

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos



DISSERTAÇÃO

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS PROBIÓTICOS  
*Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. Toyoi SOBRE A  
PROTEÇÃO CONTRA DESAFIO COM *Salmonella* Typhimurium  
EM CAMUNDONGOS**

**Janaína Martins Gonçalves Cascaes Silva**

Pelotas, 2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S586e Silva, Janaína Martins Gonçalves Cascaes  
 Efeito da associação entre os probióticos *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. Toyoi sobre a proteção contra desafio com *Salmonella* Typhimurium em camundongos / Janaína Martins Gonçalves Cascaes Silva; Ângela Nunes Moreira, orientador; Fabrício Rochedo Conceição e Rodrigo Correa França, coorientadores. - Pelotas, 2014.  
 55 f.: il.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Sinergismos. 2. Translocação. 3. Colonização intestinal.  
 4. Lesão de órgãos. 5. Histopatologia. I. Moreira, Ângela Nunes, orient.  
 II. Conceição, Fabrício Rochedo, coorient. III. França, Rodrigo Correa, coorient. IV. Título.

CDD: 636.0852

**Janaína Martins Gonçalves Cascaes Silva**

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS PROBIÓTICOS  
*Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. Toyoi SOBRE A  
PROTEÇÃO CONTRA DESAFIO COM *Salmonella* Typhimurium  
EM CAMUNDONGOS**

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ângela Nunes Moreira  
Co-orientadores: Prof. Dr. Fabricio Rochedo Conceição  
Msc. Rodrigo Correa França

Pelotas, 2013

**Banca examinadora:**

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ângela Nunes Moreira – UFPel

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

Prof. Dr. Eliezer Ávila Gandra – UFPel

Dedico este trabalho:

Ao meu filho Bernardo Gonçalves Cascaes  
por fazer minha vida mais feliz e me dar forças para alcançar mais essa vitória.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me dar a oportunidade de aprender e dar forças nas horas mais difíceis;

A minha família, pelo incentivo ao longo dessa caminhada vitoriosa, a qual sem eles seria impossível de ser concluída;

Aos meus pais Edmar Gonçalves e Sulani Gonçalves pelo incentivo a cada conquista e pelo amor e carinho que me permitiram esta concretização;

Ao meu Marido José Luis Cascaes pela paciência, cumplicidade e apoio em todos os momentos;

A minha querida irmã Edlani, pelo apoio, amizade, incentivo e cumplicidade em todos os momentos;

Ao meu co-orientador Rodrigo França pelas grandes ajudas e orientações;

A minha querida orientadora Professora Ângela Nunes Moreira pela calma, dedicação e orientação que foi de suma importância para realização deste trabalho;

À todos os meus colegas, professores e funcionários do PPGNA pela companhia, amizade e troca de experiências. Especialmente as colegas Denise Pacheco e Francine Villela Maciel;

Aos colegas Laboratório de Imunologia Aplicada e de Microbiologia de Alimentos e demais laboratórios do CDTec/UFPel principalmente do laboratório 4;

Agradeço ao Capes pelo apoio financeiro;

E por fim, agradeço a todos aqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

CASCAES, Janaína Gonçalves. **EFEITO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS PROBIÓTICOS *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. Toyoi SOBRE A PROTEÇÃO CONTRA DESAFIO COM *Salmonella Typhimurium* EM CAMUNDONGOS.** 2013.55p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da associação entre os probióticos *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. Toyoi sobre a proteção e a sobrevivência de camundongos contra a colonização intestinal, translocação e lesões intestinais após desafio com *S. Typhimurium*. Os animais foram alimentados 20 dias com rações contendo *S. boulardii* e *B. Toyoi*, administrados individualmente ou em associação, nas concentrações de 8 e 7 log UFC. g<sup>-1</sup> de ração, respectivamente. Animais do grupo controle receberam ração comercial sem probióticos. No 10º dia após o início da administração dos probióticos, os animais foram desafiados por gavagem com 5,17 log UFC de *S. Typhimurium* (DL50). Proteção contra colonização de *S. Typhimurium* foi avaliada após eutanásia dos camundongos que sobreviveram após 10 dias, através de contagens de células viáveis do patógeno presentes nas fezes e intestino delgado. Para a avaliação da ocorrência de translocação, 2/3 dos órgãos (fígado e baço) foram macerados, ressuspensos em 1 mL de solução salina a 0,9% estéril e contagens de células viáveis do patógeno, em UFC.ml<sup>-1</sup>, foram realizadas em placas de XLD. Para a avaliação da ocorrência de lesão, 1/3 do intestino delgado foi avaliado através de histopatologia. O experimento foi repetido duas vezes. *S. boulardii* não protegeu os camundongos da morte induzida por *S. Typhimurium* e da ocorrência de lesões intestinais. Não houve sinergismo entre os dois micro-organismos avaliados. Entretanto, *S. boulardii*, assim como *B. Toyoi* reduziram a eliminação de *S. Typhimurium* pelas fezes e preveniram a translocação do patógeno para o fígado dos camundongos que sobreviveram ao desafio. *B. Toyoi* protegeu os animais da morte induzida pela infecção com *S. Typhimurium* e da ocorrência de lesões e o efeito obtido pela associação, ocorreu, provavelmente, devido somente ao efeito de *B. Toyoi*. Assim, novos estudos serão realizados para avaliar os efeitos da associação destes probióticos frente ao desafio com *S. Typhimurium* e para avaliar as causas do efeito antagônico apresentado entre eles sobre a persistência deste patógeno nas fezes dos animais e sobre a translocação para o fígado.

**Palavras Chave:** Sinergismo. Translocação. Colonização intestinal. Lesão de órgãos. Histopatologia. DL50.

## ABSTRACT

CASCAES, Janaína Gonçalves. **EFEITO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS PROBIÓTICOS *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. Toyoi SOBRE A PROTEÇÃO CONTRA DESAFIO COM *Salmonella Typhimurium* EM CAMUNDONGOS.** 2013.55p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

This study aimed to evaluate the effect of the association between the *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. Toyoi probiotics on the survival and protection of mice against the occurrence of intestinal colonization, translocation and intestinal lesions after the challenge with *S. Typhimurium*. The animals were fed for 20 days with diet containing *S. boulardii* and *B. Toyoi*, administered individually or in association, in the food concentrations of 8 and 7 log CFU. g<sup>-1</sup>, respectively. The control group animals were fed with commercial food without probiotics. On the 10th day after the start of administration of probiotics, the animals were challenged by the gavages with 5.17 log CFU of *S. Typhimurium* (LD50). Protection against colonization of *S. Typhimurium* was evaluated after euthanasia of the mice, which survived after 10 days, through the viable cell counts of the pathogen presented in the small intestine and stool. To evaluate the incidence of translocation, 2/3 of the organs (liver and spleen) were macerated, and resuspended in 1 ml of saline solution in 0.9% sterile, and viable cell counts of the pathogen were performed. To evaluate the occurrence of injury, 1/3 of the small intestine was evaluated through histopathology. The experiment was repeated twice. *S. boulardii* did not protect the mice from induced death by *S. Typhimurium* and the occurrence of intestinal lesions. For this reason, it was not possible to assess the occurrence of synergism between the two micro-organisms evaluated. However, *S. boulardii* as well as *B. Toyoi* reduced the elimination of *S. Typhimurium* through the stool and prevented the translocation of the pathogen to the liver of mice that survived the challenge. *B. Toyoi* protected animals from induced death through the infection with *S. Typhimurium* and through the occurrence of injuries, and the effect obtained by the association was, probably, due only by the effect of *B. Toyoi*. Thus, further studies will be conducted to evaluate the effects of the combination of these probiotics facing the challenge with *S. Typhimurium* and to assess the causes of the antagonistic effect presented among them on the persistence of this pathogen in the stool of animals and on the translocation to the liver.

Keywords: Synergism. Translocation. Intestinal colonization. Organ lesion. Histopathology. LD50.



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Sobrevivências (%) de camundongos desafiados com 5,17 log UFC de *S. Typhimurium* no primeiro (A) e segundo (B) desafios. Os animais foram alimentados 20 dias (10 dias antes e 10 dias após o desafio) com rações contendo *S. boulardii* e *B. Toyoi*, administrados individualmente ou em associação, nas concentrações 8 e 7 log UFC.g<sup>-1</sup>, respectivamente. Animais do grupo controle receberam ração comercial sem probióticos.....23

**Figura 2.** Percentuais de camundongos que sobreviveram ao desafio com 5,17 log UFC de *S. Typhimurium* e que apresentaram lesões leves (A) e moderadas (B) no intestino. Os animais foram alimentados por 20 dias (10 dias antes e 10 dias após o desafio) com rações contendo *S. boulardii* e *B. Toyoi*, administrados individualmente ou em associação, nas concentrações 8 e 7 log UFC.g<sup>-1</sup> de ração, respectivamente. Animais do grupo controle receberam ração comercial sem probióticos.....24

**Figura 3.** Nível populacional (UFC.g<sup>-1</sup>) do patógeno nas fezes de camundongos que sobreviveram ao desafio com 5,17 log UFC de *S. Typhimurium*. Os animais foram alimentados 20 dias (10 dias antes e 10 dias após o desafio) com rações contendo *S. boulardii* e *B. Toyoi*, administrados individualmente ou em associação, nas concentrações 8 e 7 log UFC.g<sup>-1</sup> de ração, respectivamente. Animais do grupo controle receberam ração comercial sem probióticos. ....26

**Figura 4.** Nível populacional (UFC. mL<sup>-1</sup>) do patógeno no fígado (A) e baço (B) de camundongos que sobreviveram ao desafio com 5,17 log UFC de *S. Typhimurium*. Os animais foram alimentados por 20 dias (10 dias antes e 10 dias após o desafio) com rações contendo *S. boulardii* e *B. Toyoi*, administrados individualmente ou em associação, nas concentrações de 8 e 7 log UFC. g<sup>-1</sup> de ração, respectivamente. Animais do grupo controle receberam ração comercial sem probióticos.....27

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL- Microlitros

C- Celsius

CDTec- Centro de Desenvolvimento Tecnológico

COBEA- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DTA- Doenças transmitidas por alimentos

FAO- Food and Agriculture Organization/World Health Organization

h- Hora

IFN- γ - Interferon Gama

IL- Interleucina

InlA- internalina A

LB- Luria Bertaine

log- Logaritmo

mg- Miligramas

mL- Mililitros

NaCl- Cloreto de sódio

OMS- Organização Mundial de Saúde

RPM - Rotações por minuto

TGI- Trato gastrointestinal

UFC- Unidade Formadora de Colônia

UFPel- Universidade Federal de Pelotas

WHO-World Health Organization

YPD- Yeast Peptone Dextrose

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	12
2.	REVISÃO DE LITERATURA .....	14
3.	OBJETIVOS .....	18
3.1.	Objetivo geral.....	18
3.2.	Objetivos específicos.....	18
4.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	19
4.1.	Micro-organismos e condições de cultivo.....	19
4.1.1	<i>Bacillus cereus</i> Toyoi.....	19
4.1.2	<i>Saccharomyces boulardii</i> .....	19
4.1.3	<i>Salmonella</i> Typhimurim.....	20
4.2.	Preparo das rações contendo os probióticos.....	20
4.3.	Animais .....	20
4.4.	Efeito da administração associada dos probióticos <i>S.boulardii</i> e <i>B.Toyoi</i> sobre a sobrevivência e a proteção de camundongos contra a ocorrência de colonização intestinal, translocação e lesões intestinais após desafio com <i>S. Typhimurium</i> .....	19
4.5.	Análise histopatológica .....	22
4.6.	Processamento e análise dos dados .....	22
4.7.	Aspectos éticos .....	22
5.	RESULTADOS .....	23
5.1	Efeito da administração associada dos probióticos <i>S. boulardii</i> e <i>B. Toyoi</i> sobre a sobrevivência de camundongos desafiados com <i>S. Typhimurium</i> .....	23
5.2	Efeito da administração associada dos probióticos <i>S. boulardii</i> e <i>B. Toyoi</i> sobre a proteção de camundongos contra ocorrência de lesões intestinais após desafio com <i>S. Typhimurium</i> .....	25
5.3	Efeito da administração associada dos probióticos <i>S. boulardii</i> e <i>B. Toyoi</i> sobre a proteção de camundongos contra a colonização intestinal após desafio com <i>S. Typhimurium</i> .....	26
5.4	Efeito da administração associada dos probióticos <i>S.boulardii</i> e <i>B.Toyoi</i> sobre a proteção contra translocação de <i>S.Typhimurium</i> para o fígado e baço de camundongos após o desafio.....	25
6.	DISCUSSÃO.....	27
7.	CONCLUSÕES.....	41
8.	REFERÊNCIAS .....	42

## 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 transmissores de resistência a antibióticos (SAAD, 2006).

As doenças transmitidas por alimentos (DTA), as quais atingem milhões de pessoas no mundo inteiro, são causadas por micro-organismos ou toxinas, após a ingestão de água ou alimentos contaminados (NYACHUBA, 2010; WELKER et al., 2010). No Brasil, entre os anos de 1999 e 2009, foram notificados 6.349 surtos de DTA, sendo o Rio Grande do Sul responsável por 30% destas notificações. Dentre os agentes etiológicos mais frequentes, bactérias do gênero *Samonella* foram responsáveis por 42,5% dos casos notificados (BRASIL, 2009).

O efeito protetor direto ou indireto contra enteropatógenos é um dos efeitos benéficos que os micro-organismos probióticos podem apresentar. 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).

Leveduras e bactérias são os micro-organismos mais comumente utilizados como probióticos. Entretanto, eles apresentam diferentes mecanismos de ação, metabolismo e resistência a antibióticos. Uma característica importante das leveduras, em geral, é a alta produtividade a partir de substratos de baixo custo. Dentre as espécies de leveduras do gênero *Saccharomyces*, único gênero de leveduras utilizado atualmente como probiótico, a de maior destaque é *Saccharomyces boulardii*, a qual mantém suas

propriedades mesmo quando associada a antimicrobianos. 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 (MCFARLAND et al., 1995; BLEICHNER et al., 1997; MARCHAND & VANDENPLAS, 2000; GUSLANDI et al., 2000; ELMER & MCFARLAND, 2001; GUSLANDI et al., 2003), tais como a causada por *Salmonella Typhimurium* (RODRIGUES et al., 1996; ZBINDEN et al., 1999; MARTINS et al., 2010), aumentar significativamente as concentrações de IgA específicas (QAMAR et al., 2001) e estimular a resposta imune humoral de camundongos a antígenos específicos (COPPOLA et al., 2004).

Os gêneros de bactérias mais utilizados como probióticos são *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Bifidobacterium*. Entretanto, bactérias de outros gêneros, como *Bacillus cereus* var. Toyoi, uma estirpe isolada do solo que não produz enterotoxinas diarreicas ou eméticas (WILLIAMS et al., 2009), podem ser utilizados. 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 (COPPOLA & GIL-TURNES, 2004). Estudos têm demonstrado que esse probiótico é capaz de promover ganho de peso e controle de diarreias em animais (COPPOLA & TURNES, 2004), melhorar a conversão alimentar (WILLIAMS et al., 2009) e reduzir a prevalência de salmonelas em aves (VILÀ et al., 2009).

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 (proporcionar um efeito sinérgico) vem sendo estudada e tem apresentado resultados positivos (TANASIEKO et al., 2005; MOORTHY et al., 2009). Os probióticos *S. boulardii* e *B. Toyoi* agiram em sinergismo, potencializando a resposta imune humoral específica contra o antígeno recombinante internalina A (rInlA) de *Listeria monocytogenes* (dados não publicados). No entanto, o efeito da associação entre *S. boulardii* e *B. Toyoi* sobre a proteção contra a colonização e translocação de *S. Typhimurium* ainda não foi avaliado.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Os relatos dos efeitos benéficos de bactérias probióticas na alimentação datam desde a versão persa do Antigo Testamento (Gênesis 18:8), que relata que “Abraão atribuiu sua longevidade ao consumo de leite azedo”. Já em 76 a.C, Plínio um historiador romano, recomendou o uso de leite fermentado para o tratamento de gastroenterites (TEITELBAUM; WALKER, 2002). Durante as últimas décadas, microbiologistas, imunologistas e gastroenterologistas vem estudando ativamente o mecanismo pelo qual alguns micro-organismos melhoram a defesa da mucosa do trato gastrointestinal e/ou exercem efeitos benéficos com o propósito de beneficiar a saúde do hospedeiro, prevenindo e tratando doenças. Estes micro-organismos receberam o nome genérico de probióticos, que deriva do grego e significa “a favor da vida”, e vêm sendo propostos como bioterapêuticos para prevenção e tratamento de um grande número de desordens gastrointestinais (SONG et al., 2011). Fuller, em 1989, definiu probiótico como “um suplemento microbiano vivo que afeta benéficamente o animal hospedeiro graças à melhoria no balanço microbiano intestinal”. Entretanto, probióticos apresentam aplicações conhecidas em outros ecossistemas (BENGMARK, 1998; REID, 2000). Por isso, em 2001, a Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization (FAO-WHO) definiu probióticos como sendo “micro-organismos vivos que ao serem administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro”.

Na França, em meados de 1920, o microbiologista Henri Boulard descobriu, durante uma epidemia de cólera, que as frutas utilizadas em infusão no tratamento dessa doença estavam cobertas de leveduras as quais eram responsáveis pela eficácia do tratamento. Após a descoberta, a levedura passou a ser chamada de *Saccharomyces boulardii*. A levedura *S. boulardii* é um micro-organismo não patogênico, termotolerante e de uso muito difundido na medicina humana (MCFARLAND; BERNASCONI, 1993). Em 1960, iniciou-se a comercialização desta levedura liofilizada pelo Laboratório Biocodex” (Paris, França). Assim, seu uso como medicamento para combate às diarreias foi difundido em toda a Europa. Atualmente a levedura é amplamente comercializada em quase todos os países (MCFARLAND; BERNASCONI, 1993).

Diversos estudos vêm demonstrando os efeitos da utilização de *S. boulardii* em diferentes patologias. Um estudo realizado por Thomas et al. (2011) forneceu evidências de que a utilização de *S. boulardii* em pacientes com doença de Crohn e colite ulcerativa é capaz de controlar a inflamação e promover a restituição celular epitelial de forma relevante. Riaz et al. (2011) avaliaram a administração de 250 mg da levedura durante episódios de diarreia aguda em crianças com idade entre 3 e 9 meses e evidenciaram que *S. boulardii* pode ter um papel terapêutico na gestão da diarreia aguda na infância, em virtude da redução do tempo da doença.

Com relação à utilização de leveduras como probióticos em animais, Rodrigues et al. (1996) constataram que camundongos gnotobióticos suplementados com *S. boulardii* apresentaram diminuição da quantidade de *E. coli* no trato gastrintestinal e modulação da resposta imune, com aumento significativo da expressão de IgA e do número de células de Küpffer. Martins et al. (2010), observaram que essa levedura desencadeia efeitos moduladores sobre a inflamação e via de transdução de sinal em células T84 de ratos infectados com *S. Typhimurium*. Canonici et al. (2011) observaram que a levedura tem a capacidade de melhorar a atividade dos enterócitos, secretando fatores que contribuem para a restituição celular, enquanto que Mehmet et al. (2006) observaram que *S. boulardii* é eficaz no controle da translocação e melhora na função da barreira intestinal.

Martins et al. (2009) compararam o efeito de cinco formulações de leveduras probióticas (quatro de *S. boulardii* liofilizadas e uma de *S. cerevisiae* em suspensão aquosa) em relação a proteção contra infecção experimental de camundongos com *S. Typhimurium* e concluíram que a forma em que o probiótico é conservado (liofilizado ou em suspensão), além de influenciar a sua recuperação e sobrevivência *in vivo*, influencia sua propriedade protetora em desafios contra patógenos.

*B. Toyoi*, uma variedade de *Bacillus cereus* isolada do solo (WILLIAMS et al., 2009), não patogênica, não toxigênica e não resistente a antimicrobianos, vêm sendo utilizada com fins probióticos. Esporos viáveis deste *Bacillus*, sob a forma comercial Toyocerin®, são utilizados em animais como suínos, aves, bovinos e coelhos. Têm-se demonstrado seguros e acarretado melhorias na função de estabilizar a microbiota intestinal, melhorar o desempenho e permitir uma melhor digestão dos nutrientes (RUBINUM ANIMAL HEALTH, 2010). 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). Para avaliar a segurança da administração da

forma comercial Toyocerin<sup>®</sup> em humanos, foi realizado um ensaio clínico onde, durante oito dias, o produto foi administrando em uma concentração de  $6 \times 10^{10}$  esporos viáveis da bactéria ao dia, e não foram observados efeitos adversos em adultos saudáveis do sexo masculino (ISHIOKA, 1979).

Diversos outros 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), promoveu o ganho de peso, o controle de diarreias e uma redução da mortalidade perinatal em suínos (ZANI et al., 1998). Outros estudos também verificaram que a ingestão de *B. Toyoi* melhora o ganho de peso e a conversão alimentar e reduz a incidência de fezes líquidas e diarreia pós-desmame em suínos (KYRIAKIS et al, 1999; 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).

Com o aumento dos estudos em relação aos diferentes tipos e mecanismos de ação dos probióticos, surgiu o interesse de avaliar o efeito sinérgico de diferentes cepas com potencial probiótico. Alguns estudos que avaliaram a associação entre micro-organismos probióticos mostraram benefícios para o hospedeiro, como é o caso do estudo realizado por Moorthy et al. (2009), onde estudaram o sinergismo entre *Lactobacillus rhamnosus* e *L. acidophilus*. Eles 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 linfócitos 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. Daudelin et al. (2011) observaram que a suplementação de suínos com a combinação dos probióticos *Pediococcus acidilactici* e *S. boulardii* reduziu significativamente a adesão de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) à mucosa intestinal.



*Salmonella* é um agente infeccioso intracelular facultativo, na forma de bacilo, anaeróbio facultativo e Gram-negativo. Esta bactéria, agente etiológico de doenças coletivamente chamadas de salmoneloses, pertence à família *Enterobacteriaceae* e fermenta a glicose, reduz nitrato a nitrito e possui flagelos peritríquios (exceção *S. Pullorum* e *Gallinarum*). *Salmonella* foi isolada em 1885 por Daniel Salmon, um veterinário americano, e desde então, dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2004, listam 2501 diferentes sorotipos (WHO, 2011).

Os mecanismos de enteropatogenicidade das salmoneloses são bastante complexos. Sabe-se que a bactéria possui diversos fatores de virulência, como adesinas, exoenzimas, enterotoxinas e endototoxinas, além da capacidade de invadir a mucosa gastrointestinal, multiplicar-se, disseminar-se e sobreviver nas células do sistema retículo-endotelial (CARTER; COLLINS, 1974).

Diversos estudos têm demonstrado que probióticos como *S. boulardii*, *S. cerevisiae*, *E. coli* EMO, *B. longum*, *B. bifidum*, *E. faecium* e *L. acidophilus* (RODRIGUES et al., 1996; SILVA et al., 1999; LIMA FILHO et al., 2000; MAIA et al., 2001; MOURA et al., 2001; SILVA et al., 2002; MARTINS et al., 2005) conferem um efeito protetor aos animais desafiados com *S. Typhimurium* e que, na maioria desses casos, o efeito benéfico é devido, pelo menos em parte, a um aumento da resposta imune do hospedeiro (NEUMANN et al., 1998; RODRIGUES, 2000; GILL et al., 2001; LIMA FILHO et al., 2004; SILVA et al., 2004; MARTINS, 2010).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Investigar o efeito da associação entre os probióticos *S. boulardii* e *B. Toyoi* sobre a proteção contra desafio com *S. Typhimurium*, utilizando como modelo animal camundongos.

#### **3.2. Objetivos específicos**

Avaliar o efeito da associação entre os probióticos *S. boulardii* e *B. Toyoi* sobre a:

- Sobrevivência de camundongos após desafio com *S. Typhimurium*;
- Inibição ou redução da colonização intestinal por *S. Typhimurium*;
- Inibição ou redução da translocação de *S. Typhimurium* do intestino para outros órgãos e tecidos de camundongos infectados;
- Inibição ou redução da ocorrência de lesões intestinais após desafio com *S. Typhimurium*.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Micro-organismos e condições de cultivo**

Foram utilizados micro-organismos provenientes do banco do Núcleo de Biotecnologia, CDTec-UFPel. Para utilização nos experimentos, os probióticos foram cultivados em fermentador de bancada de acordo com as recomendações de Roos (2009).

#### **4.1.1 *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 h 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 h. 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 48 h, centrifugado a 5000 x g por 20 min à 4 °C e ressuspenso 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.

A concentração de *B. Toyoi*, em UFC.mL<sup>-1</sup>, foi determinada através de diluição decimal do cultivo em solução salina (NaCl 0,9%) estéril e contagem em placas contendo ágar base suplementado com 8% de sangue ovino, sendo as mesmas incubadas por 24 h à 37°C.

#### **4.1.2 *S. boulardii***

A levedura liofilizada foi ressuspensa em solução salina estéril, repicada em placas contendo Agar 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 48 h,

centrifugado a 4000 x g por 20 min à 4 °C e ressuspenso em solução salina 0,9% estéril em um volume de 30 mL e armazenado a 4° C.

A concentração de *S. boulardii*, em UFC.mL<sup>-1</sup>, foi determinada através de diluição decimal do cultivo em solução salina (NaCl 0,9%) estéril e contagem em placas contendo Agar YPD após incubação das mesmas por 24 h à 28°C.

#### 4.1.3 *S. Typhimurim*

A cepa *S. Typhimurium* 8429 foi utilizada no experimento de desafio. *S. Typhimurium* armazenada em glicerol a 20% a -80 °C foi cultivada em caldo Luria-Bertani (LB) e o cultivo incubado a 37 °C, sob agitação de 200 rpm, por 18 h. Após este período, a pureza do cultivo foi avaliada através de esfregaço utilizando a coloração de Gram e de semeadura por esgotamento em placas contendo Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD). Um mililitro do cultivo foi transferido para 19 mL de caldo LB e incubado sob as mesmas condições iniciais, por 24 h. O cultivo foi centrifugado por 10 min a 1500 g e os *pellets* foram lavados três vezes em salina tamponada fosfatada (PBS) estéril, pH 7,4, e suspensos em 1 mL de solução salina (NaCl 0,9%) estéril. A DO da solução foi ajustada a 1,0 em espectrofotômetro a 600 nm, e então diluída em série decimal em solução salina a 0,9% estéril, e o número de células viáveis presentes em cada diluição (UFC.mL<sup>-1</sup>) foi determinado através de contagem em placas (FRANÇA, 2010).

#### 4.2. Preparo das rações contendo os probióticos

Foi preparada uma formulação contendo amido de milho a 8% e ração comercial triturada isenta de quimioterápicos. A esta foram adicionados os probióticos *S. boulardii* (10<sup>8</sup> UFC.g<sup>-1</sup>) e/ou esporos viáveis de *B. Toyoi* (10<sup>7</sup> UFC.g<sup>-1</sup>). Essas formulações foram peletizadas e mantidas em estufa com circulação de ar forçada, permanecendo por 18 h à temperatura de 40°C. Após, a ração foi armazenada sob refrigeração até a sua administração (ROOS, 2009). A estimativa da concentração dos probióticos na ração foi realizada a cada 15 dias para assegurar a manutenção da concentração dos mesmos na ração fornecida aos animais (ROOS, 2009).

#### 4.3. Animais

No experimento de desafio foram utilizados camundongos BALB/c machos, com 6 a 7 semanas de idade e peso variando entre 15-20 g. Os animais foram

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 e foram alimentados com ração PET específica para roedores, sem antimicrobianos, contendo ou não os probióticos *S. boulardii* e/ou esporos viáveis de *B. Toyoi*. Ração e água foram fornecidas *ad libitum*.

Os camundongos que sobreviveram ao desafio sofreram eutanásia de acordo com as normas internacionais e em consonância com os princípios éticos de experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Após a remoção asséptica do intestino, fígado e baço, os camundongos foram congelados e entregues ao Biotério para posterior incineração.

#### **4.4. Efeito da administração associada dos probióticos *S. boulardii* e *B. Toyoi* sobre a sobrevivência e a proteção de camundongos contra a ocorrência de colonização intestinal, translocação e lesões intestinais após desafio com *S. Typhimurium***

Para avaliar a capacidade de *S. boulardii* e *B. Toyoi*, administrados associadamente a camundongos via oral, induzirem proteção e inibição ou redução da colonização intestinal, translocação de *S. Typhimurium* para outros órgãos e tecidos e da ocorrência de lesões intestinais, um experimento de desafio foi realizado.

A dose de *S. Typhimurium* necessária para provocar a morte de pelo menos 50% da população de camundongos (DL50), que foi utilizada neste estudo (5,17 log UFC), foi a descrita por FRANÇA et al. (2010).

Foram utilizados 40 camundongos, os quais foram divididos em 4 grupos compostos de 10 animais cada, distribuídos conforme a seguir:

Grupo 1 (G1): receberam os dois probióticos (*S. boulardii* e *B. Toyoi*) adicionados à ração, nas concentrações de 8 e 7 log UFC.g<sup>-1</sup>, respectivamente;

Grupo 2 (G2): receberam somente *S. boulardii* (8 log UFC.g<sup>-1</sup>) adicionado à ração;

Grupo 3 (G3): receberam somente esporos de *B. Toyoi* (7 log UFC.g<sup>-1</sup>) adicionados à ração;

Grupo 4 (G4): receberam ração isenta dos probióticos.

Os camundongos tiveram dez dias para adaptarem-se à ração contendo o(s) probiótico(s) ou não, e as receberam durante todo o experimento. No 10º dia após o início da administração das rações, os animais foram desafiados por gavagem com a

DL50 de *S. Typhimurium* (5,17 log UFC) e monitorados diariamente quanto à sintomatologia e a ocorrência de morte.

A proteção contra colonização intestinal de *S. Typhimurium* foi avaliada após eutanásia dos camundongos sobreviventes após 10 dias do desafio, através de contagens de células viáveis do patógeno presentes nas fezes e intestino delgado.

Os órgãos como baço, fígado e intestino foram coletados em condições assépticas. Para a avaliação da ocorrência de translocação, 2/3 do fígado e do baço foram macerados, suspensos em 1 mL de solução salina a 0,9% estéril e diluídos em série decimal em solução salina. Após, 100 µL das diluições foram adicionadas a placas contendo Agar XLD e as placas foram incubadas a 37° C por 24 h para determinação da contagem em UFC.mL<sup>-1</sup>.

Para a avaliação da ocorrência de lesão, 1/3 do fígado e do baço e o intestino delgado foram avaliados através de histopatologia.

#### **4.5. Análise histopatológica**

As amostras do baço, fígado e intestino coletadas em condições assépticas foram submersas em formol tamponado 10%. Os fragmentos foram submetidos à técnica histológica de rotina e coloração com método usual de hematoxilina-eosina. As lâminas com cortes histológicos foram avaliadas no Departamento de Histologia da UFPel quanto à presença ou ausência de lesão.

#### **4.6. Processamento e análise dos dados**

Análise de variância e teste de Tukey foram utilizados para determinar diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Statistix 7.

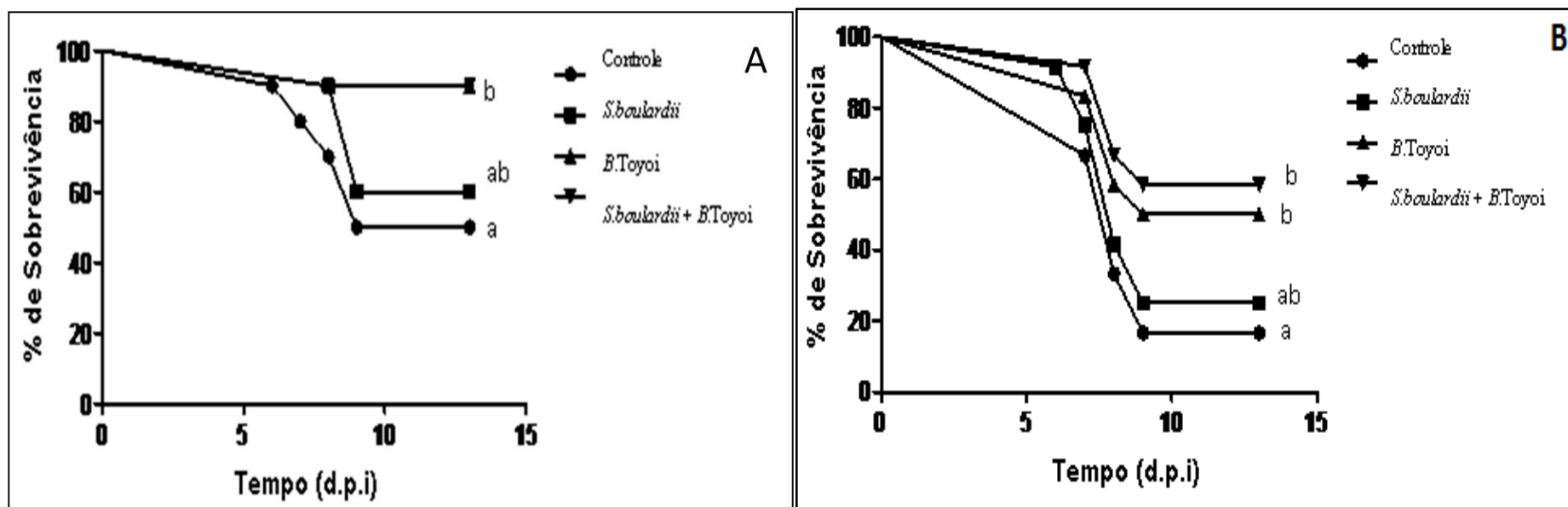
#### **4.7. Aspectos éticos**

Este projeto de pesquisa é parte do projeto “Sinergismo dos probióticos *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* Toyoi sobre a imunomodulação e a proteção contra a colonização e translocação da *S. Typhimurium* em camundongos”, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel sob o número de registro 9289.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Efeito da administração associada dos probióticos *S. boulardii* e *B. Toyoi* sobre a sobrevivência de camundongos desafiados com *S. Typhimurium*

O primeiro (Figura 1A) e o segundo (Figura 1B) desafios com *S. Typhimurium* apresentaram resultados semelhantes, mas com diferenças nos valores das taxas de sobrevivência. As taxas de sobrevivência dos animais alimentados com a ração contendo o probiótico *B. Toyoi*, administrado individualmente ou em associação com *S. boulardii* (ambas de 90% no primeiro desafio e de 50 e 58,4%, respectivamente, no segundo desafio) foram significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) às dos animais do grupo controle (50% no primeiro desafio e 16,7% no segundo), e não apresentaram diferença significativa quando comparadas com as do grupo alimentado somente com *S. boulardii* (60% no primeiro desafio e 25% no segundo). Também não houve diferença nas taxas de sobrevivência entre os animais que receberam *S. boulardii* individualmente e os animais do grupo controle, em ambos os desafios.



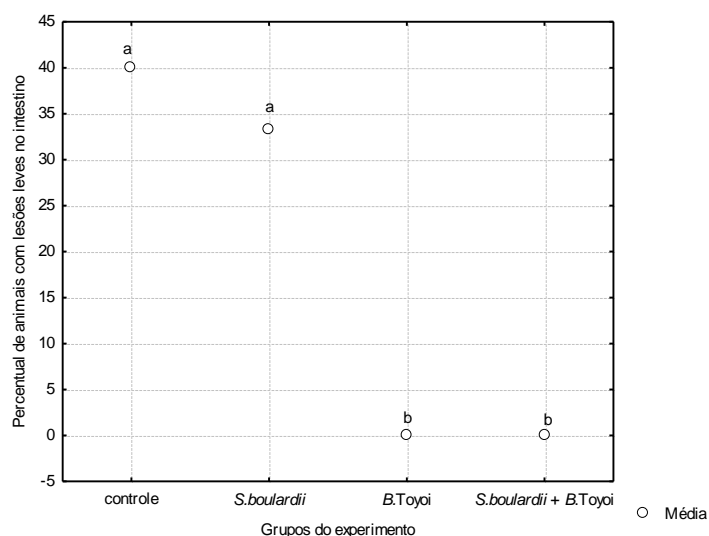
**Figuras 1.** Médias dos percentuais de camundongos desafiados com 5,17 log UFC de *S. Typhimurium* que sobreviveram ao primeiro (A) e segundo (B) desafios. Os animais foram alimentados 20 dias (a partir de 10 dias antes do desafio) com rações contendo *S. boulardii* e *B. Toyoi*, administrados individualmente ou em associação, nas concentrações 8 e 7 log UFC.g<sup>-1</sup>, respectivamente. Animais do grupo controle receberam ração comercial sem probióticos. Letras diferentes representam diferenças significativamente estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre as taxas de sobrevivência (d.p.i: dias após infecção).

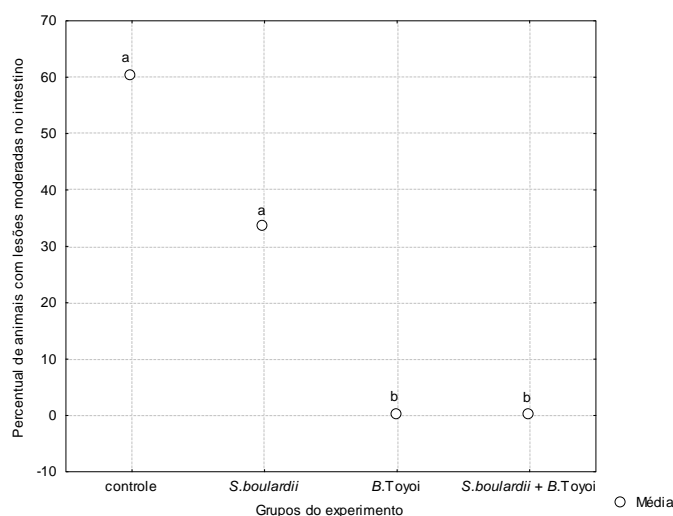


## 5.2 Efeito da administração associada dos probióticos *S. boulardii* e *B. Toyoi* sobre a proteção de camundongos contra ocorrência de lesões intestinais após desafio com *S. Typhimurium*

Os resultados das análises das seções histopatológicas do intestino dos animais que sobreviveram ao primeiro desafio corroboram com os resultados relativos à sobrevivência, pois camundongos alimentados com *B. Toyoi* administrado individualmente ou em associação com *S. boulardii* não apresentaram lesões histológicas, 10 dias após o desafio. Somente os animais alimentados com a levedura, bem como os animais do grupo controle apresentaram alterações leves (Figura 2A) (40 e 34%, respectivamente) a moderadas (Figura 2B) (ambos 34%) nas concentrações de infiltrado leucocitário na submucosa e folículos isolados. No segundo desafio também foram observadas somente alterações leves a moderadas nos intestinos dos animais sobreviventes de todos os grupos. Porém, não houve diferença significativa entre eles. Alterações patológicas graves no intestino de camundongos infectados experimentalmente por *S. Typhimurium* não foram evidenciadas em ambos os desafios (dados não mostrados).

A

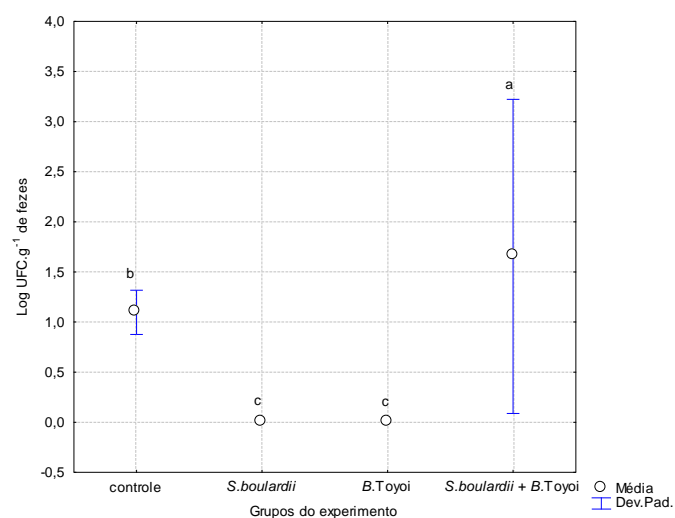


**B**

**Figuras 2.** Médias dos percentuais de camundongos que sobreviveram ao desafio com  $5,17 \log$  UFC de *S. Typhimurium* e que apresentaram lesões leves (A) e moderadas (B) no intestino. Os animais foram alimentados por 20 dias (a partir de 10 dias antes do desafio) com rações contendo *S. boulardii* e *B. Toyoi*, administrados individualmente ou em associação, nas concentrações 8 e 7  $\log$  UFC.g<sup>-1</sup> de ração, respectivamente. Animais do grupo controle receberam ração comercial sem probióticos. Letras diferentes representam diferenças significativamente estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os percentuais de animais com lesões leves ou moderadas no intestino.

### 5.3 Efeito da administração associada dos probióticos *S. boulardii* e *B. Toyoi* sobre a proteção de camundongos contra a colonização intestinal após desafio com *S. Typhimurium*

Com relação ao nível populacional do patógeno nas fezes dos camundongos que sobreviveram ao primeiro desafio, não houve diferença significativa nas médias entre os grupos. Dez dias após o segundo desafio, foi observado que houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre o nível populacional do patógeno nas fezes dos animais alimentados com a associação probiótica (1,65  $\log$  UFC. g<sup>-1</sup> de fezes) e os animais do grupo controle (1,10  $\log$  UFC. g<sup>-1</sup> de fezes). Nos grupos que receberam as rações com os probióticos individualmente, observou-se ausência de *S. Typhimurium* nas fezes, havendo, dessa forma, diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) no nível fecal do patógeno entre os animais destes grupos e os dos grupos controle e associação (Figura 3).



**Figura 3.** Médias dos níveis populacionais (UFC.g<sup>-1</sup>) dos patógenos nas fezes de camundongos que sobreviveram ao desafio com 5,17 log UFC de *S. Typhimurium*. Os animais foram alimentados 20 dias (a partir de 10 dias antes do desafio) com rações contendo *S. boulardii* e *B. Toyoi*, administrados individualmente ou em associação, nas concentrações 8 e 7 log UFC.g<sup>-1</sup> de ração, respectivamente. Animais do grupo controle receberam ração comercial sem probióticos. Letras diferentes representam diferenças significativas estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os níveis populacionais de patógeno encontrados nas fezes dos animais desafiados.

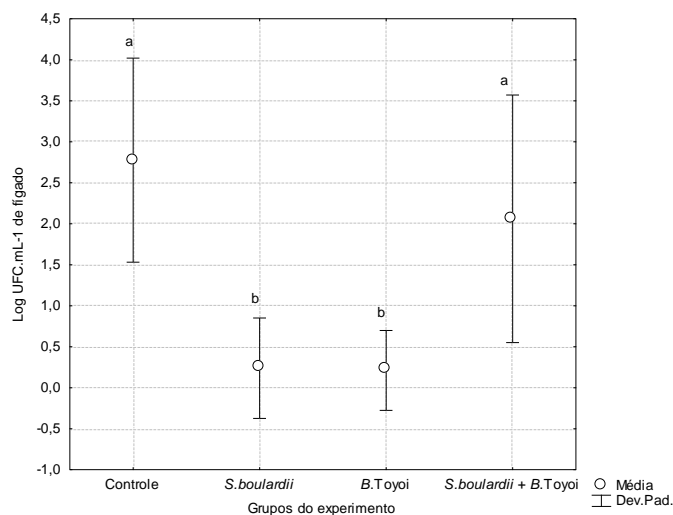
Com relação ao nível populacional do patógeno no intestino dos camundongos que sobreviveram aos dois desafios, não houve diferença significativa nas médias entre os grupos.

#### 5.4 Efeito da administração associada dos probióticos *S. boulardii* e *B. Toyoi* sobre a proteção contra translocação de *S. Typhimurium* para o fígado e baço de camundongos após o desafio

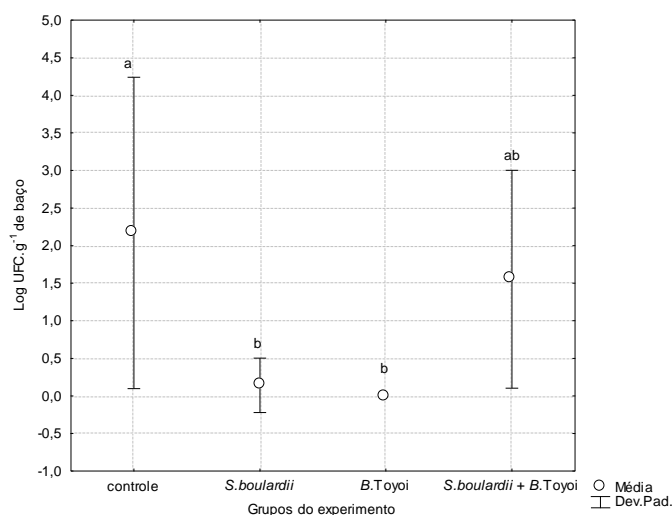
Ao avaliar a ocorrência de translocação bacteriana dez dias após o primeiro desafio, foram observados maiores níveis populacionais de *S. Typhimurium* no fígado de camundongos tratados com a associação probiótica (2,06 log UFC.mL<sup>-1</sup>) e dos animais do grupo controle (2,78 log UFC.mL<sup>-1</sup>), não havendo diferença significativa entre eles. Níveis populacionais estatisticamente inferiores ( $p < 0,001$ ) aos obtidos no fígado de animais do grupo associação e controle foram encontrados nos animais tratados com a levedura (0,24 log UFC.mL<sup>-1</sup>) e com o *B. Toyoi* (0,21 log UFC.mL<sup>-1</sup>) isoladamente, não havendo diferença estatisticamente significativa nestes níveis entre eles (Figura 4A). No mesmo período, foi avaliada a translocação bacteriana para o baço, onde foram encontrados níveis populacionais semelhantes em camundongos do grupo

controle ( $2,17 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$ ) e do grupo associação ( $1,55 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$ ). Níveis populacionais estatisticamente inferiores ( $p < 0,001$ ) aos obtidos no baço de animais do grupo controle foram encontrados nos animais tratados com a levedura ( $0,14 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$ ) e com o *B. Toyoi* ( $0 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$ ) individualmente (Figura 4B). Porém, entre os grupos que receberam *S.boulardii* e *B. Toyoi* individualmente e o grupo associação probiótica não houve diferença significativa.

A



B



**Figura 4.** Nível populacional ( $\text{UFC. mL}^{-1}$ ) do patógeno no fígado (A) e baço (B) de camundongos que sobreviveram ao desafio com  $5,17 \log \text{ UFC}$  de *S. Typhimurium*. Os animais foram alimentados por 20 dias (a partir de 10 dias antes do desafio) com rações contendo *S. boulardii* e *B. Toyoi*, administrados individualmente ou em associação, nas concentrações de 8 e 7  $\log \text{ UFC. g}^{-1}$  de ração, respectivamente. Animais do grupo controle receberam ração comercial sem probióticos. Letras diferentes representam diferenças significativamente estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os níveis populacionais do patógeno encontrados no fígado e baço dos animais desafiados.

## 6. DISCUSSÃO

Uma ampla variedade de antibióticos são utilizados, indiscriminadamente, no tratamento de salmoneloses em seres humanos (BUTLE, 2011). No entanto, mutações genéticas podem tornar *Salmonella*, e outras bactérias, resistentes ou multi-resistente a antibióticos (WHICHARD, 2007). Dessa forma, o desenvolvimento de processos alternativos para o tratamento e prevenção de distúrbios gastrointestinais, como a administração oral de probióticos, torna-se uma opção atraente, podendo ser eficaz na prevenção ou melhora de algumas doenças infecciosas, como as do trato intestinal (SONG et al., 2011; TSAI et al., 2011).

Nos seres humanos, *Salmonella* causa mais de um bilhão de infecções por ano, com consequências que vão desde uma gastroenterite auto-limitante a febre tifóide, causada por *S. Typhi*. Em contraste com o grave resultado da doença em seres humanos, *S. Typhi* é avirulenta na maioria dos animais, incluindo camundongos. No entanto, a doença associada com a infecção por *S. Typhimurium* nestes animais assemelha-se a da *S. Typhi* em seres humanos (SANTOS et al., 2001).

A penetração de *S. Typhimurium* na mucosa intestinal pode acontecer através dos enterócitos ou 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 no espaço extracelular (CUMMINGS et al., 2004; MACDONALD & MONTELEONE, 2005). Após, ocorre a produção de moléculas inflamatórias, diarreia, ulceração, destruição da mucosa e morte (GIANELLA, 1996).

No presente estudo, a utilização de *S. boulardii* e *B. Toyoi*, de forma associada, foi utilizada como um método de potencializar seus efeitos e melhorar a eficácia destes probióticos em camundongos desafiados com *S. Typhimurium*. Os resultados observados indicam que *S. boulardii* não protegeu os camundongos da morte induzida por *S. Typhimurium* e da ocorrência de lesões intestinais e, consequentemente, não ocorreu sinergismo microbiano, ou seja, não foi possível avaliar a ocorrência de sinergismo entre os probióticos no presente estudo. Os resultados demonstraram também que o probiótico *B. Toyoi* protegeu os animais da morte induzida pela infecção com *S. Typhimurium* e da ocorrência de lesões e que o efeito obtido pela associação ocorreu, provavelmente, somente devido ao efeito do *B. Toyoi*, pois não houve diferença significativa nas taxas de sobrevivência e na porcentagem de camundongos

que apresentaram lesões intestinais após desafio com o patógeno quando o probiótico *B. Toyoi* foi administrado individualmente ou em associação com *S. boulardii*, e houve diferença significativa nestes resultados entre animais destes grupos e animais do grupo controle.

No segundo desafio, o grupo de animais que foram alimentados com *B. Toyoi* individualmente obtiveram um aumento nas taxas de sobrevivência de aproximadamente três vezes, quando comparado com camundongos do grupo controle. Atribui-se a este aumento o fato de *B. Toyoi* apresentar-se na forma esporulada, a qual é mais resistente que a célula vegetativa, passando pelo trato gastrointestinal sem sofrer variações na sua estrutura (HOA et al., 2001). Além disso, *B. Toyoi* tem a capacidade de germinar em números significativos na porção terminal do intestino, sendo que esta germinação funciona como um probiótico convencional ou como um agente de exclusão competitiva (HOA et al., 2001). Essa proteção não está ligada somente a um antagonismo populacional. Outros mecanismos, como a imunomodulação, estão envolvidos (CASULA; CUTTING., 2002).

Estudos como o de Roos et al. (2006) apresentaram resultados satisfatórios com relação a administração individual de esporos de *B. Toyoi* sobre a imunomodulação, onde ao avaliarem o efeito desta suplementação em cordeiros vacinados contra BoHV-5 e *E. coli* K88ab, obtiveram soroconversão maior contra BoHV-5, quando comparada com a soroconversão causada pelo antígeno *E. coli*, sugerindo, dessa forma, que o efeito do probiótico difere em função do antígeno utilizado. Outro estudo de Roos et al., (2012), onde o probiótico *B. Toyoi* foi avaliado como método potencial para melhorar a eficácia da vacina contra BoHV-5, observou que o uso deste probiótico foi capaz de modular a resposta imune de camundongos, aumentando os níveis de IgG em aproximadamente 2 vezes, em média, em relação ao grupo controle. Quando os linfócitos de camundongos foram expostos a diferentes componentes de *B. Toyoi* (DNA, células, sobrenadantes ou conjunto), foi induzida a expressão de citocinas que são capazes de estimular naturalmente a diferenciação de células T helper em Th1, Th2 ou Threg. Além disso, no grupo suplementado com *B. Toyoi*, estimulado com o antígeno da vacina BoHV-5, foi observado níveis mais elevados da expressão de mRNA, IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-10, de forma significativa ( $p < 0,05$ ), quando comparado com o grupo controle. O aumento da expressão de mRNA de IL-10 pode ter tido efeito estimulador nas células B, conduzindo o aumento dos níveis de anticorpos observados no estudo.

Poucos estudos avaliaram o efeito protetor de *B. Toyoi* contra a infecção causada por *S. Typhimurium*. VILÀ et al. (2009), ao avaliarem os efeitos da suplementação da dieta de galinhas e frangos de corte com Toyocerin (10 log UFC.g<sup>-1</sup> de esporos viáveis de *B. Toyoi*) em desafio com 6,3 log UFC por frango e 8 log UFC de *S. Enteritidis* por galinha, observaram que *Salmonella* não foi detectada em frangos que receberam dieta enriquecida com Toyocerin na idade do abate (42 dias), enquanto que 42% dos frangos de corte não tratados apresentaram o patógeno. No final do experimento com galinhas (28 dias) observou-se que a alimentação com Toyocerin reduziu a prevalência deste patógeno nas aves, pois somente 38% das aves do grupo tratado com Toyocerin foram positivas para *Salmonella*, enquanto que 63% das aves do grupo controle foram positivas. Neste experimento também foi possível avaliar o ganho de peso diário, o peso corporal final e a conversão alimentar. Os resultados demonstraram que não houve diferença estatística nestas variáveis entre as galinhas alimentadas com ração acrescida de Toyocerin e o grupo controle. Já em frangos de corte, animais suplementados com Toyocerin apresentaram melhora nas variáveis de desempenho, quando comparadas com as dos animais do grupo controle.

Scharek-Tedin et al. (2013) observaram que a suplementação de porcas e suas leitegadas com *B. Toyoi* (5,5 log UFC. g<sup>-1</sup> e 5,94 log UFC. g<sup>-1</sup>, respectivamente) teve um impacto positivo sobre o estado de saúde dos leitões após um desafio com *S. Typhimurium* DT104 (9,48 log UFC), provavelmente devido a uma resposta imune alterada marcada pela frequência reduzida de células T CD8 no sangue periférico e no epitélio jejunal. Além disso, observaram que a eliminação de *Salmonella* nas fezes foi significativamente menor no grupo alimentado com *B. Toyoi*, 25 dias após a infecção ( $p = 0.004$ ).

No estudo de Shivaramaiah et al. (2011), aves alimentadas com *B. subtilis* isolado do ambiente (6 log de esporos. g<sup>-1</sup> de ração) apresentaram contagens de *S. Typhimurium* no cecum significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) as de aves do grupo controle e um maior ganho de peso corporal em pintos e aves jovens, independentemente da ocorrência ou não do desafio com *Salmonella*.

*S. boulardii* é utilizada em todo o mundo para a prevenção e tratamento de uma variedade de distúrbios intestinais, incluindo diarreias infecciosas e doenças inflamatórias do intestino (POTHOUKAKIS, 2009). Os mecanismos propostos pelos quais a levedura exerce seus efeitos de proteção incluem: efeitos anti-toxigênicos (POTHOUKAKIS et al., 1993; CASTAGLIUOLO et al., 1996); efeitos tróficos sobre

os enterócitos (BUTS, 2006); efeitos anti-inflamatórios (DALMASSO et al., 2006; THOMAS et al., 2009); aumento da resposta imune (BUTS et al., 1990; RODRIGUES et al., 2000; MARTINS et al., 2009); aumento da ligação e da eliminação de toxinas bacterianas (BRANDÃO et al., 1998); aumento da ligação e eliminação de bactérias patogênicas (GEDEK, 1999); interferência nas vias de sinalização bacterianas (MARTINS et al., 2010; CHEN et al., 2006; MUMY et al., 2008); ações sobre os fatores de virulência bacteriana (WU et al., 2008) e interferência na motilidade bacteriana (PONTIER-BRES et al., 2012).

Diversos estudos tem demonstrado que *S. boulardii* apresenta efeito protetor contra a infecção causada por *S. Typhimurium* em camundongos. Martins et al. (2010) observaram que o efeito anti-inflamatório observado não é devido a um decréscimo no número de *S. Typhimurium* por *S. boulardii* ou a uma habilidade da levedura matar a bactéria. Concluíram que a suplementação de *S. boulardii* modifica propriedades invasivas da *Salmonella*, que a adição da levedura durante a infecção reduz em 50% a invasão por salmonelas e mantém a função de barreira da monocamada epitelial, e que a exposição à levedura antes da infecção, amplifica significativamente o efeito benéfico, onde a invasão de *Salmonella* é completamente abolida e o processo inflamatório é cessado. Experimentos de microscopia eletrônica e confocal demonstraram que um dos mecanismos através do qual *S. boulardii* exerce seu efeito protetor, é através da sua adesão a bactéria, e o menor número de bactérias em contato direto com a célula do hospedeiro diminui ou inibe a cascata de sinalização envolvida na ativação da resposta inflamatória.

Rodrigues et al. (1996) observaram, através da avaliação da taxa de sobrevivência e/ou de dados histopatológicos, um efeito protetor contra *S. Typhimurium* em camundongos tratados com *S. boulardii*.

Recentemente, Martins et al. (2013) investigaram os efeitos do tratamento com 8 log UFC de *S. boulardii* por gavagem, fornecida a camundongos 10 dias antes do desafio intragástrico com 4 log UFC de *S. Typhimurium* (DL50), e constataram que o tratamento com *S. boulardii* reduziu significativamente a ativação de vias de sinalização, com conseqüente redução da inflamação, manifestações clínicas, danos no tecido e morte (aumentou a taxa de sobrevivência dos animais tratados de 40 para 70% em relação ao grupo que não recebeu o probiótico).

Resultados semelhantes foram observados pelo mesmo grupo, em 2010, (Martins et al., 2010), administrando-se a mesma dose de 8 log UFC de *S. boulardii*,



durante 10 dias, por gavagem, e desafiando camundongos com a mesma dose de *S. Typhimurium* (4 log UFC). Novamente *S. boulardii* protegeu camundongos da morte induzida pela infecção experimental com *S. Typhimurium*, pois aumentou significativamente a sobrevivência de 40% (grupo somente desafiado) para 70% (grupo desafiado e tratado com a levedura) após 16 dias. Entretanto, em ambos os experimentos, os autores administraram a mesma dose da levedura utilizada no presente trabalho (8 log UFC) por gavagem, ou seja, sem perdas e com controle total da dose, e desafiaram os animais com 1 log a menos de salmonela do que no presente experimento.

Em outro estudo do mesmo grupo (Martins et al., 2009), ao comparem os efeitos de cinco formulações contendo leveduras (quatro contendo *S. boulardii* liofilizada e uma contendo *S. cerevisiae* em suspensão aquosa) sobre a proteção contra uma infecção experimental com 4 log UFC de *S. Typhimurium*, observaram maior sobrevivência (70%) quando um dos produtos contendo *S. boulardii*, o que continha o maior número de células viáveis e o que apresentou as maiores contagens de leveduras viáveis e a maior persistência nas fezes, foi administrado aos animais, em comparação com o grupo controle (40%,  $p < 0,05$ ). Observaram também maior proteção dos tecidos hepáticos e intestinais. Bach et al. (2003) também observaram que 4 log UFC.mL<sup>-1</sup> de *S. boulardii* não foi capaz de inibir o crescimento de 4 log UFC.mL<sup>-1</sup> de *E. coli* O157:H7 em um fluido ruminal *in vitro*. Estes resultados demonstram a importância da dose do probiótico sobre o seu efeito e podem explicar a ausência de proteção por *S. boulardii* no presente estudo, pois, apesar de ter sido oferecida uma dose elevada da levedura (semelhante à administrada em outros estudos) aos animais (8 log UFC. g<sup>-1</sup> de ração), esta foi administrada na ração e não por gavagem, como em todos os experimentos citados, o que aumenta os riscos de perdas das leveduras e dificulta o controle da administração.

Outros estudos avaliaram os efeitos da suplementação com outras leveduras sobre a infecção causada por *S. Typhimurium*. Martins et al. (2005) avaliaram a capacidade de 8 log UFC de *S. cerevisiae* 905, administrada por 10 dias, proteger camundongos convencionais ou gnotobióticos contra desafio oral com *S. Typhimurium* (com 4 log e 2 log UFC por animal, respectivamente) e não observaram antagonismo da levedura pelo patógeno no trato digestivo dos camundongos gnotobióticos, pois não houve diferença na sobrevivência entre camundongos controles e experimentais desafiados com *S. Typhimurium* e todos os animais morreram em 6 a 7 dias. Entretanto,

após 28 dias do início do desafio, a sobrevivência de camundongos convencionais tratados com a levedura foi maior (55%), quando comparada com a do grupo controle (15%), e o tecido hepático foi melhor preservado ( $p < 0,05$ ). Os autores sugerem que o efeito protetor pode ser devido à imunomodulação ou ação e competição por sítios de adesão ou nutrientes.

Martins et al. (2011) observaram que o tratamento de camundongos com 8 log UFC de *S. cerevisiae* 905 por gavagem, por 10 dias antes do desafio e durante todo o experimento (por mais 28 dias), aumentou a taxa de sobrevivência (80%) quando comparada a do grupo controle (40%) ( $p < 0,05$ ), após desafio com 4 log UFC de *S. Typhimurium*. Eles sugerem que estes resultados devem-se a habilidade da levedura ligar-se a bactéria e modular as vias de sinalização envolvidas na ativação da inflamação em um modelo murino de febre tifóide.

As diferenças nas taxas de sobrevivência observadas nos dois desafios do presente trabalho podem ter ocorrido devido a alterações nos métodos de produção e administração dos probióticos, na viabilidade da preparação e devido às condições do hospedeiro e da microbiota intestinal, fatores passíveis de serem afetados em experimentos com probióticos.

A excreção de *S. Typhimurium* observada nas fezes de camundongos que sobreviveram ao desafio no presente estudo, dez dias após o desafio, é decorrente da sobrevivência do patógeno no intestino, após as etapas de colonização e invasão de enterócitos e linfonodos mesentéricos. A ausência do patógeno nas fezes dos animais dos grupos alimentados com *S. boulardii* e *B. Toyoi* isoladamente demonstra que ocorreu uma eliminação passiva do patógeno pelos animais, e pode ser resultado da exclusão competitiva exercida por eles, reduzindo o número de células viáveis do patógeno na luz do intestino. Nogueira et al. (2012) ao avaliarem o efeito da administração dos probióticos *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *S. boulardii* adicionados a ração de suínos, observaram que ambos os grupos apresentaram elevadas frequências de excreção, não sendo observada diferença entre eles. Estudos anteriores relatam efeitos positivos do uso de probióticos para proteção de suínos contra infecção por *Salmonella*. Fedorka-Cray et al. (1999) administraram culturas de bactérias cecais à leitões em fase de lactação, desafiados com *S. Choleraesuis*, e obtiveram menores taxas de colonização intestinal no grupo tratado. Casey et al. (2007) forneceram leites adicionados de culturas de *Lactobacillus* e *Pediococcus* a leitões desmamados e observaram menor ocorrência de diarreia e menores contagens fecais da

*S. Typhimurium* que tinha sido inoculada. Por outro lado, Szabó et al. (2009) não obtiveram o mesmo sucesso, observando tendência de maior excreção de *Salmonella* em leitões tratados com uma cepa de *Enterococcus faecium*. Segundo Callaway et al. (2008), resultados mais promissores são obtidos quando o probiótico é administrado a animais mais jovens, que, por estarem em fase de modificação da microbiota intestinal, são mais facilmente colonizados pelas cepas probióticas. Dessa forma, resultados mais promissores no presente estudo poderiam ter sido alcançados se os probióticos tivessem sido administrados em camundongos mais jovens ou tão logo ao nascer.

Com relação à persistência intestinal de *S. Typhimurium* no intestino de camundongos desafiados, no estudo realizado por Martins et al. (2013), foi observado que animais tratados com a levedura reduziram o número de *S. Typhimurium* no intestino. Os autores atribuíram esse resultado ao fato da levedura *S. boulardii* ligar-se ao patógeno, reduzindo o número de bactérias associadas ao epitélio intestinal, diminuindo, conseqüentemente, a colonização.

Com relação à população de *S. Typhimurium* encontrada em fezes de animais tratados com *S. boulardii* e desafiados em outros estudos, Rodrigues et al. (1996) concluíram que a proteção contra esta bactéria, obtida em camundongos convencionais e gnotobióticos associada com *S. boulardii*, não é devido à redução da população bacteriana no intestino, pois as contagens de *S. Typhimurium* foram elevadas nas fezes ( $10 \log \text{ UFC. g}^{-1}$ ) e permaneceram elevadas até a morte ou sacrifício dos animais. Martins et al. (2005) também tiveram a mesma conclusão, pois as contagens de *S. Typhimurium* nas fezes de camundongos gnotobióticos permaneceu elevada (8 a  $9 \log \text{ UFC. g}^{-1}$  de fezes), tanto em camundongos tratados quanto em não tratados com a levedura, resultado similar ao encontrado em outro estudo de Rodrigues et al. (2000). E Martins et al. (2013) também concluíram que os efeitos observados não foram associados a um antagonismo bacteriano, pois o número de salmonelas nas fezes permaneceu o mesmo na presença ou ausência da levedura.

No presente estudo, embora não tenha sido observada a presença de *S. Typhimurium* nas fezes dos animais alimentados somente com *S. boulardii*, dez dias após o desafio, foi observada a presença de lesões leves e moderadas no intestino destes animais, o que demonstra que o patógeno não foi totalmente eliminado por *S. boulardii* e concorda com as conclusões acima. Filho-Lima et al. (2000), ao avaliaram a associação entre *S. boulardii* (10 mg a cada 2 dias), *Lactobacillus acidophilus* e *Escherichia coli* ( $8 \log \text{ UFC}$  de cada bactéria, intragastricamente), por 10 dias, sobre a

proteção contra desafio intragástrico com 8 log UFC de *S. Typhimurium* em camundongos livres de germes, também observaram que *S. Typhimurium* colonizou o trato digestivo e continuou presente em altos níveis nas fezes (8 log UFC g<sup>-1</sup>) dos camundongos do grupo experimental assim como nas fezes dos animais do grupo controle. Resultado semelhante foi observado no presente estudo, onde *S. Typhimurium* foi observada nas fezes dos animais alimentados com a associação dos probióticos em concentrações elevadas, quando comparadas aos demais grupos (aproximadamente 1,7 log UFC). Entretanto, o fato das contagens nas fezes dos animais do grupo alimentado com a associação probiótica terem sido estatisticamente superiores as encontradas nos grupos que receberam os probióticos isoladamente e grupo controle, dez dias após o segundo desafio, sugere uma interferência negativa na ação entre os probióticos, quando administrados concomitantemente, sobre a persistência intestinal do patógeno.

Resultados semelhantes foram observados ao avaliar a presença de *S. Typhimurium* no fígado dos animais que sobreviveram ao segundo desafio (dez dias após) no presente estudo, pois animais do grupo alimentado com a associação probiótica apresentaram níveis estatisticamente superiores do patógeno no fígado, quando comparados aos que receberam os probióticos isoladamente. Estes resultados também sugerem a ocorrência de um efeito antagônico entre os dois probióticos sobre a translocação deste patógeno para o fígado e pode ter interferido negativamente sobre a sobrevivência dos animais alimentados com a associação dos probióticos após o desafio, embora não tenha reduzido a taxa de sobrevivência obtida. Já no baço, não houve diferença significativa entre o grupo tratado com a associação probiótica e os demais grupos.

Alguns estudos também observaram que *S. boulardii* protege animais da translocação de salmonelas para outros órgãos. Geyik et al. (2006) demonstraram, em seu estudo, que a administração de *S. boulardii* reduziu significativamente a translocação bacteriana em ratos com icterícia obstrutiva. Martins et al. (2010) observaram que o tratamento com *S. boulardii* inibiu a translocação da bactéria para o fígado, após desafio com *S. Typhimurium* em camundongos, e não induziu modificações inflamatórias significativas no parênquima hepático, o qual apresentou sua arquitetura lobular normal, e no cólon de camundongos infectados. Martins et al. (2013) observaram que no grupo controle, a translocação bacteriana pode ser observada a partir de 5 d.p.i. e persiste até o dia 15 no fígado. Observaram também que *S. boulardii* preveniu a translocação de *S. Typhimurium*, protegeu camundongos de

lesões hepáticas e reduziu os níveis de citocinas inflamatórias e a ativação de vias de sinalização envolvidas na ativação da inflamação induzida por *S. Typhimurium*, após o desafio com esta bactéria, com conseqüente redução da inflamação, manifestações clínicas, dano tecidual e morte. Os autores atribuem estes resultados, ao menos em parte, a ligação da bactéria a levedura, diminuindo o número de bactérias livres capazes de se ligar a células epiteliais, e consequentemente a translocação. Observaram, também, que a administração da levedura seis dias após a infecção por *Salmonella* foi eficaz na redução do número de mortes, sugerindo que *S. boulardii* pode ser benéfica como adjuvante no tratamento de pacientes com febre tifóide, mesmo quando administrada após o início da doença.

Peret Filho et al. (1998) avaliaram a sobrevivência, translocação e alterações histológicas no íleo terminal, fígado e baço em camundongos imunossuprimidos e tratados ou não com *S. boulardii* e observaram uma relativa proteção destes animais pelo tratamento com a levedura. Entretanto, observaram que este fenômeno foi inversamente proporcional a dose da levedura, pois a sobrevivência foi maior e a translocação bacteriana para o fígado menor, após sete dias de tratamento, no grupo imunossuprimido e tratado com 0,1 mg de *S. boulardii* do que nos outros grupos imunossuprimidos, e a maior translocação para o fígado e baço foi observada no grupo imunossuprimido e tratado com 10 mg de *S. boulardii*. Além disso, proteção relativa contra alterações histológicas foram obtidas quando os animais foram tratados com a levedura, independente da dose.

Generoso et al. (2011) observaram que o tratamento oral com células viáveis de *S. boulardii* ou com células mortas pelo calor mantiveram a integridade intestinal e modularam o sistema imune em um modelo de obstrução intestinal murino, prevenindo a translocação bacteriana e lesões intestinais.

A interferência negativa entre *S. boulardii* e *B. Toyoi* sugerida no presente estudo, não se deve a um efeito antagônico quanto à sobrevivência ao trato gastrointestinal (TGI) dos camundongos, visto que, em outro estudo do nosso grupo (Castelli, 2011), o qual avaliou a associação entre os probióticos *S. boulardii* e *B. Toyoi* sobre a resposta imune humoral e celular em camundongos, foi observado que ambos os probióticos avaliados individualmente (*S. boulardii* = 69,5% e *B. Toyoi* = 85,3%) e em associação (*S. boulardii* = 59,5% e *B. Toyoi* = 79,2%) apresentaram taxas de sobrevivência ao TGI de camundongos elevadas e semelhantes, 24 h após a administração. Esses resultados indicam 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 ao seu local de ação (Charteris et al., 1998) e que outros fatores, como a propriedade de *S. boulardii* ligar-se a bactérias pode ter sido responsável pelo efeito antagônico entre a levedura e *B. Toyoi*, no presente estudo.

No estudo de Castelli (2011), apesar de não ter ocorrido diferença significativa entre as taxas de sobrevivência entre os probióticos, *B. Toyoi*, o qual foi acrescentado 1 log a menos nas rações do que *S. boulardii*, apresentou uma taxa de sobrevivência ao TGI 25,8% maior, 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.

No mesmo estudo, utilizando a proteína recombinante internalina A (rInIA) de *Listeria monocytogenes* como antígeno modelo, foi observado que os probióticos *S. boulardii* e *B. Toyoi* agiram em sinergismo, potencializando a resposta imune humoral específica contra este antígeno, pois os animais do grupo onde *S. boulardii* e *B. Toyoi* foram associados apresentaram títulos de anticorpos Ig totais e soroconversões significativamente superiores ( $p < 0,005$ ) as dos animais suplementados com cada um dos probióticos individualmente.

Outros estudos evidenciaram efeito sinérgico entre probióticos sobre a imunomodulação. Tanasieko et al. (2005) observaram que a associação entre *Enterococcus faecium* e *S. cerevisiae* elevou significativamente a eficácia de uma vacina anti-tumoral *in vivo*. Resultados semelhantes foram encontrados por Randhawa et al. (2011), quando avaliou a associação entre as cepas probióticas *Lactobacillus delbrueckii* 405 e *Lactobacillus casei* subsp. Casei 17 e observaram que os títulos de anticorpos foram significativamente superiores quando os dois probióticos foram administrados simultaneamente.

Alguns estudos avaliaram os efeitos da associação entre probióticos sobre a infecção causada por *S. Typhimurium* e demonstraram efeitos sinérgicos. Outros não. Em um estudo, camundongos que receberam uma mistura de três cepas de *Lactobacillus acidophilus* mortas pelo calor, via oral, por sete dias antes do desafio oral com *S. Typhimurium*, apresentaram menores taxas de invasão de salmonelas no fígado e baço do que os animais do grupo controle. Os autores sugerem que este efeito pode ser devido à ativação do sistema imune e não a aderência dos probióticos ao epitélio intestinal (Lin, 2007).

Em outro estudo, a associação entre *Enterococcus faecalis* e *Pediococcus pentosaceus* (7,08 log CFU de cada um por gavagem no dia 1) reduziu a colonização por 6 log UFC de *S. Typhimurium* administrada no dia 3 ( $p = 0.07$ ), em um modelo de pássaro livre de patógenos específicos (Waters, 2005)

Tsai et al. (2011), ao avaliarem a influência de combinações quatro a quatro de 12 cepas de bactérias lácteas (BAL, 9 log UFC de cada) com diferentes propriedades probióticas, administradas a camundongos BALB/c por 63 dias, sobre desafio com 7 log UFC de *S. Typhimurium*, observaram que as combinações reduziram a invasão do patógeno ao fígado e baço dos animais 8 dias após o desafio, visto que ocorreu uma redução significativa no número de células do patógeno nestes órgãos.

Jain et al. (2008), ao avaliarem o efeito do probiótico dahi (presente em coalhada) suplementado com *Lactobacillus acidophilus* e *L. casei*, administrado a camundongos, por sete dias, contra infecção por *S. Enteritidis*, observaram uma redução nas contagens de *S. Enteritidis* no intestino, fígado e baço e uma redução na colonização do TGI, bem como da translocação do patógeno, e atribuíram esses resultados a estimulação da resposta imune específica e não específica.

No estudo de Higgins (2009), uma combinação de três cepas ATCC de lactobacilos (LAB3, *Lactobacillus casei* 11578, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 e *Lactobacillus fermentum* 14931, contendo 6 a 7 log UFC de cada) e uma cultura probiótica disponível comercialmente (PROB, produto comercial Floramax, contendo 11 isolados de bactérias ácido lácticas de origem do TGI de aves domésticas) foram avaliadas em desafio por gavagem com 3 a 4 log UFC de *S. Enteritidis* em pintos de corte (1 h após o desafio). PROB reduziu mais eficientemente *S. Enteritidis* que LAB3, visto que PROB reduziu significativamente a recuperação de *S. Enteritidis* nas tonsilas cecais dos pintos, 24 h após o tratamento, quando comparado com o grupo controle ou o grupo tratado com LAB3 ( $p < 0,05$ ). Estes resultados demonstram que as bactérias ácido lácticas não são igualmente efetivas em reduzir salmoneloses em aves e que pequenas diferenças na expressão de proteínas de superfície entre lactobacilos, pode diferenciar bactérias ácido lácticas que efetivamente previnem a infecção daquelas que não conferem proteção.

Em outro estudo, ao avaliar uma preparação probiótica comercial para a prevenção de distúrbios intestinais em cães e gatos contendo *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* e *S. Cerevisiae* (Vitacanis), administrada a camundongos gnotobióticos 10 dias antes de um desafio intragástrico com 2 log UFC de

*S. Typhimurium*, foi observado que *E. faecium* foi o único dos três componentes do produto que forneceu proteção contra o patógeno, pois apresentou uma taxa de sobrevivência superior (82%,  $p < 0.05$ ) a dos outros grupos. Todos os animais dos outros grupos morreram após o desafio, mas o tempo de sobrevivência foi maior ( $p < 0.05$ ) para os animais dos grupos que receberam os três probióticos ou somente *L. acidophilus* do que para os dos grupos controle e que receberam *S. cerevisiae*. Os dados de sobrevivência foram semelhantes aos achados histopatológicos, os quais mostraram mais lesões hepáticas e intestinais severas em camundongos do grupo controle e que receberam somente *S. cerevisiae* (Maia et al., 2001)

No estudo que avaliou a associação entre *S. boulardii* (10 mg a cada 2 dias), *Lactobacillus acidophilus* e *E. coli* EMO (8 log UFC de cada bactéria, intragastricamente) sobre a proteção contra *S. Typhimurium* em camundongos livres de germes, não foi observado efeito sinérgico entre os probióticos avaliados, visto que, *S. Typhimurium* colonizou o trato digestivo e continuou presente em altos níveis nas fezes tanto dos animais tratados, quanto dos animais do grupo controle e que o efeito antagônico observado foi devido somente a *E. coli* EMO, pois o antagonismo não aumentou na presença dos outros dois probióticos (*Lact. acidophilus* e *S. boulardii*). Além disso, observaram que a população da levedura nas fezes dos animais foi menor (aproximadamente 6 log UFC. g<sup>-1</sup> de fezes) que a dos outros probióticos, mesmo quando administrada isoladamente (Filho-Lima et al., 2000).

Filho-Lima et al. (2000) argumentam que experimentos com probióticos podem ser afetados por fatores como o tipo de agente bioterapêutico, métodos de produção e administração dos probióticos, viabilidade da preparação e condições do hospedeiro e da microbiota intestinal, fatores que podem também ter influenciado os resultados do presente trabalho.

Concluiu-se, com o presente trabalho, que, como *S. boulardii* não protegeu os camundongos da morte induzida por *S. Typhimurium* e da ocorrência de lesões intestinais, não foi possível avaliar a ocorrência de sinergismo entre os dois micro-organismos avaliados. Entretanto, *S. boulardii*, assim como *B. Toyoi*, isoladamente e em conjunto, reduziram a eliminação de *S. Typhimurium* pelas fezes e preveniram a translocação do patógeno para o fígado dos camundongos que sobreviveram ao desafio e *B. Toyoi* protegeu os animais da morte induzida pela infecção com *S. Typhimurium* e da ocorrência de lesões intestinais. Novos estudos serão realizados para avaliar os efeitos da associação destes probióticos frente ao desafio com *S. Typhimurium* e para



avaliar as causas do efeito antagônico apresentado entre eles sobre a persistência do patógeno nas fezes dos animais e sobre a translocação para o fígado.

## 7. CONCLUSÕES

- *S. boulardii* não protegeu os camundongos da morte induzida por *S. Typhimurium* e da ocorrência de lesões intestinais. Consequentemente, não foi possível avaliar a ocorrência de sinergismo entre os dois micro-organismos avaliados. Entretanto, *S. boulardii*, assim como *B. Toyoi* reduziram a eliminação de *S. Typhimurium* pelas fezes e preveniram a translocação do patógeno para o fígado nos camundongos que sobreviveram ao desafio.
- O probiótico *B. Toyoi* protegeu os animais da morte induzida pela infecção com *S. Typhimurium* e da ocorrência de lesões e o efeito obtido pela associação, ocorreu, provavelmente, devido somente ao efeito de *B. Toyoi*.
- A presença de *S. Typhimurium* nas fezes e fígado dos animais do grupo alimentado com a associação probiótica, em níveis estatisticamente superiores aos encontrados nos grupos que receberam os probióticos isoladamente, dez dias após o segundo desafio, sugere uma interferência negativa na ação entre os probióticos, quando administrados concomitantemente.
- O efeito antagônico entre os dois probióticos, sobre a persistência deste patógeno nas fezes dos animais e sobre a translocação para o fígado, pode ter interferido negativamente sobre a sobrevivência dos animais alimentados com a associação dos probióticos após o desafio, embora não tenha reduzido a taxa de sobrevivência obtida.
- Novos estudos fazem-se necessários para avaliar os efeitos da associação destes probióticos frente ao desafio com *S. Typhimurium* e para avaliar as causas do efeito antagônico apresentado entre eles.

## 8. REFERÊNCIAS

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.

BACH, S.J.; MCALLISTER, T.A.; VIEIRA, D.M.; GANNON, V.P.J.; HOLLEY, R.A. Effects of a *Saccharomyces boulardii* feed supplement on *Escherichia coli* O157:H7 in ruminal fluid *in vitro*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 104, p. 179-189, 2003.

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.

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

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

BUTLER, T. Treatment of typhoid fever in the 21st century: promises and shortcomings. **Clinical Microbiology Infection**. 17, 959–963, 2011.

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

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Vigilância Epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004. Boletim Eletrônico Epidemiológico, 6:1-7. Atualizado em 28.12.2005. Disponível em [HTTP://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol\\_epi\\_6\\_2005\\_corrigido.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf). Acesso em: 02 de maio de 2012.

BUTS, J.P.; P. BERNASCONI, J.P. VAERMAN, C. DIVE. Stimulation of secretory IgA and secretory component of immunoglobulins in small intestine of rats treated with *Saccharomyces boulardii*, **Digestive Diseases and Sciences**, 35: 251 – 256, 1990.

BUTS, J.P., De KEYSER N. Effects of *Saccharomyces boulardii* on Intestinal Mucosa. **Digestive Diseases and Sciences**, 51: 1485-1492, 2006.

BUTS, J.P. Ejemplo de un medicamento probiótico: *Saccharomyces boulardii* liofilizada. **Revista de Gastroenterología del Perú**. 25: 176-188. 2005.

CANONICI, A.; SIRET, C.; PELLEGRINO, E.; PONTIER-BRES, R.; POUYET, L.; MONTERO, M.P.; COLIN, C.; CZERUCKA, D.; RIGOT, V.; ANDRÉ, F. *Saccharomyces boulardii* improves intestinal cell restitution through activation of the  $\alpha 2 \beta 1$  integrin collagen receptor. **PLoS ONE**, v 6, p:1–12, 2011.

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

CASEY, P.G.; GARDINER, G.E.; CASEY, G.; BRADSHAW, B.; LAWLOR, P.G.; LYNCH, P.B.; LEONARD, F.C.; STANTON, C.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; HILL, C. A five-strain probiotic combination reduces pathogen shedding and

alleviates disease signs in pigs challenged with *Salmonella* enterica serovar Typhimurium. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, p. 1858-1863, 2007.

CASTAGLIUOLO. I.; J.T. LAMONT, S.T. NIKULASSON, C. POTHOUAKIS. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits *Clostridium difficile* toxin A effects in the rat ileum, **Infection and Immunity**. 64 – 5225 e 5232, 1996.

CASTELLI, R.M. Sinergismo dos probióticos *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. Toyoi sobre a imunomodulação em camundongos. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, 58p, 2011.

CASULA, G.; CUTTING, S.M.; *Bacillus* probiotics: spore e germination in the gastrointestinal tract. **Applied Enviromental Microbiology** ,68, 2002.

CALLAWAY, T.R.; EDRINGTON,T.S.; ANDERSON, R. C.; BYRD J. A.; NISBET, D. J.;. Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to *Salmonella*. **Journal Animal Science**, E163-72, 2008.

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

CHEN.X.; E.G. KOKKOTOU, N. MUSTAFA, K.R. BHASKAR, S. SOUGIOULTZIS, M. O'BRIEN, C. POTHOUAKIS, C.P. KELLY. *Saccharomyces boulardii* inhibits ERK1/2 mitogen-activated protein kinase activation both in vitro and in vivo and protects against *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis. **Parasitology**. 134: 695–703, 2006.

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**. 16(3): 213-219. 2005.

COPPOLA, M. M. & GIL-TURNES, C. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, 34 (4), 1297-1303, 2004.

CUMMINGS, J. H. et al. Passclaim – Gut Health and immunity. **European Journal of Nutrition** 118-173, 2004.

CZERUCKA, D. & RAMPAL, P. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. **Microbes and Infection**, 4: 733-739, 2002.

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

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

ELMER, GW & MCFARLAND, L.V. Biotherapeutic agents in the treatment of infectious diarrhea. **Gastroenterology clinics of North America**, 30: 837-854, 2001.

FAO-WHO: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria**. Córdoba, 2001. 34p. Disponível em: <[http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/probiotics.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf)>.

FEDORKA-CRAY, P.J.; BAHNSON, P.B.; LADELY, S.R. Antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* isolates collected from slaughter age pigs. Proceedings of International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in pork, Washington: North Caroline State University,. p.245-247, 1999.

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

against experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella enteritidis* subsp. Typhimurium in gnotobiotic mice, **Journal of Applied Microbiology** n.88, p.365–370, 2000.

GEYIK, M. F.; ALDEMIR, M.; HOSOGLU, S.; AYAZ, C.; SATILMIS, S.; BUYUKBAYRAM, H.; KOKOGLU, O. F. The effects of *Saccharomyces boulardii* on bacterial translocation in rats with obstructive jaundice. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, London, v. 88, n. 2, p. 178–180, 2006.

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

GENEROSO, S. V.; VIANA, M. L.; SANTOS, R. G.; ARANTES, R. M.; MARTINS, F. S.; NICOLI, J. R.; MACHADO, J. A.; CORREIA, M. I.; CARDOSO, V. N. Protection against increased intestinal permeability and bacterial translocation induced by intestinal obstruction in mice treated with viable and heat-killed *Saccharomyces boulardii*. **European Journal of Nutrition**, 50:261–269, 2011.

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.

GIANNELLA, R.A. (Ed.), *Salmonella*, fourth ed., Baron's Medical Microbiology The University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.

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

GUSLANDI, M; GIOLLO, P; TESTONI, PA. A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, 15: 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**, 45: 1462-1464, 2000.

HIGGINS, J.P.; HIGGINS, S.E.; WOLFENDEN, A.D.; HENDERSON, S.N.; TORRES-RODRIGUEZ, A.; VICENTE, J.L.; HARGIS, B.M.; TELLEZ, G. Effect of lactic acid bacteria probiotic culture treatment timing on *Salmonella* Enteritidis in neonatal broilers. **Poultry Science** 89 :243–247, 2010.

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.

ISHIOKA, T. A. Preliminary clinical evaluation of safety of *Bacillus Toyoi* preparation (Toyocerin) in humans. Study Report. **Asahi Chemical Industry Co.,Ltd**, 1979.

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**, 32(2): 141-144, 1992.

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.

JAIN, S.; YADAY, H.; SINHA, P.R. Probiotic dahi containing *Lactobacillus casei* protects against *Salmonella* enteritidis infection and modulates immune response in mice. **Journal of Medicinal Food**, 12: 576- 583, 2009.

LIMA FILHO, J.V.M.; VIEIRA, L.Q.; ARANTES, R.M.E.; NICOLI, J.R. Effect of the *Escherichia coli* EMO on experimental infection by *Salmonella enterica* subsp. Enteric serovar Typhimurium in gnotobiotic mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1005-1013, 2004.

LIMA FILHO, J.V.M.; VIEIRA, E.C.; NICOLI, J.R. Antagonistic effect of *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* and *Escherichia coli* against experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella enteritidis* ssp. Typhimurium in gnotobiotic mice. **Journal Applied Microbiology**, v. 88, p. 365-371, 2000.

LIN WH, YU B, LIN CK, HWANG WZ, TSEN HY. Immune effect of heat killed multistrain of *Lactobacillus acidophilus* against *Salmonella* Typhimurium invasion to mice. **Applied and Environmental Microbiology**, 102: 22 – 31, 2007.

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.

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

MAIA, O.B.; DUARTE, R.; SILVA, A.M.; CARA, D.C.; NICOLI, J.R. Evaluation of the components of a commercial probiotic in gnotobiotic mice experimentally challenged with *Salmonella enterica* subsp. enterica ser. Typhimurium. **Veterinary Microbiology** v. 79, p. 183-189, 2001.

MARCHAND, J.; VANDENPLAS, Y. Micro-organisms administered in the benefit of the host: myths and facts. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, 12: 1077-1088, 2000.

MARTEAU, P.R.; VRESE, M.; CELLIER, C.J.; SCHREZENMEIR. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 73, p. 4305-4365, 2001.



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** Volume 5- Número 2 - 2º Semestre 2005.

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**, 49, 738-744, 2009.

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, v5, 2010.

MARTINS, F.S.; ELIAN, S.D.; VIEIRA, A.T.; TIAGO, F.C.; MARTINS, A.K.; SILVA, F.C.; SOUZA, E.L.; SOUSA, L.P.; ARAÚJO, H.R.; PIMENTA, P.F.; BONJARDIM, C.A.; ARANTES, R.M.; TEIXEIRA, M.M.; NICOLI, J.R. Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune responses and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in a murine model of typhoid fever. **Journal of Medical Microbiology**, 301: 359-64, 2011.

MARTINS, F.S.; A.T, VIEIRA.; S.D, ELIAN.; R.M, ARANTES.; F.C, TIAGO.; L.P, SOUSA.; H.R, ARAÚJO.; P.F, PIMENTA.; C.A, BONJARDIM.; J.R, NICOLI.; M.M, TEIXEIRA. Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as one of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice. **Microbes and Infection** 15: 270 - 279, 2013.

MCFARLAND, L.V.; BERNASCONI, P. *Saccharomyces boulardii*: A review of an innovative biotherapeutic agent. **Microbial Ecology in Health and Diseases**, v. 6, p. 157-171, 1993.

MCFARLAND, L.V.; SURAWICZ, C.M.; GREENBERG, R.N.; ELMER, G.W.; MOYER, K.A.; MELCHER, S.A.; BOWEN, K.E.; COX, J.L. Prevention of  $\beta$ -lactam associated diarrhoea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. **The American Journal of Gastroenterology**, 90: 439-448, 1995.

MOURA, L.N.; NEUMANN, E.; VIEIRA, L.Q.; NICOLI, J.R. Protection by *Lactobacillus* UFV-H2B20 against experimental oral infection with *Salmonella* enteric subsp. enterica ser. Typhimurium in gnotobiotic and conventional mice. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 32, p. 66-69, 2001.

MUMY, K.L.; X. CHEN, C.P. KELLY, B.A. MCCORMICK. *Saccharomyces boulardii* interferes with *Shigella* pathogenesis by postinvasion signaling events, *Am. J. Physiol. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 294: G599 - G609, 2008.

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.

NEUMANN, E.; OLIVEIRA, M.A.; CABRAL, C.M.; MOURA, L.N.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, E.C.; CARA, D.C.; PODOPRIGORA, G.I.; VIEIRA, L.Q. Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 1565-1573, 1998.

NOGUEIRA, M. G.; CALVEYRA, J. C.; KICH, A. C.; MORAES, N.; CARDOSO, M. R. I. Efeito de probiótico na infecção e excreção fecal de *Salmonella* em suínos. **Ciência Rural**, v.42, n.3, 2012.

NYACHUBA, D. G. Foodborne illness: is it on the rise? **Nutrition Reviews**, v.68, n. 5, p. 257-269, 2010.

PERET FILHO L.A.; PENNA FJ, BAMBIRRA EA, NICOLI JR. Dose effect of oral *Saccharomyces boulardii* treatments on morbidity and mortality in immunosuppressed mice. **Journal of Medical Microbiology**. v.47, p. 111-116, 1998.

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.

PONTIER-BRES. R.; F. PRODON, P. MUNRO, P. RAMPAL, E. LEMICHEZ, J.F. PEYRON, D. CZERUCKA. Modification of *Salmonella* Typhimurium motility by the probiotic yeast strain *Saccharomyces boulardii*, **PLoS One**. 7: 33796, 2012.

POTHOULAKIS, C. Review article: anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*. **Aliment Pharmacol Ther** 30, 826–833, 2009.

QAMAR et al. *Sacharomices boulardii* stimulates intestinal immunoglobulin A immune response to *Clostridium difficile* toxin A in mice. **Infection and Immunity**, 69, (4): 2762-2767, 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.

READ, N. W.; AL-JANABI M. N.; HOLGATE A. M.; BARBER D. C.; EDWARD C. A. Simultaneous measurement of gastric emptying, small bowel residence and colonic filling of a solid meal by the use of the gamma camera. **Gut**, v. 27, n. 3, p. 300 – 308, 1986.

REITER, K.; EGGEBRECHT, 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.

RIAZ, M., et al. Efficacy and Safety of *Saccharomyces boulardii* in Acute Childhood Diarrhea: A Double Blind Randomised Controlled Trial. **Indian Journal Pediatric**, Oct 14. 2011.

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.**, v. 81, p. 251-256, 1996.

RODRIGUES, A. C. P. Efeito de *Saccharomyces boulardii* na resposta imune de camundongos gnotobióticos e convencionais. Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 2000.

ROOS, T.B. Efeito de *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. Toyoi na resposta imune humoral de cordeiros vacinados contra *Escherichia coli* e Herpes Vírus Bovino-5. Setembro de 2006. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Programa de pós-graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

ROOS, T. B. Efeito imunomodulador de *Bacillus cereus* var. Toyoi e *Saccharomyces boulardii* em animais vacinados contra Herpesvírus Bovino tipo 5. 2009. 90f. Tese (Doutorado em Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

ROOS, T. B.; LARA, A. P. S.; DUMMER, L.A.; FISCHER, G.; LEITE, F. P. L. The immune modulation of *Bacillus cereus* var. Toyoi in mice immunized with experimental inactivated Bovine Herpesvirus Type 5 vaccine. **Vaccine** 30: 2173– 2177, 2012.

RUBINUM ANIMAL HEALTH: Acesso em 23/06/2012. 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**, 42 (1): 1-16, 2006.

SALEZ, L.; MALO, D. Protagonists of innate immunity during in *Salmonella* infections. **Medical Science. (Paris)**, v. 20, p. 1119-1124, 2004.

SANTOS. R.L.; S. ZHANG, R.M. TSOLIS, R.A. KINGSLEY, L.G. ADAMS, A.J. BA"UMLER. Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever, **Microbes and Infection**. 3 - 1335 e1344, 2001.

SCHAREK-TEDIN L, PIEPER R, VAHJEN W, TEDIN K, NEUMANN K, ZENTEK J. *Bacillus cereus* var. Toyoi modulates the immune reaction and reduces the occurrence of diarrhoea in piglets challenged with *Salmonella* Typhimurium DT104. **Journal of Animal Science**, 2013.

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.

SHIVARAMAIAH, S.; PUMFORD, NR.; MORGAN, MJ.; WOLFENDEN, RE.; WOLFENDEN, A.D.; TORRES-RODRÍGUEZ, A.; HARGIS, B.M.; TÉLLEZ, G. Evaluation of *Bacillus* species as potential candidates for direct-fed microbials in commercial poultry. **Poultry Science Association** 90: 1574 -1580, 2011.

SILVA, A.M.; BAMBIRRA, E.A.; OLIVEIRA, A.L.; SOUZA, P.P.; GOMES, D.A.; VIEIRA, E.C.; NICOLI, J.R. Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with *Salmonella* enteritidis subsp. Typhimurium in conventional and gnotobiotic mice. **Journal Applied Microbiology** .v. 86, p. 331-336, 1999.

SILVA, A.M.; BARBOSA, F.H.F.; DUARTE, R.; VIEIRA, L.Q.; NICOLI, J.R. Influence of oral treatment with *Bifidobacterium* Bb12 and Bb46 on *Salmonella* Typhimurium translocation and clearance of *Escherichia coli* in gnotobiotic and conventional mice. **Microecology Therapy**. v. 29, p. 179-184, 2002.

SILVA, A.M.; BARBOSA, F.H.F.; DUARTE, R.; VIEIRA, L.Q.; ARANTES, R.M.E.; NICOLI, J.R. Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis in mice. **Journal Applied Microbiology**. v. 97, p. 29-37, 2004.

SONG HJ, KIM JY, JUNG SA, KIM SE, PARK HS, JEONG Y, HONG SP, CHEON JH, KIM WH, KIM HJ, YE BD, YANG SK, KIM SW, SHIN SJ, KIM HS, SUNG JK, KIM EY: Effect of probiotic *Lactobacillus* (Lacidofil® cap) for the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a prospective, randomized, double-blind, multicenter study. **Journal Korean Medical Science**, 2010.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics and symbiotics: approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 73, n. 2, p.361-364, 2001.

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.

SZABÓ, I.; WIELER, L.H.; TEDIN, K.; SCHAREK-TEDIN, L.; TARAS, D.; HENSEL, A.; APPEL, B.; NÖCKLER, K. Influence of a probiotic strain of *Enterococcus faecium* on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 infection in a porcine animal infection model. **Applied Environmental Microbiology**. 75: 2621-8, 2009.

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**, 27 (4): 336-338, 2005.

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

THOMAS. S.; I. PRZESDZING, D. METZKE, J. SCHMITZ, A. RADBRUCH, D.C. BAUMGART. *Saccharomyces boulardii* inhibits lipopolysaccharideinduced activation

of human dendritic cells and T cell proliferation. **Clinical & Experimental Immunology**. 156: 78 e 87, 2009.

THOMAS, S., *et al.* Anti-inflammatory effects of *Saccharomyces boulardii* mediated by myeloid dendritic cells from patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. **American Journal Physiol Gastrointest Liver Physiology**, Sep 8. 2011.

TSAI, C.C., HSIH, H.Y., CHIU, H.H., LAI, Y.Y., LIU, J.H., YU, B. AND TSEN, H.Y. Antagonistic activity against *Salmonella* infection in vitro and in vivo for two *Lactobacillus* strains from swine and poultry. **Journal Food Microbiology** 102, 185–194, (2005).

TSAI, C.C.; LIANG, H.W.; YU, B.; HSIEH, C.C.; HWANG, C.F.; CHEN, M.H.; TSEN, H.Y. The relative efficacy of different strain combinations of lactic acid bacteria in the reduction of populations of *Salmonella enterica* Typhimurium in the livers and spleens of mice. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, V. 63: 44–53, 2011.

VANDENBERGH, P.A. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. **FEMS Microbiology Review**, 12: 221-238, 1993.

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**, 88: 975 - 979, 2009.

WATERS, S.M.; MURPHY, R.A.; POWER, R.F. Assessment of the effects of Nurmi-type cultures and a defined probiotic preparation on a *Salmonella* Typhimurium 29E challenge in vivo. **Journal of Food Protection**, 68: 1222-1227, 2005.

WELKER C.A.D.; BOTH J.M.C; LONGARAY S.M.; HAAS S.; SOEIRO M.L.T.; RAMOS R.C. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, 8 (1): 44-48, 2010.

WILLIAMS, L. D.; BURDOCK G.A.; JIMÉNEZ, G.;CASTILLO, M. Literature review on the safety of Toyocerin, a non-toxigenic and non-pathogenic *Bacillus cereus* var. Toyoi preparation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 55: 236 - 246; 2009.

WHICHARD, J.M.; K. GAY, J.E. STEVENSON, K.J. JOYCE, K.L. COOPER, M. OMONDI, F. MEDALLA, G.A. JACOBY, T.J. BARRETT. Human *Salmonella* and concurrent decreased susceptibility to quinolones and extended spectrum cephalosporins, **Emerging Infectious Diseases**, 1681e1688E; 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, 2007. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>. Acessado em 01 de junho de 2012.

YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: Microbiological factors related to its potencial as a mosquitolarvicide. **Advances in Biotechnology Processes**, 3: 315-343, 1984



**Efeito da associação entre os probióticos *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. Toyoi sobre a proteção contra desafio com *Salmonella* Typhimurium em camundongos**

**Association effect between the probiotics *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. Toyoi ON the protection against challenge with *Salmonella* Typhimurium in mice.**

Janaína Martins Gonçalves Cascaes SILVA  
Mestranda do Programa de Pós-Graduação Nutrição e Alimentos – Faculdade de  
Nutrição – UFPel – Pelotas – RS.  
Rua Major Cícero, 933, Centro,  
(53) 91012002  
[janainacascaes@gmail.com](mailto:janainacascaes@gmail.com)

Ângela Nunes MOREIRA  
Doutora em Biotecnologia - UFPel  
Faculdade de Nutrição – UFPel  
Rua Gomes Carneiro – Centro – Pelotas  
(53) 32757583  
[angelanmoreira@yahoo.com.br](mailto:angelanmoreira@yahoo.com.br)

Fabício Rochedo CONCEIÇÃO  
Doutor em Biotecnologia - UFPel  
Centro de Desenvolvimento Tecnológico/Biotecnologia - UFPel  
Campus Universitário Capão do Leão s/ número, Laboratório de Imunologia Aplicada,  
Prédio 19  
Jardim América  
(53) 32757583  
[fabicio.rochedo@ufpel.edu.br](mailto:fabicio.rochedo@ufpel.edu.br)

Rodrigo Correa FRANÇA  
Mestre em Ciência e Tecnologia Agroindustrial – UFPEL  
Pelotas – RS.  
(53) 99110199  
[rodrigodfranca@yahoo.com.br](mailto:rodrigodfranca@yahoo.com.br)

**RESUMO.** Investigar os efeitos da associação entre *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. Toyoi na sobrevivência e proteção de camundongos contra a ocorrência de colonização intestinal, translocação e lesões intestinais após desafio com *S. Typhimurium*. Os camundongos foram divididos em quatro grupos: (1) controle, (2) *S.boulardii*, (3) *B.Toyoi* e (4) *S.boulardii* e *B.Toyoi* em associação. No 10º dia após desafio, foram realizadas eutanásia nos animais sobreviventes. A proteção contra colonização e translocação de *S. Typhimurium* foi avaliada através de contagens de células viáveis do patógeno presentes nas fezes e intestino delgado, e em amostras do fígado e baço, respectivamente. A avaliação da ocorrência de lesão no intestino delgado foi através de histopatologia. *S. boulardii* não protegeu os camundongos da morte induzida por *S. Typhimurium* e da ocorrência de lesões intestinais. Entretanto, *S. boulardii*, assim como *B. Toyoi* reduziram a eliminação de *S. Typhimurium* pelas fezes e preveniram a translocação do patógeno para o fígado de camundongos sobreviventes. *B. Toyoi* protegeu os animais da morte induzida pela infecção com *S. Typhimurium* e da ocorrência de lesões. Novos estudos serão realizados para avaliar os efeitos da associação destes probióticos frente ao desafio com *S. Typhimurium*.

**Palavras-chave:** Sinergismo, translocação, colonização intestinal, lesão de órgãos, histopatologia, DL50.

**Abstract:** Investigate the effects of the association between *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. Toyoi in survival and protection of mice against the occurrence of intestinal colonization, translocation and intestinal lesions after challenge with *S. Typhimurium*. The mice were divided into four groups: (1) control, (2) *S.boulardii*, (3) *B.Toyoi* and (4) a combination of *S. boulardii* and *B. Toyoi*. On the 10th day after challenge, euthanasia was performed in surviving animals. Protection against colonization and translocation of *S. Typhimurium* was evaluated through viable cell counts of pathogen, present in small intestine and feces, and through samples of spleen and liver, respectively. The evaluation of occurrence of lesions in small intestine was done through histopathology. *S. boulardii* has not protected the mice from induced death by *S. Typhimurium* and from the occurrence of intestinal lesions. However, *S. boulardii*, as well as *B. Toyoi*, reduced the elimination of *S. Typhimurium* in feces and prevented translocation of pathogen to surviving mice liver. *B. Toyoi* protected animals from induced death by infection with *S. Typhimurium* and from the occurrence of injury. Further studies will be conducted to assess the effects of the combination of these probiotics upon the challenge with *S. Typhimurium*.

**Keywords:** Synergism, translocation, intestinal colonization, organ lesion, histopathology, LD50.

## INTRODUÇÃO

Probióticos podem ser definidos como micro-organismos vivos que ao serem administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro<sup>1</sup>. 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 transmissores de resistência a antibióticos<sup>2</sup>.

O efeito protetor direto ou indireto contra enteropatógenos é um dos efeitos benéficos que os micro-organismos probióticos podem apresentar. Mecanismos de ação direta incluem a produção de substâncias antimicrobianas, que apresentam efeito inibitório ou letal para o patógeno<sup>3</sup>; inibição da adesão dos patógenos à mucosa intestinal, devido à co-agregação entre probiótico e patógeno ou por competição pelos sítios de adesão<sup>4,5</sup>; competição por nutrientes e inibição da produção ou ação de toxinas microbianas<sup>6,7</sup>. Mecanismos de ação indireta incluem a modulação da microbiota intestinal ou do sistema imune do hospedeiro<sup>8</sup>.

Leveduras e bactérias são os micro-organismos mais comumente utilizados como probióticos. Entretanto, eles apresentam diferentes mecanismos de ação, metabolismo e resistência a antibióticos. Uma característica importante das leveduras, em geral, é a alta produtividade a partir de substratos de baixo custo. Dentre as espécies de leveduras do gênero *Saccharomyces*, único gênero de leveduras utilizado atualmente como probiótico, a de maior destaque é *Saccharomyces boulardii*, a qual mantém suas propriedades mesmo quando associada a antimicrobianos. Os gêneros de bactérias mais utilizados como probióticos são *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Bifidobacterium*.

Entretanto, bactérias de outros gêneros, como *Bacillus cereus* var. Toyoi, uma estirpe isolada do solo que não produz enterotoxinas diarreicas ou eméticas<sup>9</sup>, podem ser utilizados. 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<sup>10</sup>.

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 vem sendo estudada e tem apresentado resultados positivos<sup>11</sup>. Porém, o efeito da associação entre *S. boulardii* e *B. Toyoi* sobre a proteção contra a colonização e translocação de *S. Typhimurium* ainda não foi avaliado.

O objetivo deste trabalho foi Investigar o efeito da associação entre os probióticos *S. boulardii* e *B. Toyoi* sobre a proteção contra desafio com *S. Typhimurium*, utilizando como modelo animal camundongos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material**

*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 h 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 h. Cinquenta mililitros desse inóculo foram adicionados a 1 L de meio NYSM (caldo nutriente, extrato de levedura,

MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>)<sup>12</sup>, e o cultivo foi mantido sob agitação de 200 rpm à 37 °C durante 48 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.

A concentração de *B. Toyoi*, em UFC.mL<sup>-1</sup>, foi determinada através de diluição decimal do cultivo em solução salina (NaCl 0,9%) estéril e contagem em placas contendo ágar base suplementado com 8% de sangue ovino, sendo as mesmas incubadas por 24 h à 37°C.

#### *S. boulardii*

A levedura liofilizada foi ressuspensa em solução salina estéril, repicada em placas contendo Agar 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 48 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.

A concentração de *S. boulardii*, em UFC.mL<sup>-1</sup>, foi determinada através de diluição decimal do cultivo em solução salina (NaCl 0,9%) estéril e contagem em placas contendo Agar YPD após incubação das mesmas por 24 h à 28°C.

## **S. Typhimurim**

A cepa *S. Typhimurium* 8429 foi utilizada no experimento de desafio. *S. Typhimurium* armazenada em glicerol a 20% a -80 °C foi cultivada em caldo Luria-Bertani (LB) e o cultivo incubado a 37 °C, sob agitação de 200 rpm, por 18 h. Após este período, a pureza do cultivo foi avaliada através de esfregaço utilizando a coloração de Gram e de semeadura por esgotamento em placas contendo Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD). Um mililitro do cultivo foi transferido para 19 mL de caldo LB e incubado sob as mesmas condições iniciais, por 24 h. O cultivo foi centrifugado por 10 min a 1500 g e os *pellets* foram lavados três vezes em salina tamponada fosfatada (PBS) estéril, pH 7,4, e suspensos em 1 mL de solução salina (NaCl 0,9%) estéril. A DO da solução foi ajustada a 1,0 em espectrofotômetro a 600 nm, e então diluída em série decimal em solução salina a 0,9% estéril, e o número de células viáveis presentes em cada diluição (UFC.mL<sup>-1</sup>) foi determinado através de contagem em placas<sup>13</sup>.

### **8.1. Animais**

No experimento de desafio foram utilizados camundongos BALB/c machos, com 6 a 7 semanas de idade e peso variando entre 15-20 g. Os animais foram 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 e foram alimentados com ração PET específica para roedores, sem antimicrobianos, contendo ou não os probióticos *S. boulardii* e/ou esporos viáveis de *B. Toyoi*. Ração e água foram fornecidas *ad libitum*.

Os camundongos que sobreviveram ao desafio sofreram eutanásia de acordo com as normas internacionais e em consonância com os princípios éticos de experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Após a remoção asséptica do intestino, fígado e baço, os camundongos foram congelados e entregues ao Biotério para posterior incineração.

## **Métodos**

### **8.2. Preparo das rações contendo os probióticos**

Foi preparada uma formulação contendo amido de milho a 8% e ração comercial triturada isenta de quimioterápicos. A esta foram adicionados os probióticos *S. boulardii* ( $10^8$  UFC.g<sup>-1</sup>) e/ou esporos viáveis de *B. Toyoi* ( $10^7$  UFC.g<sup>-1</sup>). Essas formulações foram peletizadas e mantidas em estufa com circulação de ar forçada, permanecendo por 18 h à temperatura de 40°C. Após, a ração foi armazenada sob refrigeração até a sua administração<sup>14</sup>. A estimativa da concentração dos probióticos na ração foi realizada a cada 15 dias para assegurar a manutenção da concentração dos mesmos na ração fornecida aos animais<sup>14</sup>.

### **8.3. Efeito da administração associada dos probióticos *S. boulardii* e *B. Toyoi* sobre a sobrevivência e a proteção de camundongos contra a ocorrência de colonização intestinal, translocação e lesões intestinais após desafio com *S. Typhimurium***

Para avaliar a capacidade de *S. boulardii* e *B. Toyoi*, administrados associadamente a camundongos via oral, induzirem proteção e inibição ou redução da colonização intestinal, translocação de *S. Typhimurium* para outros órgãos e tecidos e da ocorrência de lesões intestinais, um experimento de desafio foi realizado.

A dose de *S. Typhimurium* necessária para provocar a morte de pelo menos 50% da população de camundongos (DL50), que foi utilizada neste estudo (5,17 log UFC), foi a descrita por FRANÇA<sup>13</sup>.

Foram utilizados 40 camundongos, os quais foram divididos em 4 grupos compostos de 10 animais cada, distribuídos conforme a seguir: (1): receberam os dois probióticos (*S. boulardii* e *B. Toyoi*) adicionados à ração, nas concentrações de 8 e 7 log UFC.g<sup>-1</sup>, respectivamente; (2): receberam somente *S. boulardii* (8 log UFC.g<sup>-1</sup>) adicionado à ração; (3): receberam somente esporos de *B. Toyoi* (7 log UFC.g<sup>-1</sup>) adicionados à ração; (4): receberam ração isenta dos probióticos.

Os camundongos tiveram dez dias para adaptarem-se à ração contendo o(s) probiótico(s) ou não, e as receberam durante todo o experimento. No 10º dia após o início da administração das rações, os animais foram desafiados por gavagem com a DL50 de *S. Typhimurium* (5,17 log UFC) e monitorados diariamente quanto à sintomatologia e a ocorrência de morte.

A proteção contra colonização intestinal de *S. Typhimurium* foi avaliada após eutanásia dos camundongos sobreviventes após 10 dias do desafio, através de contagens de células viáveis do patógeno presentes nas fezes e intestino delgado.

Os órgãos como baço, fígado e intestino foram coletados em condições assépticas. Para a avaliação da ocorrência de translocação, 2/3 do fígado e do baço foram macerados, suspensos em 1 mL de solução salina a 0,9% estéril e diluídos em série decimal em solução salina. Após, 100 µl das diluições foram adicionadas a placas contendo Agar XLD e as placas foram incubadas a 37° C por 24 h para determinação da contagem em UFC.mL<sup>-1</sup>.

Para a avaliação da ocorrência de lesão, 1/3 do fígado e do baço e o intestino delgado foram avaliados através de histopatologia.



#### **8.4. Análise histopatológica**

As amostras do baço, fígado e intestino coletadas em condições assépticas foram submersas em formol tamponado 10%. Os fragmentos foram submetidos à técnica histológica de rotina e coloração com método usual de hematoxilina-eosina. As lâminas com cortes histológicos foram avaliadas no Departamento de Histologia da UFPel quanto à presença ou ausência de lesão.

#### **Tratamento estatístico dos resultados**

Análise de variância e teste de Tukey foram utilizados para determinar diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Statistix 7.

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **8.5. Efeito da administração associada dos probióticos *S. boulardii* e *B. Toyoi* sobre a sobrevivência e ocorrência de lesões intestinais em camundongos desafiados com *S. Typhimurium***

O primeiro (Figura 1A) e o segundo (Figura 1B) desafios com *S. Typhimurium* apresentaram resultados semelhantes, mas com diferenças nos valores das taxas de sobrevivência. As taxas de sobrevivência dos animais alimentados com a ração contendo o probiótico *B. Toyoi*, administrado individualmente ou em associação com *S. boulardii* (ambas de 90% no primeiro desafio e de 50 e 58,4%, respectivamente, no segundo desafio) foram significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) às dos animais do grupo controle (50% no primeiro desafio e 16,7% no segundo), e não apresentaram diferença significativa quando comparadas com as do grupo alimentado somente com *S. boulardii*

(60% no primeiro desafio e 25% no segundo). Também não houve diferença nas taxas de sobrevivência entre os animais que receberam *S. boulardii* individualmente e os animais do grupo controle, em ambos os desafios.

Os resultados das análises das seções histopatológicas do intestino dos animais que sobreviveram ao primeiro desafio corroboram com os resultados relativos à sobrevivência, pois camundongos alimentados com *B. Toyoi* administrado individualmente ou em associação com *S. boulardii* não apresentaram lesões histológicas, 10 dias após o desafio. Somente os animais alimentados com a levedura, bem como os animais do grupo controle apresentaram lesões leves (40 e 34%, respectivamente) a moderadas (ambos 34%) nas concentrações de infiltrado leucocitário na submucosa e folículos isolados. No segundo desafio também foram observadas somente lesões leves a moderadas nos intestinos dos animais sobreviventes de todos os grupos. Porém, não houve diferença significativa entre eles. Alterações patológicas graves no intestino de camundongos infectados experimentalmente por *S. Typhimurium* não foram evidenciadas em ambos os desafios.

No presente estudo, a utilização de *S. boulardii* e *B. Toyoi*, de forma associada, foi utilizada como um método de potencializar seus efeitos e melhorar a eficácia destes probióticos em camundongos desafiados com *S. Typhimurium*. Os resultados observados indicam que *S. boulardii* não protegeu os camundongos da morte induzida por *S. Typhimurium* e da ocorrência de lesões intestinais e, consequentemente, não ocorreu sinergismo microbiano no presente estudo. Os resultados demonstraram também que o probiótico *B. Toyoi* protegeu os animais da morte induzida pela infecção com *S. Typhimurium* e da ocorrência de lesões e que o efeito obtido pela associação ocorreu, provavelmente, somente devido ao efeito do *B. Toyoi*, pois não houve diferença significativa nas taxas de sobrevivência e na porcentagem de camundongos

que apresentaram lesões intestinais após desafio com o patógeno quando o probiótico *B. Toyoi* foi administrado individualmente ou em associação com *S. boulardii*, e houve diferença significativa nestes resultados entre animais destes grupos e animais do grupo controle.

No segundo desafio (Figura B), o grupo de animais que foram alimentados com *B. Toyoi* individualmente obtiveram um aumento nas taxas de sobrevivência de aproximadamente três vezes, quando comparado com camundongos do grupo controle. Atribui-se a este aumento o fato de *B. Toyoi* apresentar-se na forma esporulada, a qual é mais resistente que a célula vegetativa, passando pelo trato gastrointestinal sem sofrer variações na sua estrutura<sup>15</sup>. Além disso, *B. Toyoi* tem a capacidade de germinar em números significativos na porção terminal do intestino, sendo que esta germinação funciona como um probiótico convencional ou como um agente de exclusão competitiva<sup>15</sup>. Essa proteção não está ligada somente a um antagonismo populacional. Outros mecanismos, como a imunomodulação, estão envolvidos<sup>16</sup>.

No estudo de Roos et al.<sup>17</sup>, onde o probiótico *B. Toyoi* foi avaliado como método potencial para melhorar a eficácia da vacina contra BoHV-5, observou que o uso deste probiótico foi capaz de modular a resposta imune de camundongos, aumentando os níveis de IgG em aproximadamente 2 vezes, em média, em relação ao grupo controle. Quando os linfócitos de camundongos foram expostos a diferentes componentes de *B. Toyoi* (DNA, células, sobrenadantes ou conjunto), foi induzida a expressão de citocinas que são capazes de estimular naturalmente a diferenciação de células T helper em Th1, Th2 ou Threg. Além disso, no grupo suplementado com *B. Toyoi*, estimulado com o antígeno da vacina BoHV-5, foi observado níveis mais elevados da expressão de mRNA, IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-10, de forma significativa ( $p < 0,05$ ), quando comparado com o grupo controle. O aumento da expressão de mRNA de IL-10

pode ter tido efeito estimulador nas células B, conduzindo o aumento dos níveis de anticorpos observados no estudo.

Poucos estudos avaliaram o efeito protetor de *B. Toyoi* contra a infecção causada por *S. Typhimurium*. Scharek-Tedin et al.<sup>18</sup>, observaram que a suplementação de porcas e suas leitegadas com *B. Toyoi* (5,5 log UFC. g<sup>-1</sup> e 5,94 log UFC. g<sup>-1</sup>, respectivamente) teve um impacto positivo sobre o estado de saúde dos leitões após um desafio com *S. Typhimurium* DT104 (9,48 log UFC), provavelmente devido a uma resposta imune alterada marcada pela frequência reduzida de células T CD8 no sangue periférico e no epitélio jejunal. Além disso, observaram que a eliminação de *Salmonella* nas fezes foi significativamente menor no grupo alimentado com *B. Toyoi*, 25 dias após a infecção ( $p = 0.004$ ).

Diversos estudos tem demonstrado que *S. boulardii* apresenta efeito protetor contra a infecção causada por *S. Typhimurium* em camundongos. Martins et al.<sup>19</sup>, observaram que o efeito anti-inflamatório observado não é devido a um decréscimo no número de *S. Typhimurium* por *S. boulardii* ou a uma habilidade da levedura matar a bactéria. Concluíram que a suplementação de *S. boulardii* modifica propriedades invasivas da *Salmonella*, que a adição da levedura durante a infecção reduz em 50% a invasão por salmonelas e mantém a função de barreira da monocamada epitelial, e que a exposição à levedura antes da infecção, amplifica significativamente o efeito benéfico, onde a invasão de *Salmonella* é completamente abolida e o processo inflamatório é cessado. Experimentos de microscopia eletrônica e confocal demonstraram que um dos mecanismos através do qual *S. boulardii* exerce seu efeito protetor, é através da sua adesão a bactéria, e o menor número de bactérias em contato direto com a célula do hospedeiro diminui ou inibe a cascata de sinalização envolvida na ativação da resposta inflamatória.

Recentemente, Martins et al.<sup>20</sup>, investigaram os efeitos do tratamento com 8 log UFC de *S. boulardii* por gavagem, fornecida a camundongos 10 dias antes do desafio intragástrico com 4 log UFC de *S. Typhimurium* (DL50), e constataram que o tratamento com *S. boulardii* reduziu significativamente a ativação de vias de sinalização, com conseqüente redução da inflamação, manifestações clínicas, danos no tecido e morte (aumentou a taxa de sobrevivência dos animais tratados de 40 para 70% em relação ao grupo que não recebeu o probiótico).

As diferenças nas taxas de sobrevivência observadas nos dois desafios do presente trabalho podem ter ocorrido devido a alterações nos métodos de produção e administração dos probióticos, na viabilidade da preparação e devido às condições do hospedeiro e da microbiota intestinal, fatores passíveis de serem afetados em experimentos com probióticos.

#### **8.6. Efeito da administração associada dos probióticos *S. boulardii* e *B. Toyoi* sobre a proteção de camundongos contra a colonização intestinal após desafio com *S. Typhimurium***

Com relação ao nível populacional do patógeno nas fezes dos camundongos que sobreviveram ao primeiro desafio, não houve diferença significativa nas médias entre os grupos. Dez dias após o segundo desafio, foi observado que houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre o nível populacional do patógeno nas fezes dos animais alimentados com a associação probiótica (1,65 log UFC. g<sup>-1</sup> de fezes) e os animais do grupo controle (1,10 log UFC. g<sup>-1</sup> de fezes). Nos grupos que receberam as rações com os probióticos individualmente, observou-se ausência de *S. Typhimurim* nas

fezes, havendo, dessa forma, diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) no nível fecal do patógeno entre os animais destes grupos e os dos grupos controle e associação.

A excreção de *S. Typhimurium* observada nas fezes de camundongos que sobreviveram ao desafio no presente estudo, dez dias após o desafio, é decorrente da sobrevivência do patógeno no intestino, após as etapas de colonização e invasão de enterócitos e linfonodos mesentéricos. A ausência do patógeno nas fezes dos animais dos grupos alimentados com *S. boulardii* e *B. Toyoi* isoladamente demonstra que ocorreu uma eliminação passiva do patógeno pelos animais, e pode ser resultado da exclusão competitiva exercida por eles, reduzindo o número de células viáveis do patógeno na luz do intestino. Nogueira et al.<sup>21</sup>, ao avaliarem o efeito da administração dos probióticos *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *S. boulardii* adicionados a ração de suínos, observaram que ambos os grupos apresentaram elevadas frequências de excreção, não sendo observada diferença entre eles. Estudos anteriores relatam efeitos positivos do uso de probióticos para proteção de suínos contra infecção por *Salmonella*. Casey et al.<sup>22</sup>, forneceram leites adicionados de culturas de *Lactobacillus* e *Pediococcus* a leitões desmanados e observaram menor ocorrência de diarreia e menores contagens fecais da *S. Typhimurium* que tinha sido inoculada. Por outro lado, Szabó et al.<sup>23</sup>, não obtiveram o mesmo sucesso, observando tendência de maior excreção de *Salmonella* em leitões tratados com uma cepa de *Enterococcus faecium*. Segundo Callaway et al.<sup>24</sup>, resultados mais promissores são obtidos quando o probiótico é administrado a animais mais jovens, que, por estarem em fase de modificação da microbiota intestinal, são mais facilmente colonizados pelas cepas probióticas. Dessa forma, resultados mais promissores no presente estudo poderiam ter sido alcançados se os probióticos tivessem sido administrados em camundongos mais jovens ou tão logo ao nascer.

Com relação à persistência intestinal de *S. Typhimurium* no intestino de camundongos desafiados, no estudo realizado por Martins et al.<sup>20</sup>, foi observado que animais tratados com a levedura reduziram o número de *S. Typhimurium* no intestino. Os autores atribuíram esse resultado ao fato da levedura *S. boulardii* ligar-se ao patógeno, reduzindo o número de bactérias associadas ao epitélio intestinal, diminuindo, consequentemente, a colonização.

Com relação à população de *S. Typhimurium* encontrada em fezes de animais tratados com *S. boulardii* e desafiados em outros estudos, Rodrigues et al.<sup>25</sup>, concluíram que a proteção contra esta bactéria, obtida em camundongos convencionais e gnotobióticos associada com *S. boulardii*, não é devido à redução da população bacteriana no intestino, pois as contagens de *S. Typhimurium* foram elevadas nas fezes ( $10 \log \text{ UFC. g}^{-1}$ ) e permaneceram elevadas até a morte ou sacrifício dos animais. Martins et al.<sup>26</sup>, também tiveram a mesma conclusão, pois as contagens de *S. Typhimurium* nas fezes de camundongos gnotobióticos permaneceu elevada (8 a  $9 \log \text{ UFC. g}^{-1}$  de fezes), tanto em camundongos tratados quanto em não tratados com a levedura, resultado similar ao encontrado em outro estudo de Rodrigues et al.<sup>27</sup>. E Martins et al.<sup>20</sup>, também concluíram que os efeitos observados não foram associados a um antagonismo bacteriano, pois o número de salmonelas nas fezes permaneceu o mesmo na presença ou ausência da levedura.

No presente estudo, embora não tenha sido observada a presença de *S. Typhimurium* nas fezes dos animais alimentados somente com *S. boulardii*, dez dias após o desafio, foi observada a presença de lesões leves e moderadas no intestino destes animais, o que demonstra que o patógeno não foi totalmente eliminado por *S. boulardii* e concorda com as conclusões acima. Filho-Lima et al.<sup>28</sup>, ao avaliaram a associação entre *S. boulardii* (10 mg a cada 2 dias), *Lactobacillus acidophilus* e *Escherichia coli* (8

log UFC de cada bactéria, intragastricamente), por 10 dias, sobre a proteção contra desafio intragástrico com 8 log UFC de *S. Typhimurium* em camundongos livres de germes, também observaram que *S. Typhimurium* colonizou o trato digestivo e continuou presente em altos níveis nas fezes (8 log UFC g<sup>-1</sup>) dos camundongos do grupo experimental assim como nas fezes dos animais do grupo controle. Resultado semelhante foi observado no presente estudo, onde *S. Typhimurium* foi observada nas fezes dos animais alimentados com a associação dos probióticos em concentrações elevadas, quando comparadas aos demais grupos (aproximadamente 1,7 log UFC). Entretanto, o fato das contagens nas fezes dos animais do grupo alimentado com a associação probiótica terem sido estatisticamente superiores as encontradas nos grupos que receberam os probióticos isoladamente e grupo controle, dez dias após o segundo desafio, sugere uma interferência negativa na ação entre os probióticos, quando administrados concomitantemente, sobre a persistência intestinal do patógeno.

Resultados semelhantes foram observados ao avaliar a presença de *S. Typhimurium* no fígado dos animais que sobreviveram ao segundo desafio (dez dias após) no presente estudo, pois animais do grupo alimentado com a associação probiótica apresentaram níveis estatisticamente superiores do patógeno no fígado, quando comparados aos que receberam os probióticos isoladamente. Estes resultados também sugerem a ocorrência de um efeito antagônico entre os dois probióticos sobre a translocação deste patógeno para o fígado e pode ter interferido negativamente sobre a sobrevivência dos animais alimentados com a associação dos probióticos após o desafio, embora não tenha reduzido a taxa de sobrevivência obtida. Já no baço, não houve diferença significativa entre o grupo tratado com a associação probiótica e os demais grupos.



Com relação ao nível populacional do patógeno no intestino dos camundongos que sobreviveram aos dois desafios, não houve diferença significativa nas médias entre os grupos.

#### **8.7. Efeito da administração associada dos probióticos *S. boulardii* e *B. Toyoi* sobre a proteção contra translocação de *S. Typhimurium* para o fígado e baço de camundongos após o desafio**

Ao avaliar a ocorrência de translocação bacteriana dez dias após o primeiro desafio, foram observados maiores níveis populacionais de *S. Typhimurium* no fígado de camundongos tratados com a associação probiótica ( $2,06 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$ ) e dos animais do grupo controle ( $2,78 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$ ), não havendo diferença significativa entre eles. Níveis populacionais estatisticamente inferiores ( $p < 0,001$ ) aos obtidos no fígado de animais do grupo associação e controle foram encontrados nos animais tratados com a levedura ( $0,24 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$ ) e com o *B. Toyoi* ( $0,21 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$ ) isoladamente, não havendo diferença estatisticamente significativa nestes níveis entre eles (Figura 4A). No mesmo período, foi avaliada a translocação bacteriana para o baço, onde foram encontrados níveis populacionais semelhantes em camundongos do grupo controle ( $2,17 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$ ) e do grupo associação ( $1,55 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$ ). Níveis populacionais estatisticamente inferiores ( $p < 0,001$ ) aos obtidos no baço de animais do grupo controle foram encontrados nos animais tratados com a levedura ( $0,14 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$ ) e com o *B. Toyoi* ( $0 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$ ) individualmente (Figura 4B). Porém, entre os grupos que receberam *S. boulardii* e *B. Toyoi* individualmente e o grupo associação probiótica não houve diferença significativa.

Ao avaliar a presença de *S. Typhimurium* no fígado dos animais que sobreviveram ao segundo desafio (dez dias após) no presente estudo, pois animais do grupo alimentado com a associação probiótica apresentaram níveis estatisticamente superiores do patógeno no fígado, quando comparados aos que receberam os probióticos isoladamente. Estes resultados também sugerem a ocorrência de um efeito antagônico entre os dois probióticos sobre a translocação deste patógeno para o fígado e pode ter interferido negativamente sobre a sobrevivência dos animais alimentados com a associação dos probióticos após o desafio, embora não tenha reduzido a taxa de sobrevivência obtida. Já no baço, não houve diferença significativa entre o grupo tratado com a associação probiótica e os demais grupos.

Alguns estudos também observaram que *S. boulardii* protege animais da translocação de salmonelas para outros órgãos. Martins et al.<sup>19</sup>, observaram que o tratamento com *S. boulardii* inibiu a translocação da bactéria para o fígado, após desafio com *S. Typhimurium* em camundongos, e não induziu modificações inflamatórias significativas no parênquima hepático, o qual apresentou sua arquitetura lobular normal, e no cólon de camundongos infectados. Martins et al.<sup>20</sup>, observaram que no grupo controle, a translocação bacteriana pode ser observada a partir de 5 d.p.i. e persiste até o dia 15 no fígado. Observaram também que *S. boulardii* preveniu a translocação de *S. Typhimurium*, protegeu camundongos de lesões hepáticas e reduziu os níveis de citocinas inflamatórias e a ativação de vias de sinalização envolvidas na ativação da inflamação induzida por *S. Typhimurium*, após o desafio com esta bactéria, com conseqüente redução da inflamação, manifestações clínicas, dano tecidual e morte. Os autores atribuem estes resultados, ao menos em parte, a ligação da bactéria a levedura, diminuindo o número de bactérias livres capazes de se ligar a células epiteliais, e conseqüentemente a translocação. Observaram, também, que a administração da

levedura seis dias após a infecção por *Salmonella* foi eficaz na redução do número de mortes, sugerindo que *S. boulardii* pode ser benéfica como adjuvante no tratamento de pacientes com febre tifóide, mesmo quando administrada após o início da doença.

Generoso et al.<sup>29</sup>, observaram que o tratamento oral com células viáveis de *S. boulardii* ou com células mortas pelo calor mantiveram a integridade intestinal e modularam o sistema imune em um modelo de obstrução intestinal murino, prevenindo a translocação bacteriana e lesões intestinais.

A interferência negativa entre *S. boulardii* e *B. Toyoi* sugerida no presente estudo, não se deve a um efeito antagônico quanto à sobrevivência ao trato gastrointestinal (TGI) dos camundongos, visto que, em outro estudo do nosso grupo<sup>30</sup>, o qual avaliou a associação entre os probióticos *S. boulardii* e *B. Toyoi* sobre a resposta imune humoral e celular em camundongos, foi observado que ambos os probióticos avaliados individualmente (*S. boulardii* = 69,5% e *B. Toyoi* = 85,3%) e em associação (*S. boulardii* = 59,5% e *B. Toyoi* = 79,2%) apresentaram taxas de sobrevivência ao TGI de camundongos elevadas e semelhantes, 24 h após a administração. Esses resultados indicam 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 ao seu local de ação<sup>31</sup> e que outros fatores, como a propriedade de *S. boulardii* ligar-se a bactérias pode ter sido responsável pelo efeito antagônico entre a levedura e *B. Toyoi*, no presente estudo.

No estudo de Castelli<sup>30</sup>, apesar de não ter ocorrido diferença significativa entre as taxas de sobrevivência entre os probióticos, *B. Toyoi*, o qual foi acrescentado 1 log a menos nas rações do que *S. boulardii*, apresentou uma taxa de sobrevivência ao

TGI 25,8% maior, 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.

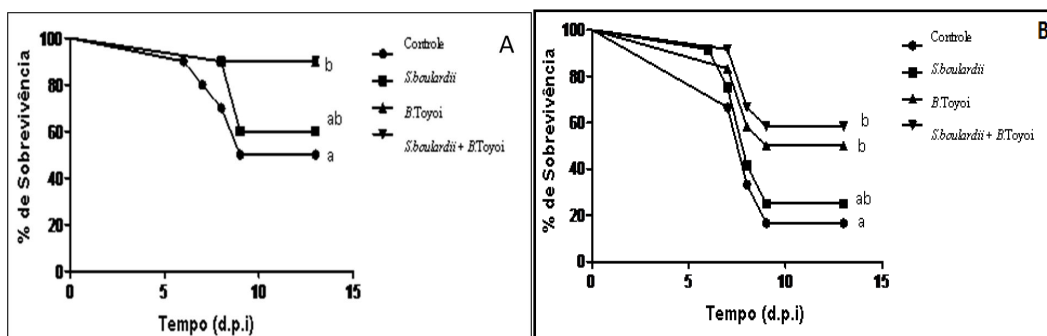
Alguns estudos avaliaram os efeitos da associação entre probióticos sobre a infecção causada por *S. Typhimurium* e demonstraram efeitos sinérgicos. Outros não. Em um estudo, camundongos que receberam uma mistura de três cepas de *Lactobacillus acidophilus* mortas pelo calor, via oral, por sete dias antes do desafio oral com *S. Typhimurium*, apresentaram menores taxas de invasão de salmonelas no fígado e baço do que os animais do grupo controle. Os autores sugerem que este efeito pode ser devido à ativação do sistema imune e não a aderência dos probióticos ao epitélio intestinal<sup>32</sup>.

## CONCLUSÕES

Concluiu-se, com o presente trabalho, que, como *S. boulardii* não protegeu os camundongos da morte induzida por *S. Typhimurium* e da ocorrência de lesões intestinais, não foi possível avaliar a ocorrência de sinergismo entre os dois micro-organismos avaliados. Entretanto, *S. boulardii*, assim como *B. Toyoi*, isoladamente e em conjunto, reduziram a eliminação de *S. Typhimurium* pelas fezes e preveniram a translocação do patógeno para o fígado dos camundongos que sobreviveram ao desafio e *B. Toyoi* protegeu os animais da morte induzida pela infecção com *S. Typhimurium* e da ocorrência de lesões intestinais. Novos estudos serão realizados para avaliar os efeitos da associação destes probióticos frente ao desafio com *S. Typhimurium* e para avaliar as causas do efeito antagônico apresentado entre eles sobre a persistência deste patógeno nas fezes dos animais e sobre a translocação para o fígado.

**Agradecimentos**

A Universidade Federal de Pelotas, em especial aos Laboratórios do CDTec/UFPel , principalmente ao laboratório 4.



**Figuras 1.** Médias dos percentuais de camundongos desafiados com  $5,17 \log$  UFC de *S. Typhimurium* que sobreviveram ao primeiro (A) e segundo (B) desafios. Os animais foram alimentados 20 dias (a partir de 10 dias antes do desafio) com rações contendo *S. boulardii* e *B. Toyoi*, administrados individualmente ou em associação, nas concentrações 8 e 7  $\log$  UFC.g<sup>-1</sup>, respectivamente. Animais do grupo controle receberam ração comercial sem probióticos. Letras diferentes representam diferenças significativamente estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre as taxas de sobrevivência (d.p.i: dias após infecção).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FAO-WHO: Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 2001. 34p. Disponível em: [[http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/probiotics.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf)]
2. Saad S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. Revista brasileira de ciências farmacêuticas, 42 (1): 1-16, 2006.
3. Vandenberg, P.A. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. Fems Microbiology review, 12: 221-238, 1993.
4. Bernet, M.F.; Brassart, D.; Neeser, J.R.; Servin, A.L. *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. Gut, **35**: 483-489, 1994.
5. Czerucka, D. & Rampal, P. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. Microbes and infection, 4: 733-739, 2002.
6. Czerucka, D; Roux, I; Rampal, P. *Saccharomyces boulardii* inhibits secretagogue-mediated adenosine 3'5'-cyclic monophosphate induction in intestinal cells. Gastroenterology, 106: 65-72, 1994.
7. Brandão, R.; Castro, I.M.; Bambirra, E.A.; Amaral, S.C.; Fietto, L.G.; Tropia, M.J.M.; Neves, M.J; Santos, R.G.; Gomes, N.C.M.; Nicoli, J. Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and environmental microbiology, 64: 564 - 568, 1998.
8. 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, 32(2): 141-144, 1992.
9. 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, 55: 236 - 246; 2009.
10. COPPOLA, M. M. & GIL-TURNES, C. Probióticos e resposta imune. Ciência rural, 34 (4), 1297-1303, 2004.
11. 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, 27 (4): 336-338, 2005.

12. YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: Microbiological factors related to its potencial as a mosquitolarvicide. *Advances in biotechnology Processes*, 3: 315-343, 1984.
13. França RC. Avaliação do potencial probiótico da levedura *Pichia pastoris* [dissertação de mestrado]. Pelotas (RS): Universidade Federal de Pelotas; 2010.
14. Roos, T. B. Efeito imunomodulador de *Bacillus cereus* var. Toyoi e *Saccharomyces boulardii* em animais vacinados contra Herpesvírus Bovino tipo 5. [tese doutorado]. Pelotas (RS): Universidade Federal de Pelotas; 2009.
15. 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.
16. Casula, G.; Cutting, S.M.; *Bacillus* probiotics: spore e germination in the gastrointestinal tract. *Applied enviromental microbiology* ,68, 2002.
17. Roos, T. B.; Lara, A. P. S.; Dummer, L.A.; Fischer, G.; Leite, F. P. L. The immune modulation of *Bacillus cereus* var. Toyoi in mice immunized with experimental inactivated Bovine Herpesvirus Type 5 vaccine. *Vaccine* 30: 2173– 2177, 2012.
18. Scharek-Tedin L, Pieper R, Vahjen W, Tedin K, Neumann K, Zentek J. *Bacillus cereus* var. Toyoi modulates the immune reaction and reduces the occurrence of diarrhoea in piglets challenged with *Salmonella* Typhimurium DT104. *Journal of animal science*, 2013.
19. 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, v5,2010.
20. Martins, F.S.; A.T, Vieira.; S.D, Elia.; R.M, Arantes.; F.C, Tiago.; L.P, Sousa.; H.R, Araújo.; P.F, Pimenta.; C.A, Bonjardim.; J.R, Nicoli.; M.M, Teixeira. Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as one of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice. *Microbes and infection* 15: 270 - 279, 2013.
21. Nogueira, M. G.; Calveyra, J. C.; Kich, A. C.; Moraes, N.; Cardoso, M. R. I. Efeito de probiótico na infecção e excreção fecal de *Salmonella* em suínos. *Ciência rural*, v.42, n.3, 2012.
22. Casey, P.G.; Gardiner, G.E.; Casey, G.; Bradshaw, B.; Lawlor, P.G.; Lynch, P.B.; Leonard, F.C.; Stanton, C.; Ross, R.P.; Fitzgerald, G.F.; Hill, C. A five-strain probiotic



combination reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in pigs challenged with *Salmonella* enterica serovar Typhimurium. applied environmental microbiology, v. 73, p. 1858-1863, 2007.

23. Szabó, I.; Wieler, L.H.; Tedin, K.; Scharek-Tedin, L.; Taras, D.; Hensel, A.; Appel, B.; Nöckler, K. Influence of a probiotic strain of *Enterococcus faecium* on *Salmonella* enterica serovar Typhimurium DT104 infection in a porcine animal infection model. Applied environmental microbiology. 75: 2621-8, 2009.

24. Callaway, T.R.; Edrington, T.S.; Anderson, R. C.; Byrd J. A.; Nisbet, D. J.;. Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to *Salmonella*. Journal animal science, E163-72, 2008.

25. 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, v. 81, p. 251-256, 1996.

26. 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. V. 5- Número 2 - 2º Semestre 2005.

27. Rodrigues, A. C. P. Efeito de *Saccharomyces boulardii* na resposta imune de camundongos gnotobióticos e convencionais [tese de doutorado]. Minas Gerais (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2000.

28. Filho-Lima J.V.M.; Vieira E.C. ; Nicoli J.R., Antagonistic effect of *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* and *Escherichia coli* combinations against experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella enteritidis* subsp. Typhimurium in gnotobiotic mice, Journal of applied microbiology n.88, p.365–370 ,2000.

29. Generoso, S.V.; Viana, M.L.; Santos, R.G.; Arantes, R.M.; Martins, F.S.; Nicoli, J.R.; Machado, J.A.; Correia, M.I.; Cardoso, V.N. Protection against increased intestinal permeability and bacterial translocation induced by intestinal obstruction in mice treated with viable and heat-killed *Saccharomyces boulardii*. European journal of nutrition, 50:261–269, 2011.

30. Castelli, R.M. Sinergismo dos probióticos *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. Toyoi sobre a imunomodulação em camundongos [dissertação de mestrado]. Pelotas (RS): Universidade Federal de Pelotas; 2011.

31. 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.
32. Lin, W.H.; Yu, B.; Lin, C.K.; Hwang, W.Z.; Tsen, H.Y. Immune effect of heat killed multistrain of *Lactobacillus acidophilus* against *Salmonella* Typhimurium invasion to mice. *Applied and environmental microbiology*, 102: 22 – 31, 2007.