



Efeito da Ingestão Aguda de Álcool na Microbiota do Trato Gastrointestinal e na Produção Local de IgA Secretora em Camundongos

Effect of Acute Alcohol Ingestion in the Microbiota of the gastrointestinal tract and in Local IgA Secretory Productions in Mice

Andreza Cristina de Souza Lima¹
Hildebrando Pereira da Silva¹
Miguel da Silva Diniz¹
Bruno Braga Roberto²
Filipe Didier Maciel²
Mariléia Chaves Andrade³

¹ Alunos do Programa de Desenvolvimento de Iniciação Científica do 4º ano do curso de Medicina da Faculdade de Medicina de Itajubá – FMIt

² Alunos do 6º ano do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina de Itajubá - FMIt

³ Doutora em Imunologia. Professora das disciplinas Microbiologia, Parasitologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Itajubá-FMIt

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina de Itajubá – FMIt

Apoio financeiro Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Correspondência:
Mariléia Chaves Andrade
Rua Joviano Lucas de Almeida, 167,
Céu Azul – Belo Horizonte-MG Brasil
CEP: 31585-300
E-mail: marileia@cpqrr.fiocruz.br

RESUMO

Introdução: O trato gastrointestinal é colonizado logo após o nascimento por bactérias que desenvolvem populações complexas e estáveis, normalmente benéficas ao hospedeiro. Entretanto, diversos fatores, como a ingestão de álcool, podem promover disfunções na microbiota intestinal, acarretando prejuízo ao indivíduo. **Objetivo:** Avaliar o impacto da ingestão aguda de álcool sobre a microbiota gastrointestinal e produção de IgA secretória no muco de camundongos. **Metodologia:** 30 camundongos BALB/c, fêmeas adultas, foram tratadas por 4 dias consecutivos com álcool ou salina. No quinto dia foram sacrificados e retirados amostras de estômago, intestino delgado e grosso para análises. Foi feita uma lavagem em cada órgão para o isolamento dos microrganismos além da análise de IgA secretória no muco, pelo método de ELISA. **Resultados:** Animais tratados por via intragástrica com etanol apresentaram redução no número de colônias bacterianas em todos os segmentos do trato gastrintestinal. Além disso, foi observado um aumento no percentual de bactérias fermentadoras de glicose no estômago e intestino grosso em comparação com o grupo controle, associado a alterações no percentual de colônias lactose positivas em todo o trato gastrintestinal. Em relação à avaliação imunológica, observou-se no intestino grosso, uma redução significativa nos níveis dessa imunoglobulina no grupo tratado com etanol. **Conclusão:** O álcool causa um desequilíbrio na microbiota intestinal, que pode inclusive estar favorecendo o crescimento de colônias patogênicas em detrimento das simbióticas. Uma vez que o hábito de ingerir álcool é frequente na sociedade, esses resultados abrem perspectivas para estudos mais elucidativos com possíveis implicações clínicas.

Palavras chave: Álcool, trato gastrointestinal, microbiota, disbiose, IgA.

ABSTRACT

Introduction: The gastrointestinal tract is colonized soon after birth by bacteria that develop complex and stable populations, usually beneficial to the host. However, several factors, as alcohol ingestion, may promote dysfunctions in the intestinal microbiota, causing injury to the individual. **Objective:** To evaluate the impact of acute alcohol ingestion on gastrointestinal microbiota and secretory IgA production in the mucus. **Methods:** 30 mice BALB/c, adult females were treated for 4 consecutive days with saline or alcohol. On the fifth day they were sacrificed and samples were taken from the stomach, small and large intestine for analysis. It was made a body wash for the isolation of the gut microorganisms besides analysis of secretory IgA in the mucus. **Results:** Animals treated with ethanol by intragastric administration presented a reduction in the counts bacteria colonies in all segments of gastrointestinal tract. It was also observed an increase in percentage of colonies with properties of glucose fermentation in stomach and large intestine, besides alterations in percentage of lactose positive colonies in all gastrointestinal compartments of ethanol treated mice. In relation to immunological evaluation, it was observed in the large intestine, a significantly reduction in the concentration of this immunoglobulin in the ethanol treated mice. **Conclusion:** Ethanol point to an imbalance in intestinal microbiota, which may even be encouraging the growth of colonies at the expense of pathogenic symbiotic. Once the habit of drinking alcohol is prevalent in society, these results open perspectives for further studies elucidating with clinical implications.

Key words: Alcohol, gastrointestinal tract, microbiota, imbalance, IgA.

INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal é o primeiro segmento do corpo a entrar em contato com as substâncias ingeridas. Dentre suas principais funções incluem-se a digestão, absorção dos alimentos e eliminação dos produtos sólidos do catabolismo.¹ É constituído por um longo tubo muscular, que chega a medir sete vezes o tamanho do indivíduo e por glândulas anexas, como o fígado e o pâncreas. Inicia-se na boca, passa pela faringe, esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso e finalmente termina no reto.

Ao longo de todo o tubo digestivo de um indivíduo adulto normal existe uma grande quantidade de microrganismos, diferentemente distribuídos em microambientes, caracterizando uma microbiota compartimentalizada. Cada região do trato gastrointestinal possui uma microbiota própria, peculiar, que se encontra parcialmente determinada.^{2,3}

A colonização do trato gastrointestinal depende da capacidade de adesão das bactérias, em receptores denominados sítios de adesão na mucosa intestinal.⁴ Espécies com esta característica tendem a colonizar de forma permanente, sem necessidade de reintrodução periódica, e constitui a denominada microbiota autóctone. Pelas características biológicas citadas, a microbiota autóctone tende a ser estável quanto às espécies bacterianas e quanto ao número de colônias ao longo do tempo, acompanhando o indivíduo durante toda a vida.⁵

Apesar de serem encontradas em todo o trato gastrointestinal, a distribuição das bactérias é bastante heterogênea.⁶ No estômago e no intestino delgado o ambiente é desfavorável para a colonização e proliferação bacteriana, que é reduzida, por ação bactericida do suco gástrico, da bile e da secreção pancreática, como pelo intenso peristaltismo do intestino delgado. No cólon, as bactérias encontram condições favoráveis para sua proliferação devido à ausência de secreções intestinais, peristaltismo lento e abundante suprimento nutricional. A população microbiana do cólon alcança 10^{10} a 10^{12} microrganismos por grama de conteúdo luminal, e supera em número o total das células eucarióticas presentes no corpo humano.^{6,7}

A enorme população bacteriana do trato gastrointestinal é composta predominantemente por poucos gêneros bacterianos, altamente diversos quanto às espécies.⁸ Prevaecem os gêneros bacteróides, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Ruminococcus*. Estima-se a existência de cerca de 300 a 500 diferentes espécies de bactérias, com composição variada em cada indivíduo.⁶ Três importantes funções são desencadeadas por esses microrganismos: a) a resistência à colonização, que pode ser definida como a capacidade de impedir ou reduzir a multiplicação de microrganismos exógenos que por acaso penetram no ecossistema digestivo; b) a imunomodulação do sistema imune da mucosa intestinal; c) a contribuição nutricional, que oferece diversas fontes

energéticas e de vitaminas, além de participar da regulação da fisiologia digestiva do hospedeiro.⁹

Diante dessa íntima inter-relação com o organismo, uma disfunção na microbiota intestinal pode resultar em consequências danosas para o indivíduo.¹⁰ Esse fato é denominado disbiose e está relacionado a diversos fatores como o estresse, mudança na alimentação, uso prolongado de antibióticos e, dentre fatores químicos, destaca-se a ingestão de álcool.¹¹

Atualmente, o álcool, cientificamente conhecido como etanol (álcool etílico), é a droga de abuso mais consumida em todo o mundo.⁹ O alcoolismo constitui um dos mais graves problemas médico-sociais dos grandes centros na atualidade. Esse fato tem preocupado governos, profissionais da saúde e a sociedade de um modo geral,¹² e as repercussões do uso abusivo na saúde do indivíduo acabam tornando comum o atendimento de pacientes dependentes nos hospitais gerais.¹²⁻¹⁶

Nesse contexto, é devidamente importante a compreensão das alterações no trato gastrointestinal após contato com o álcool. Alterações morfológicas e funcionais do trato gastrointestinal têm sido descritas em humanos¹⁷ e animais experimentais,¹⁸ caracterizando-se, essencialmente, pela lesão de barreira epitelial interferindo na absorção de nutrientes e no sistema imune de mucosa.¹⁹

Recentemente, Andrade e colaboradores²⁰ estabeleceram um modelo experimental de indução de gastrite aguda pela administração intragástrica de etanol 50 % em camundongos C57BL/6. Esses animais apresentaram várias alterações imunológicas e funcionais no trato gastrointestinal, dentre estas, a redução da atividade da pepsina no estômago, diminuição do muco estomacal e intestinal e aumento da concentração de proteínas intactas no sangue. Apesar do crescente interesse sobre os efeitos do álcool no organismo, pouco se tem feito para investigar o impacto da administração de etanol sobre microbiota autóctone e suas consequências para a homeostase no trato gastrointestinal.

Tendo em vista o uso abusivo de álcool como um padrão de ingestão que vem resultando em efeitos deletérios à saúde, dificultando as relações sociais e/ou problemas legais, torna-se relevante desenvolver estudos que investiguem a exposição do trato gastrointestinal em presença da administração de etanol bem como suas consequências. Neste sentido, o objetivo deste trabalho consistiu em avaliar o impacto da ingestão aguda de álcool sobre a diversidade da microbiota do trato gastrointestinal, além da avaliação imunológica pela produção de IgA secretória no muco.

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado na sala de experimentação animal do Biotério e no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de Itajubá (FMI). Este estudo obedeceu à Lei Federal 6.638 e às

orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi realizado somente após aprovação do projeto pelo Conselho de Ética em Pesquisa Animal (CEP) da Faculdade de Medicina de Itajubá – FMI.

Os procedimentos de análise imunológica foram realizados no Laboratório de Imunobiologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Animais:

Foram utilizados nesse trabalho 30 camundongos da linhagem BALB/c, fêmeas, com 8-10 semanas de idade, fornecidas pelo Biotério da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG e mantidas no Biotério da Faculdade de Medicina de Itajubá – FMI.

Os animais do grupo experimental (n=10) receberam 4 administrações intragástricas de 0,2 mL de etanol 50% (v/v) (utilizando uma agulha de ponta arredondada acoplada a uma seringa de 1ml), durante 4 dias consecutivos, ou somente 0,2 mL de salina fisiológica NaCl 0,15M nos animais do grupo controle (n=10), seguindo o protocolo descrito por Andrade e colaboradores (2006)²⁰. Em todo o trabalho os animais tiveram água e ração *ad libitum* e alterações comportamentais foram anotadas durante e após as administrações intragástricas de etanol.

No 5º dia do experimento, ou seja, 24 horas após a última administração intragástrica de salina ou etanol o estômago, intestinos e os microrganismos foram coletados.

Obtenção de lavados do trato gastrointestinal:

Os órgãos: estômago, intestino delgado e intestino grosso foram retirados e lavados com 4 mL de salina fisiológica. Em seguida, os conteúdos dos lavados intestinais foram diluídos (intestino delgado: 1:1000, e intestino grosso: 1:10000. Uma alíquota de 100µL foi diluída em 0,9 mL de caldo nutriente para cultura, completando 1000 µL de solução. Deste preparado foram retirados 100 µL para plaqueamento (detalhado no próximo item). No caso do estômago foi utilizado o lavado total (sem diluição), sendo pipetados 100 µL, que foram diretamente plaqueados.

Plaqueamento

Após a coleta descrita no item anterior, os lavados do estômago e as diluições dos intestinos foram plaqueados. A semeadura em placas ou plaqueamento revela o número de células capazes de se multiplicarem e formarem colônias em meios de cultivo apropriados e sob condições de incubação adequadas. Uma alíquota (100µL), de cada lavado gástrico e de cada diluição dos lavados intestinais, foi pipetada em Placas de *Petri* contendo meios de culturas sólidos (Ágar–nutriente), e

com o auxílio de uma alça de Drigalsky, previamente esterilizada, o conteúdo foi espalhado por toda a superfície. Após esse procedimento, as placas foram armazenadas em estufa de 37 graus centígrados para crescimento bacteriano. Após 48 horas de incubação, iniciou-se a análise da diversidade dos microrganismos aeróbicos e anaeróbicos facultativos que cresceram na placa, através de vários parâmetros, inicialmente macroscópicos, como coloração, tamanho e forma das colônias.

Após a identificação inicial baseada em características morfológicas, as bactérias foram analisadas por características metabólicas através dos testes de fermentação da glicose.

Contagem de colônias bacterianas

Para a contagem das colônias que cresceram nas Placas de *Petri*, em meios não seletivos (Agar - nutriente), foram utilizadas uma lupa e uma base milimetrada para maior precisão do trabalho.

Os dados obtidos foram organizados em uma tabela e foi usado um padrão de contagem. Nesse padrão, as placas com até 500 colônias foram documentadas com o número exato, para número de colônias entre 500 e 1000, utilizou-se >500 e para as placas que tiveram um crescimento em massa, foi utilizado >1000.

Plaqueamento em meio seletivo para Gram-negativos

Com a ajuda de uma alça, amostras de bactérias das colônias anteriormente citadas, foram colocadas em meio Agar McConkey, através do método de esgotamento para crescimento seletivo de bactérias Gram-negativas e separação das colônias de bactérias entre lactase positivas e negativas. Trata-se de um meio indicador e a identificação ocorre da seguinte maneira: bactérias fermentadoras de lactose utilizam esse açúcar disponível no meio e produzem ácido como produto final. Este ácido diminui o pH do meio para valores inferiores a 6,8, resultando na observação de colônias rosa choque/vermelhas, classificadas como Lac+. As colônias brancas representam as bactérias Lac -.

Identificação fisiológica de bactérias pelo teste de fermentação

Para o teste de fermentação foram utilizadas amostras retiradas do Agar McConkey. Com a ajuda de uma alça, amostras das colônias foram diluídas em caldo de crescimento bacteriano, contendo glicose. Foram observados aspectos macroscópicos dos tubos. Cada tubo tinha em seu interior um tubo de Duhan invertido, para se avaliar a fermentação da glicose, pela formação de gás. Nesse estudo, além da verificação da presença de gás, foi analisada a turvação do caldo, como indicativo de crescimento bacteriano. A soma dos dois

resultados indicaria um processo de fermentação positivo, o que comprovaria a utilização da glicose pelas bactérias.

Análise da produção de IgA secretória no muco gastrointestinal

A investigação imunológica consistiu da análise de IgA secretória (sIgA) no muco. Para isso, foram utilizados os lavados originais de cada órgão. Os lavados foram congelados e armazenados em temperatura controlada. Foi realizado o teste ELISA para verificação da quantidade de IgA secretória (sIgA) no muco. Para a realização desse teste, as placas foram incubadas com anticorpos monoclonais de cabra anti-IgA de camundongos (100 µl/poço de 1 µg/ml; Southern Biotechnology, Birmingham, AL). O muco foi adicionado (100µl/poço) em diluições seriadas (fator 0.5) a partir de 1:20 para IgA do lavado intestinal, e total (sem diluição) para IgA do lavado estomacal e do intestino grosso. As imunoglobulinas ligadas foram reveladas com 0.5 µg/ml de anticorpos policlonais específicos para a cadeia alfa de camundongos (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) marcados com biotina. Uma solução adicional de detecção contendo estreptavidina conjugada à peroxidase (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) em uma diluição de 1:10000 (100µl/poço) foi adicionada e as placas incubadas por 1 hora a 37°C. A revelação foi feita colocando-se o substrato da peroxidase (H₂O₂) juntamente com um cromógeno (OPD) diluídos em tampão citrato (100µl/poço). Após a interrupção da reação pela adição de 20µl/poço de ácido sulfúrico

(H₂SO₄ 2N), as placas foram lidas em Leitor automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader), usando o filtro de 492 nm.

Análise estatística

Para a realização dos cálculos estatísticos foi utilizado o Software STATISTICA instalado nos computadores do laboratório de informática da Faculdade de Medicina de Itajubá.

Na análise estatística foi utilizado o Teste t de Student, para a comparação dos grupos, considerando diferença significativa àqueles que apresentaram valor de p<0,05.

RESULTADOS

Animais tratados por via intragástrica com etanol apresentam redução no número de colônias bacterianas em todos os segmentos do trato gastrointestinal.

Após coleta dos lavados gastrintestinais, realizou-se o plaqueamento de alíquotas dos mesmos (após diluição ou não) em Ágar-nutriente não seletivo e após 24 horas em estufa de 37 graus centígrados, realizadas a contagem de colônias. A Figura 1 demonstra que o grupo tratado com álcool apresentou uma nítida redução no número de colônias isoladas em todo o trato gastrointestinal comparado com o grupo controle, sendo que no estômago e intestino grosso a diferença foi mais acentuada.

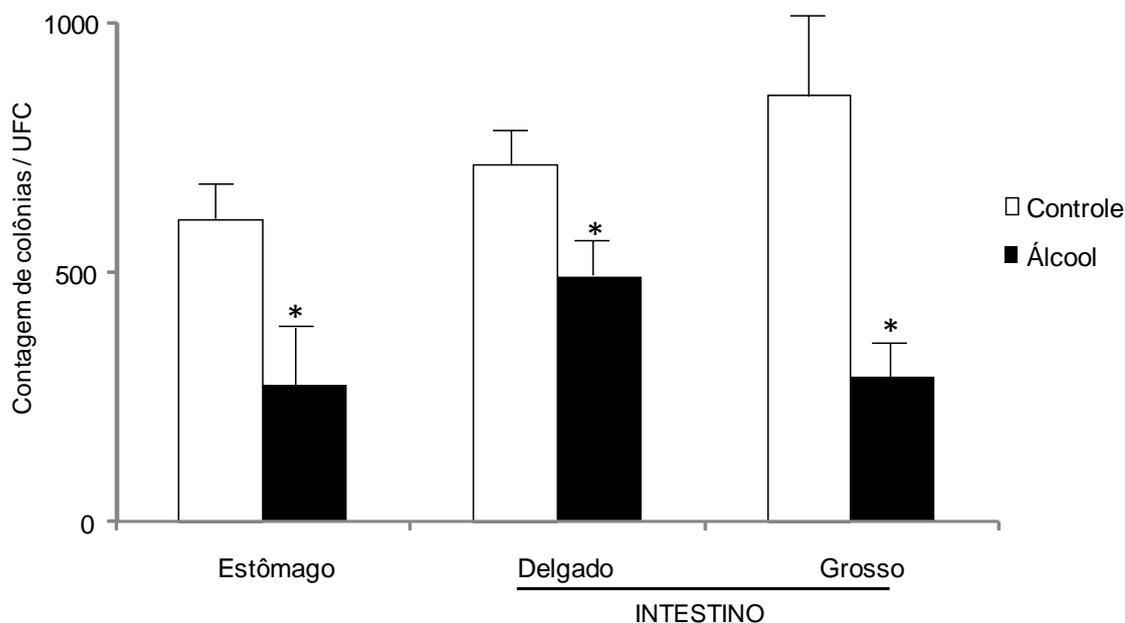


Figura 1- Quantificação de colônias bacterianas em lavados do trato gastrointestinal de animais controles e tratados com etanol por via intragástrica. *p<0,05.

Animais tratados por via intragástrica com etanol apresentam um aumento no percentual de bactérias fermentadoras de glicose no estômago e intestino grosso em comparação com o grupo controle.

A fermentação de açúcares é uma característica de bactérias que habitam o trato gastrointestinal. Antes da análise em meios específicos, foi analisada a propriedade de fermentar glicose e produzir gás pelas bactérias

isoladas após crescimento em Ágar-nutriente. A Figura 2 demonstra que no estômago houve uma mudança na relação entre bactérias fermentadoras de glicose (gás+) e bactérias não fermentadoras (gás-), no grupo tratado com etanol quando comparado com o grupo controle. O álcool promoveu um aumento no percentual de bactérias fermentadoras de glicose. Já no intestino delgado observou-se que a relação de bactérias gás+/gás- foi

maior tanto no grupo controle quanto no grupo tratado com álcool. Entretanto nos animais deste grupo houve um aumento relativo de bactérias gás+. No intestino grosso, interessantemente foi observado nos animais tratados com etanol uma ausência de bactérias gás-, sendo que 100% das bactérias foram fermentadoras de glicose (gás+).

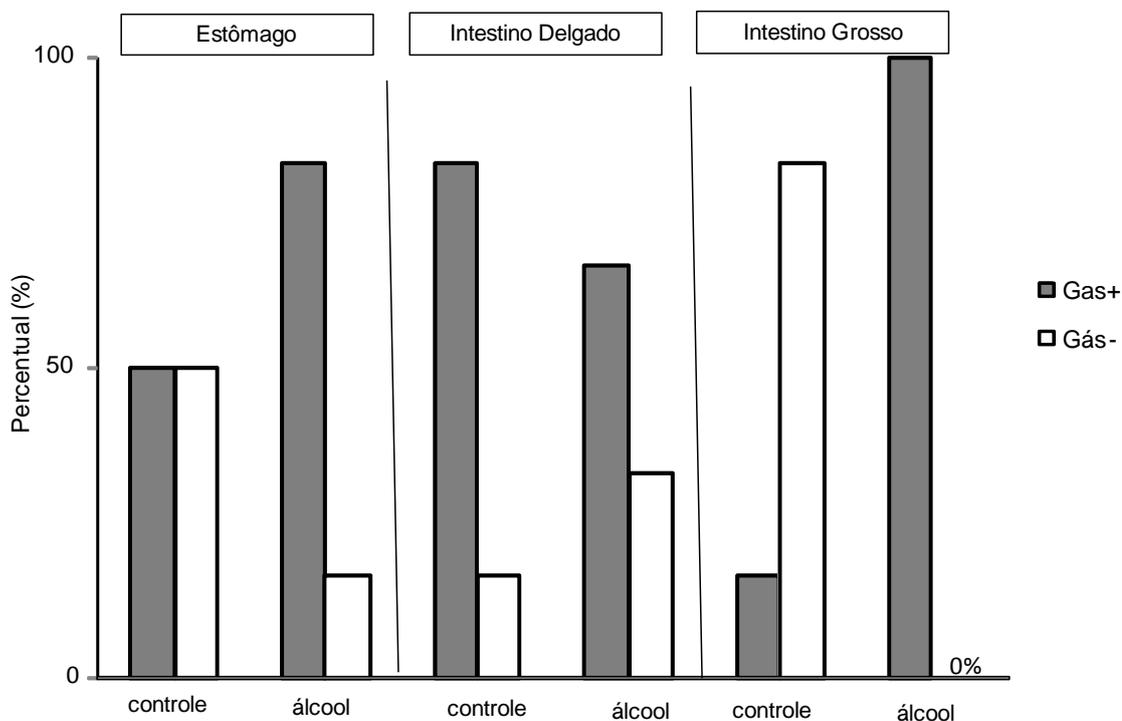


Figura 2 - Análise da propriedade de fermentação da glicose pelas bactérias isoladas após crescimento em meio seletivo.

Animais tratados por via intragástrica com etanol apresentam alterações no percentual de colônias lactose positivas no trato gastrointestinal.

O teste da lactose é usado como um dos parâmetros iniciais para identificação de enterobactérias, que sabidamente fermentam esse carboidrato. A Figura 3 demonstra que houve uma redução no percentual de bactérias Lac+ no estômago dos animais tratados com etanol. Já no intestino, delgado e grosso, observou-se um

nítido aumento no percentual de bactérias Lac+ nos animais tratados com etanol em comparação com o grupo controle. Interessante ressaltar que no intestino delgado dos animais tratados com etanol observou-se 50% de bactérias Lac+ e 50% de Lac-, sendo que no grupo controle essa relação foi de 16 e 84%, respectivamente. Já no intestino grosso, animais tratados com etanol apresentaram uma relação de 66 e 34% (Lac+ e Lac-).

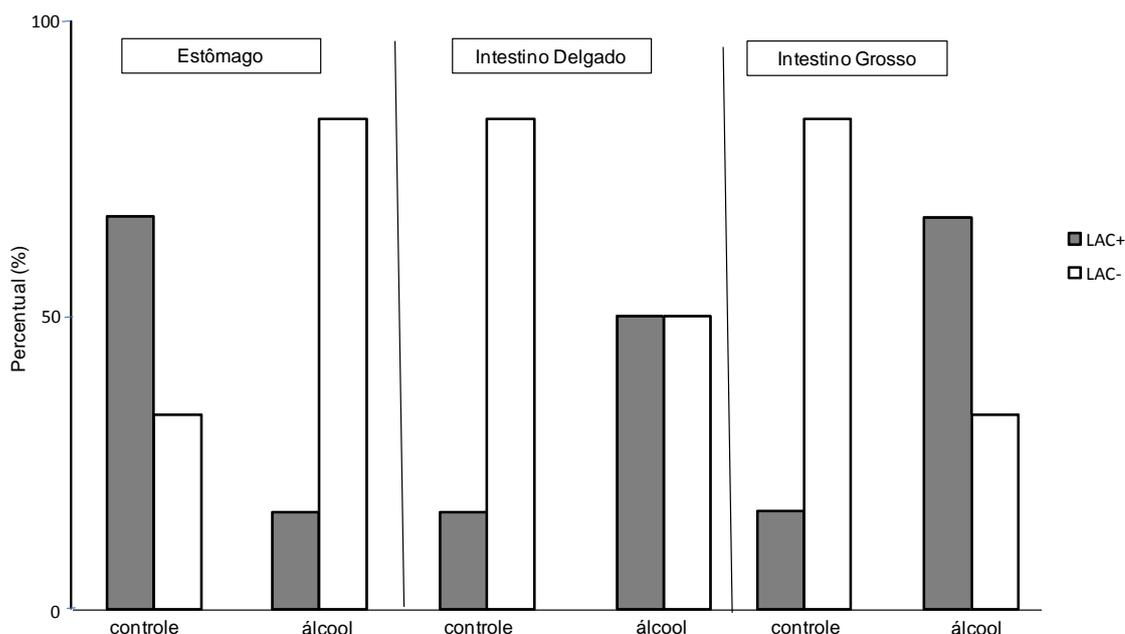


Figura 3 - Análise de seletividade para Enterobactérias pelo teste da lactose.

Perfis distintos de produção de produção de IgA secretória são observados no intestino delgado e grosso de animais tratados com etanol.

A dosagem de IgA secretória foi realizada no muco coletado após lavagem do trato gastrointestinal de animais tratados com etanol ou salina (controles). A Figura 4 demonstra que, no estômago, não houve diferença na concentração dessa imunoglobulina entre os

grupos. Entretanto, uma diferença marcante foi observada no intestino. Interessantemente animais do grupo tratado com etanol, em comparação com o grupo controle, apresentaram um aumento nos níveis de IgA secretória no intestino delgado. Já no intestino grosso, observou-se uma marcante redução nos níveis dessa imunoglobulina no grupo tratado com etanol.

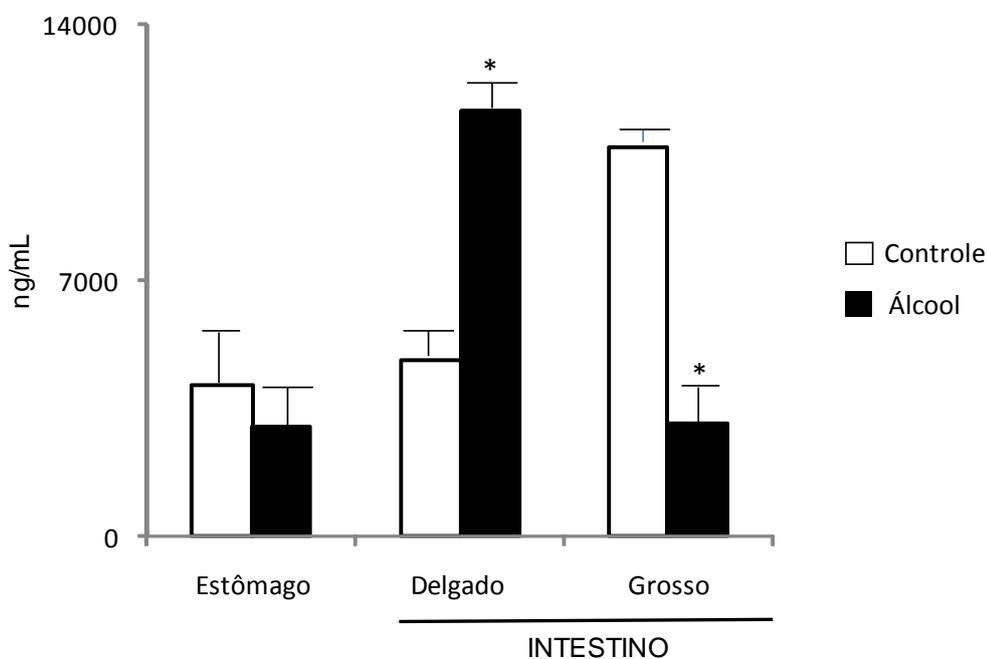


Figura 4 – Concentração de IgA secretória no muco gastrointestinal *p<0,05.

DISCUSSÃO

O estudo fundamentou-se no trabalho desenvolvido por Andrade e colaboradores²⁰ que estabeleceram um modelo experimental de indução de gastrite aguda, pela administração intragástrica de etanol 50 % em camundongos C57BL/6. Esses animais apresentaram várias alterações imunológicas e funcionais no trato gastrointestinal, dentre estas se destaca redução da atividade da pepsina no estômago, diminuição do muco estomacal e intestinal e aumento da concentração de proteínas intactas no sangue. Assim, devido a praticidade na manutenção, anestesia e execução de procedimentos a serem executados e pela oportunidade de realização da investigação em uma nova espécie, o presente trabalho trabalhou com camundongos da linhagem BALB/c. Os resultados, discutidos em seguida, demonstraram adequação do modelo experimental.

Em relação à avaliação macroscópica, a pelagem dos animais do grupo tratado com etanol, a partir do 2º dia do experimento, apresentou alterações em suas características, com aspectos de oleosidade, arrepiamento e perda do brilho. Enquanto a pelagem, dos animais do grupo controle, manteve-se inalterada (dados não mostrados). Acreditamos em uma provável intoxicação em resposta a uma intolerância alcoólica decorrente da dificuldade de metabolização hepática do álcool em consequência da alta concentração e quantidade administrada.

Observou-se no segundo dia de experimento, instantes após a ingestão de álcool, que animais do grupo experimental manifestaram efeitos estimulantes como intensa agitação ao percorrerem os espaços da gaiola de um extremo a outro. Em seguida, com o passar de 10 minutos aproximadamente, começaram aparecer os efeitos depressores como, falta de coordenação motora e prostração. Tais efeitos, encontrados de forma evidente apenas nos animais do grupo experimental, seriam decorrentes da interferência do álcool nos neurônios, levando a um efeito depressor mais exacerbado após algum tempo da ingestão. Tais resultados estão de acordo com a literatura, ao explicar que os efeitos depressores do etanol são devidos principalmente a ações nos dois maiores receptores ionotrópicos presentes no cérebro (GABAA e NMDA). O etanol aumenta a condutância dos canais GABAA ao íon cloreto promovendo um aumento de correntes inibitórias e potencializando a neurotransmissão GABAérgica, efeito revertido pelo antagonista benzodiazepínico Ro15-4513 sugerindo um sítio de ação do etanol nesse sítio modulatório. Os receptores NMDA são bloqueados pelo álcool, ocorrendo diminuição do influxo de cátions por esse receptor e redução da excitabilidade neuronal. Além disso, canais de cálcio ativados por voltagem são bloqueados pela administração aguda de etanol contribuindo ainda mais para diminuição da

excitabilidade neuronal, uma vez que esses canais estão envolvidos na fusão e liberação de vesículas de neurotransmissores.²¹

A análise microbiológica demonstrou uma nítida redução no número de colônias isoladas em todo o trato gastrointestinal no grupo tratado com etanol. No intestino grosso observamos uma maior diferença no número de colônias bacterianas entre o grupo tratado com álcool e o grupo controle. É possível postular que houve um impacto quantitativo importante do álcool sobre as bactérias autóctones em todo o trato gastrointestinal. Sabe-se que no organismo humano, por exemplo, 100 trilhões de bactérias de mais de 400 espécies diferentes vivem em um delicado balanço. A microbiota intestinal tem funções importantes como a síntese de algumas vitaminas e a defesa do nosso organismo. Quando esta é afetada por algum fator extrínseco, o organismo fica sujeito, dentre outras alterações, à colonização predominante de bactérias oportunistas ou mesmo patogênicas, além da passagem de toxinas bacterianas para a circulação portal. Chama-se disbiose intestinal, transtorno no qual as bactérias promotores de saúde ficam em minoria e isso pode afetar negativamente o microambiente intestinal causando um impacto sobre a fisiologia do intestino, além de influenciar o sistema imune de mucosa.²² Acreditamos que a redução do número de colônias nos animais tratados com etanol comprove a ocorrência de disbiose intestinal em decorrência do uso dessa substância química, que pode causar efeitos diretos e/ou indiretos sobre a microbiota. Outro dado concordante com essa observação foi que na análise macroscópica, observamos uma maior diversidade de colônias nas placas do grupo controle (dados não mostrados). Neste grupo eram encontrados no mínimo dois tipos de colônias, sendo uma de aspecto de coloração branca, e outra no aspecto amarelada. Em algumas placas ainda, observamos a presença de uma terceira colônia de coloração alaranjada, que por sua vez não foi observada no grupo experimental.

A ingestão aguda de etanol resultou em um maior número de bactérias com propriedades fermentadoras da glicose e produtoras de gás (gás-glicose) em todos os compartimentos gastrintestinais. No entanto, no intestino grosso desses animais, observamos que todas as bactérias analisadas (100%) eram fermentadoras de glicose e produtoras de gás. Acreditamos que isso se deva a possíveis erros durante o procedimento ou durante a análise. Interessante notar que no grupo controle observamos no estômago um balanço entre bactérias fermentadoras ou não de glicose. Já no intestino desses animais a relação muda, sendo que no delgado há um maior percentual de bactérias fermentadoras de glicose e no intestino grosso de bactérias não fermentadoras de glicose. Essas discrepâncias podem estar associadas à diferentes famílias de bactérias predominantes em cada microambiente. Por esse motivo

nosso próximo objetivo foi fazer a análise da família Enterobacteriaceae, que compreende vários gêneros, com espécies patogênicas e oportunistas, pertencentes à microbiota intestinal e que apresentam características específicas, como por exemplo, fermentação da lactose.

No teste de seletividade, analisamos a capacidade da bactéria de produzir a enzima lactase, degradando, portanto a lactose presente no meio de cultura específico para o crescimento de enterobactérias. A metabolização (lac+) ou não (lac-) da lactose era evidenciado por uma alteração na cor da colônia. Fica claro analisando o grupo controle, que a relação percentual entre bactérias não fermentadoras e fermentadoras de lactose é diferente em cada compartimento analisado. No estômago observamos um maior percentual de bactérias lac+, em contraste com o intestino (delgado e grosso) que apresentou um menor percentual de bactérias com essa propriedade. Fica evidente que o tratamento com etanol leva a uma mudança nessa relação em todos os compartimentos analisados. No estômago há uma inversão, passando a um maior percentual de bactérias lac-. No intestino delgado observamos um equilíbrio entre bactérias lac+ e lac-. E no intestino grosso um aumento no percentual de bactérias lac+. É sabido que as enterobactérias são microrganismos anaeróbios facultativos e Gram-negativos. No ecossistema intestinal sem alterações, as enterobactérias estão em constante equilíbrio, exercendo efeitos benéficos que incluem proteção contra infecções entéricas, diminuem o pH por metabolizar carboidratos, suprimem bactérias patogênicas, produzem vitaminas, ativam as funções intestinais e auxiliam na digestão e absorção e estimulam a resposta imunológica.²³ Em nosso estudo, as análises do teste de seletividade comprovaram uma inversão no predomínio de enterobactérias lactase (+) e lactase (-) como relatado anteriormente, sendo que no intestino grosso houve um nítido aumento no percentual de enterobactérias (lac+). A partir disso supomos a ocorrência de uma desestabilização da microbiota intestinal, tendendo ao aumento do número de enterobactérias patogênicas que possam comprometer a integridade intestinal e oferecem riscos de sérios danos aos organismos sujeitos a estas mudanças. Embora este seja um estudo da ingesta aguda do etanol, efeitos importantes já são percebidos e certamente irão se agravar mediante ao uso crônico desta substância.

Na análise de IgA secretória (IgAs) contida no muco dos lavados dos órgãos através do método ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), observamos que houve um aumento significativa na concentração de IgAs no muco do intestino delgado de animais tratados com etanol em comparação com o grupo controle. Por sua vez, no intestino grosso notamos uma redução desta imunoglobulina no muco dos animais tratados com etanol em relação ao grupo controle. Acreditamos que para compreender essa alteração imunológica necessitamos de

estudos complementares, uma vez que a produção de IgAs pelo sistema imune de mucosa é bastante complexa e multifatorial. De qualquer forma, acreditamos que o grupo tratado com etanol de forma aguda, pode sofrer uma ação direta do álcool sobre os mecanismos de barreira no trato gastrointestinal, cuja principal função é controlar a microbiota intestinal e prevenir a entrada de antígenos no sistema.²⁴ A IgAs é o anticorpo que desempenha um papel importante na atividade anti-infecciosa nas superfícies mucosas, neutralizando antígenos luminiais e inibindo a aderência bacteriana. Conseqüentemente, qualquer alteração na sua produção pode comprometer a resposta anti-infecciosa local. Sendo assim, mediante a redução de IgAs no intestino grosso de animais tratados com etanol, local de maior concentração de microrganismos, acreditamos em uma maior vulnerabilidade desses animais a certas patologias que não ocorreriam nas condições de integridade do organismo.

CONCLUSÃO

Portanto, o álcool mesmo em experimentação aguda, afeta significativamente o microambiente gastrointestinal e essas alterações tem um impacto direto na microbiota, induzindo alterações quantitativas e fisiológicas.

Uma vez que ingestão de álcool é um hábito freqüente em nossa sociedade, além de ser um problema de caráter social, de saúde e econômico, espera-se que os resultados aqui avaliados abram perspectivas para estudos mais elucidativos com possíveis implicações clínicas.

Agradecimentos:

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo auxílio financeiro, à oportunidade oferecida pelo Programa de Desenvolvimento à Iniciação Científica (PDIC-FMI), à parceria com a Universidade Estadual de Montes Claro (Unimontes) e a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pelo fornecimento do material animal. Agradecimento especial a Andréa Catão Alves, Victória Paula Dias Cruz e Profª Raquel Maria Lima Lemes, pelo auxílio na elaboração deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Jacob SW, Francone CA, Lossow WJ. Anatomia e Fisiologia Humana. 5ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1988. p.405-39.
2. Dani R, Castro LP. Gastroenterologia Clínica. 3ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1993. p.778-82.
3. Monreal MTFD. Intestinal microbiota in patients with bacterial infections of the respiratory tract treated with amoxicillin. J Venom Anim Toxins. 2005;11:92-6.
4. Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. Acta Paediatr. 2003;441(Suppl):48-55.

5. Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 1999;69(Suppl):1035S-45S.
6. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2003;361:512-9.
7. Tannock GW. The normal microflora: an introduction. In: Tannock GW, ed. *Medical importance of normal micro-flora*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 1999. p.1-23.
8. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005;307:1915-20.
9. Lepre RM, Martins RA. Raciocínio moral e uso abusivo de bebidas alcoólicas por adolescentes. *Paideia* jan.-abr. 2009, Vol. 19, No. 42, 39-45.
10. Ganong WF. *Fisiologia Médica*. 17ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p.340-62.
11. Silva LFAG. Disbiose intestinal - Conheça as causas e os tratamentos. *Web Médicos –Urologia*. [Internet]. 2001. [Acesso em 2007 mar 31]. Disponível em: http://www.webmedicos.com.br/detalhe_artigo.asp?Id=396&Tema=Urologia
12. Vargas D, Labate RC. Actitudes de enfermeros de hospital general frente al uso de alcohol y al alcoholismo. *Rev Bras Enferm*. [Internet]. 2006 Jan./Feb; [Acesso em 2007 mar 31] 59(1). Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-71672006000100009&lng=pt&nrm=iso&tng=pt
13. Masur J, Cunha J, Zuiker AP. Prevalência de pacientes com indicadores de alcoolismo internados em uma enfermaria de clínica geral: relevância da forma de detecção. *Acta Psiq Psicol da América Latina*. 1980;26:125-30.
14. Diniz SA. Sentido da vida base para a compreensão de alcoolista [dissertação]. Ribeirão Preto (SP): Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 1992.
15. Raeder JR, Carline-Cotrin B. Internações hospitalares no Brasil por dependência de drogas, álcool e psicoses alcoólicas, em 1988. *Rev ABP-APAL* 1990;12(1/4):33-9
16. Bertolote JM. *Alcoolismo hoje*. 3ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1997.
17. Peres W, Carmo MGT, Zucoloto S, Iglesias AC, Braulio VB. Ethanol intake inhibits growth of the epithelium in the intestine of pregnant rats. *Alcohol*. 2004;33:83-9.
18. Garige M, Azuine, Lakshman. MR. Chronic ethanol consumption upregulates the cytosolic and plasma membrane sialidase genes, but downregulates lysosomal membrane sialidase gene in rat liver. *Metabolism Clinical and Experimental*. 2006;55:803-10.
19. Watzl B, Watson RR. Symposium: Nutrition, immunomodulation and AIDS. Role of alcohol abuse in nutritional immunosuppression. *Am Inst Nut*. 1992;33:733-7.
20. Andrade MC, Menezes JS, Cassali GD, Martins-Filho AO, Cara DC, Faria AMC. Alcohol-induced gastritis prevents oral tolerance induction in mice. *Clinical and Experimental Immunology*. 2006;146(2):312-22.
21. Carvalho JILM. Participação dos receptores canabinóides cerebrais na tolerância rápida e aguda do álcool. [Dissertação]. Florianópolis-SC: Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina; 2006.
22. Maciel P. Disbiose intestinal e intestino Irritável. [Internet]. 2008; [Acesso em 2011 mar 03]. Disponível em: <http://www.nutricao.com.br/disbiose-intestinal.htm>
23. Guarner F, Malagelada JR. Microflora intestinal. [Internet]. 2005; [Acesso em 2011 mar 03]. Disponível em: <http://www.nutricaoclinica.com.br/20050812430/alimentos-funcionais-probioticos/probioticos-em-pediatria>
24. Watzl B, Watson RR. Role of alcohol abuse in nutritional immunosuppression. *J Nutr*. 1992;122 (S

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina de Itajubá – FMI

Apoio financeiro Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Correspondência:

Mariléia Chaves Andrade - Rua Joviano Lucas de Almeida, 167, Céu Azul – Belo Horizonte-MG Brasil

CEP: 31585-300

E-mail: marileia@cpqrr.fiocruz.br