

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial



DISSERTAÇÃO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DA LEVEDURA *Pichia pastoris*

Rodrigo Correa França

Pelotas, 2011

RODRIGO CORREA FRANÇA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DA LEVEDURA *Pichia pastoris*

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

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

Pelotas, 2011

Banca examinadora:

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

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

Prof.^a. Dr.^a. Angela Maria Fiorentini – UFPel

Prof. Dr. João Rodrigo Gil de los Santos – UFPel

Agradecimentos

A Deus, por ter me presenteado com a vida, saúde, pela família que tenho, e por me dar forças para alcançar mais essa vitória em minha vida.

Aos meus pais, Cirano Godoi França e Maria Helena Correa França que sempre me incentivaram e me apoiam em todos os momentos e que nunca mediram esforços para me fornecer uma ótima educação, proporcionando a formação e desenvolvimento do meu caráter. Esta conquista também é de vocês.

A minha noiva Elisa da Silva Sedrez, que sempre me acompanha, me incentiva e me apóia com muito amor e companheirismo, sendo compreensiva, amiga e me dando forças em todos os momentos. Obrigado por fazer parte da minha vida.

As avós Ivone Godoi França e Alice de Souza Correa (*in memorian*), pelo carinho, criação e pelo apoio em seguir, fazendo da minha vida todo dia mais saborosa e feliz.

Aos meus avôs Casildo de Sousa Correa (*in memorian*), e Darci Rodrigues França (*in memorian*), que embora não estejam mais conosco, com certeza estariam muito orgulhosos e felizes por mais essa conquista, fica o meu eterno amor e agradecimento.

Aos amigos que de uma forma ou outra sempre contribuíram na minha formação em algum momento.

Meus amigos do Laboratório de Imunologia Aplicada e de Microbiologia de Alimentos, em especial o Marcelo Mendonça, Louise Haubert e Gabriela A. Sabadin, que estiveram comigo nesta caminhada e que ainda continuaremos trilhando juntos este caminho glorioso que é a pesquisa.

As colegas dos demais laboratórios do CDTec/UFPel principalmente dos laboratórios 4, 7 e 10 que colaboraram para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Departamento de Histologia da UFPel pela colaboração no trabalho.

Aos meus amigos e orientadores, professora Ângela Nunes Moreira, Fabricio Rochedo Conceição e Wladimir Padilha da Silva, pela atenção, colaboração, dedicação e confiança depositada durante todo o período do mestrado, sendo verdadeiros exemplos de profissionais e de caráter a ser seguido.

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela convivência.

Aos professores que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Muito obrigado!

Resumo

FRANÇA, Rodrigo Correa. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DA LEVEDURA *Pichia pastoris***. 2011. 65f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Probióticos são micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Um critério importante para que um micro-organismo apresente potencial probiótico é a capacidade de proteger o trato gastrointestinal (TGI) do hospedeiro da ação de enteropatógenos, tais como a *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium*. *Pichia pastoris* é uma levedura utilizada como sistema de expressão de proteínas recombinantes em larga escala, capaz de realizar modificações pós-traducionais. O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial probiótico de *P. pastoris*. Primeiramente foi avaliada a resistência da levedura as adversidades simuladas do TGI de monogástricos. Após, foram avaliadas a segurança da utilização de *P. pastoris* como probiótico, a sua resistência ao armazenamento em solução sob refrigeração e sua capacidade de inibir o crescimento de *S. Typhimurium* e *E. coli* em meios de cultura. Por fim, foi avaliado o efeito de *P. pastoris* sobre a sobrevivência de camundongos infectados por *S. Typhimurium*. A levedura não causou alterações histopatológicas quando administrada aos animais, resistiu às adversidades do trato gastrointestinal *in vitro* e *in vivo* e foi capaz de inibir o crescimento de enteropatógenos *in vitro*. Além disso, o grupo suplementado com *P. pastoris* obteve maior sobrevivência do que o grupo controle quando desafiado com *S. Typhimurium*. Concluímos que a levedura *P. pastoris* possui potencial probiótico, porém novos testes deve ser realizado para a confirmação da característica antimicrobiana e para observar um possível efeito sobre a resposta imunológica.

Palavras-chave: Probiótico. Inocuidade. Resistência ao trato gastrointestinal. Efeito antimicrobiano. Levedura. *Pichia*

Abstract

FRANÇA, Rodrigo Correa. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DA LEVEDURA *Pichia pastoris***. 2011, 65f, Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Probiotics are live microorganisms which when administered in adequate amounts can confer health benefits to the host. An important criterion for a potential probiotic microorganism it is to present the ability to protect the gastrointestinal tract (TGI) of the host from the action of pathogens such as *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*. *Pichia pastoris* is a yeast that is commonly used as expression system to produce recombinant proteins in large scale, where is capable to do post-translational modifications. The purpose of this study was to evaluate the probiotic potential of *P. pastoris*. At first, we evaluated the resistance of the yeast to adversities of the monogastric TGI simulated *in vitro*. After, we assessed the safety of using *P. pastoris* as a probiotic, its resistance to refrigerated storage solution and its ability to inhibit the growth of *S. Typhimurium* and *E. coli* in culture media. Finally, we examined the effect of *P. pastoris* on the survival of mice infected with *S. Typhimurium*. *P. pastoris* did not cause histopathological changes when given to animals; withstood the hardships of the gastrointestinal tract *in vitro* and *in vivo* and it was able to inhibit the growth of pathogens *in vitro*. In addition, the group fed with *P. pastoris* had the highest survival than the control group when challenged with *S. Typhimurium*. We conclude that the yeast *P. pastoris* has the potential probiotic, but the development of new tests should be performed to confirm the antimicrobial characteristics and to observe a possible effect on the immune response.

Keywords: Probiotic. Safety. Resistance to the gastrointestinal tract. Antimicrobial effect. Yeast. *Pichia*

Lista de Figuras

		Página
Figura 1	Porcentagem de sobrevivência da levedura <i>Pichia pastoris</i> às condições gastrointestinais simuladas.	40
Figura 2	Níveis populacionais de <i>Pichia pastoris</i> nas fezes de camundongos até 72 h após sua administração.	42
Figura 3	Aspectos histopatológicos do baço (A e B), fígado (C e D) e intestino (E e F) de camundongos não tratados (A, C e E) ou tratados (B, D e F) com <i>Pichia Pastoris</i> .	43
Figura 4	Porcentagem de inibição do crescimento de <i>Salmonella</i> Typhimurium e <i>E. coli</i> co-cultivadas com <i>Pichia pastoris</i> em dois meios de cultura não seletivos (LB e YPD).	47
Figura 5	Porcentagem de sobrevivência de camundongos tratados diariamente com <i>Pichia pastoris</i> (<i>Pichia pastoris</i> + <i>Salmonella</i> Typhimurium) ou não (controle) durante 10 dias antes de serem desafiados com 10^4 UFC de <i>Salmonella</i> Typhimurium.	50

Lista de Tabelas

		Página
Tabela 1	Taxas de sobrevivência de <i>Pichia pastoris</i> em duas soluções após 70 dias de refrigeração	44
Tabela 2	Rendimento em peso de massa seca de <i>Pichia pastoris</i> (g.L ⁻¹) após cada reaproveitamento do caldo YPD	45
Tabela 3	Tempo de geração de <i>Salmonella</i> Typhimurium e <i>Escherichia coli</i> após 8 h de co-cultivo com <i>Pichia pastoris</i>	48

Lista de Abreviaturas e Siglas

µL- Microlitros

AOX1- Álcool Oxidase I

AOX2- Álcool Oxidase II

BEM- Eosina Azul de Metileno

C- Celsius

CDTec- Centro de Desenvolvimento Tecnológico

COBEA- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

D.O.- Densidade Ótica

DL- Dose Letal

FAO- Food and Agriculture Organization/World Health Organization

FDA- Food and Drug Administration

GPI- Fosfolipídio-fosfatidil-inositol

h- Hora

HCl- Ácido Clorídrico

HIV- Human immunodeficiency vírus

IFN-g- Interferon Gama

IL- Interleucina

LB- Luria Bertaine

LBP- LPS-binding protein,

log- Logaritmo

LPS- Lipopolissacarídeo

mg- Miligramas

mL- Mililitros

NaCl- Cloreto de sódio

Nm-Nanômetro

Nod- Nucleotide-binding organization

OMS- Organização Mundial de Saúde

PAMPs- Pathogen-associated molecular patterns

PBS- Salina tamponada fosfatada

rGH- Gene do hormônio do crescimento

RPM- Rotações por minuto

SCP- Single Cell Protein

SPI-1- *Salmonella* pathogenicity island 1

TGI- Trato gastrointestinal

TLR- Toll Like Receptor

TNF- α - Fator de Necrose tumoral alfa

TTSS- Type Three Secretion System

UFC- Unidade Formadora de Colônia

UFPeI- Universidade Federal de Pelotas

WHO-World Health Organization

XLD- Xilose Lisina Desoxicolato

YPD- Yeast Peptone Dextrose

Sumário

1 Introdução	12
2 Objetivos	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3 Revisão Bibliográfica	15
3.1 Probióticos.....	15
3.2 Leveduras como probióticos.....	17
3.3 <i>Pichia pastoris</i>	18
3.4 <i>Salmonella</i>	22
3.5 Probióticos e <i>Salmonella</i>	27
4 Materiais e Métodos	29
4.1 Micro-organismos e condições de cultivo	29
4.2 Animais	29
4.3 Resistência da levedura <i>Pichia pastoris</i> a condições gastrointestinais simuladas	30
4.3.1 Resistência a condições gástricas simuladas	30
4.3.2 Resistência a condições intestinais simuladas.....	30
4.3.3 Resistência consecutiva a condições gástricas e intestinais simuladas	31
4.3.4 Resistência da levedura <i>Pichia pastoris</i> ao trato gastrointestinal de camundongos, persistência, disseminação e segurança da utilização de <i>P. pastoris</i> como probiótico.....	31
4.3.5 Resistência da levedura <i>Pichia pastoris</i> ao armazenamento em solução sobrefrigeração	32
4.4 Reaproveitamento de caldo Yeast Peptone Dextrose (YPD) para cultivo de <i>Pichia pastoris</i>	33
4.5 Teste de inibição do crescimento de <i>S. Typhimurium</i> e <i>E. coli</i> em meios de cultura	34
4.6 Avaliação do efeito de <i>Pichia pastoris</i> sobre a sobrevivência de camundongos infectados por <i>Salmonella Typhimurium</i>	34
4.7 Análises Histopatológicas	35
4.8 Estatística	35
5 Resultados e Discussão	36
6 Conclusões	53
7 Perspectivas futuras	54
Referências Bibliográficas	55

1 Introdução

Probióticos são micro-organismos vivos que ao serem ingeridos em concentrações adequadas conferem benefícios ao hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Dentre os benefícios conhecidos, podemos destacar a melhora na conversão alimentar, efeito protetor direto (CZERUCKA et al., 1994; BRANDÃO et al., 1998; MARTINS et al., 2009) ou indireto, como a regulação da microbiota intestinal, imunomodulação que agem contra enteropatógenos (KAILA et al., 1992).

Diversas bactérias possuem efeito probiótico comprovado. Os gêneros de bactérias mais utilizados como probióticos são *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Bifidobacterium*. Já entre as leveduras, apenas *Sacharomyces boulardii* e *Sacharomyces cerevisiae* são consideradas probióticos (BUTS; KEYSER, 2006; MARTINS et al., 2011).

Para um probiótico exercer seus benefícios ao hospedeiro, ele deve chegar e permanecer viável ao seu local de ação. Assim, deve sobreviver às adversidades do trato digestivo, ou seja, resistir tanto às oscilações de pH, quanto à ação das enzimas digestivas e da bile e deve manter-se metabolicamente ativo no intestino. Além disso, probióticos devem ser seguros para uso humano ou animal, ou seja, não produzir toxinas, não apresentar atividade hemolítica, não infectar imunocomprometidos e não estar associado a outras doenças, e devem resistir ao processamento industrial e manter-se viável por longo período durante a estocagem e transporte sem perder a funcionalidade (SAAD, 2006).

A levedura *P. pastoris* é amplamente utilizada como sistema de expressão de proteínas recombinantes (INVITROGEM, 2004). É capaz de alcançar altos níveis celulares de expressão, de realizar modificações pós-traducionais e de crescer utilizando substratos de baixo custo como, por exemplo, o metanol e o glicerol (CREGG, 2008). Em um estudo realizado por Storch et al. (2008), visando avaliar a utilização de *P. pastoris* como probiótico, foi avaliada a influência desta levedura e sua variante recombinante, contendo o gene da fosfolipase C de *Clostridium perfringens*, sobre a eficiência alimentar e a estimulação do sistema imune de frangos de corte contra a toxina α de *C. perfringens*. Animais alimentados com *P.*

pastoris selvagem e recombinante apresentaram melhora nos índices de eficiência alimentar (conversão alimentar e ganho de peso), na soroconversão e não apresentaram alterações histopatológicas significativas. Entretanto, como os testes realizados e os resultados encontrados não foram suficientes para qualificarmos esta levedura como probiótico, resolveu-se realizar testes adicionais no presente estudo, visando avaliar a capacidade de *P. pastoris* sobreviver às condições gastrointestinais simuladas e ao trato gastrointestinal de camundongos. Também foram avaliados a segurança de sua administração a mamíferos, se *P. pastoris* sobrevive ao armazenamento em solução sob refrigeração, se possui efeito inibitório sobre o crescimento dos enteropatógenos *E. coli* e *S. Typhimurium* em meios de cultura e se possui efeito sobre a sobrevivência de camundongos infectados por *S. Typhimurium*.

Se a levedura *P. pastoris* apresentar efeito probiótico, esta poderá ser utilizada como probiótico recombinante, ou seja, poderá apresentar, além de seus efeitos benéficos comprovados, outras propriedades desejáveis, como a expressão de proteínas terapêuticas ou imunogênicas de interesse.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial probiótico da levedura *Pichia pastoris*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a resistência da levedura *P. pastoris* a condições gastrointestinais simuladas e ao trato gastrointestinal de camundongos;
- Avaliar a segurança da utilização de *P. pastoris* como probiótico;
- Avaliar o efeito inibitório de *P. pastoris* sobre o crescimento dos enteropatógenos *S. Typhimurium* e *E. coli* em meios de cultura;
- Avaliar o efeito de *P. pastoris* sobre a sobrevivência de camundongos infectados por *S. Typhimurium*;

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Probióticos

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

A palavra probiótico deriva do grego e significa “a favor da vida”. É o antônimo de antibiótico, que significa “contra a vida”. Ao longo dos anos, o termo teve diferentes acepções. Segundo a Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO, 2002), probióticos podem ser definidos como micro-organismos vivos que ao serem ingeridos em quantidades adequadas trazem benefícios à saúde do hospedeiro. Assim, o termo é utilizado para designar preparações ou produtos que contêm micro-organismos viáveis definidos e em quantidade adequada, que alteram a microbiota própria das mucosas por implantação ou colonização de um sistema do hospedeiro, produzindo efeitos benéficos em sua saúde (SCHREZENMEIR; DE VRESE, 2001).

Os relatos dos efeitos benéficos das bactérias 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”. Plínio, um historiador romano, em 76 a.C., recomendou o uso de leite fermentado para o tratamento de gastroenterites (TEITELBAUM; WALKER, 2002). Fuller (1989) definiu probiótico como “um suplemento microbiano vivo que afeta benéficamente o animal hospedeiro graças à melhoria no balanço microbiano intestinal”, embora, hoje, os probióticos já

tenham, também, aplicações conhecidas em outros ecossistemas (BENGMARK, 1998; REID, 2000). Esta definição pode ser estendida ao hospedeiro humano como “micro-organismos não-patogênicos que, quando ingeridos, exercem uma influência positiva na saúde ou fisiologia do hospedeiro” (MARTEAU et al., 2001).

Existem alguns critérios a serem considerados na seleção de probióticos. A tolerância às adversidades de pH, enzimas digestivas e sais biliares são pré-requisitos fundamentais para a sobrevivência do micro-organismo à passagem através do TGI. Outros critérios fundamentais são: ser seguro para uso humano ou animal, ou seja, não produzir toxinas prejudiciais ao hospedeiro, não apresentar atividade hemolítica, não infectar imunocomprometidos e não estar associado a outras doenças; resistir ao processamento e manter-se viável por longo período durante a estocagem e transporte do alimento sem perder a funcionalidade e manter-se metabolicamente ativo no intestino. Além disso, a capacidade de se aderir à superfície da mucosa intestinal é uma característica recomendada para assegurar a permanência do probiótico por longos períodos no TGI (CONWAY, 1996; OUWEHAND et al., 1999).

Entre os efeitos benéficos possíveis de um probiótico incluem-se a melhora na conversão alimentar (STORCH et al., 2008), regulação da microbiota intestinal, imunomodulação e o efeito protetor direto ou indireto contra enteropatógenos. Mecanismos de ação direta incluem a produção de substâncias antimicrobianas, que apresentam efeito inibitório ou letal para o patógeno (VANDENBERGH, 1993); inibição da adesão dos patógenos à mucosa intestinal seja devido à co-agregação entre probiótico e patógeno ou por competição pelos sítios de adesão (CZERUCKA; RAMPAL, 2002); competição por nutrientes (BERNET et al., 1994) e inibição da produção ou ação de toxinas microbianas (CZERUCKA et al., 1994; BRANDÃO et al., 1998). Por outro lado existem os mecanismos de ação indireta que incluem a modulação da microbiota intestinal ou do sistema imune do hospedeiro (KAILA et al., 1992). Além disso, os probióticos surgem como a alternativa mais promissora para a substituição dos antibióticos como promotores de crescimento na alimentação animal, os quais estão proibidos (KREHBIEL et al., 2003).

3.2 Leveduras como probióticos

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

A partir de 1960 iniciou-se a comercialização desta levedura liofilizada, pelo Laboratoires Biocodex” (Paris, França). Assim, seu uso como medicamento para combate às diarreias foi difundido em toda Europa. Atualmente a levedura é amplamente comercializada na Europa, Américas do Sul e do Norte, Ásia e África (MCFARLAND; BERNASCONI, 1993) e recentemente seu uso foi liberado pela FDA (Food and Drug Administration) nos Estados Unidos.

S. boulardii vem sendo utilizada em humanos contra vários distúrbios gastrointestinais como diarreia associada ao uso de antibióticos (SURAWICZ et al., 1989a; BARTLETT, 1992; SURAWICZ, 2003), no tratamento da diarreia causada pelo *C. difficile* (ELMER; MCFARLAND, 2001; SURAWICZ, 2003), tanto nos casos de prevenção (SURAWICZ et al., 1989a; MCFARLAND et al., 1994; CASTAGLIUOLO et al., 1999), quanto nos casos de recorrência da doença (SURAWICZ et al., 1989b; KIMMEY et al., 1990; SURAWICZ et al., 2000), na prevenção e tratamento da diarreia do viajante (SCARPIGNATO; RAMPAL, 1995) e da diarreia em pacientes infectados pelo HIV (BORN et al., 1993).

A utilização de leveduras como probióticos em animais é recente, embora a idéia de sua utilização como fonte de proteína tenha surgido nos anos 70. Em humanos, leveduras foram avaliadas como probióticos para o tratamento de problemas digestivos provocados pela utilização prolongada de antibióticos com

resultados promissores (SURAWICZ et al., 1989a; MCFARLAND et al., 1995). Rodrigues et al. (1996) constataram que camundongos gnotobióticos suplementados com *S. boulardii* apresentaram diminuição da quantidade de *E. coli* no trato gastrointestinal e modulação da resposta imune, como aumento significativo da expressão de IgA e do número de células de Küpffer.

Estudos recentes demonstraram que a suplementação da ração de frangos de corte com *S. boulardii* aumentou a eficiência alimentar (GIL DE LOS SANTOS et al., 2005). Lila et al. (2004) constataram que a utilização *in vitro* de células vivas de *S. cerevisiae* em líquido ruminal de bovinos estimulou a fermentação ruminal de micro-organismos, além de diminuir a quantidade de lactato, metano e hidrogênio produzido pelos animais. Roos et al. (2009) observaram que a suplementação de camundongos e ovinos com esta levedura e com *Bacillus cereus* var. Toyoi melhorou a resposta imune do hospedeiro frente a vacinação contra Herpes vírus Bovino tipo 5. Lara-Flores et al. (2003) suplementaram a ração de peixes da espécie Tilapia (*Oreochromis niloticus*) com as bactérias *Streptococcus faecium* e *Lactobacillus acidophilus*, e a levedura *S. cerevisiae*, constatando que os grupos suplementados com *S. cerevisiae* apresentaram desempenhos superiores aos restantes.

Martins et al. (2009) compararam o efeito de cinco formulações de leveduras probióticas (quatro *S. boulardii* liofilizadas e uma *S. cerevisiae* em suspensão aquosa) sobre 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.

3.3 *Pichia pastoris*

P. pastoris é uma levedura da família *Saccharomycetaceae*, gênero *Pichia*, que pode ser utilizada para a produção de proteínas recombinantes. Outras leveduras desta família também podem ser utilizadas para tal fim, como *S. cerevisiae*, que produziu a proteína Gag recombinante do HIV tipo 2 (MORIKAWA et al., 2007). Uma das características das leveduras do gênero *Pichia* é que elas

podem utilizar o metanol como fonte de carbono, devido à presença dos genes Álcool Oxidase I e II (AOX1 e AOX2). Estes genes, principalmente o AOX1, também servem de promotores para a produção da proteína desejada (INVITROGEN, 2004). Atualmente, outras fontes de carbono tais como o glicerol resultante da fabricação de biodiesel, estão sendo estudadas para a indução da produção de proteínas (ÇELIK et al., 2008). Embora a utilização do metanol não seja uma característica exclusiva deste gênero (os gêneros *Candida*, *Hansenula* e *Torulopsis* também tem a mesma propriedade), *Pichia* se destaca quanto à produtividade em células por litro (é capaz de produzir até 130 g por litro de matéria seca) (CREGG, 2008) e quanto a sua capacidade de expressar proteínas heterólogas em grande quantidade (CREGG, 2008).

A utilização de *P. pastoris* para a expressão de proteínas heterólogas apresenta várias vantagens sobre a utilização de bactérias, como a *E. coli*, tais como: capacidade de produzir proteínas de eucariotos, devido à sua própria natureza de eucarioto; capacidade de controlar a expressão das proteínas através da quantidade de metanol que é fornecida à cultura; alta capacidade de produção de proteínas; e seleção de clones recombinantes através da resistência à Zeocina, um antibiótico de uso exclusivo em pesquisa (INVITROGEN, 2004).

P. pastoris foi estudada nos anos 70 pela empresa Phillips Petroleum Company quando se desenvolveu o conceito de *Single Cell Protein* (SCP) como fonte de proteína para animais, primeiro transformando gás metano em metanol, e logo após transformando o metanol em proteína concentrada como SCP (CREGG, 2008). Atualmente *P. pastoris* é utilizada para a produção dos mais diferentes tipos de proteínas heterólogas, principalmente visando à produção de vacinas. Exemplos de proteínas expressas por *P. pastoris* incluem a fosfolipase C de *Bacillus cereus* (SEO; RHEE, 2004); o antígeno de superfície do *Plasmodium falciparum*, o parasita causador da malária (YADAVA; OCKENHOUSE, 2003); proteínas codificadas pelos genes Ba86, Bd86 e Bm86 de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *R. annulatus* e *R. decoloratus*, carrapatos que afetam animais de zonas intertropicais (CANALES et al., 2008) e oxalato oxidase do gérmen de trigo (PAN et al., 2007). Proteínas estruturais recombinantes do vírus da Dengue também foram produzidas visando a produção de uma vacina (SUGRUE et al., 1997; BISHT et al., 2001; WEI et al., 2003; VALDÉS et al., 2007).

P. pastoris apresenta como característica importante sua grande capacidade de utilização de diferentes fontes nutritivas para o seu cultivo, especialmente aquelas constituídas por efluentes industriais. Schneid et al. (2004) demonstraram que o efluente aquoso gerado no processo de parboilização do arroz continha níveis de nutrientes adequados para o cultivo de leveduras como *S. boulardii*, sendo necessário apenas o acréscimo de carboidratos, como por exemplo, a sacarose comercial. O estudo demonstrou que *S. boulardii* cultivada com efluente de parboilização multiplicou-se mais rapidamente que o grupo controle, demonstrando seu potencial como meio alternativo de cultura para leveduras como *P. pastoris*.

Chen et al. (2000) utilizaram *P. pastoris* recombinante contendo o gene para a expressão do hormônio do crescimento (rGH) como suplemento para a ração de frangos de corte. Essas leveduras utilizadas na suplementação foram submetidas ao processo de expressão via metanol, sendo depois utilizada apenas a levedura seca como suplemento. A biomassa de *P. pastoris* resultante continha pequena quantidade de rGH no interior das células, provavelmente nos peroxissomos, e os animais suplementados apresentaram ganhos de peso significativamente superiores aos do grupo controle suplementados com a levedura nativa.

Esses estudos sugerem que o uso de leveduras pode trazer benefícios à produção animal, pois através da complementação ou suplementação da alimentação com a levedura *P. pastoris*, será possível introduzir outras proteínas no organismo dos animais como forma de estimular seu crescimento e sua imunidade, além de suprir eventuais deficiências nutricionais, que podem aparecer eventualmente em certas dietas.

Leveduras como *S. boulardii* e *S. cerevisiae* apresentam um efeito benéfico em seu hospedeiro, mesmo após inativadas (OEZTUERK et al., 2005). Uma potencial explicação para os efeitos estimulantes de leveduras ou produtos de leveduras pode ser relacionada com a composição da parede celular ou outros conteúdos celulares. A parede celular contém três componentes, chamados de glucanos, manoproteínas e quitina, que representam 20% do peso seco da célula. Isso consiste de uma estrutura de camadas, com uma camada interna constituída de β -1,3 e β -1,6 glucanos, assim como uma pequena quantidade de quitina e manoproteínas, e outra camada constituída de manoproteínas (FLEET, 1991; MOUKADIRI et al., 1997). Estas estruturas são substratos apropriados para a fermentação microbiana no intestino, independente do estado da levedura

(OEZTUERK et al., 2005). É possível que este efeito observado nas leveduras anteriormente citadas seja observado também em *P. pastoris*.

Quando *P. pastoris* é cultivada utilizando como fonte de carbono o metanol, mostra uma grande proliferação de peroxissomos contendo metanol-oxidase e diidroxiacetona sintetase, entre outras enzimas, podendo constituir até 80% do volume da célula (VEENHUIS et al., 1983). Devido a esse grande acúmulo de enzimas, o interesse inicial nessa levedura foi para a produção de SCP, antes que fosse reconhecida sua capacidade como hospedeira de genes heterólogos (CREGG et al., 1993).

Rossanese et al. (1999) sugerem que *P. pastoris* tem um aparelho de Golgi melhor estruturado que *S. cerevisiae*, o qual apresenta esse aparelho disperso. Eles relacionaram esta característica à grande facilidade para exportar as proteínas produzidas verificada em sua célula. Segundo Yamada et al. (2003), que realizaram seu estudo com amostras de *S. cerevisiae* coletadas de destilarias e cervejarias, a parede celular das leveduras representa um problema quando se busca a absorção da proteína deste micro-organismo, devido à elevada resistência que esta parede apresenta à digestão em monogástricos, fato que poderia explicar a facilidade com que as leveduras atingem o intestino, mantendo sua viabilidade. As leveduras, de uma forma geral, apresentam altos índices protéicos e grande quantidade de vitaminas do complexo B, assim como grande quantidade de glucanos, com ligações β -1,3 e β -1,6, provenientes de sua parede, como foi citado anteriormente.

Estudos iniciais visando avaliar a utilização de *P. pastoris* como probiótico foram realizados na Universidade Federal de Pelotas. Em um estudo, foi avaliada a influência de *P. pastoris* e sua variante recombinante contendo o gene da fosfolipase C de *Clostridium perfringens* sobre a eficiência alimentar e a estimulação do sistema imune de frangos de corte contra a toxina α de *C. perfringens*. Animais alimentados com *P. pastoris* selvagem e recombinante apresentaram melhora nos índices de eficiência alimentar (conversão alimentar e ganho de peso), na soroconversão e não apresentaram alterações histopatológicas significativas (STORCH, 2008).

Como probióticos recombinantes, além de apresentarem os efeitos benéficos conhecidos, podem apresentar outras propriedades desejáveis. A utilização da levedura *P. pastoris* como probiótico capaz de expressar proteínas terapêuticas ou imunogênicas de interesse torna-se atrativa. Porém, primeiramente

deve ser comprovado o seu efeito probiótico, ou pelo menos sua inocuidade, ao ser administrada em animais.

3.4 *Salmonella*

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, pertencem à família *Enterobacteriaceae* e fermentam a glicose, reduzem nitrato a nitrito e possuem flagelos peritríquios (exceção *Salmonella Pullorum* e *Gallinarum*). A *Salmonella* foi isolada em 1885 por Daniel Salmon, um veterinário americano e, desde então, dados da OMS de 2004, listam 2501 diferentes sorotipos (WHO, 2011). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhi e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Paratyphi são os agentes da febre tifóide e paratifóide nos seres humanos, infecções que se tornam um problema de saúde pública, principalmente em regiões onde há pouco ou nenhum acesso a água potável e onde o tratamento de águas é insatisfatório.

Embora todos os sorotipos de *Salmonella enterica* possam causar doenças em seres humanos, geralmente uma infecção alimentar que resulta em gastroenterite, eles são classificados de acordo com sua adaptação aos hospedeiros. Alguns sorotipos possuem um limitado espectro de hospedeiros, como por exemplo, *Salmonella* Typhi em primatas, *Salmonella* Dublin em gado e *Salmonella* Choleraesuis em suínos. Quando esses sorotipos causam doença em seres humanos, esta costuma ser de forma invasiva. A maioria dos sorotipos, entretanto, possui um amplo espectro de hospedeiros. Classicamente eles causam gastroenterite que, na maioria das vezes, se resolve sem uso de antibióticos (SALEZ; MALO, 2004) e que precisa de tratamento específico apenas em crianças, idosos e indivíduos imunodebilitados. Esse grupo compreende *Salmonella* Enteritidis

e *Salmonella* Typhimurium, os dois principais sorotipos transmitidos do animal para o homem (WHO, 2011).

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

As infecções por *Salmonella* acometem, geralmente, o trato digestivo. Em camundongos, a *S. Typhimurium* causa uma doença sistêmica acompanhada de sintomas semelhantes à febre tifóide causada pela *Salmonella* Typhi em seres humanos, independente da via de infecção. Classicamente, a cinética da infecção em camundongos se caracteriza por quatro fases. A primeira se traduz pela rápida eliminação de bactérias séricas. Durante a semana seguinte à infecção, a *Salmonella* se replica ativamente dentro de células fagocitárias. Essa fase precede uma fase de platô, caracterizada pelo reconhecimento de certos patógenos, por motivos moleculares específicos, pelas células mononucleadas da linhagem fagocitária. Isso resulta na produção de várias citocinas (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IFN-g) e uma infiltração massiva de monócitos e de neutrófilos polinucleares nos locais de inflamação. Na quarta fase da infecção se instala a defesa inflamatória adquirida, fazendo intervir as células B e T, assim como os fatores humorais que dela decorrem (SALEZ; MALO, 2004).

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

Após sua ingestão e passagem pelo estômago, a *Salmonella* coloniza o intestino, interagindo e translocando através do epitélio intestinal, via três rotas: (i)

invasão ativa dos enterócitos, (ii) invasão das células M e, (iii) pelas células dendríticas que intercalam as células epiteliais (GRASSL; FINLAY, 2008). As bactérias, aderidas à superfície das células epiteliais, induzem degeneração nas microvilosidades do enterócito. Posteriormente, projeções citoplasmáticas das células do hospedeiro circundam as bactérias até que elas fiquem contidas em vacúolos envoltos por membrana. Ocorre, então, a reconstituição da borda em escova dos enterócitos. A *S. Typhimurium* induz rearranjos na membrana celular como parte do processo de internalização (FRANCIS et al., 1992).

Ainda a *S. Typhimurium* pode aderir e invadir diferentes linhagens celulares de mamíferos, incluindo células HeLa (GIANELLA et al., 1973), células Hep-2 (SNALL et al., 1987) e células Henle (ALTMAYER et al., 1993).

Em camundongos inoculados intragastricamente, observou-se que o sítio primário de colonização por *Salmonella enterica* é o íleo terminal (CARTER; COLLINS, 1974). Também foi observado que a *Salmonella* interagia, preferencialmente, com as células das placas de Peyer (tecido linfóide associado ao intestino), como é o caso da *S. Typhimurium* (HOHMANN et al., 1978). A bactéria entra, seletivamente, pelas células M do epitélio associado aos folículos linfóides (JONES et al., 1994).

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

Ainda por ser uma bactéria Gram-negativa, a *Salmonella* exprime em sua parede externa o lipopolissacarídeo (LPS), uma molécula extremamente imunogênica. A proteína de ligação ao LPS (LPS-binding protein, LBP) é uma proteína sérica cuja principal característica é apresentar o LPS sob a forma monomérica ao receptor CD14, sua forma livre em solução sendo micelar. Os primeiros trabalhos que colocaram em evidência o papel da LBP, quando da infecção por *S. Typhimurium*, o descreveram como sendo necessário para uma reação inflamatória eficaz para eliminar o patógeno invasivo (JACK et al., 1997). O receptor CD14, presente majoritariamente nos monócitos e macrófagos, é o receptor, por excelência, do LPS. Presente nos organismos sob a forma membranar

(mCD14) e solúvel (sCD14), este possui em seu domínio carboxi-terminal, um sítio de ligação para um grupamento GPI (fosfolípidos), que favorece a ancoragem à membrana celular, mas sem a atravessar, impedindo qualquer contato com o meio citoplasmático e, assim, toda interação molecular permite a transdução do sinal (SALEZ; MALO, 2004).

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

O complexo LPS/LBP pode gerar uma mensagem intracelular via o receptor CD14, por intermédio de uma proteína dotada de um domínio transmembranar, o receptor TLR-4, que reconhece especificamente o LPS. Esse receptor possui um domínio extracelular, rico em leucina, e um domínio intracelular, homólogo ao domínio intracelular do receptor de IL-1 (domínio TIR) (TAKEDA et al., 2003).

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

Em contato com a célula hospedeira, a *Salmonella* estimula sua própria captura pelas células epiteliais. A habilidade dessa bactéria em entrar na célula hospedeira é central para o sucesso da infecção. Para isso ela faz uso de um aparato, conhecido como sistema de secreção do tipo 3 (TTSS, “type three secretion system”), onde ela introduz na célula hospedeira um conjunto de proteínas efetoras que são capazes de mimetizar as funções de várias proteínas da célula hospedeira (GALÁN, 2001). O mecanismo de entrada na célula é caracterizado por um profundo rearranjo do citoesqueleto de actina no local onde a bactéria entra em contato com a célula hospedeira (PATEL; GALÁN, 2005).

Esse remodelamento do citoesqueleto da célula induz a membrana a formar extensões celulares que envelopam a bactéria, conduzindo à entrada da bactéria em

vacúolos ligados à membrana. Essa entrada em células não fagocíticas é absolutamente dependente da liberação de proteínas efetoras específicas introduzidas na célula hospedeira via TTSS codificadas pela ilha de patogenicidade 1 da *Salmonella* (SPI-1, “*Salmonella* pathogenicity island 1”). Esses fatores de virulência funcionam em conjunto para empregar as proteínas da célula hospedeira e promover uma série de eventos que culminam na entrada da bactéria (PATEL; GALÁN, 2005).

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

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

O estudo de salmoneloses em camundongos utilizando a *S. Typhimurium* é um excelente modelo, pois os sintomas provocados por esta bactéria e pela *Salmonella* Choleraesuis são muito semelhantes aos sintomas da febre tifóide

causada pela *S. Typhi* em seres humanos (SALYERS; WHITT, 1994). Os resultados obtidos nestes estudos têm sido extrapolados para a compreensão de vários aspectos da infecção causada pela *S. Typhi*. Em condições experimentais normais, este último sorotipo não é virulento para os camundongos, ou seja, é incapaz de induzir uma doença progressiva neste animal (CARTER; COLLINS, 1974).

3.5 Probióticos e *Salmonella*

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., 2005a) 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).

Trabalhando com uma mistura de probióticos (duas linhagens de *L. murinus*, *L. salivarius* subsp. *salivarius*, *L. pentosus* e *Pediococcus pentosaceus*) para suínos, Casey et al. (2007) observaram que os animais tratados e desafiados com *S. Typhimurium* apresentaram um número menor de ocorrência de diarreia, menor gravidade e duração, além de aumento do ganho de peso, quando comparados com animais controle. Ao contrário do que já havia sido observado em outros trabalhos, eles observaram que essa associação de probióticos possibilitou uma diminuição nos níveis fecais da *Salmonella* em relação ao controle, após 15 dias de infecção, demonstrando que o tratamento possibilitou uma melhora clínica e microbiológica. Theppangna et al. (2006) presumiram que o efeito benéfico dos probióticos contra desafios patogênicos com *Salmonella* pode ser explicado pela inibição do crescimento dos patógenos pela diminuição do pH e pela produção de bacteriocinas e outras substâncias inibidoras de crescimento. Entretanto, vários trabalhos *in vivo*

sugerem que o efeito benéfico é, na grande maioria das vezes, explicado por outros mecanismos como a imunomodulação (NEUMANN et al., 1998; RODRIGUES et al., 2000; LIMA FILHO et al., 2004; SILVA et al., 2004).

No estudo de Promsopone et al. (1998) análises do ceco dos animais experimentais não acusaram diferenças entre os grupos, no que se refere ao pH ou concentrações de acetato ou propionato. Entretanto, um aumento nos níveis de butirato foi observado no ceco dos animais tratados com as duas culturas, em relação ao controle. Promsopone et al. (1998) também observaram uma diminuição nos níveis de *S. Typhimurium* em aves tratadas com *L. acidophilus* e *E. faecium* e também com anticorpos anti-*Salmonella Typhimurium*. Essa diminuição nos níveis de *S. Typhimurium* em animais tratados com *L. acidophilus* e lactose não foi observada por Johannsen et al. (2004), o que demonstra que o efeito benéfico não é oferecido por todos os micro-organismos e que, na grande maioria das vezes, esse efeito é espécie específico.

Trabalhando com uma associação de probióticos para cães, contendo *L. acidophilus*, *E. faecium* e *S. cerevisiae*, Maia et al. (2001), utilizando o modelo de camundongos isentos de germes, observaram que apenas o *E. faecium* promovia uma proteção intestinal e uma menor mortalidade significativa, e que essa proteção não foi devido a uma diminuição dos níveis intestinais de *S. Typhimurium*. Também utilizando o mesmo enteropatógeno, Rodrigues et al. (2000) observaram uma proteção em camundongos isentos de germes e convencionais tratados com *S. boulardii*, e que essa proteção estava intimamente relacionada com a imunomodulação promovida pela levedura. Silva et al. (1999) observaram um efeito protetor de *B. bifidum* contra *S. Typhimurium* e correlacionaram esse efeito a uma capacidade imunomoduladora desse probiótico e uma diminuição da resposta inflamatória.

4 Material e Métodos

4.1 Micro-organismos e condições de cultivo

Os micro-organismos utilizados no presente estudo pertencem ao estoque do Núcleo de Biotecnologia do CDTec, UFPel. Para utilização nos experimentos, a levedura *P. pastoris* cepa X-33 foi cultivada em caldo Yeast Peptone Dextrose (YPD) por 12 h, à 28°C, 150 rpm em agitador orbital. Os enteropatógenos *S. Typhimurium* 8429 e *E. coli* foram recuperados em caldo Luria Bertaine (LB) overnight à 37°C, 150 rpm em agitador orbital.

4.2 Animais

Camundongos BALB/c cedidos pelo Biotério Central da UFPel, com 6 a 10 semanas de idade e peso variando entre 15-20 g, foram mantidos em gaiolas apropriadas contendo cinco camundongos/gaiola, sob temperatura média de 22° C e ciclo de luz de 12 h. Os animais foram alimentados com ração PET específica para roedores isenta de antimicrobianos e água foi fornecida *ad libitum*.

Os camundongos foram tratados e sacrificados de acordo com as normas internacionais e em consonância com os princípios éticos de experimentação animal do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel sob o número do processo nº 23110.001961/2010-70.

4.3 Resistência da levedura *P. pastoris* a condições gastrointestinais simuladas

4.3.1 Resistência a condições gástricas simuladas

Para simular as condições gástricas, 8 log UFC.mL⁻¹ da levedura foram incubadas a 37°C sob agitação constante para simular a peristalse (150 rpm) por 1 h em tubos contendo 10 mL de caldo YPD acidificado a pH 2 com 0,1 N HCl e suplementado com 1 mg.mL⁻¹ de pepsina (DUC et al., 2004, com modificações). Tubos contendo YPD com pH ajustado a 7,2 foram incluídos como controles. Alíquotas de 0,1 mL foram coletadas após 1 h e diluídas em série decimal em solução salina 0,9%. Contagens das leveduras viáveis foram determinadas através do plaqueamento de 0,1 mL das diluições dos cultivos em ágar YPD e incubação das placas a 30°C por 48 h. A taxa de sobrevivência foi calculada como a porcentagem do log do número de UFCs que cresceram nas placas após a exposição às condições gástricas simuladas em relação à concentração inicial da levedura (log UFC.mL⁻¹). O experimento foi realizado em triplicata.

4.3.2 Resistência a condições intestinais simuladas

Para simular as condições intestinais, 8 log UFC.mL⁻¹ da levedura foram incubadas a 37°C a 150 rpm por 5 h (para simular a peristalse) em tubos contendo caldo YPD suplementado com 1 mg.mL⁻¹ de pancreatina, 0,2% de sais biliares e com o pH ajustado a 8 com 0,1N NaOH (DUC et al., 2004, com modificações). Tubos contendo YPD com pH ajustado a 7,2 foram incluídos como controles. Alíquotas de 0,1 mL foram coletadas após 5 h e diluídas em série decimal em solução salina 0,9% pH 7,2. Contagens das leveduras viáveis foram determinadas através do plaqueamento de 0,1 mL das diluições dos cultivos em ágar YPD e incubação das placas a 30°C por 48 horas. A taxa de sobrevivência foi calculada como a porcentagem do log do número de UFCs que cresceram nas placas após a

exposição a condições intestinais simuladas em relação à concentração inicial da levedura (log UFC.mL⁻¹). O experimento foi realizado em triplicata.

4.3.3 Resistência consecutiva a condições gástricas e intestinais simuladas

Aproximadamente 8 log UFC.mL⁻¹ da levedura foram suspensas em 10 mL da solução que simula o fluido gástrico. Os tubos, em triplicata, foram incubados a 37°C sob agitação constante para simular a peristalse. Tubos contendo YPD com pH ajustado a 7,2 foram incluídos como controles. Após 1 h de incubação, as suspensões foram centrifugadas a 7000g por 10 min e 10 mL da solução que simula o fluido intestinal foi adicionado aos *pellets* celulares. Após incubação por 5 h, alíquotas de 0,1 mL foram coletadas, diluídas em série decimal em solução salina 0,9%, pH 7,2 e contagens das leveduras viáveis foram determinadas através do plaqueamento de 0,1 mL das diluições decimais dos cultivos em ágar YPD e incubação das placas a 30°C por 48 h. A taxa de sobrevivência foi calculada como a porcentagem do log do número de UFCs que cresceram nas placas após a exposição a condições gastrointestinais simuladas em relação à concentração inicial da levedura (log UFC.mL⁻¹). O experimento foi realizado em triplicata.

4.3.4 Resistência da levedura *P. pastoris* ao trato gastrointestinal de camundongos, persistência, disseminação e segurança da utilização de *P. pastoris* como probiótico

Uma única dose oral contendo 7,17 log UFC de *P. pastoris* foi administrada a camundongos (Balb/c fêmeas de 6 semanas) alimentados com ração sem antimicrobianos através de gavagem. Fezes foram coletadas 24, 48 e 72 h após a administração da levedura e diluídas em série decimal em solução salina a 0,9%. Para avaliar a resistência da levedura *P. pastoris* ao trato gastrointestinal de camundongos e sua persistência, contagens de UFCs totais por grama de fezes frescas foram determinadas através do plaqueamento das diluições seriais das fezes

em placas contendo ágar YPD. Para avaliar a ocorrência de disseminação de *P. pastoris* e para avaliar a segurança da sua utilização como probiótico, camundongos foram eutanasiados, amostras de tecidos e órgãos foram coletadas e análises histopatológicas dos órgãos (baço, fígado e intestino) foram realizadas no Departamento de Histologia da Universidade Federal de Pelotas. Animais não inoculados com a levedura serviram como controle das análises.

4.3.5 Resistência da levedura *P. pastoris* ao armazenamento em solução sob refrigeração

Para utilização neste experimento, colônias de *P. pastoris* cepa X-33 isoladas em ágar YPD foram cultivadas *overnight* em 10 mL de caldo YPD em balão aletado, a 28°C, em agitador orbital (150 rpm). Cinco mililitros desta solução foi adicionada a 45 mL de caldo YPD e a solução foi incubada em agitador orbital a 150 rpm a uma temperatura de 28°C por 12 horas. Após, 20 mL dessa solução foi adicionada a 180 mL de caldo YPD, incubada nas mesmas condições por 12 h, dividida em duas frações e centrifugada a 3000 rpm por 10 min. Um pellet foi ressuspensão em 50 mL de solução salina 0,9% e o outro em 50 mL de solução salina tamponada fosfatada (PBS), pH 7,2. Por fim, os tubos foram armazenados em câmara fria sob uma temperatura de 4°C por até 70 dias.

Para aferir a resistência da levedura em solução sob refrigeração, 50 µL das duas soluções foram plaqueadas em placas de Petri contendo ágar YPD, utilizando a técnica de espalhamento com alça de Drigalski. Após a confirmação da viabilidade, foram feitas diluições em série decimal e contagens em duplicata, a cada 48 horas durante os primeiros 30 dias, e a cada 7 dias após o trigésimo dia. As placas foram incubadas a 30°C por 48 h. A taxa de sobrevivência foi calculada como a porcentagem do log do número de UFCs que cresceram nas placas após a exposição à armazenagem em solução sob refrigeração em relação à contagem inicial.

Para avaliar a resistência da *P. pastoris* ao trato gastrointestinal de camundongos após 70 dias de armazenamento em solução sob refrigeração, camundongos BALB/c machos de 6 semanas de idade foram inoculados por

gavagem com uma única dose da levedura suspensa nas soluções armazenadas sob essas condições. Um grupo composto de dois animais recebeu 0,3 mL da solução salina contendo $9,36 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$ da levedura armazenada sob refrigeração e outro recebeu 0,3 mL da solução contendo $9,72 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$ da levedura suspensa em PBS. Fezes foram coletadas 24 h após a administração da levedura, diluídas em série decimal em solução salina a 0,9% e contagens de UFCs totais por grama de fezes frescas foram determinadas através do plaqueamento das diluições seriadas das fezes em placas contendo ágar YPD.

4.4 Reaproveitamento de caldo Yeast Peptone Dextrose (YPD) para cultivo de *P. pastoris*

As colônias de *P. pastoris* foram cultivadas em 10 mL de caldo YPD e incubadas *overnight* a 28°C em um agitador orbital a 150 rpm. Cinco mililitros desta solução foram transferidos para 45 mL de caldo YPD produzindo-se o pré-inóculo. Do pré-inóculo, 20 mL foram adicionados a 180 mL de caldo YPD e incubado nas mesmas condições por 12 h. Este cultivo (total 200 mL) foi aliqotado em tubos contendo 20 mL e armazenado em câmara fria, para ser utilizado como inóculo nos testes de reutilização do meio.

O cultivo foi realizado em duplicata através da adição de 20 mL do inóculo em Erlenmeyer de 1000 mL contendo 180 mL de caldo YPD devidamente esterilizado e incubação a 28°C em agitador orbital a 150 rpm por 12 horas. Após o primeiro cultivo de 12 horas, centrifugaram-se as células a 5000 g, a 20°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi adicionado a um novo Erlenmeyer e 20 mL do inóculo previamente preparado e armazenado em câmara fria foi acrescido e cultivado nas mesmas condições do primeiro cultivo. Este procedimento foi repetido por seis vezes.

As células obtidas nos pellets foram lavadas duas vezes sendo resuspensas em água destilada e centrifugadas novamente a 5.000 g, a 20°C durante 10 minutos. Após a segunda lavagem os pellets foram ressuspensos em 45 mL e a DO da suspensão foi medida em triplicata efetuando-se diluições de forma a obter-se um

valor entre 0,2 e 0,8 para formação da curva de linearidade. A biomassa foi calculada usando-se a equação padrão Massa seca (g) = $0,0002 \cdot DO - 1 \cdot 10^{-5}$.

4.5 Teste de inibição do crescimento de *S. Typhimurium* e *E. coli* em meios de cultura

A interferência da levedura *P. pastoris* no crescimento de *S. Typhimurium* e *E. coli* foi avaliada utilizando-se metodologia descrita por Drago et al. (1997), com modificações, através da incubação de 10^6 células de cada cepa patogênica e da levedura um tubo contendo 10 ml de caldo YPD e em outro contendo 10 ml de caldo LB. Cultivos puros de cada micro-organismo foram utilizados como controles. Os tubos foram cultivados a temperatura de 37°C sob agitação de 150 rpm. Após 0, 4, 8 e 24 horas, alíquotas foram coletadas, diluídas em série decimal e plaqueadas em duplicatas para determinação do número de células viáveis de cada micro-organismo. Para a contagem da levedura foi utilizado ágar Batata Dextrose (BDA) pH 5,2, para contagem de *E. coli* foi utilizado ágar Eosina Azul de Metileno (BEM)-Levine e para contagem de *S. Typhimurium*, ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD).

4.6 Avaliação do efeito de *P. pastoris* sobre a sobrevivência de camundongos infectados por *S. Typhimurium*

S. Typhimurium 8429 foi utilizada para a determinação da dose mínima necessária para provocar a morte de pelo menos 50% da população (DL50). *S. Typhimurium* armazenada em glicerol a 20% a -80 °C (50 µL) foi cultivada em 950 µL de caldo LB e o cultivo incubado a 37 °C, sob agitação de 200 rpm, por 18 h. Após este período, o 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 o *pellet* ressuspenso em 1 mL de solução salina (NaCl 0,9%) estéril. A solução foi diluída em série decimal e a D.O. das diluições foram lidas em espectrofotômetro a 600 nm para quantificação do número de células presentes em cada diluição.

A DL 50 foi determinada conforme Método de Reed e Munch (JOSEPH, et al., 1966). Resumidamente, camundongos BALB/c fêmeas, de 6 a 8 semanas de idade, obtidos do Biotério Central da UFPel, foram divididos em grupos de 4 animais e inoculados via oral, com 200 µL de cada uma das diluições seriadas contendo aproximadamente 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 células de *S. Typhimurium*. Os animais foram monitorados diariamente para determinação da DL 50.

Para avaliar o efeito de *P. pastoris* sobre a sobrevivência de camundongos infectados por *S. Typhimurium*, um grupo composto de 27 camundongos BALB/C com 7 semanas recebeu doses orais diárias contendo 1×10^8 UFC.mL⁻¹ de *P. pastoris* por gavagem durante 20 dias e outro grupo (controle) recebeu solução salina a 0,9%. No 10º dia após o início da administração da levedura, os camundongos foram desafiados por gavagem com a DL 50 da *S. Typhimurium* utilizada (10^4 UFC.mL⁻¹) e monitorados diariamente quanto à sintomatologia e a ocorrência de morte.

4.7 Análises Histopatológicas

Amostras do baço, fígado e intestino foram coletadas em condições assépticas e 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 preparadas e avaliadas no Departamento de Histologia da UFPel quanto à presença ou ausência de lesão.

4.8 Estatística

O teste de Tukey foi utilizado determinar diferenças significativas $p \leq 0,05$ entre as médias.

5 Resultados e Discussão

Nas últimas décadas, o interesse pelo uso de probióticos para a prevenção ou como complemento ou alternativa no tratamento de um grande número de distúrbios gastrointestinais vem aumentando. Isso se deve, principalmente, ao estímulo da Organização Mundial da Saúde (OMS) para utilização de probióticos como alternativa ao uso dos antibióticos, visando evitar a seleção de bactérias resistentes (VIEIRA et al., 1998).

Probióticos podem agir de diversas formas contra enteropatógenos. Mecanismos de ação direta incluem a competição por sítios de adesão; produção de substâncias antimicrobianas, que apresentam efeito inibitório ou letal para o patógeno como bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos; competição por nutrientes; adsorção às bactérias e/ou suas toxinas; e inibição da produção ou ação de toxinas microbianas (CZERUCKA et al., 1994; BRANDÃO et al., 1998). Mecanismos de ação indireta incluem a modulação da microbiota intestinal ou do sistema imune do hospedeiro (KAILA et al., 1992) e o estímulo do peristaltismo e da maturação e renovação das células epiteliais do cólon (MCFARLAND, 2000).

Teoricamente, qualquer organismo não patogênico, como bactérias, leveduras, fungos ou protozoários, poderá ser um candidato potencial para uso como probiótico. Entretanto, a maioria dos probióticos comercializados são bactérias, principalmente lactobacilos e bifidobactérias; foram isoladas de humanos saudáveis; possui alguns de seus mecanismos de ação desvendados; e foi avaliada em ensaios experimentais e clínicos.

Atualmente, apenas duas leveduras são usadas como probióticos, *S. boulardii* na medicina humana e *S. cerevisiae* na medicina veterinária. As vantagens de se trabalhar com leveduras são que elas podem ser liofilizadas, podem ser utilizadas como fonte de proteína em rações animais, apresentam elevada produtividade a partir de substratos de baixo custo, são rapidamente eliminadas após interrupção da terapia e não são afetadas pelo uso de antibacterianos (BLEHAUT et al., 1989; BODDY et al., 1991). Esta última propriedade é importante, pois permite a associação entre probióticos e antibacterianos em terapias onde a

utilização de drogas é indispensável como, por exemplo, no tratamento da infecção por *Helicobacter pylori* (ARMUZZI et al., 2001).

A levedura *S. boulardii* passou a ser comercializada a partir de 1960 pelo “Laboratoires Biocodex” (Montrouge, França). Assim, seu uso como medicação para combate às diarreias foi difundido em toda Europa. Atualmente, a levedura é amplamente comercializada na Europa, América do Sul e do Norte, Ásia e África (MCFARLAND; BERNASCONI, 1993). Os direitos de comercialização para a América do Sul foram adquiridos pelas Indústrias Químicas da MERCK S.A. (MARTINS et al., 2005b). Entretanto, preparações de *S. boulardii* disponíveis no Brasil, por serem medicamentos patenteados, são de valor elevado. Assim, levando-se em consideração que os principais casos de diarreia ocorrem em pessoas de baixa renda, seria de grande interesse a seleção de uma nova levedura, a custos mais acessíveis.

P. pastoris x-33, confirmando seu efeito probiótico, apresentará várias vantagens, quando comparada a *S. boulardii* e a *S. cerevisiae*, por apresentar uma elevada produtividade (de até 130 g por litro de cultivo) e por crescer em meios de cultivo de baixo custo ou alternativos, como meios contendo resíduos industriais. Dessa forma, viabilizará uma produção a baixos custos e auxiliará na solução de problemas ambientais. Além disso, por ser um sistema de expressão de proteínas recombinantes estabelecido, poderá ser utilizado como um probiótico recombinante. Assim, poderá expressar, por exemplo, proteínas terapêuticas ou imunogênicas de interesse e atuar como veículo vacinal. A última aplicação é de grande interesse para uso em humanos e animais, pois estimularia a produção de IgAs de mucosa específicas, melhorando a resposta imune contra enteropatógenos. Seria de grande importância também em medicina veterinária, pois sua administração evitaria estresses aos animais conferindo um maior ganho de peso. Assim, no presente estudo, o potencial probiótico de *P. pastoris* foi avaliado utilizando ensaios *in vitro* e *in vivo*. Como ensaios *in vivo* são demorados e envolvem a utilização de um grande número de animais, inicialmente, são realizados testes *in vitro* para avaliar candidatos a probióticos. Um procedimento *in vitro* geralmente descrito na literatura é a avaliação da capacidade do micro-organismo resistir a condições simuladas encontradas no trato gastrointestinal.

Para desenvolver seu potencial efeito benéfico, um probiótico deve chegar viável, metabolicamente ativo e em quantidades adequadas ao ecossistema onde

sua ação é esperada. Assim, ele deve resistir a uma variedade de condições adversas simultâneas e seqüenciais ao longo do trato gastrointestinal do hospedeiro. Este problema é particularmente importante quando o probiótico não é originado do trato digestivo de mamíferos, como *P. pastoris*. Neste trabalho, a resistência da levedura *P. pastoris* às adversidades do trato gastrointestinal foi avaliada. A levedura foi submetida a simulações das condições gástricas, intestinais e gastrointestinais.

A primeira grande barreira biológica que o micro-organismo enfrenta após a sua ingestão é o suco gástrico, cujo efeito inibitório está relacionado ao baixo pH. O pH no estômago é de 0,9, mas a presença de alimentos eleva esse pH a 3,0 (ERKKILA; PETAJA, 2000) e pode tamponar a solução onde o probiótico ingerido está, conferindo um efeito protetor (CONWAY et al., 1996).

Os resultados demonstraram que esta levedura é capaz de resistir a ação do baixo pH do suco gástrico e da enzima digestiva pepsina, pois sua porcentagem de sobrevivência quando exposta a condições gástricas simuladas foi de 80,5% (Figura 1). A elevada tolerância ácida apresentada por *P. pastoris* foi também observada em cepas de *S. cerevisiae* isoladas de alimentos, bebidas e fezes (ÁGARWAL et al., 2000; PSOMAS et al., 2001; KÜHLE et al., 2005). No estudo de Pennacchia et al. (2008), 20 das 22 cepas de leveduras isoladas de alimentos apresentaram uma porcentagem de sobrevivência superior a 90% quando expostas a um ambiente ácido (pH 2,5 por 2,5 h). Dentre essas cepas, uma foi identificada como *Pichia galeiformis* / *membranifaciens* / *manshurica* e apresentou uma porcentagem de sobrevivência de 99,9%. Todas as 12 linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de diferentes fontes avaliadas por Martins et al. (2005a) apresentaram uma elevada viabilidade (variando de 94 a 109%) quando expostas as mesmas condições e todas as 18 cepas de *S. cerevisiae* e oito de *S. boulardii* avaliadas por Kühle et al. (2005), sobreviveram após 4 h de incubação a pH 2,5.

Três estudos investigaram a influencia do pH sobre a viabilidade de *S. boulardii* (FIETTO et al., 2004; GRAFF et al., 2008). Enquanto um desses estudos concluiu que *S. boulardii* resistiu ao baixo pH do estômago, pois a porcentagem de viabilidade foi mantida em 75% após 60 min a pH 2 (FIETTO et al., 2004), os outros dois estudos encontraram que menos de 1 % das células de *S. boulardii* sobreviveram após 120 min. a pH 1,1 (GRAFF et al., 2008; VANHEE et al., 2010).

Após sobreviver as condições gástricas, o probiótico deve resistir às condições intestinais, que incluem a presença de sais biliares e de enzimas

digestivas, representadas pela pancreatina, uma mistura de várias enzimas digestivas produzidas pelas células exócrinas do pâncreas, além de um pH alcalino. Os sais biliares apresentam, além da função detergente, um mecanismo de defesa específico (MARTEAU et al., 2001) e inespecífico (KALAMBAHETI et al., 1994) do intestino. Assim, a bile é crítica para as membranas celulares de micro-organismos que são compostas de lipídeos e ácidos graxos (ERKKILA; PETAJA, 2000) e a eficácia de seu efeito inibitório é primariamente determinada pela concentração dos sais biliares (CHARTERIS et al., 2000).

Embora a concentração da bile no TGI varie, a concentração média intestinal usada para o screening de probióticos resistentes é entre 0,2 e 0,3% (GILLILAND et al., 1984). A levedura foi incubada a 37° C nessas condições por 5 h, pois segundo Read et al. (1986), em humanos, o tempo médio de permanência no intestino delgado é de 4 h. *P. pastoris*, também demonstrou uma tolerância satisfatória à exposição aos sais biliares, pancreatina e ao pH alcalino encontrado no ambiente intestinal, visto que sua porcentagem de sobrevivência quando exposta a condições intestinais simuladas foi de 92,7% (Figura 1). No estudo de Kühle et al. (2005) todas as 18 cepas de *S. cerevisiae* e as oito de *S. boulardii* apresentaram boa resistência aos sais biliares após 4 h de incubação.

Como o trânsito de micro-organismos no trato gástrico e intestinal é consecutivo, é importante determinar a sobrevivência das cepas às condições intestinais (do suco intestinal) após uma pré-exposição às condições gástricas (do suco gástrico). No presente estudo, *P. pastoris* foi capaz de resistir às condições do TGI em um número suficiente para exercer um efeito benéfico *in situ*, pois sua porcentagem de sobrevivência à exposição consecutiva às condições gástricas e intestinais foi de 76,8% (Figura 1). Já no estudo de Pennachia et al. (2008), as cepas de leveduras isoladas de alimentos apresentaram diferentes comportamentos quando expostas a condições intestinais simuladas (0,3% de sais biliares e 0,1% de pancreatina por 5 h) após 2,5 h de pré-exposição ao suco gástrico. Somente 10 das 22 cepas isoladas apresentaram uma boa porcentagem de sobrevivência (de 71,5 a 94%) e a *Pichia* isolada apresentou porcentagem de sobrevivência superior a 90%. No estudo de Kühle et al. (2005), as 26 cepas de *S. cerevisiae* analisadas foram capazes de crescer na presença de 0,3% de sais biliares, com um retardo no crescimento quando a exposição excedeu 4 h. Psomas et al. (2001) encontraram que cepas de leveduras isoladas de fezes de recém-nascidos toleraram até 1% de

sais biliares, enquanto que cepas isoladas de queijo apresentaram um comportamento diferente, pois na presença de sais biliares, algumas não cresceram e outras demonstraram uma redução no crescimento quando a porcentagem de sais biliares aumentou de 0,1 para 1%. Ágarwal et al. (2000) observaram a sobrevivência das 9 cepas de *S. cerevisiae* testadas mesmo quando a concentração de sais biliares atingiu 0,9%. Entretanto, Ágarwal et al. (2000), Psomas et al. (2001) e Kühle et al. (2005), investigaram a exposição somente a sais biliares sem adicionar pancreatina (PENNACCHIA et al.2008). Em outros estudos, os quais avaliaram *S. boulardii* e *cerevisiae*, 8 cepas de *Lactobacillus* e 4 cepas de *Bifidobacterium*, as mortalidades variaram de 30 a 50 % em uma hora (DEL PIANO et al., 2008; MARTINS, 2005a; GRAFF et al., 2008).

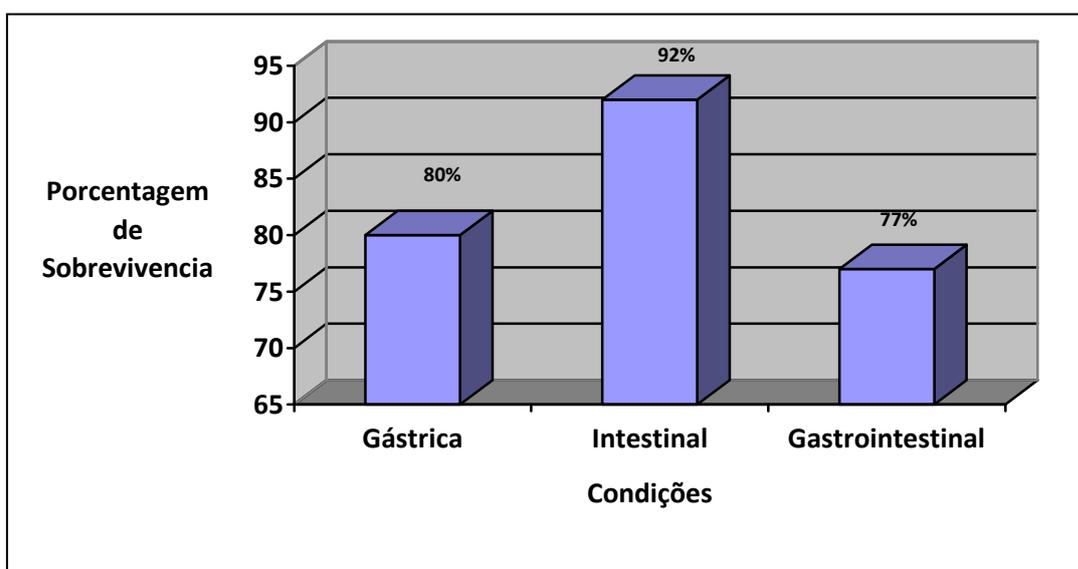


Figura 1 – Porcentagem de sobrevivência da levedura *P. pastoris* às condições gastrointestinais simuladas.

Como resultados obtidos em experimentos *in vitro* não podem ser extrapolados para a situação *in vivo*, experimentos utilizando modelos animais devem ser realizados. Por isso, foram realizadas as avaliações da resistência da levedura *P. pastoris* ao trato gastrointestinal de mamíferos, da sua persistência e disseminação e da segurança da sua utilização como probiótico, utilizando como modelo animal camundongos.

Como dito anteriormente, para um probiótico desenvolver seus benefícios ao hospedeiro, entre eles a proteção contra a invasão por enteropatógenos, ele deve chegar viável e em quantidades adequadas (10^6 a 10^7 UFC), segundo Charteris et

al. (1998), ao local da infecção. Por isso, a resistência da levedura *P. pastoris* ao trato gastrointestinal de camundongos foi avaliada. *P. pastoris* apresentou uma elevada sobrevivência à passagem através do TGI dos camundongos 24 h após a sua administração, visto que foi obtida uma contagem de $6,9 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ de fezes frescas. Já 48 h após a sua administração, foi obtida uma contagem de $7,5 \times 10^2$ UFC.g⁻¹, e após 72 h não houve crescimento (Figura 2). Confirmou-se que a levedura *P. pastoris* é capaz de resistir às condições do TGI de camundongos e chegar viável, metabolicamente ativa e em quantidades adequadas ao ecossistema onde sua ação é esperada após 24 h de administração. Podemos concluir, também, que a levedura deve ser fornecida uma vez a cada 24 h para se manter em quantidades adequadas no hospedeiro.

Leveduras, em geral, são eliminadas do TGI do hospedeiro pela microbiota intestinal. Entretanto existem diferenças em sua taxa de eliminação. A levedura *S. boulardii* também precisa ser administrada de maneira repetida e regular, pois não coloniza o trato digestivo e é progressivamente eliminada pela microbiota normal presente no intestino dos animais (FULLER, 1992). Dois a cinco dias após a descontinuação do seu uso, ela não é mais encontrada nas fezes (BLÉHAUT et al., 1989). Tiago et al. (2009), ao avaliarem 103 leveduras não-Saccharomyces como candidatas a probióticos, entre elas 48 pertencentes ao gênero *Pichia* (*Pichia farinose*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia Kluyveri*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia silvícola*), observaram diferenças nas taxas de eliminação. A melhor performance foi obtida por três delas (*Pichia kluyveri*, *Metschnikowia reukaufii* e *Zygosaccharomyces fermentati*), as quais não foram mais encontradas nas fezes 4 dias após a interrupção do tratamento. As leveduras *Pichia membranifaciens* e *Debaryomyces hansenii* não foram capazes de competir com a microbiota intestinal e de se estabelecerem no TGI dos camundongos e *Pichia guilliermondii* foi eliminada um dia após a interrupção do tratamento.

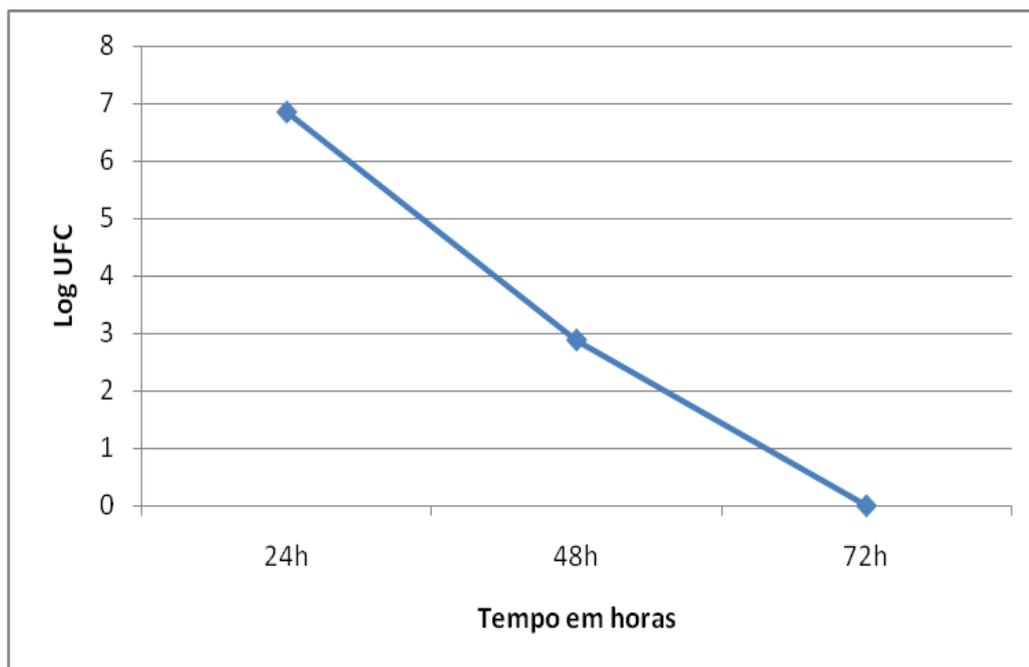


Figura 2 – Níveis populacionais de *P. pastoris* nas fezes de camundongos até 72h após a administração de uma dose oral contendo 7,17 log UFC.

Além dos probióticos resistirem às adversidades do TGI, estes não podem causar lesões ou infecções nos seus consumidores. Não podem invadir o epitélio, nem liberar substâncias que possam alterar ou prejudicar o hospedeiro. Por isso, a inocuidade da utilização de *P. pastoris* como probiótico foi avaliada através da avaliação histopatológica dos órgãos dos animais alimentados com ela. O exame histopatológico dos órgãos confirmou que *P. pastoris* não causou nenhuma lesão histológica em nenhum dos órgãos analisados. Os órgãos avaliados não apresentaram modificações morfológicas ou presença da levedura no seu parênquima. As microvilosidades intestinais também não apresentaram modificações comparadas as do grupo controle. Também não foram encontradas alterações na lâmina própria (Figura 3).

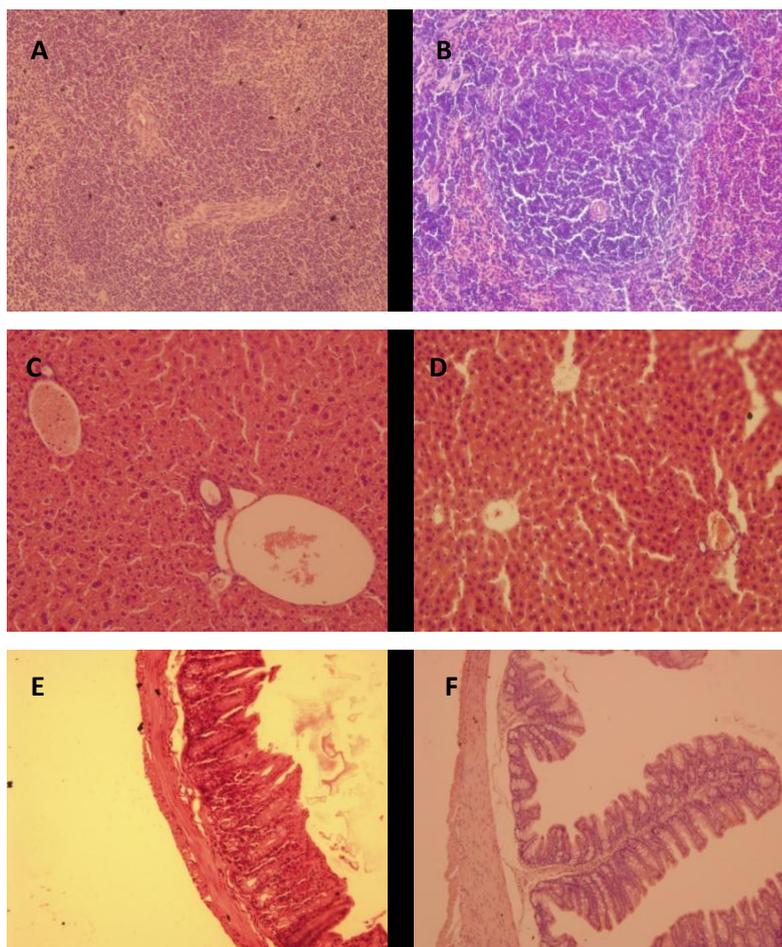


Figura 3 – Aspectos histopatológicos do baço (A e B), fígado (C e D) e intestino (E e F) de camundongos controle (A, C e E) ou tratados (B, D e F) com *P. pastoris*.

A sobrevivência de probióticos no produto alimentício é fundamental. O micro-organismo precisa alcançar populações suficientemente elevadas (tipicamente acima de 10^6 UFC.mL⁻¹ ou g) para ser de importância fisiológica ao consumidor (JELEN; LUTZ, 1998) e o consumo de quantidades adequadas deles (10^9 a 10^{10} UFC / 100 g de produto) são suficientes para a manutenção das concentrações ativas fisiologicamente (CHARTERIS et al., 1998).

Para que um probiótico entre no mercado de alimentos funcionais, ele deve atender a algumas exigências, entre elas a resistência às condições em que será armazenado (SANDERS, 2003). A grande maioria dos produtos contendo probióticos disponíveis comercialmente é encontrada na forma líquida e é armazenada sob refrigeração. Por isso, a resistência da levedura *P. pastoris* ao armazenamento em solução sob refrigeração e à passagem através do trato gastrointestinal de mamíferos após 70 dias de armazenamento, utilizando camundongos como modelo animal, foi avaliada.

As contagens de *P. pastoris* se mantiveram estáveis durante todo o período de armazenamento, apresentando uma taxa de sobrevivência de 100% após 70 dias de refrigeração em ambas as soluções (Tab. 1). Esses resultados sugerem que a levedura apresenta uma elevada resistência ao armazenamento em solução sob refrigeração.

Em relação à resistência de *P. pastoris* à passagem através do TGI de camundongos após 70 dias de armazenamento, foi observado que *P. pastoris* apresentou uma elevada sobrevivência 24 h após a sua administração, visto que foi obtida uma contagem de 8,23 log e 9,53 UFC.g⁻¹ de fezes frescas das leveduras armazenadas na solução salina e no PBS respectivamente. Esses resultados sugerem que a levedura apresenta uma elevada resistência ao trato gastrointestinal de camundongos, mesmo após 70 dias de armazenamento.

Tabela 1 – Taxas de sobrevivência de *P. pastoris* em duas soluções após 70 dias de refrigeração

Soluções	Taxas de sobrevivência (%)
Solução salina	99
PBS	100

Martins et al. (2009), avaliando o número de células viáveis em cinco produtos probióticos (quatro contendo *S. boulardii* liofilizado e um contendo *S. cerevisiae* em suspensão aquosa), bem como sua recuperação e sobrevivência no TGI de camundongos, observaram que o produto conservado em suspensão apresentou baixas contagens e não foi recuperado a partir do intestino dos camundongos. De acordo com Morgan et al. (2006), esse resultado era esperado, pois a armazenagem de probióticos por longos períodos em solução aquosa não é recomendada e deve ser utilizada somente para produtos probióticos contendo bactérias esporuladas (*Bacillus*). Por isso, testes de estabilidade para avaliar a influencia da armazenagem dos probióticos devem ser realizados.

No estudo de Vanhee et al. (2010), a qualidade de 15 produtos probióticos contendo *S. boulardii* foi avaliada e somente menos de 1% das células de *S. boulardii* sobreviveram ao armazenagem por 3 meses a 40° C a 75% de umidade relativa. Esses resultados demonstraram a influencia considerável da temperatura e

umidade sobre a sobrevivência de *S. boulardii* e a importância do armazenamento adequado dos produtos.

P. pastoris apresenta capacidade de utilização de diferentes fontes nutritivas para o seu cultivo, até mesmo daquelas constituídas por efluentes industriais. Um dos meios de cultura comumente utilizados no nosso laboratório para o cultivo de *P. pastoris* é o YPD. Este meio contém extrato de levedura, peptona e dextrose, caracterizando-se por ser um meio rico e com um custo de aproximadamente R\$ 9,17 por litro de meio. Visando uma economia laboratorial e, futuramente, industrial, a possibilidade de reaproveitamento do caldo YPD para cultivo de *P. pastoris* foi avaliada por seis reutilizações e o seu rendimento em massa foi acompanhado.

Os rendimentos em peso de massa seca (g.L^{-1}) dos sete cultivos de *P. pastoris* testados indicam que não houve diferença significativa entre o primeiro e o segundo cultivo, o mesmo ocorrendo entre o segundo e quarto cultivo. No quinto e sexto cultivos, os dados apresentados são referentes a um único balão, não podendo ser usados nos testes estatísticos, porém apresentaram dados muito semelhantes aos obtidos nos terceiro e quarto cultivos. Ressalta-se que neste caso os valores de produção estão relacionados à utilização de agitador orbital (Tabela 2).

Tabela 2 – Rendimento em peso de massa seca de *P. pastoris* (g.L^{-1}) após cada reaproveitamento do caldo YPD.

Amostras (cultivos)	Média em peso de massa seca (g.L^{-1})
1	7,5 ^a
2	6,71 ^{a,b}
3	5,91 ^b
4	6,15 ^b
5	6,29*
6	5,9*

Obs.: Os dados com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). *Nestes experimentos apresentam-se os valores de massa de somente um Erlenmeyer

Os dados obtidos demonstram que o meio não se esgota como fonte de nutrientes para o desenvolvimento da levedura *P. pastoris* mesmo após seis reutilizações. Observando estes resultados pode-se extrapolar uma economia para diferentes projetos de pesquisa ou até para nível industrial, não apenas para a

produção de probiótico, mas também em trabalhos em que a levedura é utilizada como sistema de expressão de proteínas heterólogas, que também são desenvolvidas no CDTec/UFPel.

Um litro de caldo YPD produz 20 g da levedura liofilizada a uma concentração de 1×10^8 UFC.g⁻¹. Em um experimento com 250 aves, as quais receberiam um total de 1000 kg de ração contendo 10^7 UFC da levedura liofilizada por grama durante 40 dias, sem o reaproveitamento seria necessário 500 L de meio, enquanto que reaproveitando quatro vezes o mesmo caldo, necessitaria de 125 L de meio. Como o custo do caldo por litro é de R\$ 9,17, então a reutilização do meio por quatro vezes permitiria ao laboratório uma economia de R\$ 3.438,75, somente neste experimento.

Na maioria dos casos, diarreias infecciosas são tratadas através de reidratação oral e, eventualmente, através do uso de antibióticos. Entretanto a OMS tem recomendado a busca de tratamentos alternativos para infecções, e probióticos tem sido propostos para esse propósito (VIEIRA et al., 1998). Embora a eficácia desse tratamento contra salmonelose não tenha sido comprovada em humanos, resultados obtidos em modelos murinos tem indicado que probióticos podem ser eficientes contra infecção por salmonelas (JAIN et al., 2008; TRUUSALU et al., 2008; MARTINS et al., 2009).

Em humanos, *Salmonella* spp. é responsável por mais de um bilhão de infecções anualmente, com conseqüências variando de uma gastroenterite auto-limitante a febre tifóide (MARTINS et al., 2010) Em camundongos, a infecção por *S. Typhimurium* causa uma febre entérica com sintomas similares aqueles observados em humanos após infecção por *S. Typhi* (SANTOS et al., 2001).

Para a avaliação do efeito antimicrobiano de *P. pastoris*, foi realizado um teste de inibição do crescimento de enteropatógenos em meios de cultura, utilizando como modelos *S. Typhimurium* e *E. coli*, duas importantes bactérias causadoras de toxinfecções alimentares e dois meios de cultura não seletivos (YPD e LB).

P. pastoris inibiu o crescimento de ambos patógenos nos dois meios de cultivo após 24 h de incubação. Ocorreu redução de aproximadamente 86 e 67% da população de *E. coli* quando co-cultivada com *P. pastoris* nos caldos LB e YPD, respectivamente, e de 50% da população de *S. Typhimurium* quando o

enteropatógeno foi co-cultivado com *P. pastoris* em ambos os caldos (Figura 4).

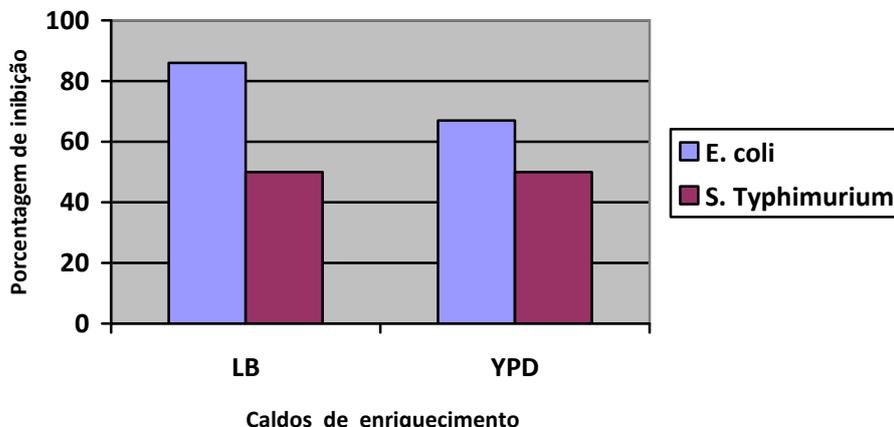


Figura 4 – Porcentagem de inibição do crescimento de *Salmonella Typhimurium* e *Escherichia coli* co-cultivadas com *P. pastoris* em dois meios de cultura não seletivos (LB e YPD).

O tempo de geração dos enteropatógenos avaliados estão na Tabela 3. Os resultados demonstraram um aumento do tempo de geração de ambas as bactérias quando elas cresceram na presença de *P. pastoris*. *S. Typhimurium* apresentou um rápido crescimento quando cultivada sozinha (24 min) em ambos os caldos, enquanto que na presença de *P. pastoris* esse tempo aumentou para 36 min (150% superior). *E. coli* foi mais sensível que *S. Typhimurium* a presença de *P. pastoris*, apresentando um tempo de geração de 36 min quando cultivada sozinha e de 75 quando co-cultivada (208% superior). Esta inibição pode ter ocorrido por competição por nutrientes, por adsorção da levedura às bactérias ou devido a modificações que o crescimento da levedura pode fazer ao meio como, por exemplo, a acidificação. No estudo de Millette et al. (2007) *E. coli* apresentou um decréscimo no tempo de geração na presença de uma mistura de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* (170% inferior) e o crescimento de *S. Typhimurium* não foi afetado por essa mistura.

Tabela 3 - Tempo de geração de *S. Typhimurium* e *E. coli* após 8 h de co-cultivo com *P. pastoris*.

Enteropatógeno	Controle (min)	Co-cultivo (min)	Impacto de <i>P. pastoris</i> sobre o tempo de geração (%)
<i>S. Typhimurium</i>	24	36	↑ 150
<i>E. coli</i>	36	75	↑ 208

Observou-se que *P. pastoris* apresenta efeito antimicrobiano contra os enteropatógenos avaliados e que o caldo LB pode ser utilizado em testes de inibição do crescimento de enterobactérias por *P. pastoris*, como uma alternativa mais acessível e menos dispendiosa ao caldo YPD para o cultivo dessa levedura. Testes de inibição do crescimento de outras bactérias patogênicas de importância em alimentos serão realizados.

Antagonismo de leveduras contra bactérias não é frequentemente observado e descrito na literatura. Inibição do crescimento de algumas bactérias patogênicas por *S. boulardii* foi relatada utilizando experimentos *in vitro* (BRUGIER; PATTE, 1975). Tiago et al. (2009) realizaram 350 experimentos de antagonismo (25 leveduras contra 14 micro-organismos indicadores) e observaram inibição do crescimento em 70 deles (20%). Entre os 14 micro-organismos indicadores utilizados (13 bactérias e 1 levedura), *P. aeruginosa* (susceptível a 23 das 25 leveduras testadas), *E. faecalis* (14/25) e *C. perfringens* (16/25) foram os mais sensíveis. Sensibilidade intermediária foi observada por *C. difficile* e *B. cereus* (6/25) e baixa sensibilidade por *S. Typhi* (3/25), *S. Typhimurium* (2/25 para cepas laboratoriais e 1/25 para cepas ATCC), *C. albicans* (2/25) and *S. sonnei* (1/25) e quatro indicadores foram resistentes em todos os testes (*E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. flexneri* e *V. cholerae*). Entre as leveduras do gênero *Pichia* avaliadas, *P. silvicola* apresentou antagonismo contra *B. Cereus*, *E. Faecalis*, *P. Aeruginosa* e *C. Perfringens*. *P. farinose* apresentou somente contra *P. Aeruginosa* e *C. Perfringens*; *P. guilliermondii* somente contra *E. faecalis* e *P. Aeruginosa*; *P. kluyveri* contra *E. faecalis*, *S. Sonnei*, *P. Aeruginosa* e *C. Perfringens* e *P. membranifaciens* contra *E. Faecalis*, *P. Aeruginosa* e *C. Perfringens*. Nenhuma das leveduras do gênero *Pichia* avaliadas apresentou antagonismo contra *S. Typhimurium* e *E. coli*. Martins et al. (2005) em

outro experimento avaliou a capacidade do *S. cerevisiae* em inibir o crescimento microbiano *in vitro*, mas esta levedura não conseguiu evitar a multiplicação das bactérias. No entanto Bach et al. (2003) observaram que *S. boulardii* foi capaz de inibir o crescimento de *E. coli* O157:H7 em um fluido ruminal *in vitro*. Já Zbinden et al. (1999), utilizando culturas de células HeLa, observaram que *S. boulardii* foi capaz de reduzir consideravelmente o crescimento de *S. Typhimurium* e de inibir completamente a multiplicação de *Yersinia enterocolitica*. Tasteyre et al. (2002), utilizando células VERO, observaram inibição da aderência de *C. difficile* pela *S. boulardii*.

Diversos estudos têm demonstrado que o antagonismo apresentado *in vitro* nem sempre é expresso *in vivo* no trato digestivo dos animais. Por isso, foi realizado um experimento para avaliar o efeito de *P. pastoris* sobre a sobrevivência de camundongos infectados por *S. Typhimurium*. Probióticos que apresentam efeito protetor contra enteropatógenos podem ser utilizados na prevenção ou como uma alternativa a antibióticos no tratamento de doenças de origem alimentar em humanos e como uma alternativa a antibióticos adicionados a rações como promotores de crescimento na produção de animais. Estes antimicrobianos, quando mal administrados, ou seja, utilização de sub doses podem conferir resistência a micro-organismos patogênicos presentes na microbiota intestinal dos animais. Por consequência a seleção dos resistentes pode acarretar enfermidades com uma maior dificuldade de cura.

Para avaliar o efeito antimicrobiano de *P. pastoris in vivo*, um experimento de desafio foi realizado. Camundongos foram escolhidos como modelo animal e *S. Typhimurium* como enteropatógeno alvo. O grupo de animais suplementados com a levedura apresentou uma maior sobrevivência (56%) 10 dias após o desafio oral com *S. Typhimurium* do que o grupo controle (48%), ou seja, 8% maior. Entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$), sendo o p encontrado pelo teste de Tukey de 0,08 (Figura 5).

Em outro estudo, que comparou em modelo murino o efeito da administração intragástrica de duas cepas de *Bifidobacterium lactis* sobre a proteção contra o efeito patogênico de *S. Typhimurium*, o grupo tratado com uma das cepas apresentou uma maior sobrevivência (60%) no dia 28 após o desafio do que o grupo controle (50%), não estatisticamente significativa, e o grupo tratado com a outra

cepa apresentou uma sobrevivência de 80%, estatisticamente superior a do grupo controle (MARTINS et al., 2010).

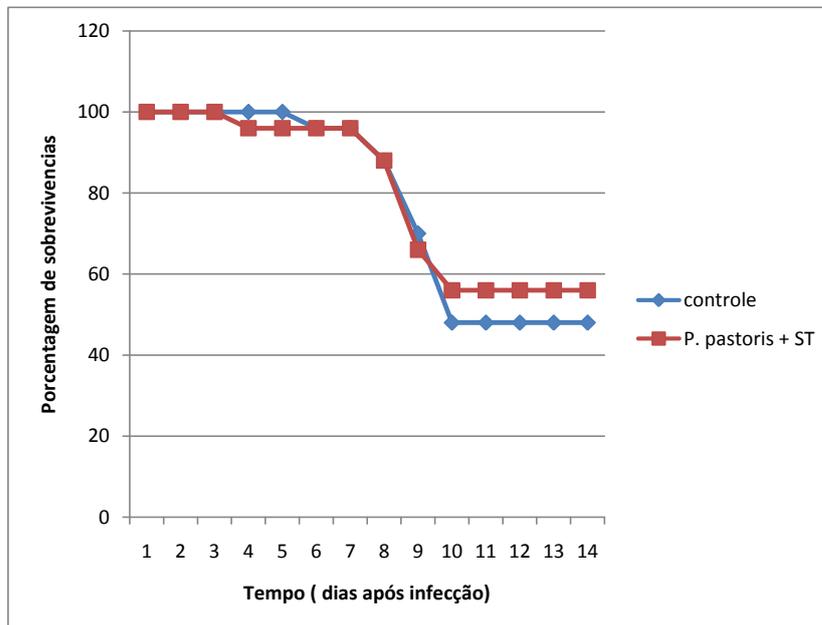


Figura 5 – Porcentagem de sobrevivência de camundongos tratados diariamente com *P. pastoris* (*P.pastoris* + ST) ou não (controle) durante 10 dias antes de serem desafiados com 10^4 UFC de *S. Typhimurium*.

No estudo que avaliou 103 cepas de leveduras não-*Saccharomyces* como candidatas a probióticos utilizando experimentos *in vitro* e *in vivo*, a habilidade protetora em camundongos experimentalmente desafiados com *Clostridium difficile* foi avaliada e, baseado neste e em outros critérios, uma cepa de *Pichia kluyveri* foi a que apresentou potencial para uso como probiótico, pois após 28 dias, 60% dos animais tratados com ela sobreviveram em comparação a 10% no grupo controle (TIAGO et al., 2009).

No estudo realizado por Martins et al. (2010), *S. boulardii* protegeu camundongos da morte induzida por *S. Typhimurium*, pois significativamente aumentou a sobrevivência de 40% (grupo somente desafiado) para 70% (grupo desafiado e tratado com a levedura), e preveniu a translocação bacteriana para o fígado. Observaram também, utilizando camundongos germ-free, 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. E concluíram que:

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, significativamente amplifica o efeito benéfico, 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. Efeito protetor de *S. boulardii* contra infecção por *S. Typhimurium* foi descrito também em outro estudo utilizando camundongos convencionais e gnotobióticos (MARTINS et al., 2010)

De acordo com Fuller (1992), experimentos com probióticos podem ser afetados por fatores como o tipo de agente bioterápico, métodos de produção e administração, viabilidade da preparação e condições do hospedeiro e da microbiota intestinal. Tal fato pode ser observado em outro estudo realizado por Martins et al. (2009), o qual comparou o efeito de cinco formulações de leveduras probióticas (4 *S. boulardii* liofilizadas e uma *S. cerevisiae* em suspensão aquosa) sobre a proteção contra infecção experimental de camundongos com *S. Typhimurium* e concluiu que a forma em que o probiótico se encontra (liofilizado ou em suspensão), além de influenciar a sua recuperação e sobrevivência *in vivo*, influencia sua propriedade protetora em desafios contra patógenos. *P. pastoris* foi administrada na forma de suspensão aquosa, o que pode ter influenciado negativamente o efeito protetor observado no desafio contra *S. Typhimurium*. No estudo de Martins et al. (2009), as taxas de sobrevivência, 28 dias após o desafio, foram de 50 a 70% nos grupos alimentados com a levedura liofilizada, de 20% no grupo alimentado com a levedura em suspensão e de 40% no grupo controle, ou seja, somente o grupo alimentado com uma das formulações liofilizadas apresentou taxa de sobrevivência estatisticamente superior a do grupo controle.

Diversas propriedades podem ser atribuídas aos probióticos para explicar a sua ação contra enteropatógenos, sendo a mais frequentemente usada a supressão do número de células viáveis através da produção de compostos com atividade antimicrobiana. Outras propriedades que podem explicar esse efeito protetor são a alteração do metabolismo microbiano, através do aumento ou da diminuição da

atividade enzimática do micro-organismo; o estímulo da imunidade do hospedeiro, através do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos; a modulação da produção ou ação de toxinas; e a competição por nutrientes ou por sítios de adesão. O espectro de atividade dos probióticos pode ser dividido em efeitos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos (FULLER, 1989).

Enfim, os resultados obtidos demonstraram que *P. pastoris* tem potencial para uso probiótico devido à presença das seguintes propriedades: resistência a passagem através do TGI de mamíferos, inocuidade e capacidade de inibir o crescimento de enteropatógenos *in vitro*. Quanto a avaliação do efeito antimicrobiano *in vivo*, a levedura não apresentou o resultado desejado frente à bactéria patogênica *S. Typhimurium*. Esse experimento será novamente realizado com a adição da levedura na ração. Experimentos visando avaliar outros potenciais efeitos probióticos de *P. pastoris*, como o desafio *in vivo* frente a outros enteropatógenos, bem como experimentos de imunomodulação, também serão realizados.

6 Conclusões

Pode-se concluir que a levedura *P. pastoris* possui potencial para ser caracterizada como probiótico, pois é inócua e capaz de resistir à passagem através do trato gastrointestinal de mamíferos e de inibir o crescimento de *S. Typhimurium* e *E. coli in vitro*. Novos experimentos serão realizados para avaliar a ação antimicrobiana da levedura *in vivo*, bem como a capacidade de modular a resposta imune do hospedeiro.

7. Perspectivas Futuras

Avaliar *in vitro* a capacidade da levedura *Pichia pastoris* se aderir e invadir células Caco-2 e inibir a adesão de *Salmonella Typhimurium* a essas células.

Avaliar o efeito imunomodulador de *Pichia pastoris* em camundongos.

Avaliar efeito imunomodulador de *Pichia pastoris* em aves.

Referências Bibliográficas

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

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

AHMED F. E. Genetically modified probiotics in food. **TRENDS in Biotechnology**, v 21, n. 11, p. 491-497, 2003

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

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.

BARTLETT, J.G. Antibiotic-associated diarrhea. **Clinical Infectious Disease**, v. 15, p. 573-581, 1992.

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 cells lines and inhibits cell attachment and cell-invasion by enterovirulent bacteria. **Gut**, v. 35, p. 483-489, 1994.

BISHT, H; CHUGH D.A.; SWAMINATHAN S.; KHANNA N. Expression and purification of Dengue Virus type 2 envelope protein as a fusion with Hepatitis B surface antigen in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 23, p.84-96, 2001.

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

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

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

BRANDÃO R., I.M. CASTRO, E.A. BAMBIRRA, S.C. AMARAL, L.G. FIETTO, M.J.M. TROPIA, M.J, NEVES, R.G. DOS. SANTOS, N.C.M. GOMES, J. NICOLI, Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*, **Applied and Environmental Microbiology**. n64, 564-568, 1998.

BRUGIER, S. and PATTE, F. Antagonisme *in vitro* entre l'ultra-levure et différents germes bactériens. **Med. Paris**. v 45, p.61–66,1975.

BUTS, JP; KEYSER N.D. Effects of *Saccharomyces boulardii* on Intestinal Mucosa. **Digestive Disease and Sciences**,n 51, p.1485-1492, 2006.

CANALES, M.; LASTRA J. M. P.; NARANJO V.; NIJHOF A. M.; HOPE M.; JONGEJAN F.;FUENTE J. Expression of recombinant Rhipicephalus (Boophilus) microplus, R. annulatus and R. decoloratus Bm86 orthologs as secreted proteins in *Pichia pastoris*. Disponível em <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/8/14>. Acesso em 09 de junho de 2008.

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.; RIEGLER, M.F.; VALENICK, L.; LAMONT, J.T.; POTHOUKAKIS, C. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. **Infection and Immunity**, v. 67,p. 302-307, 1999.

CENCI, G.; TROTTA F. and CALDINI G. Tolerance to challenges miming gastrointestinal transit by spores and vegetative cells of *Bacillus clausii* -Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072 -Journal compilation ^a 2006 The Society for Applied Microbiology, **Journal of Applied Microbiology** v101, p. 1208–1215, 2006.

ÇELİK, E.;OZBAY N. E.; ÇALIK P. Use of Biodiesel Byproduct Crude Glycerol as the Carbon Source for Fermentation Processes by Recombinant *Pichia pastoris*. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v 47, p. 2985-2990, 2008.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Ingredient selection criteria for probiótico microorganisms in functional dairy foods. **International Journal of Dairy Technology**. v.51, n.4, p.123-136, 1998.

CHARTERIS W. P.; KELLY P. M.; MORELLI L.; COLLINS J. K. Effect of Conjugated Bile Salts on Antibiotic Susceptibility of Bile Salt-Tolerant *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Isolates. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 10, p.1369-1376, 2000.

CHEN C.M.; CHENG W.T.; CHANG Y.C.; CHANG T.J.; CHEN H.L. Growth enhancement of fowls by dietary administration of recombinant yeast cultures containing enriched growth hormone. **Life Sciences**, v. 67, p.2103-2115, 2000..

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

CONWAY, P., 1996. Selection criteria for probiotic microorganisms. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition** n5. p. 10–14.

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

CREGG J. M.; VEDVICK T. S.; RASCHK W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. **Biotechnology**, v. 11, p.905-910, 1993.

CREGG J. THE PICHIA SYSTEM, **Keck Graduate Institute**, Claremont, California. Disponível em http://rctech.com/pichia/pichia_system.pdf Capturado em 09/06/2008.

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

CZERUCKA, D; ROUX, I; RAMPAL, P. *Saccharomyces boulardii* inhibits secretagogue-mediated adenosine 3'5'-cyclic monophosphate induction in intestinal cells. **Gastroenterol**, n106. p.65-72, 1994.

DEL PIANO, M.;STROZZI P.; BARBA M.; ALLESINA S.; DEIDDA F.; LORENZINI P; MORELLI L.; CARMAGNOLA S.; PAGLIARULO M.; BALZARINI M.; BALLARE M.; ORSELLO M.; MONTINO F.; SARTORI, M.; GARELLO E.; CARPURSO L.- *In vitro* Sensitivity of Probiotics to Human Pancreatic Juice, **Journal Clinical Gastroenterol**,42:S170–S173, 2008.

DRAGO L. Inhibition of *in vitro* growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin, **FEMS Microbiology Letters**, n.153, p.455-463, 1997.

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

ERKKILA S.; PETAJA E. **Meat Science** 2000, v.55, p.297.

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

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

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.

FLEET, G H.; ROSE A. H. AND HARRISON J. S., **The Yeasts. Academic Press**, New York, NY. v. 14 P. 199–277 1991.

FRANÇA, R. C.; SEHN, C. P.; CORRÊA, M. S.; MENDONÇA, M.; SILVA, V. S.; CASTELLI, R. M.; HAUBERT, L.; CONCEIÇÃO, F. R.; MOREIRA, Â. N.; SILVA, W. P. Avaliação *in vitro* do potencial probiótico antimicrobiano de *P. pastoris*, "**25º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**" em 11 de Novembro de 2009, em Porto de Galinhas-PE.

FRANÇA, R. C.; SANTOS, D. G.; HAUBERT, L.; CONCEIÇÃO, F. R.; SILVA, W. P.; MOREIRA, A. N.; Reaproveitamento de Caldo Yeast Peptone Dextrose (YPD) para cultivo de *P. pastoris*, **XIX Congresso de Iniciação Científica, XII Encontro de Pós-Graduação, Universidade Federal de Pelotas**, 2010

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

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378,1989.

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

GALÁN, J.E. *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 17, p. 53-86, 2001.

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

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

GIL-TURNES, C. DOS SANTOS, A.F.; DA CRUZ, F.W.; MONTEIRO, A.V. Properties of the *Bacillus cereus* strain used in Probiotic CenBiot. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 30, p. 11-14, 1999.

GIL DE LOS SANTOS, J. R.; STORCH O.B.; GIL-TURNES C. *Bacillus cereus* var. *toyoi* and *Saccharomyces boulardii* increase feed efficiency in broilers infected with *Salmonella enteritidis*. **British Poultry Science**, v. 46, n. 4, p 494-497, 2005.

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.

GILLILAND, S. E.; STALEY T.E.; BUSH L.J. Importance of Bile Tolerance of *Lactobacillus acidophilus* Used as a Dietary Adjunct. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 3045-3051, 1984

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

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

GRAFF S.; CHAUMEIL J. C.; Lai-Kuen P. R.; Charrueau- J.C. ,Influence of pH conditions on the viability of *Saccharomyces boulardii* yeast **Gene Applied Microbiology**,54,221-22, 2008.

GRASSL, G.A.; FINLAY, B.B. Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. **Current Opinion Gastroenterology**, v. 24, p. 22-26, 2008.

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

HERSH, D.; MONACK, D.M.; SMITH, M.R.; GHORI, N.; FALKOW, S.;ZYCHLINSKY, A. The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.**, v. 96, p. 2396-2401, 1999.

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

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

INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES. The *Pichia pastoris* Expression System. Put the proven strength of Pichia behind your protein expression. www.invitrogen.com, 2001.

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

JAIN, S.; YADAV H.; SINHA P.R.; NAITO Y.; MAROTTA F. Dahi containing probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* has a protective effect against *Salmonella* enteritidis infection in mice. **Int J Immunopathol Pharmacol**. v. 21, n. 4, p.1021-9, 2008.

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

JELEN, P.; LUTZ, S. Functional milk and dairy products. In: MAZZA, G., ed. **Functional foods: biochemical and processing aspects**. Lancaster: Technomic Publishing, p.357-381, 1998.

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

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

KALAMBAHETI, T.; COOPER G. N.; JACKSON G. D. Role of bile in non-specific defence mechanisms of the gut. **Gut**, v. 35, n. 08, p.1047-52, 1994.

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** Aug;n.32(2) p.141-144, 1992.

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

KONINKX J.F.J.G., J.J. MALAGO, The Protective Potency of Probiotic Bacteria and Their Microbial Products against Enteric Infections – Review, <http://www.biomed.cas.cz/mbu/fofia/>, Revised version 17 January 2008.

KÜHLE, ALIS VAN DER AA.; KERSTIN SKOVGAARD.; LENE JESPERSEN, *In vitro* screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains, **International Journal of Food Microbiology** n101.p. 29– 39, 2005.

LARA-FLORES, M.; OLVEA-NOVOA, M.A.; GUZMAN-MENDEZ, B.E. et al. Use of bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v.216, n.1-4, p.193-201, 2003.

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.

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.

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 2005a.

MARTINS, F.S.; NARDI, R.M.D.; ARANTES, R.M.E.; ROSA, C.A.; NEVES, M.J. AND NICOLI, J.R. Screening of yeast as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice. **Journal of General and Applied Microbiology.** , v. 51, n. 2, p. 83-92, 2005b.

MARTINS, F.S.; VELOSO, L.C.; ARANTES, R.M.E.; NICOLI J.R. Effect of yeast probiotic formulation on viability, revival and protection against infection with *Salmonella* enterica ssp. enterica serovar Typhimurium in mice. **Letters in Applied Microbiology**, 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. Disponível em <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0008925>.

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.; FEKETY, R.; ELMER, G.W.; MOYER, K.A.; MELCHER, S.A.; BOWEN, K.E.; COX, J.L.; NOORANI, Z. A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 271, p. 1913-1918, 1994.

MCFARLAND, LV; SURAWICZ, CM; GREENBERG, RN; Prevention of β -lactam associated diarrhoea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. **Am J Gastroenterol**, n.90. p.439-448, 1995.

MILETTE M., *In vitro* growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus* casein-fermented milk, n 44. p.314-319, 2007.

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.

NARDI, R.D.; VIEIRA, E.C.; CROCCO-AFONSO, L.C.; SILVA, M.E.; BAMBIRRA, E.A.; ANDRADE, A.M.V.; NICOLI, J.R. Bacteriological and immunological aspects of conventional and germfree mice infected with *Salmonella* Typhimurium. **Revista Latinoamericana Microbiologia.**, v. 31, p. 239-243, 1991.

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

OEZTUERK, H.; SCHROEDER B.; BEYERBACH M.; BREVES G. Influence of Living and Autoclaved Yeasts of *Saccharomyces boulardii* on *In Vitro* Ruminant Microbial Metabolism, **Journal of Dairy Science.** v. 88, p 2594–2600, 2005.

OUWEHAND, A.C., KIRJAVAINEN, P.V., SHORTT, C., SALMINEN, S., Probiotics: mechanisms and established effects. **International Dairy Journal** n9. p. 43–52, 1999.

PAN, H; WHITTAKER M. M.; BOUVERET R.; BERNA A.; BERNIER F.; WHITTAKER J. W. Characterization of wheat germen (oxalate oxidase) expressed by *P. pastoris*. **Biochemical And Biophysical Research Communications.** v. 356, n. 4, p 925–929. 2007.

PATEL, J.C.; GALÁN, J.E. Manipulation of the host actin cytoskeleton by *Salmonella* all in the name of entry. **Current Opinion In Microbiology**, v. 8, p. 10-15, 2005.

PENNACCHIA Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains from different food matrices and their preliminary selection for a potential use as probiotics, **Journal of Applied Microbiology**, n 105, 1919–1928, 2008.

PROMSOPONE, B.; MORISHITA, T.Y.; AYE, P.P.; COBB, C.W.; VELDKAMP, A.; CLIFFORD, J.R. Evaluation of an avian-specific probiotic and *Salmonella* Typhimurium-Specific antibodies on the colonization of *Salmonella* Typhimurium in broilers. **Journal of Food Protection.**, v. 61, p. 176-180, 1998.

PSOMAS, E.; ANDRIGHETTO C.; LITOPOULOU-TZANETAKI E.; LOMBARDI A.; TZANETAKIS N. Some probiotic properties of yeast isolates from infant faeces and Feta cheese. **International Journal of Food Microbiology.**, p. 125 – 133, 2001.

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.

REID, G. Probiotic therapy and functional foods for prevention of urinary tract infections: state of the art and science. **Current Infectious Disease Report.**, v. 2, p. 518-522, 2000.

ROBERFROID, M.B. Prebiotics: preferential substrates for specific germs? **Am. J. Clinical. Nutrition.**, v. 73, p. 406-409, 2001.

RODRIGUES, A.C.; NARDI, R.M.; BAMBIRRA, E.A.; VIEIRA, E.C.; NICOLI, J.R. Effect of *Saccharomyces boulardii* against experimental oral infection with *Salmonella* Typhimurium and *Shigella flexneri* in conventional and gnotobiotic mice. **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 imunomodulador de *Bacillus cereus* var. *Toyo* e *Saccharomyces boulardii* em animais vacinados contra Herpesvírus Bovino tipo 5.** Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, p.90, 2009.

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

SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. **Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach.** Washington D.C., ASM Press, 1994.

SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutr. Rev.**, New York, v.61, n.3, p.91-99, 2003.

SANTOS R. L.; ZHANG S.; TSOLIS R. M.; KINGSLEY R. A.; ADAMS BÄUMLER A. J. Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. **Microbes and Infection.** v. 3, p. 1335-1344, 2001.

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

SCHELLENBERG, D.; MENENDEZ C.; APONTE J.J.; KAHIGWA E.; TANNER M.; MSHINDA H.; ALONSO P. Treatment of *Clostridium difficile* diarrhea with brewer's yeast. **Lancet**, v. 343, p. 171-172, 1994. INTERNATIONAL PROBIOTIC CONFERENCE, 2, 2004, Kosice, Slovakia, 66p. 2004.

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.

SEO RHEE, C.; LIBET L.; CHISHOLM D.; TAKABAYASHI K.; BAIRD S.; BIGBY T. D.; HEE LEE C.; HORNER A. A.; RAZ E. Allergen-independent immunostimulatory sequence oligodeoxynucleotide therapy attenuates experimental allergic rhinitis. **Immunology** .Volume 113, Issue 1, pages 106–113, September 2004.

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

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

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

SNALL, P.L.; ISBERG, R.R.; FALKOW, S. Comparison of the ability of enteroinvasive *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* to enter and replicate within Hep-2 cells. **Infection and Immunity**, v. 55, p. 1674-1679, 1987.

STAMATOVA I.; MEURMAN JH, Probiotics: health benefits in the mouth **American Journal Dentistry** 2009 Dec;22(6):329-38

STORCH, O.B.; **Avaliação de *Pichia pastoris* e *Pichia pastoris* recombinante contendo o gene da fosfolipase C de *Clostridium perfringens* como probióticos para frangos de corte**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, p. 52, 2008.

SUGRUE, R. J.; Fu J.; Howe J.; Cha Y. Expression of the Dengue virus structural proteins in *P. pastoris* leads to the generation of virus-like particles. **Journal of General Virology**. v. 78, p. 1861-1866, 1997.

SURAWICZ, C.M.; ELMER, G.W.; SPEELMAN, P.; MCFARLAND, L.V.; CHINN, J.; VAN BELL, G. Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*. **Gastroenterology**, v. 96, p. 981-988, 1989a.

SURAWICZ, C.M.; MCFARLAND, L.V.; ELMER, G.; CHINN, J. Treatment of recurrent *Clostridium difficile* colitis with vancomycin and *Saccharomyces boulardii*. **American Journal Gastroenterol.**, v. 84, p. 1285-1287, 1989b.

SURAWICZ, C.M.; MCFARLAND, L.V.; GREENBERG, R.N.; RUBIN, M.; FEKETY, R.; MULLIGAN, M.E.; GARCIA, R.J.; BRANDMARKER, S.; BOWEN, K.; BORJAL, D.; ELMER, G.W. The search for a better treatment for recurrent *Clostridium difficile* disease: use of high-dose vancomycin combined with *Saccharomyces boulardii*. **Clinical Infectious Disease**, v. 31, 1012-1017, 2000.

SURAWICZ, C.M. Probiotics, antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* diarrhoea in humans. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, p. 775-783, 2003.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 21, p. 335-376, 2003.

TASTEYRE, A.; BARC, M.C.; KARJALAINEN, T.; BOURLIOUX, P.; COLLIGNON, A. Inhibition of *in vitro* cell adherence of *Clostridium difficile* by *Saccharomyces boulardii*. **Microbiol Pathogenesis**, v. 32, p. 219-25, 2002.

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.

THEPPANGNA, W.; OTSUKI, K.; MURASE, T. Inhibitory effects of Enterococcus strains obtained from a probiotic product on *in vitro* growth of *Salmonella* enteric serovar enteritidis strain IFO3313. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 2258-2262, 2006.

TIAGO F. C. P.; MARTINS F. S.; ROSA C. A.; NARD R. M. D.; CARA D. C.; NICOLI J. R. Physiological characterization of non-*Saccharomyces* yeasts from agro-industrial and environmental origins with possible probiotic function, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Volume 25, Number 4, 657-666,

TRIANTAFILOU, M.; TRIANTAFILOU, K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. **Trends Immunology**, v. 23, p. 301-304, 2002.

TRUUSALU, K.; Mikelsaar R.; Naaber P.; Karki T.; Kullisaar T.; Zilmer M.; Mikelsaar M. Eradication of *Salmonella* Typhimurium infection in a murine model of typhoid fever with the combination of probiótico *Lactobacillus fermentum* ME-3 and ofloxacin. **BMC Microbiol.** v. 23, 2008.

TSAI, CHENG-CHIH.; HSIH, HSIEN-YEE.; CHIU, HSUEH-HUI.; LAI, YUNG-YU.; LIU JENN-HUA.; YU, BI.; TSEN, HAU-YANG. Antagonistic activity against *Salmonella* infection *in vitro* and *in vivo* for two *Lactobacillus* strains from swine and poultry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p. 185-194, 2005.

UEMATSU, S.; MATSUMOTO, M.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E(2) production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E(2) synthase gene induced by the Toll-like receptor 4/MyD88/NFIL6 pathway. **The Journal of Immunology**. v. 168, p. 5811-5816, 2002.

VALDÉS I, HERMIDA L, ZULUETA A, MARTÍN J, SILVA R, ALVAREZ M, GUZMÁN MG, GUILLÉN G. Expression in *P. pastoris* and immunological evaluation of a truncated Dengue envelope protein. **Molecular Biotechnology**. v. 35, p.23-30, 2007.

VANDENBERH, P.A. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. **FEMS Microbiol Rev** 12. p.221–238, 1993.

VANDENPLAS, Y.; BRUNSER, O.; SZAJEWSKA, H. *Saccharomyces boulardii* in childhood. **European Journal of Pediatric**. 2009 p.253-65.

VANHE L. M. E.; GOEMÉ F.; NELIS, H. J; COENYE T.; Quality control of fifteen probiotic products containing *Saccharomyces boulardii*. **Journal of Applied Microbiology** © 2010 The Society for Applied Microbiology 28 Juny 2010, DOI: 10.1111/j.1365-2672.2010.04805

VEENHUIS, M.; VAN DIJKEN, J. P.; HARDER, W. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts. **Advances in Microbial Physiology**. v 24, p 1-82, 1983.

VIEIRA, L. Q.; OLIVEIRA M.R.; NEUMANN E.; NICOLI J.R.; VIEIRA E. C. Parasitic infections in germfree animals. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**.. v. 31, p.105-110, 1998.

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “*in vitro*” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International, Amsterdam**, v.36, p.895-904, 2003.

YADAVA, A.; OCKENHOUSE, C. F. Effect of Codon Optimization on Expression Levels of a Functionally Folded Malaria Vaccine Candidate in Prokaryotic and Eukaryotic Expression Systems. **Infection And Immunity**. v. 71, n. 9, p.4961-4969, 2003.

YAMADA, E. A.; ALVIM I. D.; SANTUCCI M. C. C.; SGARBIERI V. C. Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 16, n. 4, p.423-432, 2003.

YAMAMOTO, M.; SATO, S.; MORI, K.; HOSHINO, K.; TAKEUCHI, O.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Cutting edge: A novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. **The Journal of Immunology.**, v. 169, p. 6668-6672, 2002.

WEI, H.; JIANG L.; XUE Y.; FANG D.; GUO H. Secreted expression of Dengue virus type 2 full-length envelope glycoprotein in *P. pastoris*. **Journal of Virological Methods.** v. 109, p.17-23, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, 2007. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>. Acessado em 30 de janeiro de 2011.

ZBINDEN, R. GÖNCZI, E.E.; ALTWEGG, M. Inhibition of *Saccharomyces boulardii* (nom. inval.) on cell invasion of *Salmonella* Typhimurium and *Yersinia enterocolitica*. Microb. **Microbial Ecology in Health and Diseases.** v. 11, p. 158-162, 1999.