



ARTIGO DE REVISÃO

***Bases experimentais e clínicas atuais
para o emprego dos probióticos****Up-to-date clinical and experimental basis for the use of probiotics***Francisco José Penna¹, Luciano A.P. Filho², Antônio Celso Calçado³, Hugo R. Junior⁴, Jacques R. Nicoli⁵****Resumo**

Objetivo: Avaliar o potencial dos probióticos ou agentes bioterapêuticos para a prevenção e/ou o tratamento de infecções intestinais específicas.

Métodos: O sistema de levantamento bibliográfico Medline foi usado para procurar todos os artigos relevantes no período de 1990 até fevereiro de 1998. As referências bibliográficas dos artigos obtidos foram também usadas. Todos os experimentos com animais e os estudos controlados com placebo em humano foram examinados para obter informações sobre os mecanismos de ação, eficiência ou efeitos adversos desses bioterapêuticos.

Resultados: Na primeira parte desta revisão, os diferentes mecanismos de ação, bem demonstrados em animais de laboratório e que têm eficiência na melhora dos processos diarreicos, foram discutidos. Os mais importantes são a indução enzimática das dissacaridases, os efeitos tróficos sobre a mucosa intestinal, a ação no bloqueio das toxinas bacterianas e a indução da imunidade. Os efeitos terapêuticos no ser humano, principalmente nas doenças do aparelho digestivo, foram relatados na segunda parte. Os estudos controlados com placebo demonstram efeitos benéficos na evolução da diarreia aguda infantil, na diarreia do viajante, na diarreia induzida pelo uso de antibióticos, com ou sem enterocolite associada ao *Clostridium difficile* (pseudomembranosa) e naquelas associadas à imunodepressão, inclusive na AIDS. Os agentes bioterapêuticos que mereceram as considerações mais importantes foram os lactobacilos, as bifidobactérias e o *Saccharomyces boulardii*.

Conclusões: Temos agora evidências de que a administração de microorganismos selecionados é benéfica na prevenção e no tratamento de certas infecções intestinais. A maior experiência na literatura é com o uso do *Saccharomyces boulardii*. A discussão considerou a perspectiva para novas indicações, o provável efeito sinérgico de diferentes probióticos devido aos seus diferentes e os complementares mecanismos de ação. Enfatizou-se a importância de mais estudos experimentais e clínicos para melhor entendimento de suas atividades e para a indicação dos probióticos em outras situações clínicas.

J. pediatr. (Rio J.). 2000; 76 (Supl.2): S209-S217: probióticos, Saccharomyces boulardii, diarreia.

Abstract

Objective: To evaluate the potential of probiotics or biotherapeutic agents for the prevention and/or treatment of selected intestinal infections.

Methods: The Medline database was searched for all relevant articles between 1990 and February 1998. The bibliographies of obtained articles were also used. All animal experiments and placebo-controlled human studies were reviewed to provide information on the mechanisms of action, potential efficacy or adverse effects of these biotherapeutic agents.

Results: In the first part of this review, the different mechanisms of action, well demonstrated in laboratory animals, which are effective in the treatment of diarrhea are discussed. The most important are: enzymatic induction of disaccharidase activity, its trophic effects in the intestinal mucosa, its action in blocking bacterial toxins, and also the induction of immunological response. Therapeutic effects of probiotics in humans, mainly in the gastrointestinal tract, are reported in the second part. Placebo-controlled studies have shown that biotherapeutic agents have been used successfully to treat acute infantile diarrhea, traveler's diarrhea, antibiotics-associated diarrhea, with or without *Clostridium difficile*-associated enterocolitis (pseudomembranous colitis), and in immunosuppression-associated diarrhea, including AIDS. *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Saccharomyces boulardii* were the most important biotherapeutic agents to be considered.

Conclusions: There is now evidence that administration of selected microorganisms is beneficial in the prevention and treatment of certain intestinal infections. According to the literature, *Saccharomyces boulardii* is the most important probiotic. Future indications were discussed, such as the probable synergic effect of many probiotics because of their different and complementary mechanisms of action. The importance of new experimental and clinical studies for the better understanding of the actions and uses of probiotics in the other clinical situations was emphasized.

J. pediatr. (Rio J.). 2000; 76 (Supl.2): S209-S217: probiotics, Saccharomyces boulardii, diarrhea.

1. Professor Titular - Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
2. Professor Adjunto - Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
3. Professor Adjunto - Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.
4. Professor Adjunto - Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA.
5. Professor Titular - Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

Introdução

As comunidades microbianas que habitam as diversas superfícies e mucosas do homem representam, com o hospedeiro que as alojam, os ecossistemas mais complexos e menos controlados que se conhecem. Essas populações microbianas são particularmente abundantes nas últimas porções do trato digestivo, onde apresentam níveis populacionais elevados (10^{11} células viáveis/g de conteúdo) e de uma extrema variedade (400 espécies diferentes num único indivíduo). Pelo seu tamanho, essa biomassa pode ser considerada como um órgão ou organismo alojado no corpo humano, onde desenvolve diversas funções benéficas para o hospedeiros, entre as quais podemos destacar: (i) *a proteção ecológica*, (ii) *a imunoestimulação* e (iii) *a contribuição nutricional*.

Qualquer modificação nos equilíbrios populacionais deste ecossistema microbiano resulta numa interferência nas suas funções. Fatores endógenos e exógenos como o uso de antibacterianos, as mudanças alimentares e o estresse podem perturbar a microbiota gastrointestinal, reduzindo suas funções, em particular protetoras. Por outro lado, teoricamente, não se pode destacar uma possibilidade de reforçar essas funções pela modulação do ecossistema digestivo. Dois caminhos experimentais ou terapêuticos podem ser seguidos na tentativa de compensar ou estimular essas funções: (i) administração oral de microorganismos vivos (*probióticos*) ou (ii) ingestão de substratos estimuladores para grupos específicos da microbiota normal (*prebióticos*) que podem ser classificados como alimentos funcionais). Uma ação benéfica dos microorganismos ingeridos ou estimuladores deve ter sido previamente comprovada¹. Entre os probióticos, dois grandes grupos microbianos foram particularmente estudados em termos experimentais e clínicos e são já comercializados: (i) as bactérias lácticas e (ii) as leveduras.

Histórico

Os gêneros de bactérias lácticas até agora estudados foram os *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* e *Enterococcus*, mas somente os dois primeiros apresentam volume de trabalhos e dados mais consistentes. Os lactobacilos foram os primeiros microorganismos cuja ingestão na forma viva foi associada como um efeito benéfico quando, no início deste século, Metchnikoff² sugeriu o consumo de leite fermentado para uma modulação da microbiota digestiva. Na mesma época, Tissier³ afirmava que a microbiota fecal de recém-nascidos humanos amamentados no seio apresentava mais bifidobactérias do que aquela de crianças que recebiam fórmula. Apesar dessa observação não ter sido confirmada posteriormente, uma série de evidências sugerem uma função benéfica dessas bactérias no ecossistema digestivo humano. Ao contrário dos lactobacilos, a utilização das bifidobactérias é relativamente recente⁴. Dentre as bactérias lácticas, as mais freqüentemente usadas como probióticos pertencem às espécies *Lactobacillus aci-*

dophilus, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium longum*.

As leveduras não patogênicas possuem algumas características que as diferenciam das bactérias. A resistência natural que têm aos antibióticos tem-se constituído numa base interessante para sua aplicação como probióticos. Neste particular, o *Saccharomyces boulardii* é o que mais amplamente foi testado em ensaios experimentais e clínicos, revelando resultados muito importantes. Esse microorganismo foi inicialmente isolado em frutas ("lychee") da Indochina. As frutas contaminadas com o *Saccharomyces boulardii* eram usadas na medicina popular local para o tratamento de diarreia. O produto foi introduzido na França, com a mesma finalidade, a partir de 1950⁵, e hoje encontra-se amplamente comercializado em países da Europa, África e América do Sul.

Tipos de preparação e impacto ecológico na microbiota intestinal

Os diferentes probióticos são estudados e comercializados na forma de preparações contendo um único ou uma combinação de microorganismos. O probiótico deve se apresentar viável na preparação e manter essa viabilidade no ecossistema digestivo, condição indispensável para a sua atuação. Os probióticos são comercializados na forma de preparações farmacêuticas (cápsula ou *sachet*) ou naturais (leite fermentado ou iogurte). No primeiro caso, a liofilização do produto permite manter a viabilidade durante longo período de armazenamento na temperatura ambiente. Já em produtos fermentados do leite, a refrigeração é indispensável, e o tempo de vida das células microbianas é extremamente reduzido⁶. Não são conhecidos probióticos capazes de se instalarem no ecossistema digestivo, mesmo após uma ingestão prolongada, já que a microbiota local, perturbada ou não, impede essa colonização. Contudo, diversos bioterapêuticos sobrevivem durante a sua passagem intestinal como nos casos de *L. acidophilus*⁷, *Saccharomyces boulardii*⁸ e *Bifidobacterium*⁹. Mas a sobrevivência não é o único fator importante para atuação de um probiótipo. Os níveis populacionais do bioterapêutico devem ser suficientemente elevados para ter um impacto no local onde se espera que ele desenvolva a sua função. Em ecologia microbiana, considera-se que um microorganismo influi no ecossistema onde ele se encontra, somente quando a sua população é igual ou superior a 10^7 unidades formadoras de colônias/g ou ml (UFC/g ou UFC/ml) do conteúdo¹⁰. A concentração em células viáveis do probiótico deve ser, portanto, ajustada na preparação inicial, levando-se em conta a capacidade de sobrevivência do microorganismo, sem se multiplicar no tubo digestivo, e o efeito de diluição intestinal, de maneira a atingir no mínimo 10^7 UFC/g do conteúdo intestinal. A ingestão diária de um probiótico em quantidade adequada é, portanto, indispensável para manter níveis artificialmente elevados do microorganismo no ecossistema digestivo, permitindo que ele desenvolva o efeito benéfico desejado.

Mecanismos de ação

Os possíveis mecanismos de ação sugeridos para explicar os efeitos benéficos dos probióticos são basicamente os mesmos utilizados pela microbiota digestiva normal para exercer suas funções. Isso não deixa de ser coerente com o objetivo do uso desses bioterapêuticos, a saber, compensar ou reforçar a atividade do ecossistema microbiano gastrointestinal.

Proteção ecológica

Dentro dos mecanismos de proteção ecológica podemos distinguir dois tipos: (i) os que impedem a multiplicação dos alvos patogênicos (*antagonismo*) e (ii) os que inibem a ação patogênica (*modulação de toxina*).

O antagonismo pode ser explicado pelas competições por nutrientes ou por sítios de adesão e pelas produções de metabólitos ou substâncias tóxicas. Uma competição por nutrientes tem sido proposta como um dos mecanismos pelo qual a microbiota digestiva normal pode inibir o crescimento do *Clostridium difficile*¹¹, sem que esses efeitos tenham sido correlacionados com o uso de probióticos. Foi demonstrado que um *Lactobacillus sp* compete com uma *Escherichia coli* enteropatogênica por adesão no trato digestivo de suínos¹². O *Lactobacillus acidophilus* impede também a adesão de microorganismos patogênicos em cultura de células intestinais humanas¹³. O tratamento com *Saccharomyces boulardii* reduz a mortalidade de ratos jovens infectados com *Entamoeba histolytica*¹⁴. *In vitro*, o contato entre este protozoário e o *Saccharomyces boulardii*, suas membranas ou o sobrenadante de cultivo da levedura, reduz o número de trofozoitos capazes de aderir a eritrócitos¹⁵. A produção de substâncias antimicrobianas por vários probióticos já foi demonstrada. Essas substâncias podem ser metabólitos como ácidos orgânicos (em particular o ácido láctico, ao qual as *Samonella sp.* são particularmente sensíveis) ou H₂O₂ (somente nas partes superiores do trato digestivo, onde o oxigênio molecular ainda está presente em quantidade suficiente para permitir essa produção). Bacteriocinas ou “bacteriocinas-like” são freqüentemente produzidas *in vitro* por *Lactobacillus sp.* e *Bifidobacterium sp.* mas nunca foi possível comprovar a atuação desses compostos *in vivo*¹⁶. O *Saccharomyces boulardii* demonstrou uma capacidade protetora elevada quando usado em camundongos convencionais e gnotoxênicos contra *Salmonella typhimurium* e *Shigella flexneri*, mas o mecanismo responsável por este efeito envolve outros fatores, não característicos do antagonismo¹⁷.

Apesar de algumas bactérias poderem também modular a produção de toxinas por microorganismos patogênicos¹⁸, essa capacidade é uma propriedade marcante do *Saccharomyces boulardii*. Diversos trabalhos mostraram que esse agente é capaz de reduzir em modelos animais ou cultura de células intestinais os danos resultantes da ação de toxinas bacterianas de *Vibrio cholerae*^{19, 20}, de *Escherichia coli*^{21, 22} e de *Clostridium difficile*¹⁸. Vários mecanismos podem explicar essa propriedade de modulação de toxina pelo

Saccharomyces boulardii, e essas hipóteses não são mutuamente exclusivas: (i) a produção de uma proteína de 120 kilodaltons (kD), sem atividade proteolítica, que reduz a formação de AMPc por células intestinais num meio onde foram adicionados a toxina da cólera ou a toxina termolábil de *Escherichia coli*²¹; (ii) a produção, também, de uma proteína de 54 kD que degrada a toxina A do *Clostridium difficile* assim como o seu receptor no enterócito *in vitro*²³; (iii) dados recentes, usando uma toxina da cólera marcada com I¹²⁵, mostram que o *Saccharomyces boulardii* apresenta na sua superfície receptores específicos para essa toxina que poderiam desviar a mesma dos seus receptores nos enterócitos²⁴.

Imunoestimulação

O interesse na capacidade de estimulação do sistema imune pelos probióticos iniciou-se com o uso de extrato de visco fermentado para o tratamento de câncer na década de 20. O componente estimulador foi identificado como sendo um produto de degradação da parede celular de lactobacilos²⁵. Posteriormente, inúmeros trabalhos experimentais confirmaram essa capacidade estimuladora que se traduz por aumentos dos títulos em anticorpos, da atividade de macrófagos, do número de células *killer*, do número de células T e de interferon²⁶. O tratamento por via oral de camundongos gnotobióticos com *Saccharomyces boulardii* reduziu de 10 a 50 vezes a população intestinal de *Candida albicans*, provavelmente por algum tipo de imunoestimulação²⁷. Em camundongos imunossuprimidos (descontaminação por antibióticos e injeções de prednisolona), a administração oral de *Saccharomyces boulardii* reduziu a freqüência de translocação de *Candida albicans* para os linfonodos mesentéricos, fígado e rins²⁸. O tratamento com doses inferiores à posologia normal do *Saccharomyces boulardii*, em camundongos imunossuprimidos (ciclofosfamida), protegeu também os animais conforme revelam os dados de (i) translocação bacteriana para linfonodos mesentéricos, fígado e baço; (ii) histopatologia da mucosa intestinal e (iii) sobrevivência²⁹. Ainda, no caso do uso de *Saccharomyces boulardii*, um aumento da secreção de IgA secretora e do componente secretório de imunoglobulinas foram observados em ratos^{30, 31}. A administração oral do *Saccharomyces boulardii* (1 g/dia - 7 dias) a 60 voluntários induziu aumento de células do sangue periférico indicativo de ativação de proteínas típicas da fase aguda da resposta inflamatória³². Houve significativo aumento do número de eritrócitos, hemoglobina, leucócitos, neutrófilos, células polinucleares, fagócitos, componentes do complemento como C₃, C₅ e principalmente de C_{3d}. Houve também aumento da atividade quimiotática dos leucócitos e da atividade anticomplementar do soro. Não foi encontrado aumento significativo do número de eosinófilos, basófilos, monócitos e de proteínas séricas como albumina e imunoglobulinas. Não foram encontrados efeitos mitogênicos e nem modificação na população de linfócitos. Essas alterações foram possivelmente transitórias, já que dez destes,

voluntários estudados quatro semanas após a última administração do *Saccharomyces boulardii* retornaram aos valores basais. Não houve repercussão clínica em nenhum dos casos. A possível explicação para as variações do hemograma pode ser a estimulação do sistema retículo endotelial. Após sua estimulação haveria mobilização de células dos órgãos hematopoiéticos para a circulação. Experiências²⁹ em camundongos que receberam *Saccharomyces boulardii* por via oral demonstraram imunoestimulação representada por uma maior expressão do componente linfóide na lâmina própria, no fígado e no baço. A demonstração de que o glucano e outros extratos do *Saccharomyces boulardii* são importantes na estimulação retículo endotelial reforçam essa hipótese³³. O significado dessas observações não está esclarecido, podendo ser especulado o aumento da resistência a infecções. Outro ponto importante a ser considerado e que merece mais estudos é sobre a relação dose/efeito.

Efeito trófico na mucosa intestinal

A melhora da digestão da lactose em humano é uma das propriedades bem conhecidas da bactérias lácticas³⁴. A boa digestibilidade da lactose no iogurte por exemplo foi extensivamente investigada, e três hipóteses são geralmente propostas: (i) estimulação da atividade da lactase da mucosa intestinal³⁵; (ii) tempo de trânsito intestinal reduzido para o iogurte quando comparado com o leite³⁶; (iii) digestão na luz intestinal da lactose pela lactase do iogurte³⁶. As leveduras, bem como outras células eucariotas e procariotas, contêm quantidades variáveis de poliaminas (espermidina e espermina), que são necessárias para a sua divisão celular, síntese de DNA e de proteínas³⁷. Ratos tratados com *Saccharomyces boulardii* via oral³⁸ apresentam no lúmen intestinal títulos elevados de espermidina e espermina, que seriam secretadas pelo *Saccharomyces boulardii* ou principalmente liberadas durante o seu catabolismo. Estas seriam responsáveis pelos efeitos tróficos na mucosa do intestino delgado com aumento da atividade das dissacaridases³⁰, do conteúdo de DNA da mucosa, da concentração celular de imunoglobulinas poliméricas, de IgA secretora, além do aumento do componente secretor de IgA nas células das vilosidades e criptas^{31,39}. Em estudo realizado no homem³⁰, administrou-se, por via oral, o *Saccharomyces boulardii* na dose de 1 grama diária por 14 dias a sete voluntários. Houve aumento da sacarase (82%); lactase (77%) e maltase (75%), corroborando achados encontrados em animais. Estes resultados podem ter importância clínica, merecendo investigação na área das doenças diarréicas.

Ensaios clínicos

O aumento do conhecimento da fisiologia dos fluídos corporais e do fluxo de água e eletrólitos no trato digestivo proporcionou uma terapêutica mais racional e uma grande redução na mortalidade infantil por diarreia aguda. A terapia de reidratação oral (TRO) com o uso da solução glicoeletrolítica recomendada pela Organização Mundial da

Saúde (OMS) tem provado ser altamente eficaz para a correção da desidratação associada às doenças diarréicas agudas de diversas etiologias, assegurando-se que os pacientes sejam capazes de beber e não apresentem sinais de desidratação grave⁴⁰. Embora a solução de reidratação oral (SRO) da OMS seja segura e eficaz⁴¹, apresenta importantes limitações: não reduz a taxa de perda fecal e nem encurta a duração da doença diarréica⁴²⁻⁴⁵. As mães habitualmente não compreendem a relação entre diarreia e desidratação e sua preocupação básica, compartilhada por muitos profissionais de saúde, é reduzir o volume ou a frequência das fezes ou a duração da diarreia. Esse fato, provavelmente, é responsável pelo uso indiscriminado de drogas anti-diarréicas e antibióticos, associados ou não uso de SRO para tratar a diarreia⁴⁶. O desenvolvimento de um medicamento de baixo custo, seguro, eficaz e estável ao armazenamento prolongado, que conjuntamente à TRO, fosse capaz de promover uma redução substancial nas perdas fecais totais, através da redução da duração do episódio diarréico ou da taxa de perda fecal, representaria uma enorme vantagem, melhorando, em particular, a receptividade e o uso da TRO por parte das mães e dos profissionais de saúde. Isso também resultaria em um uso reduzido de drogas ineficazes e antibióticos no manejo da diarreia aguda e em redução do impacto negativo no estado nutricional por meio da diminuição da duração dos episódios. Tais mudanças representariam um grande avanço no controle da morbidade e da mortalidade por doenças diarréicas através de um tratamento mais efetivo.

Existe um entusiasmo crescente em busca de uma terapêutica baseada nos conhecimentos atuais da fisiopatologia das doenças diarréicas, através da qual poderíamos interferir ativando e estabilizando a microbiota intestinal “fisiológica” ou promovendo competição com o germe patogênico, impedindo sua proliferação. Os trabalhos de investigação existentes na literatura mostram que dentre os probióticos, as leveduras e os lactobacilos reúnem as características potenciais mais promissoras como coadjuvantes na terapia das doenças diarréicas. O *Saccharomyces boulardii* está entre os microorganismos mais estudados para esta finalidade.

Com base nos mecanismos de ação descritos nos parágrafos anteriores – antagonismo microbiano, competição por sítio de adesão, inibição dos efeitos ou da produção de toxinas bacterianas, aumento das defesas anti-infecciosas não específicas (fagocitose, sistema complemento), aumento da atividade das dissacaridases –, foram desenvolvidos alguns trabalhos que demonstram a existência de algum efeito protetor no emprego de bactérias lácticas e do *Saccharomyces boulardii* nas doenças diarréicas.

Saavedra *et al.*⁴⁷ publicaram, em 1994, um estudo randomizado, duplo-cego, que avalia o efeito protetor de fórmulas lácteas suplementadas com *B. bifidum* e *S. thermophilus* contra diarreia por Rotavírus em crianças hospitalizadas por doença crônica. Este mostrou uma menor ocorrência de episódios de diarreia no grupo suplementado

- GS (6,9%) em relação ao grupo controle - GC (31%). Ademais, a prevalência de Rotavírus foi de 10,3% no GS versus 38,5% no GC. Estudos recentes têm sido conduzidos para avaliar a eficácia do *L. casei* subespécie GG no tratamento da diarreia aguda em crianças. Estes estudos, realizados na Finlândia e Paquistão, têm demonstrado que este microorganismo é eficaz em reduzir a duração dos episódios de diarreia aguda^{48,49}. Também tem sido empregado com sucesso na redução da diarreia do viajante⁵⁰.

Giudici (1985)⁵¹, utilizando o *Saccharomyces boulardii* em crianças não hospitalizadas, com diarreia sem desidratação, apresentou resultados de cura espontânea em 91% dos pacientes em 04 dias. Alguns trabalhos testaram a efetividade do *Saccharomyces boulardii* em pacientes hospitalizados com diarreia aguda e desidratação^{52,53} e revelaram resultados promissores. Assim, num estudo controlado utilizando uma amostra de 19 pacientes por grupo, Chapoy⁵² concluiu por uma superioridade do grupo tratado com *Saccharomyces boulardii*, que apresentou diferenças significativas para redução do número de dejeções ($P < 0,01$), alteração da consistência das fezes ($P < 0,05$) e redução do trânsito intestinal ($P < 0,05$). Materan⁵³, através de um estudo randomizado duplo-cego usando *Saccharomyces boulardii* ou placebo em 120 pacientes, mostrou uma diferença significativa na redução do número de evacuações após três dias, tanto na diarreia bacteriana ($2,36 \pm 1,52$ contra $3,95 \pm 2,4$, respectivamente; $P < 0,008$) quanto na virótica ($2,55 \pm 2,24$ contra $4,56 \pm 3,30$, respectivamente; $P < 0,03$). Acevedo et al.⁵⁴ apresentaram resultados positivos baseados, entre outros, no tempo médio de hospitalização, diminuição de perdas hídricas, redução do número de evacuações/dia, quando foi usado *Saccharomyces boulardii*, em um estudo com crianças que apresentavam diarreia aguda. Um trabalho publicado por Cetina-Sauri & Basto⁵⁵ mostrou resultados significativos ($P < 0,01$) em estudo duplo-cego, randomizado, com uma amostra de 130 pacientes, tendo o grupo que recebeu *Saccharomyces boulardii* cura de 84,6% (55/65), enquanto o grupo placebo apresentou eficácia de 40% (26/65), usando como critério de cura a redução do número de dejeções e a consistência das fezes às 48 e às 96 horas. Devido à falta de uniformidade na metodologia empregada, seria recomendável que estudos adicionais fossem conduzidos para confirmar o efeito benéfico deste probiótico, seguindo a metodologia duplo-cega, randomizada, com amostra de pacientes suficiente para evidenciar diferenças estatisticamente significativas e clinicamente relevantes, medindo-se a eficácia através de estudos de balanço metabólico em que se pode testar variáveis objetivas e passíveis de serem reproduzidas, como taxa de perda fecal e duração do episódio da diarreia.

Até 30% dos pacientes que recebem antibióticos podem ter diarreia de gravidade variável, mas somente 1/3 está associado à presença do *Clostridium difficile*⁵⁶⁻⁵⁸. As várias teorias sobre as causas da diarreia associada a antibióticos (DAA), como o supercrescimento de *Clostridium difficile*, o desnudamento de receptores ou locais de adesão de

toxinas causado pelo desaparecimento da microbiota normal, a diminuição dos ácidos graxos de cadeia curta devido ao desaparecimento de bactérias responsáveis pelo metabolismo dos carboidratos complexos, ou a falta de competição por nutrientes, causada pela mudança da microbiota normal, tem em comum o impacto dos antibióticos na microbiota normal do cólon^{11,59-62}. Por isso, foram feitas várias tentativas terapêuticas com agentes probióticos com a intenção de principalmente prevenir as DAA.

Diferentes preparações de *Lactobacillus* foram utilizadas para prevenção de DAA. Em um desses estudos⁶³, 79 pacientes hospitalizados em uso de ampicilina receberam uma mistura de *L. acidophilus* e *L. bulgaris* ou placebo. A incidência de diarreia foi de 0/36 e 6/43 pacientes no grupo tratado e no placebo respectivamente, mas este tipo de mistura não se mostrou eficaz em estudo semelhante⁶⁴. Outros trabalhos, utilizando *B. longum*⁶⁵, *Enterococcus faecium*⁶⁶, *L. casei* GG⁶⁷, mistura de *B. longum* e *L. acidophilus*⁶⁸, apresentam dificuldades de interpretação, ora porque o número de pacientes foi muito pequeno ou o tempo de tratamento foi curto, ora porque avaliaram-se sintomas subjetivos ou pouco importantes do ponto de vista clínico ou, ainda, porque apresentavam resultados marginais.

Na literatura existem três estudos⁶⁹⁻⁷¹ randomizados, duplo-cegos, para verificar o efeito preventivo do uso do *Saccharomyces boulardii* em pacientes que receberam antibióticos. O primeiro estudo foi realizado em 1976 na França, englobando 25 centros médicos e um total de 388 pacientes com idades superiores a 15 anos e recebendo tetraciclina ou antibiótico b-lactâmico devido a infecção do trato respiratório superior⁶⁹. Dos 199 pacientes tratados com *Saccharomyces boulardii* (100mg, 2 x /dia, via oral) apenas 9 (4,5%) desenvolveram diarreia quando comparados com os pacientes recebendo placebo (33/189; 17,5%). O outro estudo⁷⁰ demonstrou, também, a eficácia na prevenção da diarreia em pacientes hospitalizados. Neste estudo o *Saccharomyces boulardii* foi introduzido 48 horas após o início da antibioticoterapia e continuado por duas semanas após sua suspensão. A levedura foi administrada na dose de 500 mg, duas vezes ao dia, via oral. Dos 180 pacientes que completaram o estudo, 14 de 64 (21,8%) do grupo placebo apresentaram diarreia, comparados com 11 de 116 (9,5%; $P = 0,038$) que receberam o *Saccharomyces boulardii*. No terceiro estudo⁷¹, também multicêntrico, o *Saccharomyces boulardii* foi testado em 193 pacientes hospitalizados com idades iguais ou superiores a 18 anos e recebendo pelo menos um antibiótico b-lactâmico ou associação deste com outros antibióticos. O probiótico foi administrado por via oral na dose de 500 mg, duas vezes ao dia, introdução no máximo três dias após o início da antibioticoterapia e continuado até dois dias após sua suspensão. Os pacientes foram acompanhados por sete semanas. Dos 97 que receberam o *Saccharomyces boulardii*, 7 (7,2%) apresentaram diarreia comparados com 14 em 96 (14,6%; $P = 0,02$) do grupo controle. A eficácia do *Saccha-*

Saccharomyces boulardii em prevenir a diarreia associada a antibióticos foi importante. Neste mesmo trabalho, que usou análise multivariável para controle de fator risco, encontrou-se risco relativo nos pacientes que receberam o *Saccharomyces boulardii* de 0,29 (95%), com intervalo de confiança 0,08-0,98. Os resultados desses trabalhos indicam o efeito protetor do *Saccharomyces boulardii* na presença da diarreia associada, principalmente a antibióticos b-lactâmicos. Efeitos colaterais relacionados o com uso do *Saccharomyces boulardii* não foram observados nesses estudos.

Diarreia em pacientes infectados com HIV constitui uma grave complicação desta doença, sendo muitas vezes de difícil controle devido a sua causa multifatorial. Blehaut *et al.*⁷² (1992) apresentaram estudo controlado, duplo-cego em, 35 pacientes aids adultos com diarreia crônica superior a 24 dias. O *Saccharomyces boulardii* foi utilizado na dose 1,5 gramas, duas vezes ao dia, durante uma semana. As etiologias para a diarreia foram *Cryptosporidium* (17%), *Candida* (14%), Sarcoma de Kaposi (8%), *Mycobacterium atipica* (8%), Citomegalovirus (8%), *Mycobacterium* (6%) e causa desconhecida (39%). No final do ensaio clínico, 10/18 dos pacientes que receberam *Saccharomyces boulardii* curaram a diarreia contra 1/17 dos que receberam placebo (P < 0,001).

O efeito do *Saccharomyces boulardii* na prevenção da diarreia do viajante foi avaliado, em estudo duplo-cego, por Kollaritsh *et al.*⁷³ através de sua administração a adultos que viajavam para várias regiões do mundo. Os viajantes em número de 1.231 foram divididos em três grupos: placebo, *Saccharomyces boulardii* na dose de 250 mg ao dia e um terceiro grupo que recebeu o probiótico na dose diária de 500 mg. A incidência de diarreia foi respectivamente de 42,6%; 33,6% e 31,8% (P < 0,002). Os resultados em prevenir a diarreia foram melhores, dependendo da região geográfica para a qual viajavam como, por exemplo, para o norte da África, 58% (P < 0,01), podendo este efeito ser devido a variação do agente etiológico. Outro ponto importante a ser considerado é a adesão ao tratamento.

Pacientes recebendo alimentação por sonda nasoenteral apresentam maior risco de desenvolverem diarreia. A causa está relacionada principalmente com a alteração da microbiota intestinal, com supercrescimento bacteriano no intestino delgado, que pode interferir na digestão dos carboidratos e na desconjugação dos sais biliares. Outro fator causal para a diarreia está relacionado com a osmolalidade da dieta, velocidade de administração, medicamentos e doença de base. Dois estudos^{74,75} randomizados, duplo cegos, utilizando o *Saccharomyces boulardii*, foram realizados em pacientes adultos com alimentação por via nasogástrica e enteral. O primeiro⁷⁴ com 40 pacientes sob cuidados intensivos e alimentados a débito contínuo via naso-enteral. Vinte pacientes que receberam o *Saccharomyces boulardii* (500mg/litro da solução) apresentaram 34 dias de diarreia (8,7%), durante 389 dias de observação. No grupo placebo houve 63 dias de diarreia (16,9%), durante os 373 dias de

observação (P < 0,001). O segundo estudo⁷⁵ foi realizado em 20 pacientes gravemente queimados que receberam alimentação por via nasogástrica. Foram randomizados para receberem o *Saccharomyces boulardii* (2g/dia) ou placebo durante oito a 28 dias de alimentação. O número de pacientes recebendo o *Saccharomyces boulardii* que apresentaram pelo menos um dia de diarreia, bem como a duração deste sintoma, foi significativamente menor quando comparado com o grupo que recebeu placebo (P < 0,001). Outros estudos com maior número de pacientes são recomendados para melhor análise do uso do *Saccharomyces boulardii* em prevenir diarreia em pacientes que receberam alimentação enteral.

As complicações do uso do *Saccharomyces boulardii* têm sido investigadas principalmente em modelos animais. Em camundongos, a administração do *Saccharomyces boulardii* por 70 dias na água de beber, na concentração de 5%, não levou a translocação do trato gastrointestinal para outros órgãos⁷⁶. Em modelos de animais imunossuprimidos (prednisolona e descontaminação por antibiótico), o *Saccharomyces boulardii* foi encontrado em baixas concentrações nos linfonodos mesentéricos, não sendo detectados no fígado, baço ou rins²⁸. Em estudos utilizando camundongos convencionais imunossuprimidos com ciclofosfamida e recebendo por via oral doses variadas de *Saccharomyces boulardii* (0,1mg; 1,0mg e 10mg) por 7 dias, encontrou-se, independente da dose, translocação da levedura em baixas concentrações, principalmente para linfonodos mesentéricos, em alguns animais. A translocação para fígado e baço ocorreu raramente, e sempre, nos animais em que havia translocação do *Saccharomyces boulardii*, foi encontrado nível significativo de translocação bacteriana. Neste trabalho foi encontrada proteção de translocação bacteriana para fígado nos animais que receberam *Saccharomyces boulardii* na dose de 0,1 mg²⁹. Ao longo de 40 anos de uso, foram milhares de tratamentos com *Saccharomyces boulardii* no homem, tendo sido publicados apenas sete casos nos quais o microorganismo foi encontrado no sangue dos pacientes⁷⁷⁻⁸². Alguns fatores estavam presentes nestes pacientes como precárias condições gerais, provável lesão da mucosa intestinal devido a desnutrição, diarreia crônica, isquemia intestinal, uso de antibióticos de largo espectro alterando a microbiota intestinal e altas doses do probiótico. Dentre estes casos, três ocorreram em crianças: uma com grave queimadura (55%) com infecção do trato urinário por *E. faecium*⁸¹; um lactente de 1 ano de idade com diarreia protraída, desnutrição grave e broncopneumonia⁸⁰; outro lactente de 20 meses de idade com síndrome do intestino curto, história recente de septicemia, recebendo *Saccharomyces boulardii* durante 11 meses⁷⁹. Entre os quatro adultos, um paciente estava coletomizado e apresentava história recente de choque séptico⁸²; dois eram HIV-positivos, imunossuprimidos com catéteres venosos centrais⁷⁸, e um paciente desenvolveu fungemia após recuperação de parada cardíaca e isquemia de mucosa intestinal⁷⁷. Todos os pacientes recuperaram-se após tratamento antimicótico.

Não existem relatos de resistência do *Saccharomyces boulardii* aos antimicóticos. Estes dados da literatura indicam segurança para o uso oral do *Saccharomyces boulardii*. Cuidados devem ser seguidos nos pacientes gravemente enfermos, principalmente, os imunossuprimidos.

Conclusões e perspectivas

Os trabalhos experimentais e clínicos com probióticos mostram possibilidade de aplicações desses bioterapêuticos para compensar uma redução prevista (prevenção) ou instalada (tratamento) das funções da microbiótica digestiva. Os dados disponíveis na literatura não sugerem uma possibilidade de estimulação das defesas ecológicas acima dos níveis basais, de maneira similar à estimulação das defesas imunológicas com o uso de vacinas. Existem alguns pontos dos probióticos que exigem elucidações complementares, levando muitos pesquisadores a adotar posições algumas vezes extremas em relação a esses produtos. Contudo, devemos lembrar que não se pode esperar dos probióticos características funcionais que não são exigidas para outros agentes terapêuticos (nenhuma contra-indicação, nenhum efeito secundário, eficiência total, etc.).

Os probióticos representam uma importante alternativa aos antimicrobianos convencionais, aos quais muitos microorganismos patogênicos podem desenvolver resistência. Em relação ao seu potencial protetor, cada probiótico dispõe de mecanismos múltiplos simultâneos de ação como antagonismo contra microorganismos patogênicos, efeito trófico nas mucosas, imunoestimulação do hospedeiro e/ou inibição da produção ou ação de toxinas bacterianas. Isso representa uma grande diferença e vantagem em relação aos quimioterapêuticos, dificultando o desenvolvimento de resistência por mutações pontuais pelos agentes patogênicos. Uma outra vantagem dos probióticos em relação aos antimicrobianos convencionais é a ausência de impacto nefasto sobre o ecossistema digestivo.

As bactérias lácticas e o *Saccharomyces boulardii* foram particularmente estudados, mas o maior número de trabalhos clínicos com bioterapêuticos tem sido publicado sobre a ação do *Saccharomyces boulardii*⁸³. Os estudos demonstram uma eficácia do *Saccharomyces boulardii* na diarreia do viajante, na diarreia produzida pelos antibióticos, principalmente β -lactâmicos, com ou sem enterocolite pseudomembranosa associada. Nos casos refratários de enterocolite pseudomembranosa causada pelo *Clostridium difficile* são demonstradas boas respostas terapêuticas, principalmente quando associados o *Saccharomyces boulardii* e a vancomicina. Na diarreia aguda, diversos trabalhos mostram evidências de ação benéfica que devem ser reforçadas por novos ensaios bem controlados. Trabalhos com outros probióticos, como *L. casei* GG, *L. acidophilus* e *B. longum*, sugerem possíveis aplicações em diferentes tipos de diarreia, mas o emprego dos lactobacilos necessita de estudos mais bem controlados e em mais ampla escala⁸³.

Dois grandes problemas requerem maiores investigações para proporcionar um melhor uso e, portanto, desempenho dos probióticos: o conhecimento mais aprofundado tanto sobre os mecanismos de ação desses bioterapêuticos, como das leis que regulam os equilíbrios populacionais no ecossistema microbiano onde eles devem agir. Com a obtenção de informações mais detalhadas em relação a esses dois problemas, o emprego dos probióticos representará uma estratégia, ainda mais eficiente para o combate contra infecções, face ao quadro preocupante de resistência cada vez mais freqüente dos microorganismos patogênicos aos antibióticos.

Referências bibliográficas

1. Fuller R, Gibson GR. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scand J Gastroenterol* 1997; 222: 28-31.
2. Metchnikoff E. *The Prolongation of life*. London: William Heinemann; 1907.
3. Tissier H. Répartition des microbes dans l'intestin du nourrisson. *Ann Inst Pasteur* 1905; 19: 109-15.
4. Tannock GW. Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental RD. *TIBTech* 1977; 15: 270-4.
5. Mac Farland LV, Bernasconi P. *Saccharomyces boulardii*: a review of an innovative biotherapeutic agent. *Microb Ecol Health Dis* 1993; 6: 157-71.
6. Fuller R. *Probiotics: the Scientific basis*. London: Chapman & Hall; 1992. p. 214.
7. Lidbeck A, Gustafsson JA, Nord CE. Impact of *Lactobacillus acidophilus* supplements on the oropharyngeal and intestinal microflora. *Scand J Infect Dis* 1987; 19: 531-7.
8. Klein SM, Elmer GW, Macfarland LV, Surawicz CM, Levy RH. Recovery and elimination of the biotherapeutic agent, *Saccharomyces boulardii*, in healthy human volunteers. *Pharm Res* 1993; 10: 1615-9.
9. Bounnik Y, Pochart P, Marteau P, Arlet G, Goderel I, Rambaud JC. Fecal recovery in humans of viable *Bifidobacterium sp* ingested in fermented milk. *Gastroenterology* 1992; 102: 875-8.
10. Ducluzeau R, Raibaud P. *Ecologie microbienne du tube digestif*. Paris: Masson Ed.; 1979. p.1996.
11. Wilson KH, Perini F. Role of competition for nutrients in suppression of *Clostridium difficile* by the colonic flora. *Infect Immun* 1988; 56: 2610-4.
12. Blomberg L, Henriiksson A, Conway PL. Inhibition of adhesion of *Escherichia coli* k88 to piglet ileal mucus by *Lactobacillus spp*. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59: 34-39.
13. Bernet MH, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* 1994; 35: 483-489.
14. Rigotherier MC, Maccario J, Viong PN, Gayral P. Effets des levures *Saccharomyces boulardii* sur les trophozoites d'*Entamoeba histolytica* *in vitro* et dans l'amebiase caecale du jeune rat. *Ann Parasitol Hum Comp* 1990; 65: 51-60.
15. Rigotherier MC, Macario J, Gayral P. Inhibitory activity of *Saccharomyces* yeasts on the adhesion of *Entamoeba histolytica* trophozoites to human erythrocytes *in vitro*. *Parasitol Res* 1994; 80: 10-5.
16. Vandenberg PA. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol Rev* 1993; 12: 221-38.

17. Rodrigues ACP, Nardi RM, Bambilra EA, Vieira EC, Nicoli JR. Effect of *Saccharomyces boulardii* against experimental oral infection with *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* in conventional and gnotoxenic mice. *J Appl Bacteriol* 1996; 81: 251-6.
18. Corthier G, Dubos F, Raibaud P. Modulation of cytotoxin production by *Clostridium difficile* in the intestinal tracts of gnotobiotic mice inoculated with various human intestinal bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1985; 49: 250-252.
19. Dias RS, Bambilra EA, Silva ME, Nicoli JR. Protective effect of *Saccharomyces boulardii* against the cholera toxin in rats. *Braz J Med Biol Res* 1996; 28: 323-325.
20. Vidon N, Huchet B, Rambaud JC. Influence de *Saccharomyces boulardii* sur la sécrétion jéjunale induite chez le rat par la toxine cholérique. *Gastroenterol Clin Biol* 1986; 10:13-6.
21. Czerucka D, Roux I, Rampal P. *Saccharomyces boulardii* inhibits secretagogue-mediated adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate induction in intestinal cells. *Gastroenterology* 1994; 106: 65-72.
22. Massot J, Desconclois M, Astoin J. Protection par *Saccharomyces boulardii* de la diarrhée à *Escherichia coli* du souriceau. *Ann Pharm Fr* 1982; 40: 445-9.
23. Pothoulakis C, Kelly CP, Joshi MA, et al. *Saccharomyces boulardii* inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum. *Gastroenterology* 1993; 104: 1108-15.
24. Brandão RL, Castro IM, Neves MJ, Bambilra EA, Amaral SC, Fietto LG, et al. Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 564-8.
25. Bloksma N, de Heer E, van Dijk H, Willers JM. Adjuvanticity of lactobacilli. I. Differential effects of viable and killed bacteria. *Clin Exp Immunol* 1979; 37: 367-75.
26. Perdigon G, Alvarez S. Probiotics and the immune state. In: Fuller R, ed. *Probiotics: the Scientific basis*. London: Chapman & Hall; 1992. p.145-80.
27. Ducluzeau R, Bensaada M. Effet comparé de l'administration unique ou en continue de *Saccharomyces boulardii* sur l'établissement de diverses souches de *Candida* dans le tractus digestif de souris gnotoxéniques. *Ann Microbiol (Inst. Pasteur)* 1982; 133: 491-501.
28. Berg R, Bernasconi P, Fowler D, Gautreaux M. Inhibition of *Candida albicans* translocation from the gastrointestinal tract of immunosuppressed mice by oral treatment with *Saccharomyces boulardii*. *J Infect Dis* 1993; 168: 1314-8.
29. Péret LAF, Penna FJ, Bambilra EA, Nicoli JR. Dose effect of oral *Saccharomyces boulardii* treatments on morbidity and mortality in immunosuppressed mice. *J Med Microbiol* 1997; 46: 111-6.
30. Buts JP, Bernasconi P, Van Craynest MP, Maldague P, de Meyer R. Response of human and rat small intestinal mucosa to oral administration of *Saccharomyces boulardii*. *Pediatr Res* 1986; 20: 192-6.
31. Buts JP, Bernasconi P, Vaerman JP, Drive C. Stimulation of secretory IgA and secretory component of immunoglobulins in small intestine of rats treated with *Saccharomyces boulardii*. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 251-6.
32. Machado Caetano JA, Parames MT, Babo MJ, et al. Immunopharmacological effects of *Saccharomyces boulardii* in healthy human volunteers. *Int J Immunopharmacol* 1986; 8: 245-9.
33. Matsu, Kurahoshi Y, Nishid S, Onodera C, Izawa M, Hanuro J. Effect of leutinan, a specific T-cell adjuvant, on murine granulopoiesis and its roles on antitumour effect. *Int J Immunopharmac* 1982; 4: 269.
34. Gilliland SE. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 1990; 87: 175-88.
35. Besnier MO, Bourlioux P, Fourniat J, Ducluzeau R, Aumaitre A. Influence de l'ingestion de yogurt sur l'activité lactasique intestinale chez des souris axéniques ou holoxéniques. *Ann Microbiol* 1983; 134A: 219-30.
36. Gallagher CR, Molleson AL, Caldwell JH. Lactose intolerance and fermented dairy products. *J Am Diet Assoc* 1974; 65: 418-9.
37. Tabor CW, Tabor H. Polyamines. *Ann Rev Biochem* 1984; 53: 749-90.
38. Buts JP, Keyser N, Raedemaeker L. *Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines. *Pediatr Res* 1994; 36: 522-7.
39. Buts JD, De Keyser N, Kolanowski J, Sokal E, Van Hoof F. Maturation of villus and crypt cell functions in rat small intestine role of dietary polyamines. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 1091-8.
40. Avery ME, Snyder JD. Oral therapy for acute diarrhea. The underused simple solution. *N Engl J Med* 1990; 323: 891-4.
41. Mahalanabis D. Development of an improved formulation of oral rehydration salts (ORS) with antidiarrhoeal and nutritional properties: a "super ORS". 1985 (unpublished WHO document WHO/CDD/DDM/85.3).
42. Hishchhorn N, Kinzie JL, Sachar DB. Decreased in net stool output in cholera during intestinal perfusion with glucose containing solutions. *N Engl J Med* 1968; 279: 176-80.
43. Mahalanabis D, Sack RB, Jacobs B. Use an oral-glucose-electrolyte solution in the treatment of pediatric cholera: a controlled study. *J Trop Pediatr Environ Child Health* 1974; 20: 82-7.
44. Pierce NF, Barnwell JC, Mitra RC. Effect of intra gastric glucose-electrolyte infusion upon water and electrolyte balance in Asiatic cholera. *Gastroenterology* 1968; 55: 333-43.
45. Sack SA, Chowdhury AMAK, Eusof A. Oral hydration in rotavirus diarrhea: a double-blind comparison of sucrose with glucose-electrolyte solution. *Lancet* 1978; ii: 280-3.
46. World Health Organization - Diarrhoeal Disease Control Programme. Seventh programme report 1988-1989. 1990 (unpublished WHO document WHO/CDD/90.34), pp. 19-23.
47. Saavedra JM, Bauman NA, Oung I, Perman JA, Yolken RH. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus. *Lancet* 1994; 344: 1046-9.
48. Isolauri E, Juntunen M, Rautanen T, Silanaukee P, Kiovula T. A human lactobacillus strain (*Lactobacillus casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics* 1991; 88: 90-7.
49. Majamaa H, Isolauri E, Saxelin M, Vesikari T. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995; 20: 333-8.
50. Okasanen PJ, Salminen S, Saxelin M. Prevention of traveller's diarrhoea by *Lactobacillus* GG. *Ann Med* 1990; 22: 53-6.
51. Giudici HJ, Botto L, Montejo de Aramayo IA, Aramayo L. Evaluación clínica de la administración de *Saccharomyces boulardii* "Vitales" en el tratamiento de la diarrea aguda en niños. Informe preliminar. *La Semana Medica* 1985; 167: 254-62.
52. Chapoy P. Traitement des diarrhées aiguës infantiles: Essai contrôlé de *Saccharomyces boulardii*. *Ann Pediatr* 1985; 32: 561-3.
53. Materan RM, Salcedo O, Duran N, Divo M. Estudio contra placebo del *Saccharomyces boulardii* en el tratamiento de la diarrea aguda infantil. *Arch Ven Puer Ped* 1992; 55: 27-36.
54. Acevo L, Guerra L, Moron E, Rendon C, Cicco F. Efecto del *Saccharomyces boulardii* en niños con diarreas infecciosas agudas. *Arch Ven Farmacol Terap* 1992; 11: 12-16.

55. Cetina-Sauri G, Basto GS. Evaluation thérapeutique de *Saccharomyces boulardii* chez des enfants souffrant de diarrhée aiguë. *Ann Pediatr* 1994; 41: 397-400.
56. Bartlett JG. Antibiotic-associated diarrhea. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 573-81.
57. Mc Farland LV. Diarrhea acquired in the hospital. In: Giannello RA, ed. *Acute Infectious Diarrhea*. *Gastroenterol Clin North Am* 1993; 22: 563-77.
58. Zaidi N, Ponce de Leon S, Ortiz RM. Hospital-Acquired diarrhea in adults: a prospective case controlled study in Mexico. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1991; 12: 349-55.
59. Clausen MR, Bouven H, Tvede M. Colonic fermentation to short-chain fatty acids is decreased in antibiotic-associated diarrhea. *Gastroenterology* 1991; 101: 1497-1504.
60. Hoerstad T, Carlstedt-Duke B, Lingaas E. Influence of ampicillin, clindamycin and metronidazole on fecal excretion of short-chain fatty acids in healthy subjects. *Scand J Gastroenterol* 1986; 21: 621-26.
61. Nord CE, Edlund C. Impact of antimicrobial agents on human intestinal microflora. *J Chemother* 1990; 2: 218-37.
62. Rao SSC, Edwards CA, Amsten CI. Impaired colonic fermentation of carbohydrate after ampicillin. *Gastroenterology* 1988; 94: 928-32.
63. Gotz V, Romankiewicz JA, Moss J, Murray HW. Prophylaxis against ampicillin-associated diarrhea with a Lactobacillus preparation. *Am J Hosp Pharm* 1979; 36: 754-7.
64. Tankanow RM, Ross MB, Etel IJ, Dickinson DG, McCormick LS, Garfinkel JF. A double-blind placebo-controlled study of the efficacy of Lactinex in the prophylaxis of amoxicillin-induced diarrhea. *DICP* 1990; 24: 382-4.
65. Colombel JF, Cortot A, Neut C, Romond C. Yoghurt with *Bifidobacterium longum* reduces erythromycin-induced gastrointestinal effects. *Lancet* 1987; 2: 43.
66. Wunderlich PF, Braun L, Fumagalli I, et al. Double-blind report of the efficacy of lactic acid-producing *Enterococcus* SF68 in the prevention of antibiotic-associated diarrhea and in the treatment of acute diarrhea. *J Int Med Res* 1989; 17: 333-8.
67. Siitonen S, Vapaatalo H, Salminen S. Effect of *Lactobacillus* GG yoghurt in prevention of antibiotic-associated diarrhea. *Ann Med* 1990; 22: 57-9.
68. Orrhage K, Brismar B, Nord CE. Effects of supplements of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal microbiota during administration of clindamycin. *Microb Ecol Health Dis* 1994; 7: 17-25.
69. Adam J, Barret A, Barret-Belle C. Essais cliniques contrôlés en double insue de l'ultra-levure lyophilisée: étude multicentrique par 25 médecins de 388 cas. *Gazette Med France* 1977; 84: 2072-8.
70. Surawicz CM, Elmer GW, Speelman P, Mc Farland LV, Chinn J, Van Belle G. Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: a prospective study. *Gastroenterology* 1989; 96: 981-8.
71. Mc Farland LV, Surawicz CM, Greemberg RN, Elma GW, Moyer KA, Melcher AS, et al. Prevention of b-lactam-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. *Am J Gastroenterol* 1995; 3: 439-48.
72. Blehaut H, Saint-Marc T, Touroine JL. Double blind trial of *Saccharomyces boulardii* in AIDS related diarrhea. VIII International Conference on AIDS/III STD World Congress 1992 jul. 19-24, Amsterdam, The Netherlands.
73. Kollaritsch H, Holst H, Grobore P, Wiedermann G. Prophylaxe der Reisediarrhöe mit *Saccharomyces boulardii*. *Fortschr Med* 1993; 111: 153-6.
74. Tempé JD, Steidel AL, Bléhaut H, Hasselman M, Lutun PH, Maurier F. Prévention par *Saccharomyces boulardii* des diarrhées de l'alimentation entérale à débit continu. *Sem Hôp Paris* 1983; 59: 1409-12.
75. Schlotterer M, Bernasconi P, Lebreton F, Wassermann D. Intérêt de *Saccharomyces boulardii* dans la tolérance digestive de la nutrition entérale à débit continu chez le brûlé. *Nutr Clin Metabol* 1987; 1: 31-4.
76. Blehaut H, Masot J, Elmer GW, Levy RH. Disposition kinetics of *Saccaromyces boulardii* in man and rat. *Biopharm Drug Dispos* 1989; 10: 353-64.
77. Boucaud C, Berrade K, Boiletreau P. Septicémie à *Saccharomyces boulardii* après administration orale d'ultra-levure. *Réan Urg* 1996; 5: 665.
78. Forge G, Aznar C, Marguet F, Polomeni P, Bouchet R, Manicocci M. *Saccharomyces fungemia* in AIDS patients after treatment for chronic diarrhea. V European Conference on Clinical Aspects and Treatment of HIV infection 1995 set 26-29; Copenhagen-Denmark.
79. Grillot R, Lebeau B, Gorrieler-Fleuret, Choraqui JP, Andrimi P. De deux maux il faut choisir le moindre ou du caractère opportuniste de *Saccharomyces boulardii*. *Soc Fr Mycol Méd* 1986.
80. Pletincx LJ, Legrin J, Vandenplas Y. Fungemia with *Saccharomyces boulardii* in a 1-year-old girl with protracted diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995; 21: 113-5.
81. Viggiano M, Badetti C, Bernini V, Garabedian M, Manelli JC. Fongémie à *Saccharomyces boulardii* chez un brûlé grave. *Ann Fr Anesth Réanim* 1995; 14: 356-8.
82. Zunic P, Lacotte J, Pegoix M, Butux G, Leroy G, Mosquet B, et al. Fongémie à *Saccharomyces boulardii*. *Thérapie* 1991; 45: 497-501.
83. Roffe C. Biotherapy for antibiotic-associated and other diarrhoeas. *J Infect* 1996; 32: 1-10.

Endereço para correspondência:

Dr. Francisco José Penna
Rua General Carneiro, 295 - Sagrada Família
Belo Horizonte - MG - CEP 31030-170
Fone: (31) 224.3088 - Fax: (31) 224.7041