos (MARTINS et al., 2005a).

S. boulardii exerce efeitos benéficos à mucosa intestinal do hospedeiro, como incremento da resposta imune, da digestão e absorção de nutrientes (BUTS & KEYSER, 2006). Tem demonstrado eficácia na prevenção ou tratamento de várias desordens intestinais, tais como diarreia associada a antibióticos (MCFARLAND et al., 1995), do viajante (ELMER & MCFARLAND, 2001) e em pacientes alimentados por sondas (BLEICHNER et al., 1997), diarreia crônica em pacientes infectados pelo vírus HIV, gastroenterites agudas (MARCHAND & VANDENPLAS, 2000), doença de Crohn (GUSLANDI et al., 2000) e colite ulcerativa (GUSLANDI et al., 2003).

Alguns estudos demonstraram que *S. boulardii* inibiu o crescimento de *Salmonella Typhimurium* e *Yersinia enterocolitica in vitro* (ZBINDEN et al., 1999); evitou a aderência de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) e *S. Typhimurium* à mucosa intestinal, quando em tratamento com antibióticos (GEDEK, 1999); aumentou a sobrevivência de camundongos infectados com *S. Typhimurium* e evitou a translocação bacteriana para o fígado desses animais (MARTINS et al., 2010a); protegeu camundongos desafiados com *S. Typhimurium* e *Shigella flexneri* (RODRIGUES et al., 1996); reduziu a hipersecreção de sais e líquidos provocada pela inoculação de toxina colérica (BUTS, 2005); inibiu a adesão de *S. Typhimurium* e de *S. flexneri* ao intestino de modelos animais; reduziu em 50% a entrada de *E.*

coli enteropatogênica (EPEC) e *Listeria monocitogenes* nas células intestinais (CZERUCKA & RAMPAL, 2002) e apresentou resultados positivos contra diarreias associadas ao uso de antibióticos e contra infecções intestinais recorrentes causadas por *Clostridium difficile* (CZERUCKA et al., 2007).

O mecanismo de ação de *S. boulardii* vem sendo amplamente estudado. Sua ação contra *C. difficile*, se deve, principalmente, a expressão de proteases, que inibem o efeito toxigênico da enterotoxina A e da citotoxina B (POTHOULAKIS et al., 1993; CASTAGLIUOLO et al., 1996), reduzem significativamente a secreção de cloro e AMP cíclico induzida pela toxina colérica (CZERUCKA et al., 1994) e inibem a secreção de cloro mediada por Ca^{2+} (CZERUCKA & RAMPAL, 1999).

Este probiótico produz efeito inibidor importante da hipersecreção intestinal causada por *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) (BUTS, 2005) e permite, também, a restauração da função de barreira das células contra EPEC (CZERUCKA et al., 2000). Além disso, secreta um fator solúvel capaz de retardar ou impedir o processo de apoptose celular e inibir a fosforilação de certas proteínas, induzidos pela infecção por EPEC (CZERUCKA et al., 2000) e, impede a apoptose induzida por EHEC (DAHAN et al., 2003). Segundo Rodrigues et al. (1996), *S. boulardii* exerce efeito protetor contra *S. Typhimurium* e *S. flexneri*, provavelmente devido à competição por sítios de adesão e no caso de *S. Typhimurium*, esse efeito pode estar relacionado ao efeito imunomodulador da levedura. *S. boulardii* apresenta, também, efeito anti-diarreico em pacientes que recebem unicamente alimentação enteral, pois restaura a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (BREVES et al., 2000).

Os efeitos tróficos de *S. boulardii* sobre a mucosa intestinal, provavelmente, são mediados pela liberação das poliaminas, espermina e espermidina durante seu catabolismo no intestino (BUTS, 2005; BUTS & KEYSER, 2006). Acredita-se que essas poliaminas estimulem a expressão de glicoproteínas na borda em escova (BUTS et al., 1994), a expressão e a atividade de enzimas envolvidas na digestão de nutrientes (BUTS et al., 1994; JAHN et al., 1996) e a produção de IgA secretória no intestino (BUTS et al., 1990; QAMAR et al., 2001).

O efeito de *S. boulardii* em condições inflamatórias gastrointestinais é mediado pela modulação da resposta pró-inflamatória do hospedeiro. Isso ocorre

não só pela presença da levedura, mas também por fatores secretados, capazes de interferir com o patógeno por meio de moléculas sinalizadoras e de controlar a inflamação em diferentes níveis (POTHOULAKIS, 2009; KAREN et al., 2010; MARTINS et al., 2010a; FOLIGNÉ et al., 2010), como diminuindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias via inibição do fator nuclear kappa B (NF1- κ B) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) ativadas pela bactéria (DAHAN et al., 2003). Dessa forma pode exercer efeito benéfico no tratamento de doenças intestinais inflamatórias idiopáticas, como doença de Crohn e colite ulcerativa (BUTS, 2005).

3.5 Sinergismo de Probióticos

A interação entre probióticos pode ocorrer de forma sinérgica, ou seja, onde um microrganismo potencializa a resposta do outro em benefício do hospedeiro, ou de forma antagônica, onde um microrganismo inibe o desenvolvimento do outro, seja por competição por sítios de ligação ou produção de substâncias prejudiciais.

Com o aumento dos estudos em relação aos diferentes modos de ação dos probióticos, surgiu o interesse de avaliar o efeito sinérgico de diferentes cepas com potencial probiótico. Segundo Randhawa et al. (2011), a combinação de probióticos pode aumentar o efeito individual de cepas probióticas como imunomoduladores. Alguns estudos que avaliaram o efeito sinérgico entre micro-organismos probióticos mostraram benefícios para o hospedeiro. Moorthy et al. (2009) estudaram o sinergismo entre *Lactobacillus rhamnosus* e *L. acidophilus* e verificaram que o tratamento ofereceu melhor proteção à membrana intestinal contra a infecção por cepas de *Shigella dysenteriae* quando comparado aos tratamentos individuais. Em outro estudo, Tanasieko et al. (2005) avaliaram o sinergismo entre *Enterococcus faecium* e *Saccharomyces cerevisiae* e verificaram que ele elevou significativamente a eficácia de uma vacina anti-tumoral *in vivo*. O sinergismo entre *Bifidobacterium bifidum* e *Streptococcus thermophilus* aumentou o número de células CD4 em crianças infectadas com o vírus HIV (TROIS et al., 2007). Myllyluoma et al. (2008) observaram, em células Caco-2, que a combinação de *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* Lc705 e *Propionibacterium freudenreichii* subsp. Shermanii Js, inibiu a adesão de *H. pylori* a membrana da célula e melhorou a função da barreira epitelial. Randhawa et al. (2011) avaliaram o efeito da associação das cepas probióticas *L.*

delbrueckii 405 e *L. casei* subsp. *Casei* 17 sobre a imunomodulação e observaram que os títulos de anticorpos foram significativamente superiores e houve um aumento da resposta mediada por células T, quando os dois probióticos foram administrados simultaneamente em comparação com a administração individual de cada cepa. Daudelin et al. (2011) observaram que a suplementação de suínos com a combinação dos probióticos *Pediococcus acidilactici* e *S.bouardii* reduziu significativamente a adesão de ETEC F4 à mucosa intestinal.

3.6 Sistema Imune

O sistema imunológico representa a principal barreira do hospedeiro contra as infecções e tem a capacidade de realizar uma resposta rápida e efetiva contra os patógenos invasores. Além disso, pode elaborar outro tipo de resposta igualmente eficaz, porém mais lenta e duradoura. As fases iniciais da resposta do hospedeiro contra infecção dependem da imunidade inata, na qual uma variedade de mecanismos de resistência inata reconhece e responde à presença de agentes patogênicos. Esta forma de imunidade é seguida pela imunidade adaptativa, mediada pela seleção clonal de linfócitos específicos (linfócitos T e B), conduzindo assim, a uma resposta duradoura contra doença (McNEELA & MILLS, 2001; MacDONALD & MONTELEONE, 2005).

A penetração de um micro-organismo na mucosa intestinal pode acontecer através de uma camada de células formadas pelos enterócitos ou por meio das células M, que estão presentes sobre as Placas de Peyer e entre os enterócitos. Estas células englobam moléculas presentes no lúmen intestinal, por fagocitose ou endocitose, transportando-as até a membrana basal e liberando-as para o espaço extracelular (CUMMINGS et al., 2004; MacDONALD & MONTELEONE, 2005). A localização anatômica do sistema imunológico, as células da resposta inata (macrófagos e dendríticas células - DCs) e a maneira pela qual essas células adquirem antígenos são cruciais para determinar a natureza das respostas subseqüentes.

A mucosa do trato intestinal está constantemente exposta a vários microrganismos patogênicos. Entretanto, uma barreira física e química contra esses patógenos é criada pelo epitélio intestinal (LIEVIN-LE MOAL & SERVIN, 2006) e um sistema imune especializado auxilia na proteção da superfície mucosa. O sistema

imune de mucosas ou MALT contribui com cerca de 80% de todas as células imunes e é o responsável pela principal proteção das mucosas à colonização de patógenos. Além disso, impede a absorção de antígenos não degradados, diferenciando e regulando a intensidade da resposta imune (CUMMINGS et al., 2004).

A imunidade inata consiste nas barreiras epiteliais, fagócitos, células NK, sistema complemento, citocinas e em outras proteínas plasmáticas próprias desse tipo de imunidade. Os componentes da imunidade inata reconhecem estruturas que não estão presentes nas células do hospedeiro (McKENNA, et al., 2005). Também gera moléculas que funcionam como sinalizadores secundários que, junto com os antígenos, ativam os linfócitos B e T, respondendo através dos mecanismos humorais e celulares (MacDONALD & MONTELEONE, 2005).

A resposta imune adaptativa é deflagrada por células especializadas na ativação de linfócitos antígeno-específicos, através da apresentação de fragmentos antigênicos do agente infeccioso para DCs. As DCs imaturas localizam-se nos tecidos e, assim como os macrófagos e os neutrófilos, são fagocíticas quando no estado imaturo. Porém, estas células assumem um papel de apresentação de antígenos em uma segunda fase do processo de resposta ao agente infeccioso, ou seja, em uma fase que faz-se necessária a indução de uma resposta imunológica mais específica e efetiva a um tipo de micro-organismo que não tenha sido eliminado através da resposta imune inata (BANCHEREAU et al.,2000).

As células apresentadoras de antígenos têm um papel crucial na orientação de respostas dos linfócitos T helper para T helper 1 (Th1) ou T helper 2 (Th2), e na regulação das respostas imunes por meio da produção de citocinas (LARSSON et al., 1999). A maioria das células T helper são células sem padrões específicos de produção de citocinas (células Th0). Após a estimulação por células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas (DC) se diferenciam em linfócitos Th1 ou Th2 (MELLMAN and STEINMAN 2001). As respostas Th1 dependem da capacidade das células apresentadoras de antígenos de produzirem IL-12 e caracterizam-se pela produção de IFN- γ e IL-2, que induzem a imunidade mediada por células. As respostas imunes Th2 envolvem as interleucinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 e induzem a imunidade humoral (BANCHEREAU et al.,2000).

Os mecanismos humorais agem através do bloqueio ou neutralização das moléculas agressivas aos tecidos do hospedeiro, dependendo, para isso, quase que exclusivamente de anticorpos específicos para epítopos dos antígenos. Outro mecanismo de destruição é através da lise do agente ou de células do agente pelo sistema complemento. Os mecanismos celulares promovem a fagocitose por leucócitos e a citotoxicidade mediada por células ou ainda por células e anticorpos (McNEELA & MILLS, 2001; MacDONALD & MONTELEONE, 2005).

As células T produzem IL-10 e TGF- β que bloqueiam a ativação dos linfócitos e macrófagos e inibem a produção de IL-12. As células regulatórias também podem interagir diretamente com os linfócitos ou células apresentadoras de antígeno e suprimi-las por mecanismos indefinidos que não envolvem a produção de citocinas (LEVINGS & RONCAROLO, 2000). A IL-17, produzida por linfócitos T $\alpha\beta$, T $\gamma\delta$ e pelas células NK, é uma potente citocina inflamatória, com grande importância na imunidade inata e tem sido observada em grandes quantidades nas doenças que acometem o sistema imune (KAIKO et al., 2007).

3.7 Probióticos e efeito imunomodulador

Probióticos atuam na estimulação do sistema imune, assim como a microbiota intestinal, e esta é uma das importantes funções destes micro-organismos no combate a doenças gastrointestinais em humanos e em animais. Muitos estudos concentram-se em bactérias ácido-láticas, mas outros gêneros e espécies de micro-organismos vêm sendo estudados.

Foligné et al., (2010) avaliou a imunomodulação por seis cepas de leveduras do gênero *Saccharomyces in vitro*, em células de sangue periférico mononuclear de humano (PBMCs) e *in vivo*, em camundongos, e observou um aumento da expressão do TNF no íleo. *In vitro*, níveis de IL-10 e de TNF- α maiores que os controles foram dose-dependentes e induzidos pela levedura. Além disso, baixos níveis dos indicadores pró-inflamatórios IL-12p70 e IFN- γ foram detectados. Jensen et al. (2010) observaram *in vitro* que o probiótico *Bacillus coagulans* gerou uma resposta Th2, através da produção das citocinas IL-4, IL-6 e IL-10 e inibição da produção de IL-2.

Outros probióticos, como *Lactobacillus casei*, estimularam a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais e a atividade das enzimas envolvidas na fagocitose (PERDIGÓN & ALVAREZ, 1992), além de estimularem a atividade das células NK (KATO et al, 1984; MATSUZAKI, 2000; HORI et al, 2003; OGAWA, et al., 2005). *Lactobacillus acidophilus* estimularam um maior título de anticorpos em leitões imunizados com vacina de ETEC (ÁVILA et al.,1998), e camundongos suplementados com *L. acidophilus* ou *S. boulardii* responderam com maior eficácia a uma septicemia provocada por *E. coli* (NICOLI & VIEIRA, 2000). Miletì et al. (2009) observaram que os probióticos *Lactobacillus plantarum* NCIMB8826, *L. rhamnosus* GG (LGG) e *L. paracasei* B21060 induziram a liberação de citocinas, ao mesmo tempo que inibiram o potencial das células dendríticas de produzirem citocinas inflamatórias (IL-12 e TNF- α).

Tanabe et al (2008) observaram que o micro-organismo *Bifidobacterium infantis* inibiu a produção de IL-17 e melhorou a produção de IL-27, quando as células foram estimuladas por TGF- β e IL-6. Camundongos suplementados com *Bifidobacterium breve* apresentaram aumento da produção de IgA anti-rotavírus e de IgG anti-vírus Influenza (YASUI et al., 1999) e melhoraram a resposta à infecção por *S. Typhimurium* (PERDIGÓN et al., 1991). Haghghi et al. (2005) observaram que a suplementação de frangos imunizados com toxóide tetânico com *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum* resultou na presença de IgA específica e em respostas de anticorpos IgG no intestino. Ménard et al. (2008) observou que cepas de *Bifidobacterium* induziram resposta Th2, através de altos níveis de expressão de IL-4, IL-10 e TGF- β , e induziram resposta Th1 orientada por altos níveis de IFN- γ e TNF- α . Martins et al. (2010a) detectou níveis elevados de IgA secretória (sIgA) e IL-10 em camundongos suplementados com *Bifidobacterium animalis* var. *lactis*.

Os probióticos *B. Toyoi* e *S. Boulardii* também apresentaram efeito imunomodulador frente a diferentes antígenos, como a uma bacterina de *E. coli*, parvovírus canino e Herpesvírus bovino tipo-5, demonstrado através de uma maior indução de anticorpos dos animais tratados com esses probióticos e expressão das citocinas IFN- γ , IL-10 e IL-12 e IL-4 (COPPOLA et al.,2005; ROSS, 2009 ROSS et al., 2010). Outros estudos também apresentaram resultados positivos na estimulação do sistema imune por *B. Toyoi*, melhorando a imunidade em porcas gestantes (SCHIERACK et al., 2007 e 2009), e por *S. Boulardii*, através do aumento

de IgA no intestino e do estímulo da resposta imune (CZERUCKA et al., 2001; CZERUCKA & RAMPAL, 2002, DAHAN et al., 2003; POTHOUKAKIS, 2009; KAREN et al., 2010). Estes estudos comprovam a eficiência dos probióticos na modulação e estimulação da resposta imune, mas muitos estudos ainda se fazem necessários para evidenciar os mecanismos envolvidos neste processo.

3.8 Internalina A (InlA)

L. monocytogenes é um patógeno intracelular que afeta tanto indivíduos saudáveis como imunodeprimidos. Na população saudável, o microorganismo pode causar gastroenterite e febre. Nos Estados Unidos, a taxa de mortalidade é de 20 a 30%, com a morte de 500 pessoas anualmente, entre 2.500 acometidos. A dose infectante do patógeno não é conhecida; entretanto, estima-se que seja entre 10^2 e 10^6 células, dependendo do estado imunológico do hospedeiro. O período de incubação para a doença varia de três dias a três meses, em humanos, dependendo do estado imunológico e do número de células ingeridas (BHUNIA, 2008; SLEATOR et al., 2009).

A manifestação clínica da doença é descrita de duas formas, a listeriose invasiva, localizada ou sistêmica, e a listeriose não-invasiva, limitada ao intestino. A listeriose invasiva é uma doença severa, pois a taxa de mortalidade é alta (20 % a 30 %), principalmente para pessoas susceptíveis a adquirir a infecção, como gestantes, recém-nascidos, idosos, pacientes submetidos à hemodiálise, a terapias prolongadas e indivíduos com sistema imunológico deprimido (SWAMINATHAN, 2001). Já a listeriose não-invasiva pode causar desde infecções brandas, semelhantes a uma gripe, até surtos de gastroenterite febril em indivíduos saudáveis (CARRIQUE-MAS et al., 2003; GAHAN; HILL, 2005).

L. monocytogenes, por ser um micro-organismo intracelular facultativo, invade e se prolifera dentro de macrófagos e em outras células não fagocíticas, como células epiteliais e hepatócitos. Este microorganismo tem a capacidade de evitar a resposta do sistema imune humoral, por se multiplicar dentro da célula hospedeira, e escapar da resposta imune celular, por disseminar-se através da passagem célula-célula.

A Internalina A (InIA), codificada pelo gene *inIA*, apresenta peso molecular de 88 kDa e está posicionada na superfície celular, tendo como receptor a E-caderina, uma glicoproteína transmembrânica da junção ou superfície basolateral das células. A InIA tem uma sequência-sinal seguida pela presença de repetições ricas em leucinas (LRRs), o que é crítico para a entrada bacteriana em células eucarióticas; enquanto o C-terminal contém um fator de ancoragem na parede celular, a sequência LPXTG, que forma ligações cruzadas com peptidoglicanos, ao servir de substrato para a enzima sortase e ancora a InIA com a parede celular. A InIA auxilia *L. monocytogenes* a invadir células epiteliais após a interação com a molécula receptora celular, E-caderina. O possível local de entrada é a ponta das vilosidades, nos locais de extrusão celular, que ocorre naturalmente durante a renovação celular, expondo a E-caderina à InIA. A interação InIA/E-caderina está associada à invasão de células epiteliais intestinais e placentárias, e barreira hemato-encefálica (BHUNIA, 2008; SLEATOR et al., 2009)

4 Material e Métodos

4.1 Microrganismos

Os microrganismos *B. Toyoi* e *S. boulardii* utilizados neste experimento eram provenientes do banco de micro-organismos do Núcleo de Biotecnologia (CDTec-UFPel).

4.2 Condições de cultivo

4.2.1 Produção de *B. Toyoi*

Esporos da bactéria foram ressuspensos em solução salina estéril, repicados em placas contendo ágar base suplementado com 8% de sangue ovino e as placas incubadas por 24 horas à 37 °C. Tubos contendo 150 mL de caldo infusão de cérebro e coração (BHI) (Acumedia) foram inoculados com duas a três colônias de *B. Toyoi* e incubados sob agitação (200 rotações por min - rpm) a 37 °C por 16 - 18 horas. Cinquenta mililitros desse inóculo foram adicionados a 1 L de meio NYSM (caldo nutriente, extrato de levedura, $MnCl_2$, $MgCl_2$, $CaCl_2$) (YOUSTEN, 1984), e o cultivo foi mantido sob agitação de 200 rpm à 37 °C durante 96 h, centrifugado a 5000 x *g* por 20 min à 4 °C e ressuspensão em solução salina 0,9% estéril em um volume de 30 mL. Por fim, a suspensão final foi aquecida em banho-maria a 80 °C durante 15 min para eliminar formas vegetativas do bacilo e armazenadas a 4° C.

4.2.2 Produção de *S. boulardii*

A levedura liofilizada foi ressuspensa em solução salina estéril, repicada em placas contendo YPD (0,5% extracto de levedura, 1% peptona, 2% de dextrose e 2% agar) e as placas incubadas por 42 h à 28 °C. Tubos contendo 150 mL de caldo YPD foram inoculados com duas a três colônias de *S. boulardii* e incubados sob agitação (200 rpm) à 28 °C por 24 h. Cinquenta mililitros desse inóculo foram adicionados a 1 L de caldo YPD, o cultivo foi mantido sob agitação de 200 rpm à 28 °C durante 72 h, centrifugado a 4000 x *g* por 20 min à 4 °C e ressuspensão em solução salina 0,9% estéril em um volume de 30 mL e armazenado a 4° C.

4.3 Preparo das rações contendo os probióticos

Ração comercial isenta de antimicrobianos e antifúngicos foi triturada e os probióticos *S. boulardii* e/ou esporos viáveis de *B. Toyoi* foram incorporados a uma concentração de 10^8 UFC.g⁻¹ e 10^7 UFC.g⁻¹, respectivamente. Essas formulações foram peletizadas e mantidas em estufa com circulação de ar forçada, por 24 h à temperatura de 40 °C e, após e armazenadas a 4 °C (ROOS, 2009 com modificações).

4.4 Animais

Camundongos BALB/c fêmeas, com 6 a 8 semanas de idade e peso variando entre 15-20 g foram utilizados. Os animais, provenientes e mantidos no Biotério Central da UFPel em gaiolas apropriadas (contendo 5 camundongos/gaiola) sob temperatura média de 22° C e ciclo de luz de 12 h, foram alimentados com ração PET específica para roedores isenta de antimicrobianos e antifúngicos. Ração e água foram fornecidas *ad libitum*.

Os camundongos foram tratados, anestesiados e eutanasiados de acordo com as normas internacionais e em consonância com os princípios éticos de experimentação animal do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel sob o número de processo 9289.

4.5 Resistências dos probióticos *B. Toyoi* e *S. boulardii* associados às condições simuladas do trato gastrointestinal (TGI) de humanos

Para avaliar a resistência de *B. Toyoi* e *S. boulardii* a condições gástricas simuladas, 10^8 UFC.mL⁻¹ da levedura e do esporo da bactéria foram incubadas a 37 °C por 1 h sob agitação constante (150 rpm) para simular a peristalse, em tubos contendo 10 mL de solução (6,2 g.l⁻¹ de NaCl, 2,2 g.l⁻¹ de KCl, 0,22 g.l⁻¹ de CaCl₂ e 1,2 g.l⁻¹ de NaHCO₃) acidificada a pH 2 com 0,1 N HCl e suplementada com 1 mg.mL⁻¹ de pepsina (DUC et al., 2004, com modificações).

Para avaliar a resistência às condições intestinais simuladas, o mesmo inóculo foi incubado a 37 °C por 5 h em tubos contendo 10 mL da mesma solução suplementada com 1 mg.mL⁻¹ de pancreatinina, 0,2% de sais biliares e com pH

ajustado a oito com 0,1 N NaOH (DUC et al., 2004, com modificações). Tubos contendo a solução com pH 7,2 e com cultivos puros de cada micro-organismo na mesma concentração foram submetidos às mesmas condições e incluídos como controles. Contagens de células viáveis de *S. boulardii* e *B. Toyoi* foram determinadas através do plaqueamento de 0,1 mL das diluições decimais dos cultivos em ágar YPD e BHI e incubação das placas a 30°C por 48 h e a 37 °C por 24 h, respectivamente.

A resistência consecutiva a condições gástricas e intestinais foi avaliada adicionando-se um passo de centrifugação a 7000 x *g* por 10 min entre as duas etapas e ressuspensão dos *pellets* celulares em 10 mL da solução que simula o fluido intestinal. As taxas de sobrevivência foram calculadas como a porcentagem do log do número de UFCs que cresceram nas placas após a exposição a condições simuladas em relação à concentração inicial do micro-organismo ($\log \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$). Foram calculadas as taxas de sobrevivência de *B. Toyoi* (*B.T*) e *S. boulardii* (*S.b*) administrados individualmente, de *B. Toyoi* associado a *S. boulardii* (*B.T/S.b*) e de *S. boulardii* associado a *B.Toyoi* (*S.b/B.T.*). Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6 Resistência dos probióticos *B. Toyoi* e *S. boulardii* associados ao TGI de camundongos

Camundongos foram divididos em três grupos compostos de cinco animais cada: os animais do grupo 1 (G1) receberam os dois probióticos; os do grupo 2 (G2) receberam somente *S. boulardii*; e os do grupo 3 (G3) somente esporos de *B. Toyoi*. A administração foi realizada através de gavagem, em dose única oral de 300 µL de solução salina 0,9% contendo 10^9 UFC de *S. boulardii* e/ou 10^8 UFC de esporos viáveis de *B. Toyoi*. Fezes foram coletadas 24, 48 e 72 h após a administração e diluídas em série decimal em solução salina a 0,9%. Contagens de UFC. g^{-1} de *S. boulardii* e *B. Toyoi* em fezes frescas foram determinadas através do plaqueamento das diluições seriadas das fezes em placas contendo agar YPD (48 h / 28 °C) e BHI (24 h / 37 °C) , respectivamente. Foram calculadas as taxas de sobrevivência de *B. Toyoi* (*B.T*) e *S. boulardii* (*S.b*) administrados individualmente, de *B. Toyoi* associado a *S. boulardii* (*B.T/S.b*) e de *S. boulardii* associado a *B.Toyoi* (*S.b/B.T.*).

4.7 Avaliação do efeito imunomodulador da associação entre *S. boulardii* e *B. Toyoi* em camundongos

Para avaliar o efeito imunomodulador da associação dos dois probióticos, camundongos foram divididos em quatro grupos, compostos de 12 animais cada: os animais do grupo 1 (G1, grupo controle) não receberam os probióticos na ração; os do grupo 2 (G2) receberam *S. boulardii* (10^8 UFC. g^{-1}) adicionado a ração; os do grupo 3 (G3) receberam esporos de *B. Toyoi* (10^7 UFC. g^{-1}) e os do grupo 4 (G4) receberam *S. boulardii* (10^8 UFC. g^{-1}) e esporos de *B. Toyoi* (10^7 UFC. g^{-1}). Os camundongos tiveram quinze dias para adaptação à ração contendo os probióticos e a receberam durante todo o experimento. No dia zero e no dia 15, os animais foram imunizados via intramuscular com aproximadamente 3 μ g da proteína internalina A recombinante (rInIA) de *L. monocytogenes* (MENDONÇA, *et al.* 2007) combinada a 0,8% de hidróxido de alumínio. Para a avaliação da resposta imune humoral, soros dos animais imunizados foram coletados através do plexo retro ocular nos dias zero (pré-imune) e 29 após a imunização, processados e mantidos a -20 °C até o momento do uso.

4.7.1 Avaliação da imunidade humoral

4.7.1.1 Ig total

A detecção e titulação de anticorpos anti-rInIA foram realizadas através de ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay) indireto. Para a realização do ELISA, placas de microtitulação de 96 cavidades foram sensibilizadas com 5 μ g.mL⁻¹ de rInIA diluída em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M, pH 9,6) e incubadas a 4 °C *overnight*. Soros dos animais do 29º dia, diluídos em base dois em solução salina fosfatada tamponada (PBS), pH 7,4 acrescida de 0,5% de Tween 20 (PBS-T), foram utilizados como anticorpos primários. Os soros do dia zero dos animais e o soro policlonal anti-rInIA foram utilizados, respectivamente, como controles negativo e positivo. Anticorpo de cabra anti-Ig totais (Invitrogen) de camundongos conjugado a peroxidase diluído 1:6000, foi utilizado como anticorpo secundário. Todas as reações ocorreram por 1 h a 37 °C (com exceção da sensibilização). Os reagentes foram utilizados a um volume de 50 μ L/cavidade e após todas as etapas de incubação, as placas foram lavadas três vezes com 200 μ L/cavidade de PBS-T.

Após a remoção do excesso de conjugado, através de cinco lavagens com PBS-T, as reações foram reveladas através da adição da solução cromógena ortofenilenodiamina (OPD), diluída em tampão fosfato-citrato pH 4,0 (0,2 M com 0,01% de H₂O₂). As placas foram mantidas no escuro por 15 min a temperatura ambiente e a leitura das absorbâncias realizada em espectrofotômetro para microplacas a 450 nm. Os títulos dos soros foram calculados como a recíproca da última diluição cuja absorbância foi superior a do soro do dia zero acrescido de dois desvios padrão.

4.7.1.2 IgG1 e IgG2a

Para titulação de anticorpos IgG1 e IgG2a contra o antígeno rInIA, cavidades de microplacas de 96 cavidades de poliestireno foram sensibilizadas com 5 µg.mL⁻¹ de rInIA em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M, pH 9,6) e as placas mantidas a 4 °C, *overnight*. Após lavagem das placas para remoção de antígenos não ligados, diluições em base dois em PBS-T dos soros dos animais vacinados coletados no dia 29 após a 1^a imunização foram adicionadas às cavidades das placas e estas incubadas a 37 °C por 1 h. Após, anticorpo de cabra anti-IgG1 e anti-IgG2a (Sigma) de camundongo, diluídos 1:1000 em PBS-T e anticorpo de coelho anti-Ig de cabra conjugado a peroxidase (Sigma), diluído 1:2000 em PBS-T foram adicionados às cavidades das placas e estas foram incubadas por 1 h a 37 °C. Após esse período, foi adicionada a solução cromógena e efetuada a leitura. A titulação dos soros de cada animal foi realizada em duplicata.

4.7.2 Avaliação de IFN-γ

Para avaliação da resposta celular, no dia 35 após a imunização, os baços dos camundongos foram removidos, os esplenócitos foram cultivados em cavidades de placas de cultivo de 24 cavidades contendo meio RPMI e as placas incubadas em estufa a 37° C com 5% de CO₂. Após 24 h, os esplenócitos foram estimulados com 3,5 µg.mL⁻¹ de rInIA, 3,5 µg.mL⁻¹ de concavalina A (como controle positivo) ou com meio (controle negativo) e, após 72 h, os sobrenadantes foram coletados, armazenados a -20° C e os níveis de IFN-γ determinados utilizando o *Kit "Mouse IFNγ Femto-HS" High Sensitivity ELISA Ready-Set-Go* (eBioscience), de acordo com a metodologia recomendada pelo fabricante.

4.8 Análise Estatística

Análise de variância ANOVA e Testes de Qui quadrado foram utilizados para determinar níveis de significância ($p < 0,05$).

5 Resultados

5.1 Resistência dos probióticos *B. Toyoi* e *S. boulardii* associados às condições simuladas do TGI de humanos

Ambos os probióticos apresentaram elevadas taxas sobrevivência às condições simuladas do TGI de humanos quando administrados individualmente (*S.boulardii*, em média 94,4% e *B. Toyoi*, em média 84,5%) e quando associados (*S. boulardii*, em média 92,2 % e *B. Toyoi*, em média 76,3%) e *S .boulardii* apresentou taxas de sobrevivência superiores a *B. Toyoi* (Figura 1). Entretanto, não houve diferença significativa, entre as taxas de sobrevivência dos probióticos *B. Toyoi* e *S. boulardii* quando administrados individualmente ou associados em nenhuma das etapas simuladas.

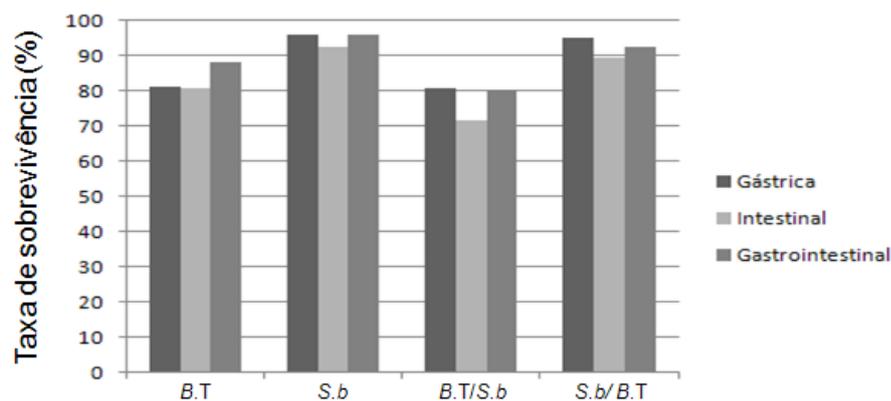


Figura 1. Taxas de sobrevivência (%) às condições simuladas do TGI de humanos dos probióticos *B. Toyoi* e *S. boulardii* administrados individualmente ou associados (B.T: *B. Toyoi* administrado individualmente, S.b: *S. boulardii* administrado individualmente, B.T/S.b: *B. Toyoi* associado a *S. boulardii*, S.b/B.T: *S. boulardii* associado a *B. Toyoi*).

5.2 Resistência dos probióticos *B. Toyoi* e *S. boulardii* co-administrados ao TGI de camundongos

Os probióticos *B. Toyoi* e *S. boulardii*, tanto administrados individualmente quanto associados, apresentaram elevadas taxas de sobrevivência 24 horas após a ingestão, sendo que nesse mesmo período, *B. Toyoi* apresentou taxas superiores a *S. boulardii* (*S. boulardii*, em média 64.4 % e *B. Toyoi*, em média 82.4%). Quarenta e oito horas após a ingestão, pode-se observar uma queda nessas taxas (*S. Boulardii*, em média 54.7 % e *B. Toyoi*, em média 51,8%). Porém, só observou-se diferença

significativa ($p < 0,05$) nas taxas de sobrevivência entre os grupos após 72 horas, onde somente o probiótico *S. boulardii*, administrado tanto individualmente quanto associado, sobreviveu ao TGI dos camundongos (*S. boulardii* individualmente = 44,8 e associado a *B. Toyoi* = 31,5%) (Figura 2).

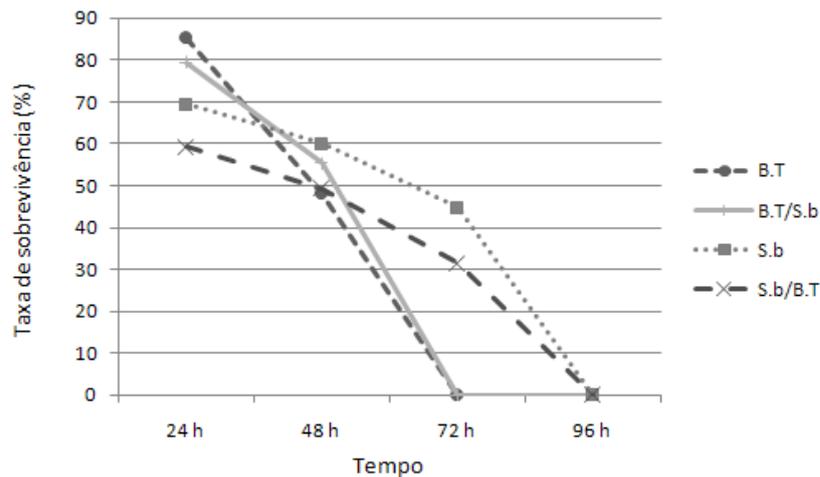


Figura 2. Taxas de sobrevivência (%) ao TGI de camundongos dos probióticos *B. Toyoi* e *S. boulardii* administrados individualmente ou associados (*B.T*: *B.Toyoi* administrado individualmente, *S.b*: *S.boulardii* administrado individualmente, *B.T/S.b*: *B.Toyoi* associado a *S.boulardii*, *S.b/B.T*: *S.boulardii* associado a *B.Toyoi*).

5.3 Avaliação do efeito imunomodulador da associação entre *S. boulardii* e *B. Toyoi* em camundongos

5.3.1 Avaliação da imunidade humoral

5.3.1.1 IgG total

Em relação às médias dos títulos de Ig total rInla específica, foi observado que os soros dos animais pertencentes aos grupos alimentados com os probióticos apresentaram títulos estatisticamente superiores ($p < 0,05$), aos dos soros dos animais do grupo controle e que os soros do grupo em que os probióticos foram administrados de forma associada apresentou o maior título, estatisticamente superior ($p < 0,05$) aos dos demais grupos (*S.boulardii* = 9.720, *B. Toyoi* = 13.500, *S.boulardii* + *B. Toyoi* = 23.400 e controle = 3.150). O grupo alimentado somente com *B. Toyoi* não apresentou diferença significativa em relação ao alimentado com *S.boulardii* (Figura 3).

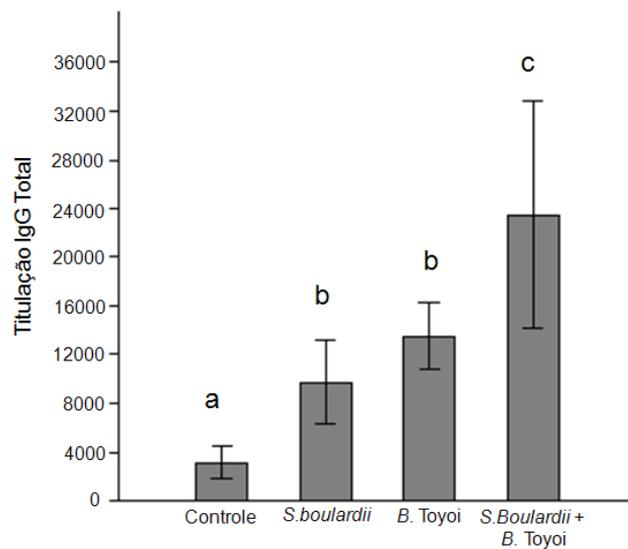


Figura 3. Médias dos títulos de anticorpos Ig total rInA específicos dos soros dos camundongos alimentados somente com a ração (controle) ou com *S. boulardii* e *B. Toyoi* administrados individualmente ou associados. Os resultados são expressos como a média \pm desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças significativamente estatísticas ($p < 0,05$) entre as médias.

A soroconversão dos animais alimentados com os probióticos associados foi de 7,4 vezes em relação à dos animais do grupo controle. Quando comparados a dos animais alimentados com os probióticos individualmente, os valores da soroconversão dos animais do grupo alimentado com ambos os probióticos foram 2,4 e 1,7 vezes superior a de *S. boulardii* e *B. Toyoi*, respectivamente. Já as soroconversões dos animais alimentados com os probióticos individualmente foram 3,1 vezes superior para *S. boulardii* e 4,3 vezes superior para *B. Toyoi*, quando comparadas a do grupo controle.

5.3.1.2 IgG1 e IgG2a

Os soros dos animais do grupo em que os probióticos foram associados apresentaram os maiores títulos de IgG1 rInA específica, seguido pelos soros dos animais do grupo administrado somente com *S. boulardii* e com *B. Toyoi*. Entretanto, a diferença foi significativa no grupo onde os animais foram administrados de forma associada em relação aos outros ($p < 0,05$) (Figura 4a). Já entre as médias dos títulos de IgG2a, não houve diferença significativa entre as médias dos soros dos animais entre os grupos (Figura 4b).

A imunização dos camundongos dos quatro grupos com rInA estimulou maiores níveis de IgG1 em relação a IgG2a, visto que as razões entre IgG1 e IgG2a

variaram de 3,7 para os animais do grupo controle a 22 para os do grupo onde os probióticos foram associados e as médias dos títulos de IgG1 foram significativamente superiores às de IgG2a ($p=0,03$). Tal fato sugere uma resposta predominantemente Th2 (humoral).

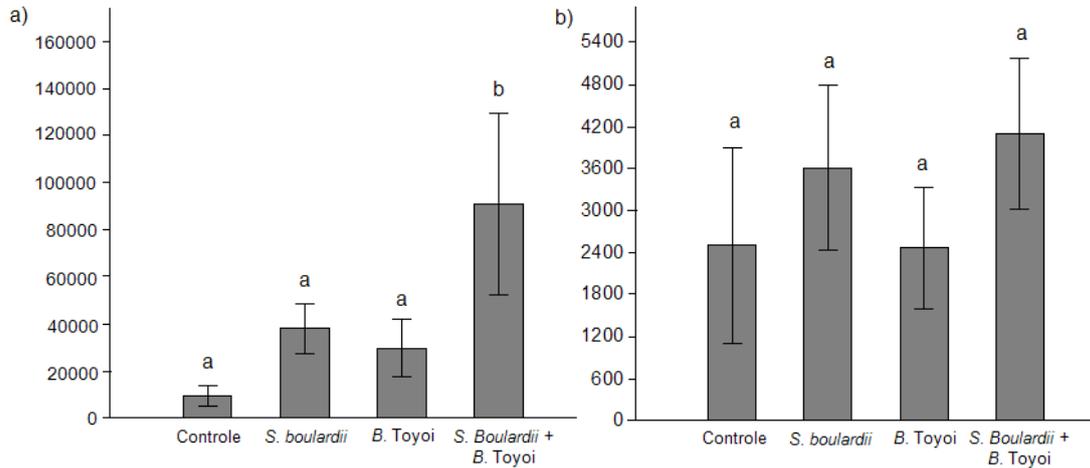


Figura 4. Médias dos títulos de anticorpos IgG1 e IgG2a rInIA específicos dos soros dos camundongos alimentados somente com a ração (controle) ou com *S.boulardii* e *B.Toyoi* administrados isoladamente ou co-administrados, a) IgG1; b) IgG2a. Os resultados são expressos como a média \pm desvio padrão. Letras diferentes representam diferenças significativamente estatísticas ($p<0,05$) entre as médias

5.3.1.3 IFN- γ

Não houve diferença significativa nas concentrações de IFN- γ entre os grupos (Figura 5).

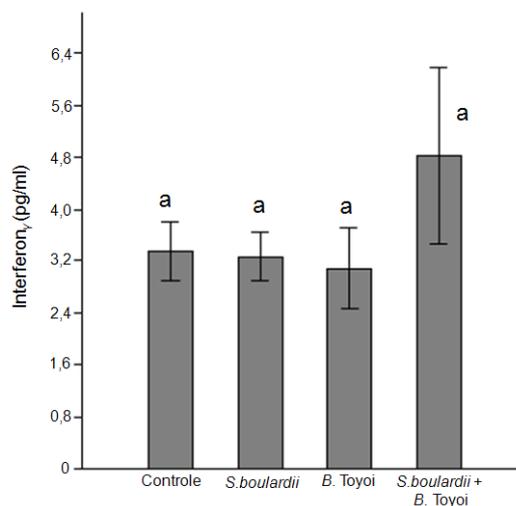


Figura 5. Médias das concentrações de IFN- γ ($\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$) rInIA específico dos camundongos alimentados somente com a ração (controle) ou com *S.boulardii* e *B.Toyoi* administrados individualmente ou associados. Os resultados são expressos como a média \pm desvio padrão ($n = 6$ por grupo). Letras diferentes representam diferenças significativamente estatísticas ($p<0,05$) entre as médias.

6 Discussão

Para um micro-organismo apresentar potencial probiótico, ele deve resistir às condições gastrointestinais as quais será submetido, ou seja, chegar viável, metabolicamente ativo e em quantidades adequadas ao ecossistema onde sua ação é esperada (CHARTERIS et al., 1998). Além disso, deve conferir algum benefício ao hospedeiro, como por exemplo, a modulação da resposta imune (MACPHERSON et al., 2004). Como a levedura *S. boulardii* e esporos da bactéria *B. Toyoi* apresentam a propriedade de modular a resposta imune do hospedeiro (COPPOLA et al., 2005; ROSS et al., 2009) e a associação entre probióticos pode proporcionar um efeito sinérgico, a influência da associação entre eles sobre a imunomodulação foi avaliada no presente estudo, utilizando como proteína modelo a InIA recombinante de *L. monocytogenes* e como modelo animal, camundongos.

Como o trânsito de micro-organismos no trato gástrico e intestinal é consecutivo, é importante determinar a sobrevivência dos probióticos às condições intestinais após uma pré-exposição às condições gástricas. No presente estudo, ambos os probióticos avaliados individualmente e em associação foram capazes de resistir às condições do TGI em um número suficiente para exercer um efeito benéfico *in situ*, pois as porcentagens de sobrevivência à exposição consecutiva às condições gástricas e intestinais variaram de 80,5 a 96,1% e não houve diferença significativa entre elas. Esses resultados sugerem a ausência de antagonismo entre os probióticos avaliados quanto a resistência a todas as condições GI avaliadas.

Estudos como os de Barbosa et al. (2005) apresentaram resultados semelhantes aos encontrados neste estudo em relação à administração individual de esporos de bactérias probióticas. Nestes estudos, esporos de cepas do gênero *Bacillus* apresentaram elevada resistência ao pH 2, a 0,2% de sais biliares e às duas condições consecutivas, assim como esporos de *Bacillus laevolacticus* DSM 6475 e de *Sporolactobacillus racemicus* IAM 12.395 foram resistentes ao pH 3,0 e esporos de *Bacillus racemilacticus* e de *Bacillus coagulans* foram tolerantes a concentração de 0,3% de sais biliares (HYRONIMUS et al., 2000).

A resistência de *S. boulardii* às condições simuladas do TGI também foi elevada neste estudo assim como no estudo de Pardo et al. (2009), onde *S. boulardii* apresentou boa tolerância a 0,5% de sais biliares e ao pH 3 e 5 por 48 h. No estudo de Kühle et al. (2005), todas as oito cepas de *S. boulardii*, além das 18 cepas de *S. cerevisiae* avaliadas, foram capazes de resistir ao pH 2,5 e a 0,3% de sais biliares, quando o tempo de incubação não excedeu 4 h. Entretanto, Kühle et al. (2005) investigaram a exposição somente a sais biliares sem adicionar pancreatina.

Diversos estudos, além do citado anteriormente, têm demonstrado que a sobrevivência de *S. boulardii* está relacionada ao tempo de exposição às condições do TGI. Fietto et al. (2004) demonstraram que *S. boulardii* manteve sua viabilidade em 75% após 60 minutos em pH 2,0. Já Graff et al. (2008) e Vanhee et al. (2010) obtiveram menos de 1 % de sobrevivência de *S. boulardii* após 120 minutos a pH 1,1. Em nosso estudo, a viabilidade se manteve elevada após 60 minutos nas condições gástricas e após quatro horas nas condições intestinais simuladas.

Estudos com outras leveduras, como os de Martins et al. (2005a) e de França (2011), também observaram uma elevada sobrevivência às condições simuladas do TGI. No primeiro, as taxas de sobrevivência variaram de 94 a 109% quando todas as 12 linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de diferentes fontes foram expostas às mesmas condições simuladas utilizadas no presente trabalho, e no segundo, as taxas foram de 80,5, 92,7 e 76,8%, quando a levedura *P. pastoris* foi exposta às mesmas condições gástricas, intestinais e gastrointestinais simuladas, respectivamente. Já no estudo de Pennachia et al. (2008) somente dez das 22 cepas isoladas de alimentos apresentaram uma boa porcentagem de sobrevivência (de 71,5 a 94%) quando expostas a condições intestinais simuladas (0,3% de sais biliares e 0,1% de pancreatina por 5 h) após 2,5 h de pré-exposição ao suco gástrico. E no estudo de Ágarwal et al. (2000), das 50 cepas avaliadas, nove foram capazes de tolerar o pH 2,0 por 6 h e somente sete sobreviveram à presença de sais biliares em diferentes concentrações (0,3-0,9%). .

Estudos preliminares de viabilidade celular de probióticos *in vitro* devem ser confirmados e melhor avaliados *in vivo*. Além disso, quando probióticos são associados, é necessário avaliar a ocorrência de inibição ou competição por sítios de ligação. Por isso, a avaliação da resistência ao TGI de mamíferos dos probióticos

S. boulardii e *B. Toyoi* associados foi avaliada utilizando camundongos como modelo animal.

Neste estudo os probióticos *B. Toyoi* e *S. boulardii* apresentaram elevada sobrevivência a passagem através do TGI de camundongos quando associados (*S. boulardii* = 59,5% e *B. Toyoi* = 79,2%) e essas taxas de sobrevivência não foram estatisticamente diferentes das observadas quando os probióticos foram administrados individualmente 24 h após a administração (*S. boulardii* = 69,5% e *B. Toyoi* = 85,3%). Esses resultados indicam que não ocorreu inibição ou competição por sítios de ligação entre eles. Além disso, esses resultados confirmam que os dois probióticos administrados simultaneamente são capazes de resistir às condições do TGI de camundongos e chegar viáveis, metabolicamente ativos e em quantidades adequadas (superiores a 10^6 e 10^7 UFC, segundo Charteris et al., 1998). Esse resultado indica que os probióticos devem ser co-administrados uma vez a cada 24 h para se manterem em quantidades adequadas no hospedeiro.

B. Toyoi apresentou maior resistência ao TGI nas primeiras 24 h, devido, provavelmente, ao fato de ser administrado na forma de esporo, a qual é mais resistente do que a célula vegetativa. Entretanto, *S. boulardii* foi isolado por até 72 h após sua administração, enquanto que *B. Toyoi* foi isolado somente até 48 h, ou seja, *S. boulardii* persistiu por mais tempo no TGI dos camundongos.

Com relação a esporos de bactérias probióticas, no estudo de HOA et al. (2001), esporos de *B. subtilis* foram detectados 96 h após a inoculação, ou seja, sobreviveram por mais tempo do que os da cepa de *B. Toyoi* avaliados no presente estudo. Já Duc et al. (2004) apresentaram resultados divergentes a este estudo, onde uma cepa de *B. subtilis* (PY79) foi eliminada rapidamente e três cepas de *Bacillus* de produtos comerciais resistiram por até 18 dias, apresentando contagens de 10^3 UFC. g^{-1} de fezes. Esses resultados indicam que a resistência às condições adversas do TGI é cepa específica, o que explica o fato de micro-organismos da mesma espécie ou gênero apresentarem diferentes respostas frente a essas condições. Além disso, estudos com esporos do probiótico comercial *Bacillus cereus* demonstraram que eles são capazes de instalar-se em altos níveis populacionais no sistema digestivo, atingindo uma contagem de $4,9 \times 10^7$ UFC. g^{-1} (BITTENCOURT et

al., 2001), e que eles podem germinar em números significativos no jejuno e no íleo (CASULA et al., 2002).

Com relação a leveduras, estas, em geral, são eliminadas do TGI do hospedeiro pela microbiota intestinal. Entretanto, existem diferenças em sua taxa de eliminação. A levedura *S. boulardii* também precisa ser administrada de maneira repetida e regular, pois não coloniza o trato digestivo e é progressivamente eliminada pela microbiota normal presente no intestino dos animais (FULLER, 1992). Segundo Bléhaut et al. (1989), dois a cinco dias após a descontinuação do seu uso, ela não é mais encontrada nas fezes. Outros autores também avaliaram a sobrevivência do probiótico *S. boulardii* e apresentaram resultados que se assemelham aos encontrados no presente estudo. Martins et al. (2009), avaliando quatro produtos probióticos a base de *S. boulardii* liofilizado, observaram que estes apresentaram uma sobrevivência *in vivo* variando de 50 a 70%. Com relação à sobrevivência de outras leveduras, MARTINS et al. (2005b) avaliaram 12 cepas de *S. cerevisiae* e apenas uma apresentou elevada sobrevivência e, esta cepa, diferentemente da *S. boulardii* deste estudo, colonizou o intestino dos camundongos. TIAGO et al. (2009), ao avaliarem 103 leveduras, obtiveram os melhores resultados somente com três delas, as quais não foram mais encontradas nas fezes quatro dias após a interrupção do tratamento, apresentando um comportamento similar ao encontrado por *S. boulardii* no presente estudo. E França (2011) observou que *P. pastoris* apresentou uma elevada sobrevivência à passagem através do TGI dos camundongos 24 h após a sua administração, visto que foi obtida uma contagem de $6,9 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ de fezes frescas. Já 48 h após a sua administração, foi obtida uma contagem de $7,5 \times 10^2$ UFC.g⁻¹, e após 72 h não houve crescimento.

A modulação da resposta imune é uma das principais funções atribuídas aos probióticos, além da prevenção e tratamento de doenças humanas (GUSLANDI, 2000; ERIKSON & HUBBARD, 2000; GOMES & MALCAT, 2006). Diversos estudos demonstraram que *B. Toyoi* e *S. boulardii*, individualmente, foram capazes de modular a resposta imune em camundongos (COPPOLA et al., 2005), frangos (GIL DE LOS SANTOS, STORCH & GIL TURNES, 2005), carneiros (ROOS et al., 2010) e em outras espécies animais (GIL TURNES et al., 2007). No presente estudo foi avaliado se a associação entre *S. boulardii* e *B. Toyoi* apresentaria um efeito sinérgico sobre a imunomodulação em camundongos, utilizando a proteína

internalina A recombinante (rInA) de *L. monocitogenes* como proteína modelo. A proteína de membrana InA é necessária para a aderência e internalização da bactéria a células não fagocíticas do hospedeiro (E-caderina) (BHUNIA, 2008). Neste estudo a forma recombinante dessa proteína, inoculada via intramuscular apesar de camundongos não apresentam o receptor E-caderina, mostrou-se bastante imunogênica, pois estimulou elevados títulos de anticorpos em animais sem suplementação.

Em relação a resposta imune humoral específica, os animais do grupo onde *S. boulardii* e *B. Toyoi* foram associados apresentaram títulos de anticorpos e soroconversões significativamente superiores as dos animais suplementados com cada um dos probióticos individualmente ($p < 0,05$). Esses resultados evidenciam que ocorreu sinergismo entre os dois probióticos em relação a resposta imune humoral contra o antígeno rInA. Resultados semelhantes foram encontrados por Randhawa et al. (2011), que avaliou a associação entre as cepas probióticas *Lactobacillus delbrueckii* 405 e *Lactobacillus casei* subsp. Casei 17 e observou que os títulos de anticorpos foram significativamente superiores quando os dois probióticos foram administrados simultaneamente. Tanasieko et al. (2005) avaliaram a associação entre *Enterococcus faecium* e *Saccharomyces cerevisiae* e verificaram que ela elevou significativamente a eficácia de uma vacina anti-tumoral *in vivo*, e Trois et al. (2007) avaliaram a associação entre *Bifidobacterium bifidum* e *Streptococcus thermophilus* e observaram que ela aumentou o número de células CD4 em crianças infectadas com o vírus HIV.

Outros estudos avaliaram a soroconversão de camundongos e carneiros suplementados com *B. Toyoi* e *S. boulardii*, individualmente, frente a diferentes antígenos e obtiveram soroconversões inferiores às encontradas no presente trabalho. As soroconversões contra Herpes vírus bovino tipo 5 foram de 1,7 e 1,3 em camundongos (ROSS et al., 2009) e de 2,8 e 5,2 em carneiros (ROSS et al., 2010) suplementados com *S. boulardii* e *B. Toyoi*, respectivamente. As soroconversões frente à bacterina tetravalente de *E. coli* variaram de 1,6 a 1,8 em camundongos (COPPOLA et al., 2005) suplementados com *S. boulardii* e de 1,2 a 4,1 em animais suplementados com *B. Toyoi* e, em carneiros (ROSS et al., 2010), as soroconversões foram de 1,9 e 1,3 nos animais suplementados com *S. boulardii* e *B. Toyoi*, respectivamente. Já as soroconversões contra *Parvovirus* em

camundongos, variaram de 6,8 a 9,1 em animais suplementados com *B. Toyoi* e de 5,2 a 12 nos suplementados com *S. boulardii* (COPPOLA et al., 2005). Esses resultados demonstram que, independentemente do antígeno avaliado, a suplementação da alimentação dos animais com ambos os probióticos de forma isolada estimula a resposta imune antígeno específica. Entretanto, a intensidade da resposta imune humoral é antígeno-dependente.

Uma das maneiras de avaliar a modulação do sistema imune frente à imunização com um determinado antígeno é através do cálculo da proporção dos níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a gerados após a imunização. Os anticorpos IgG1, em camundongos, estão associados a uma resposta Th2, enquanto que, anticorpos IgG2a, estão associados a resposta Th1 (MOSMANN; COFFMAN, 1989). Assim, a razão entre IgG1/IgG2a reflete a relativa contribuição de cada um dos tipos de resposta gerada contra o antígeno, podendo ser ela humoral (predomínio de IgG1) ou celular (predomínio de IgG2a) (MAASSEN et al., 2003, FERREIRA et al., 2008, HABJANEC; HALASSY; TOMASIC, 2008). A análise da resposta de subtipos anti-rInIA no presente estudo mostrou que a imunização de camundongos suplementados com os probióticos *B. Toyoi* e *S. boulardii* tanto administrados individualmente, quanto associados, estimulou maiores níveis de IgG1 em relação a IgG2a (proporção IgG1/IgG2a = 22), sugerindo uma resposta predominantemente Th2, ou seja uma resposta humoral. Esses resultados diferiram dos encontrados por Ross (2009), onde houve predomínio de uma resposta Th1 em animais suplementados com *B. Toyoi* e com *S. boulardii*, individualmente, e vacinados com Herpes vírus bovino tipo 5 inativado. Já no grupo controle houve predomínio de uma resposta Th2. Os resultados encontrados por Ross (2009) sugerem que os probióticos modularam a soroconversão contra Herpes vírus bovino tipo 5 a favor de uma resposta predominantemente celular. A divergência entre os resultados dos dois estudos sugere que a modulação da resposta imune varia em função do tipo de antígeno ao qual o sistema imunológico foi exposto. Além disso, de acordo com VINDEROLA et al. (2004), a modulação do sistema imune depende do microrganismo utilizado, da concentração e do período de administração e, de acordo com MATSUZAKI & CHIN (2000), um dos prováveis mecanismos através dos quais os probióticos influenciam na imunomodulação é através da estimulação da produção de citocinas.

A resposta celular foi avaliada através da quantificação de IFN- γ pelo método ELISA. Uma maior concentração de IFN- γ ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) rInA específico, foi obtida pelos animais cuja ração foi suplementada com ambos os probióticos. Entretanto esta diferença não foi estatisticamente significativa. Efeito sinérgico sobre a resposta celular foi observado entre os probióticos *Lactobacillus delbrueckii* 405 e *Lactobacillus casei* subsp. Casei 17 frente a glóbulos vermelhos de carneiros (SRBC) (RANDHAWA et al., 2011).

No presente estudo, a citocina foi detectada em pequenas concentrações (aproximadamente $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ em sobrenadantes de esplenócitos de camundongos suplementados com *B. Toyoi* e *S. boulardii*), o que confirma que a modulação da resposta imune contra InA estimulada pela associação entre os dois probióticos é predominantemente mediada por anticorpos. Ross (2009) observaram uma maior expressão das citocinas IFN- γ , IL-10 e IL-12 em camundongos suplementados com *B. Toyoi* em relação ao grupo controle e em maiores concentrações do que no presente estudo, o que indica, novamente, uma resposta predominantemente celular. No grupo suplementado com *S. boulardii* a expressão de citocinas IFN- γ e IL-12 foram inferiores ao controle.

A partir destes resultados pode-se inferir que a associação entre os probióticos *B. Toyoi* e *S. boulardii* potencializou a resposta imunológica frente ao antígeno rInA, sugerindo que esses micro-organismos podem agir de modo sinérgico no combate a patógenos. Entretanto, novos estudos devem ser realizados visando à avaliação do efeito sinérgico proposto frente a outros antígenos.

7 Conclusões

- ✓ *B. Toyoi* e *S. boulardii* apresentaram efeito sinérgico sobre a imunomodulação;
- A associação entre eles potencializou a resposta imune humoral frente à proteína rInIA através de um aumento significativo nos títulos de anticorpos;
- Os probióticos não possuíram efeito antagônico entre si quanto à sobrevivência ao TGI de mamíferos;
- ✓ Novos estudos fazem-se necessários para avaliar outros possíveis benefícios dessa associação.

Referências

ÁGARWAL, N.; KAMRA, D.N.; CHAUDHARY, L.C.; SAHOO A.; PATHAK N.N. Selection of *Saccharomyces cerevisiae* strains for use as microbial feed additive. **Letters in Applied Microbiology**, p.270–273, 2000.

ALEXOPOULOS, C.; KYRIAKIS, S.; SPAIS, A.; MILIOTIS, C.; GEORGAKIS, S.; KRITAS, S.. Evaluation of Toyocerin a probiotic containing *Bacillus toyoi* spores, on health status and productivity of weaned, growing and finishing pigs. In: **International Pig Veterinary Society-16th Congress**, Melbourne, Australia. Nottingham university Press, Nottingham, UK.

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

ÁVILA, F. A. et al. Use of vaccine and probiotic in the control of swine diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, 505- 511, 1998.

BANCHEREAU J.; BRIERE F.; CAUX C.; DAVOUST J.; LEBECQUE S.; LIU Y.J.; PULENDRAN B.; PALUCKA K. Immunobiology of dendritic cells. **Annual Review Immunology**:767-811. 2000.

BARBOSA, T. M.; SERRA C.R.; LA RAGIONE R. M.; WOODWARD, M. J.; HENRIQUES A.O. Screening for *Bacillus* Isolates in the Broiler Gastrointestinal Tract. **Applied and environmental microbiology**, 968–978, 2005.

BAUM, B.; LIEBLER-TENORIO, E.M.; ENSS, M.L.; POHLENZ, J.F.; BREVES, G. *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. *toyoi* influence the morphology and the mucins of the intestine of pigs. **Zeitschrift Fur Gastroenterologie** , 277–284, 2002.

BERG R. D. The indigenous gastrointestinal microflora. **Trends in Microbiology**, 430: 435. 1996.

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

BHUNIA, A. K.; Mechanisms and pathogenesis. **Foodborne microbial pathogens**, 276, 2008.

BITTENCOUR, T. J. L.; NICOLI, J. R.; PENA, F. J.; VIEIRA M. C.; RIBEIRO SOBRINHO, A. P.; ARANTES, R. M.E. Colonização e efeitos no ecossistema digestivo de camundongos gnotobióticos de uma cultura comercial (BIOVICERIN®) de *Bacillus cereus*. **Revista De Biologia E Ciências Da Terra**. 2001.

BLÉHAUT, H.; MASSOT J.; ELMER G. W.; LEVY R. H. Disposition kinetics of *Saccharomyces boulardii* in man and rat. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, 353-364, 1989.

BLEICHNER, G.; BLÉHAUT, H.; MENTEC,. *Sacchchromyces boulardii* prevents diarrhoea in critically ill tube-fed patients. A multicenter, randomized, double-blind-placebo-controlled trial. **Journal Intensive Care Medicine**, 517-523, 1997.

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

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

BREVES, G.; FAUL, K.; SCHRODER, B.; et al. Application of the colon-stimulation technique for studying the effects of *Saccharomyces boulardii* on basic parameters of porcine cecal microbial metabolism disturbed by Clindamycin. **Digestion**, 193-200, 2000.

BUTS, J.; BERNASCONI, P.; VAERMAN, J.P.; et al. Stimulation of secretory IgA and secretory component of immunoglobulins in small intestine of rats treated with *Saccharomyces boulardii*. **Digestive Diseases and Sciences**, 251-256, 1990.

BUTS, J.P. Ejemplo de un medicamento probiótico: *Saccharomyces boulardii* liofilizada. **Revista de Gastroenterología del Perú**, 176-188. 2005.

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

BUTS, J.P.; KEYSER N.D. Effects of *Saccharomyces boulardii* on Intestinal Mucosa. **Digestive Disease and Sciences**, 1485-1492, 2006.

CABALLERO-FRANCO, C.; KELLER, K.; DE SIMONE, C.; CHADEE, K. The probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, 315-322, 2007.

CARRIQUE-MAS, J. J.; HÖKEBERG, I.; ANDERSON, Y.; ARNEBORN, M.; THAM, W.; DANIELSSON-THAM, M.-L.; OSTERMAN, B.; LEFFFLER, M.; STEEN, M.; ERIKSSON, E.; HEDIN, G.; GIESECKLE, J. Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese – an outbreak of listeriosis? **Epidemiology and Infection**,. 79-86, 2003.

CASTAGLIUOLO, L.; LAMONT, J.T.; NIKULASSON, S.T.; et al. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits *Clostridium difficile* toxin A effects in the rat ileum. **Infection and Immunity**, 5225-5232, 1996.

- CASULA,G.; CUTTING, S.M.; Bacillus probiotics: spore e germination in the gastrointestinal tract. **Applied Environmental Microbiology** ,68, 2002.
- CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. *International Journal of Dairy Technology*,123-136, 1998.
- CID V.J.; DURAN A.; DEL REY F., et al. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiological Reviews**, 345–86. 1995.
- COMMANE, D.M.; SHORTT C.T.; SILVI, S; CRESCI, A.; HUGHES R.M.; ROWLAND, I.R. Effects of fermentation products of pro- and prebiotics on trans-epithelial electrical resistance in an in vitro model of the colon. **Nutrition and Cancer**,102–109, 2005.
- COPPOLA, M. M. & GIL-TURNES, C. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, 1297-1303, 2004.
- COPPOLA, M. M.; CONCEIÇÃO, F.R.; GIL-TURNES, C. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. Toyoi on the humoral and cellular response of mice to vaccines. **Food and Agricultural Immunology**. 213-219. 2005.
- CROSS, M .L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 245-253, 2002.
- CULLIGAN E.P.; HILL, C.; SLEATOR, R. D. Probiotics and gastrointestinal disease: successes, problems and future prospects. **Gut Pathogens**, 1-19 ,2009.
- CUMMINGS, J. H. et al. Passclaim – Gut Health and immunity. **European Journal of Nutrition** 118-173, 2004.
- CZERUCKA D.; PICHE, T.: RAMPAL. P. Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, 767–778, 2007.
- CZERUCKA, D.; DAHAN, S.; MOGRABI, B.; ROSSI, B.; RAMPAL, P.. Implication of mitogen-activated protein kinases in T84 cell responses to enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infection and Immunity*,1298-1305, 2001.
- 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. **Infection and Immunity** , 5998-6004, 2000.
- CZERUCKA, D.; RAMPAL, P. Effect of *Saccharomyces boulardii* on cAMP- and Ca²⁺-dependent CF secretion in T84 cells. **Digestive Diseases and Sciences**, 2359-2368, 1999.
- CZERUCKA, D.; RAMPAL, P;. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. **Microbes and Infection**, 733-739, 2002.

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

DAHAN, S.; DALMASSO, G.; IMBERT, V.; PEYRON, J.F., RAMPAL, P.; CZERUCKA *Saccharomyces boulardii* interferes with enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced signaling pathways in T84 cells. **Infection and Immunity**, 766-773, 2003.

DAUDELIN, J. F.; LESSARD, M.; BEAUDOIN, F.; NADEAU, É.; BISSONNETTE, N.; BOUTIN, Y.; BROUSSEAU, J. P.; LAUZON, K.; FAIRBROTHER, J. M. Administration of probiotics influences F4 (K88)-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* attachment and intestinal cytokine expression in weaned pigs. **Veterinary Research**, 42:69, 2011

DUC, L. H.; HONG, H. A.; BARBOSA, T. M.; HENRIQUES, A.O.; CUTTING, S. M. Characterization of *Bacillus* Probiotics Available for Human Use **Applied And Environmental Microbiology**. 2161–2171, 2004

ELMER, G.W.; MCFARLAND, L.V. Biotherapeutic agents in the treatment of infectious diarrhea. **Gastroenterology Clinics of North America**, 837-854, 2001.

ERICKSON, L. K.; HUBBARD, E. N. Probiotic immunomodulation in health and disease. **Journal of Nutrition**, 403-109, 2000.

EUROPEAN COMMISSION- HEALTH CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL, 2001 Disponível em: http://ec.europa.eu/health/index_en.htm acessado: 20/10/10.

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

FERREIRA, D.M.; DARRIEUX, M.; OLIVEIRA, M.L.; LEITE, L.C.; MIYAJI, E.N.; Optimized immune response elicited by a DNA vaccine expressing pneumococcal surface protein A is characterized by a balanced immunoglobulin G1(IgG1)/IgG2a ratio and proinflammatory cytokine production. **Clinical and Vaccine Immunology**: 499-505, 2008.

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 IM. .Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. **Canadian Journal Microbiology**. 615-621, 2004.

FOLIGNÉ, B.; DEWULF, J.; VANDEKERCKOVE, P.; PIGNÈDE, G.; POT, B. Probiotic yeasts: Anti-inflammatory potential of various non pathogenic strains in experimental colitis in mice **World Journal of Gastroenterology**, 2134-2145, 2010.

FRANÇA, R. C. **Avaliação do potencial probiótico da levedura *Pichia Pastoris***. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, 68p, 2011.

- FULLER, R. **Probiotics - The Scientific Basis**. Chapter 1 Edited by R. Fuller, Chapman & Hall, Reading UK, 1-8, 1992.
- GAHAN, C. G. M.; HILL, C. A review: Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. **Journal of Applied Microbiology**, 1345-1353, 2005.
- GEDEK, B.R. Adherence of *Escherichia coli* serogroup O 157 and the *Salmonellatyphimurium* mutant DT 104 to the surface of *Saccharomyces boulardii*. **Mycoses**, 261-264, 1999.
- GEORGOULAKIS, I.E.; ALEXOPOULOS, C.; MILIOTIS, C.; MALANDRAKIS, E.E.; KYRIAKIS, S.C.; Evaluation of Toyocerin, a probiotic containing *Bacillus toyoi* spores, on the health status and performance of sows and their litters. **Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society**, 34-45. 2004.
- GEYER MEDICAMENTOS S.A. Disponível em: [http:// www.geyermed.com.br/](http://www.geyermed.com.br/)
- GIL DE LOS SANTOS, J.R.; STORCH, O.B.; & GIL TURNES, C. *Bacillus cereus* var. *Toyoi* and *Saccharomyces boulardii* increased feed efficiency in broilers infected with *Salmonella enteritidis*. **British Poultry Science**, 46, 494-497, 2005.
- GIL-TURNES, C.; CONCEIÇÃO, F.R.; GIL DE LOS SANTOS, J.R. *Bacillus cereus* var. *Toyoi* improves feed efficiency and health in animals. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, 21-28, 2007.
- GIULIANO, M.; BARZA, M.; JACOBUS, N.V.; et al. Effect of broad-spectrum parenteral antibiotics on composition of intestinal microflora of humans. **Anti microbial Agents and Chemotherapy**, 202-6. 1987.
- GOMES, A. M. P.; MALCAT, F.X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos e aplicações tecnológicas. **Biotechnologia alimentar, Escola Superior de Biotechnologia, Universidade Católica Portuguesa**, 12-22, 2006.
- GRAFF, S.; CHAUMEIL, J. C.; LAI-KUEN, P. R.; CHARRUEAU, J.C. Influence of pH conditions on the viability of *Saccharomyces boulardii* yeast. **Gene Applied Microbiology**, 221-22, 2008.
- GRATZ, S. W.; MYKKANEN, H.; EL-NEZAMI, H. S. Probiotics and gut health: A special focus on liver diseases. **World Journal Gastroenterology**, 403-410. 2010.
- GUSLANDI, M.; GIOLLO, P.; TESTONI, P.A. A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**. 669-698, 2003.
- GUSLANDI, M.; MEZZI, G.; SORGI, M.; TESTONI, P.A. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. **Digestive Diseases and Sciences**, 1462-1464, 2000.
- HABJANEC, L.; HALASSY, B.; TOMASIĆ, J. Immunomodulatory activity of novel adjuvant formulations based on Montanide ISA oil-based adjuvants and peptidoglycan monomer. **International Immunopharmacology**, 717-724, 2008.

- HAGHIGHI, H. R.; GONG, J.; GYLES, C. L.; HAYES, M. A.; SANEI, B.; PARVIZI, P.; GISAVI, H.; CHAMBERS, J. R.; SHARIF, S. Modulation of antibody mediated immune response by probiotics in chickens. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 1387–1392, 2005.
- HAMANN, L.; EL-SAMALOUTI, V.; ULMER, A.J. Components of gut bacteria as immunomodulators. **International Journal of Food Microbiology**; 141–54, 1998.
- HAVENAAR, R.; BRINK, B.T.; HUIS INT'VELD, J.H.J. Selection of strains for probiotic use. In: FULLER, R. **Probiotics: the scientific basis**, 209-224, 1992.
- HOA, T. T.; DUC, L. H.; ISTICATO, R.; BACCIGALUPI, L.; RICCA, E.; VAN, P. H.; CUTTING, S. M. Fate and Dissemination of *Bacillus subtilis* Spores in a Murine Model. **Applied And Environmental Microbiology**, p. 3819–3823, 2001.
- HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre and probiotics. **Food Research International**, 109-116, 2002.
- HORI, T.; KIYOSHIMA, J.; YASUI, H. Effect of an oral administration of *Lactobacillus casei* strain Shirota on the natural killer activity of blood mononuclear cells in aged mice. **Bioscience Biotechnology & Biochemistry**, 420–2; 2003.
- HYRONIMUS, B; LE MAREC, C.; SASSI, H.A.; DESCHAMPS, A. Acid and bile tolerance of spore forming lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, 193-197. 2000.
- ISHIOKA, T. A. preliminary clinical evaluation of safety of *Bacillus toyoi* preparation (Toyocerin) in humans. Study Report. **Asahi Chemical Industry Co.,Ltd**, 1979.
- ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; Probiotics, gut inflammation and barrier function. **Gastroenterology Clinics of North America**, 437–450, 2005
- JADAMUS A.; VAHJEN, W.; SCHAEFER, K.; SIMON, O. J. Influence of the probiotic strain *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the development of enterobacterial growth and on selected parameters of bacterial metabolism in digesta samples of piglets. **Animal Physiology and Animal Nutrition**. 86, 2002.
- JAHN, H. U.; ULLRICH, R.; SCHNEIDER, T.; et al. Immunology and tropical effects of *Saccharomyces boulardii* on the small intestine in healthy human volunteers. **Digestion**, 95-104, 1996.
- JANEWAY, C. A , MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, 197 – 21 2002.
- JENSEN, G. S.; BENSON, K. F.; CARTER, S. G.; ENDRES, J. R. GanedenBC30™ cell wall and metabolites: anti-inflammatory and immune modulating effects *in vitro*. **BMC Immunology**, 11- 15.2010.
- JOHNSON-HENRY, K. C.; DONATO, K. A.; SHEN-TU, G.; GORDANPOUR, M.; SHERMAN, P.M. Lactobacillus rhamnosus strain GG prevents enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-induced changes in epithelial barrier function. **Journal of Surgical Research**, 1340–1348, 2008.

KAIKO, G. E.; HORVAT, J. C.; BEAGLEY, K. W.; HANSBRO, P. M. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? **Immunology**, 326-338, 2007.

KAILA M.; ISOLAURI E.; SOPPI E.; VIRTANEN E.; LAINE S.; ARVILOMMI H. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. **Pediatric Research** ,141-144, 1992.

KAREN, M.; YUKSEL, O.; AKYÜREK, N.; OFLUOĞLU, E.; CAĞLAR, K.; SAHIN, T.T.; PAŞAOĞLU, H.; MEMİŞ, L.; AKYÜREK, N.; BOSTANCI, H. Probiotic agent *Saccharomyces boulardii* reduces the incidence of lung injury in acute necrotizing pancreatitis induced rats. **Journal of Surgical Research**, 139–144, 2010.

KATO, I.; YOKOKURA, T.; MUTAI, M. Correlation between increase in Ia-bearing macrophages and induction of T cell dependent antitumor activity by *Lactobacillus casei* in mice. **Cancer Immunology Immunotherapy** , 215-221, 1988.

KATO, I., T.; MUTAI, M. YOKOKURA Augmentation of mouse natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* and its surface antigens. **Microbiology and Immunology**, 209-217, 1984.

KERMAUNER, A.; STRUKLEC, M. Effect of some probiotics on production parameters in growing rabbits **Krmiva** 163–173 (English translation),1998.

KÜHLE, A .A SKOVGAARDIJ, JASPERSEN, L. *In vitro* screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains, **International Journal of Food Microbiology**. 29– 39, 2005.

KYRIAKIS, S .C.; TSILOYIANNIS, V. K.; VLEMMAS, J.; SARRIS, K.; TSINAS, A. C.; ALEXOPOULOS, C.; JANSEGGERS, L. The effect of probiotic LSP 122 on the control of postweaning diarrhoea syndrome of piglets. **Research in Veterinary Science**, 223–228, 1999.

LEVINGS, M. K.; RONCAROLO, M. G. T-regulatory 1 cells: a novel subset of CD4 T cells with immunoregulatory properties. **Journal Allergy Clinical Immunology**, 109-112, 2000.

LIEVIN-LE MOAL, V.; SERVIN, A. L. The Front Line of Enteric Host Defense against Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms: Mucins, Antimicrobial Peptides, and Microbiota. **Clinical Microbiology Reviews**, 315-337, 2006.

LILLY, D. M.; STILLWEL, R.H. Probiotics. Growth promoting factors produced by micro-organisms. **Science**, 747–748, 1965.

LODEMANN, U.; LORENZ, B. M.; WEYRAUCH, K D.; MARTENS, H. Effects of *Bacillus cereus* var. *toyoi* as probiotic feed supplement on intestinal transport and barrier function in piglets, 87–106, 2008.

MAASSEN, C. B.; BOERSMA, W.J.; VAN HOLTEN-NEELEN, C.; CLAASSEN, E.; LAMAN, J.D. Growth phase of orally administered *Lactobacillus* strains differentially

affects IgG1/IgG2a ratio for soluble antigens: implications for vaccine development. **Vaccine**, 2751–2757, 2003.

MacDONALD, T. T.; MONTELEONE, G. Immunity, Inflammation and Allergy in the gut. **Science**, 1920-1925, 2005.

MACPHERSON, A. J.; UHR, T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. **Science**, 1662–1665, 2004.

MARCHAND, J.; VANDENPLAS, Y. Micro-organisms administered in the benefit of the host: myths and facts. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 1077-1088, 2000.

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*, **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, 2005a.

MARTINS F. S.; DALMASSO G.; ARANTES R. M. E.; DOYE A.; LEMICHEZ E.; LAGADEC P.; IMBERT V.; PEYRON J.; RAMPAL P.; NICOLI J. R.; CZERUCKA D. Interaction of *Saccharomyces boulardii* with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Protects Mice and Modifies T84 Cell Response to the, 2010. Disponível em <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0008925>.

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

MARTINS, F.S.; NARDI, R.M.D.; ARANTES, R.M.E.; ROSA, C.A.; NEVES, M.J. AND NICOLI, J.R. Screening of yeast as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice. **Journal of General and Applied Microbiology**. v. 51, 83-92, 2005b.

MARTINS, F.S.; VELOSO, L.C.; ARANTES, R.M.E.; NICOLI J.R. Effect of yeast probiotic formulation on viability, revival and protection against infection with *Salmonella enterica* ssp. enterica serovar Typhimurium in mice. **Letters in Applied Microbiology**. 738-744, 2009.

MATSUZAKI, T.; CHIN, J. Modulating immune responses with probiotic bacteria. **Immunology and Cell Biology**, 67-73, 2000.

MCFARLAND, L.V. Normal flora: diversity and functions. **Microbial Ecology in Health and Disease**, 193-207, 2000.

MCFARLAND, L.V.; SURAWICZ, C.M.; GREENBERG, R.N.; et al. Prevention of β -lactam associated diarrhoea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo., **American Journal of Gastroenterology** 439-448, 1995.

- McKENNA, K.; BEIGON, A. S.; BHARDWAJ, N. MINIREVIEW: Plasmacytoid dendritic cells: Linking Innate and Adaptive Immunity, **Journal of Virology**, 17-27, 2005.
- McNEELA, E. A.; MILLS, K. H. G. Manipulating the immune system: humoral versus cell-mediated immunity. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 43-54, 2001.
- MELLMAN, I. AND R. M. STEINMAN. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machine . **Cell**, 255-8, 2001
- MÉNARD, O.; BUTEL, M. J.; GABORIAU-ROUTHIAU, V.; WALIGORA-DUPRIET, A. J. Gnotobiotic mouse immune response induced by *Bifidobacterium* sp. strains isolated from infants. **Applied and Environmental Microbiology**, 660–666, 2008.
- MENDONÇA, M.; CONCEIÇÃO, F.R; CERQUEIRA, G.M; DELLAGOSTIN, O.A; MOREIRA, A.N ;ALEIXO, J.A.G; SILVA, W.P. Expressão da Proteína de membrana externa InlA de *Listeria monocytogenes* visando a produção de anticorpos monoclonais. **Revista Higiene Alimentar**, 209-210, 2007.
- MILETI, E.; MATTEOLI, G.; ILIEV, I.D.; RESCIGNO, M. Comparison of the immunomodulatory properties of three probiotic strains of Lactobacilli using complex culture systems: prediction for in vivo efficacy. **Plos One**,1-16, 2009.
- MOORTHY, G.; MURALI, M.R.; DEVARAJ, S.N. Lactobacilli facilitate maintenance of intestinal membrane integrity during *Shigella dysenteriae* 1 infection in rats. **Nutrition**, 350–358, 2009.
- MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual Review of Immunology**, 7:145-173, 1989.
- MYLLYLUOMA, E.; AHONEN, A. M.; KORPELA, R.; VAPAATALO, H.; KANKURI, E. Effects of Multispecies Probiotic Combination on *Helicobacter pylori* Infection In Vitro. **Clinical and vaccine immunology**, 1472–1482, 2008.
- NICOLI, J. R.; VIEIRA, L.Q. Prebióticos e Probióticos, **Ciência Hoje**, 34-38, 2000.
- OGAWA, T.; ASAI, Y.; TAMAI, R.; MAKIMURA, Y.; SAKAMOTO, H.; HASHIKAWA, S. and YASUDA, K. Natural killer cell activities of symbiotic *Lactobacillus casei* ssp. Casei in conjunction with dextran. **Clinical and Experimental Immunology**, 103–109, 2005.
- PARDO, S.; GALVAGNO, M. Á. ; CERRUTTI, P. Estudios de la viabilidad y la vitalidad frente al congelado de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*: efecto del preacondicionamiento fisiológico **Revista Iberoamericana de Micología**, 155-160. 2009.
- PARKER, R. B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Animal Nutrition Health**, 4-8, 1974.
- PASCHOAL ,V., NAVES, A., FONSECA, A. **Nutrição Clínica Funcional: Dos princípios à prática Clínica**. 1a Ed. revisada. São Paulo: VP editora; 2010.

PASCUAL, J. J.; MOYA, V.J.; MARTINEZ, E.; CALVO, M. A.; ADELANTADO, C.; JEMINEZ, G.; BLANCH, A.; CASTILLO, M.; Effects of dietary inclusion of toyocerin® (*Bacillus cereus* var. *toyoi*) on performance, health and faecal nitrogen excretion in growing rabbits. Proc. 9 th World Rabbit Congress, June 10-13, 2008, Verona-Italy, 2008,781-785.

PENNACCHIA, C.; BLAIOTTA, G.; PEPE, O.; VILLANI, F. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains from different food matrices and their preliminary selection for a potential use as probiotics. **Journal of Applied Microbiology**, 1919–1928, 2008.

PERDIGÓN, G.; ALVAREZ, S.; PESCE DE RUIZ HOLGADO A. A. Oral immunoadjuvante activity os *Lactobacillus casei* influence of dose the secretory immune response protective capacity in intestinal infections. **Journal Dairy Research**, 485-496, 1991.

PERDIGÓN, G.; VINTINI, E.; ALVAREZ, S.; MEDINA, M.; MEDICI, M. Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. **Journal Dairy Science**, 1108-1114, 1999.

PINHEIRO, V.; MOURAO, J. L.; JIMENEZ, G. Influence of Toyocerin (*Bacillus cereus* var. *toyoi*) on breeding performance of primiparous rabbit does. **World Rabbit Science** ,179–187. 2007.

POTHOULAKIS, C. Review article: anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, 826–833, 2009.

POTHOULAKIS, C.; KELLY, C. P.; JOSHI, M. A.; et al. *Saccharomyces boulardii* inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum. **Gastroenterology**, 1108-1115, 1993.

PRISCIANDARO, L.; GEIER, M.; BUTLER, R.; CUMMINS. A.; HOWARTH, G. Probiotics and their derivatives as treatments for inflammatory bowel disease **Inflammatory Bowel Disease**, 1906–1914, 2009.

QAMAR, A.; ABOUDOLA, S.; WARNY, M.; MICHETTI, P.; POTHOULAKIS, C.; LAMONT, J.T.; KELLY, C.P. *Saccharomyces boulardii* stimulates intestinal immunoglobulin A immune response to *Clostridium difficile* toxin A in mice. **Infection and Immunity**, 2762-2765, 2001.

RANDHAWA, K. M.; BHATIA, A.; CHUGH, C.; JASROTIA, K. The Synergistic Hypocholesterolaemic and Immunomodulatory effect of two probiotic strains *in vivo*. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, 312-315, 2011.

REITER, K.; EGGBRECHT, S.; DREWES, B.; RIESS, M.; WEYRAUCH, K. D. Effects of *Enterococcus faecium* and *Bacillus cereus* var. *toyoi* on the morphology of the intestinal mucous membrane in piglets. **Biologia**, 803–809, 2006.

RODRIGUES, A.C.; NARDI, R.M.; BAMBIRRA, E.A.; VIEIRA, E.C.; NICOLI, J.R. Effect of *Saccharomyces boulardii* against experimental oral infection with *Salmonella* Typhimurium and *Shigella flexneri* in conventional and gnotobiotic mice. **Journal Applied Bacteriology**, 251-256, 1996.

ROOS, T. B.; TABELÃO, V. C.; DÜMMER, L. A.; SCHWEGLERA, E.; GOULARTA, M. A.; MOURA S. V., CORRÊA M. N.; LEITE F. P .L.; GIL-TURNES, C. Effect of *Bacillus cereus* var. Toyoi and *Saccharomyces boulardii* on the immune response of sheep to vaccines. **Food and Agricultural Immunology**, 113-118, 2010.

ROOS, T.B. **Efeito imunomodulador de *Bacillus cereus* var. Toyoi e *Saccharomyces boulardii* em animais vacinados contra Herpesvírus Bovino tipo 5.** Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, p.90, 2009.

RUBINUM ANIMAL HEALTH:: ACESSO EM 23/11/2010. DISPONÍVEL EM <http://www.rubinum.es/home/index.php>

SAAD S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 1-16, 2006.

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C.; ISOLAURI, E. Clinical applications of probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, Amsterdam, 563-572, 1998.

SCHIERACK, P.; FILTER, M.; SCHAREK, L.; TOELKE, C.; TARAS, D.; TEDIN, K.; HAVERSON, K.; LÜBKE- BECKER, A.; WIELER, L.H.; Effects of *Bacillus cereus* var. toyoi on immune parameters of pregnant sows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 26–37. 2009.

SCHIERACK, P.; WIELER, L. H.; TARAS, D.; HERWIG, V.; TACHU, B.; HLINAK, A.; SCHMIDT, M. F. G.; SCHAREK, L. *Bacillus cereus* var. toyoi enhanced systemic immune response in piglets. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 1–11, 2007.

SLEATOR, R.D; WATSON, D.; HILL, C.; GAHAN, C.G.M. The interaction between *Listeria monocytogenes* and the host gastrointestinal tract. **Microbiology**, 2463-2475, 2009.

STAMATI, S.; ALEXOPOULOS, A.; SIOCHU, A.; SAOULIDIS, K.; KYRIAKIS, S.C.,. Probiosis in sows by administration of *Bacillus toyoi* spores during late pregnancy and lactation: effect on their health status/performance and on litter characteristics. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**. 33–40. 2006.

SWAMINATHAN, B.; DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. *Listeria monocytogenes* fundamentals and frontiers. **Food microbiology**, 383-409, 2001.

TANABE, S.; KINUTA, Y.; SAITO, Y. *Bifidobacterium infantis* suppresses proinflammatory interleukin-17 production in murine splenocytes and dextran sodium sulfate-induced intestinal inflammation. **International Journal of Molecular Medicine**, 181-185, 2008.

TANASIEKO, O. A.; CHEREMSHENKO, N. L.; TITOVA, G. P.; POTEBNYA, M.G.; GAVRILENKO, M. M.; NAGORNA, S.S.; KOVALENKO, N. K.; Elevation of the efficacy of antitumor vaccine prepared on the base of lectines from *B. subtilis* B-7025 upon its combined application with probiotics *in vivo*. **Experimental Oncology**, 336-338, 2005.

TIAGO F. C. P.; MARTINS F. S.; ROSA C. A.; NARD 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 Journal of Microbiology and Biotechnology**, 657-666, 2009.

TROIS, L.; CARDOSO, E. M.; MIURAC, E. Use of Probiotics in HIV-infected Children: A Randomized Double-blind Controlled Study. **Journal of Tropical Pediatrics**, 2007.

VANDENBERH, P.A. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. **FEMS Microbiology**, 221-238, 1993.

VANHE, L. M. E.; GOEMÉ, F.; NELIS, H. J.; COENYE, T.; Quality control of fifteen probiotic products containing *Saccharomyces boulardii*. **Journal of Applied Microbiology**, 2010.

VAZQUEZ-BOLAND, J. A. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology review** 584-640, 2001.

VILÀ, B.; FONTGIBELL, A.; BADIOLA, I.; ESTEVE-GARCIA, E.; JIMÉNEZ, G.; CASTILHO, M.; BRUFAU, J. Reduction of *Salmonella enterica* var. Enteritidis colonization and invasion by *Bacillus cereus* var. Toyoi inclusion in poultry feeds. **Poultry Science**, 975 - 979, 2009.

VINDEROLA, C.G.; MEDICI, M.; PERDIGÓN, G. Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. **Journal Applied Microbiology**, 230-243, 2004

WILLIAMS, L. D.; BURDOCK G.A.; JIMÉNEZ, G.; CASTILLO, M. Literature review on the safety of Toyocerin, a non-toxicogenic and non-pathogenic *Bacillus cereus* var. toyoi preparation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 236 - 246; 2009.

YASUI, H. SHIDA K, MATSUZAKIT, YOKOKURA T. Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, 383-389, 1999.

YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: Microbiological factors related to its potencial as a mosquitolarvicide. **Advances in Biotechnology Processes**, 315-343, 1984.

ZBINDEN, R.; GÖNCZI, E.E.; ALTWEGG, M. Inhibition of *Saccharomyces boulardii* (nom. inval.) on cell invasion of *Salmonella* Typhimurium and *Yersinia enterocolitica*. **Microbial Ecology in Health and Diseases**. 158-162, 1999.