



Análise Histopatológica do Fígado, Estômago e Intestinos de Camundongos Submetidos ao Consumo Agudo de Etanol

Histopathological analysis of the liver, stomach and intestines of mice undergoing acute ethanol exposure

Hugo Ribeiro Bellato¹

Beatriz Carvalho¹

Roseane de Souza Cândido

Irulegui²

Mariléia Chaves Andrade³

Nilo Cesar do Vale Baracho⁴

1. Acadêmicos do Programa de Desenvolvimento de Iniciação Científica do 4º ano do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina de Itajubá (FMI) – Itajubá/MG.
2. Mestre em Ensino em Ciências na linha de TCI pela Universidade Federal de Itajubá- UNIFEI e Professora Adjunta da Faculdade de Medicina de Itajubá FMI.
3. Pós-Doutoranda pela Universidad de Santiago de Compostela - Campus Santiago, USC, Espanha e Professora Titular da Faculdade de Medicina de Itajubá FMI
4. Doutor em Ciências da Saúde pelo Centro de Pós-graduação da Faculdade de Medicina da UFMG (2012) e Professor Titular da Faculdade de Medicina de Itajubá FMI

Trabalho realizado na Faculdade de Medicina de Itajubá – FMI.

Projeto apoiado financeiramente pela Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais – FAPEMIG através de bolsa de Iniciação Científica (abril de 2014 a março de 2015).

Recebido em: junho de 2015

Aceito em: junho de 2015

Correspondência:

Hugo Ribeiro Bellato

Av. Renó Júnior, 368, São Vicente, Itajubá – MG.

CEP 37502-138|

E-mail: hugobellato@hotmail.com

RESUMO

Objetivo: O presente estudo teve como objetivo analisar o efeito da administração aguda de etanol 50% sobre a histopatologia do trato gastrointestinal (TGI) através do estômago, fígado e intestinos de camundongos.

Materiais e métodos: 8 animais da linhagem C57BL/6, foram divididos da seguinte maneira: O grupo 1- controle (n=4), recebeu 0,2 mL de salina fisiológica, por dia, durante 4 dias consecutivos por gavagem. O grupo 2- experimental (n=4), recebeu 0,2mL de etanol 50%(v/v), nas mesmas circunstâncias e condições do grupo 1. No 5º dia os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. Em seguida, foi realizada uma laparotomia e foram coletados estômago, lobo esquerdo do fígado e intestinos delgado e grosso, os quais foram manipulados a fim de expor a mucosa e receberam tratamento histológico para análise. **Resultados:** O tratamento com etanol produziu hiperemia em alguns vasos de 25% dos fígados analisados quando comparados com o grupo controle. Da mesma forma, o referido tratamento produziu lesão ulcerada superficial com hiperemia, hemorragia e resquícios de material necrótico em 25% dos estômagos analisados, e úlcera mais profunda na parede gástrica, com infiltrado linfocitário em outros 25% dos estômagos analisados em comparação com o grupo controle. Por outro lado, o tratamento com etanol não foi capaz de produzir alterações nos intestinos delgado e grosso, quando comparado ao grupo controle. **Conclusão:** O consumo de etanol em caráter agudo foi capaz de causar lesão em fígado e estômagos dos animais do grupo experimental, elucidando aspectos negativos do consumo em excesso dessa substância.

Palavras chave: Álcool, Fígado, Estômago, Intestinos, Histologia.

ABSTRACT:

Objective: This study aimed to analyze the effect of acute exposure of ethanol 50% on the histopathology of gastrointestinal (GI) tract through the examination of the stomach, liver and intestines of mice. **Materials and Methods:** 8 C57BL/6 mice were divided as follows: Group 1-control group (n = 4) received 0.2 ml of physiological saline by gavage, everyday, for 4 days. Group 2-experimental group (n = 4) received 0.2 mL of 50% ethanol (v / v), in the same conditions of Group 1. On the 5th day the animals underwent euthanasia by cervical dislocation. Then, laparotomy was performed and the stomach, left lobe of the liver and small and large intestines were collected. These organs were manipulated in order to expose the mucosa and received treatment for histological analysis. **Results:** Treatment with ethanol produced hyperemia in some vessels in 25% of the livers which were analyzed when compared to the control group. Similarly, the reported treatment produced superficial ulcerated lesion with hyperemia and hemorrhage in 25% of the analyzed stomachs. Deeper ulcers were found in the gastric mucosa, with lymphocytic infiltration in another 25% of stomachs analyzed in comparison to the control group. On the other hand, the treatment with ethanol was not able to produce changes in the small and large intestines, when compared to control group. **Conclusion:** Acute ethanol consumption has been able to cause liver and stomach injury in the animals of the experimental group, showing some of the negative aspects of excessive consumption of this substance.

Keywords: Alcohol, Liver, Stomach, Intestines, Histology

INTRODUÇÃO

O consumo de bebidas alcoólicas é um comportamento adaptado à maioria das culturas. Seu uso é associado com celebrações, situações de negócio e sociais, cerimônias religiosas e eventos culturais. Por outro lado, o consumo nocivo de álcool é responsável por cerca de 3% de todas as mortes que ocorrem no planeta.¹ O 2º. Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil, promovido pela Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD), aponta que 12,3% das pessoas pesquisadas, com idades entre 12 e 65 anos, preenchem critérios para a dependência do álcool e cerca de 75% já beberam pelo menos uma vez na vida.¹

Aproximadamente 38% do consumo total mundial de álcool é ingerido sob forma de cerveja, principalmente na região das Américas, incluindo o Brasil². Segundo o relatório de 2011 da OMS (Organização Mundial de Saúde), em 2005 o consumo *per capita* mundial de bebidas alcoólicas foi equivalente a 6,13 litros de álcool puro, consumido por indivíduos entre 15 anos ou mais.²

Nos países em desenvolvimento, entre eles o Brasil, as bebidas alcoólicas são um dos principais fatores de doença e mortalidade, com seu impacto deletério sendo considerado entre 8% e 14,9% do total de problemas de saúde dessas nações.¹ As mortes e doenças não são o único impacto que o álcool promove. Reflexos socioeconômicos importantes, sobrecarga do sistema de saúde, gastos arcados pelo governo no combate a droga e stress psicológico e financeiro para as famílias são marcas deixadas pelo abuso desta substância. Três importantes mecanismos explicam a capacidade do álcool em causar danos médicos, psicológicos e sociais: (1) toxicidade física (2) intoxicação e (3) dependência. O álcool é considerado uma substância tóxica, uma vez que o consumo excessivo tem efeitos diretos e indiretos sobre uma vasta gama de órgãos e sistemas.³

O álcool é um fator causal de mais de 60 tipos de doenças e injúrias, e resulta em aproximadamente 2,5 milhões de mortes todos os anos. Mundialmente, 320.000 jovens, com idade entre 15-29 anos morrem anualmente a partir de causas relacionadas com o álcool, resultando em 9% de todas as mortes nesta faixa etária.² As maiores doenças e injúrias

desencadeadas pelo álcool, em consumo crônico, são: (1) desordens neuropsiquiátricas; (2) doenças gastrointestinais; (3) câncer; (4) injúrias intencionais, como suicídio e violência; (5) injúrias não intencionais, como quedas, envenenamento e acidentes de trânsito; (6) doenças cardiovasculares; (7) síndrome alcoólica fetal; (8) diabetes mellitus; (9) desordens imunológicas e hematopoiéticas; (9) síndromes respiratórias. Além disso, as disfunções hepáticas perfazem um grande percentual de doenças causadas pelo abuso de álcool e são muito importantes na atualidade.^{2,4-8}

O fígado é a maior víscera do corpo humano, desempenhando grande número de funções vitais à saúde do organismo como a secreção de bile, o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas e armazenamento de substâncias. Ainda atua na degradação e excreção de hormônios, transformação e excreção de drogas, produção de fatores hemostáticos e auxílio à resposta imune.⁹ No fígado, o álcool pode ser metabolizado a acetaldeído por três enzimas: álcool desidrogenase no citosol, sistema microsomal de oxidação de etanol e catalaseperoximal. Essas vias metabólicas levam à produção de espécies reativas do oxigênio e causam peroxidação lipídica.¹⁰ O acetaldeído é altamente reativo, tóxico e imunogênico, pode resultar em alterações nas propriedades físico-químicas das proteínas, ácidos nucleicos e lípidos, perturbar as funções celulares normais, tendo papel fundamental na etiopatogênese da Doença Hepática Alcoólica (DHA).^{11,12} A DHA pode se manifestar e evoluir em gravidade numa série de doenças, que são divididas de modo clássico em: esteatose; cirrose e hepatite¹³, e, num estágio mais avançado, o carcinoma hepatocelular (CHC), tipo de câncer grave que acomete o fígado.

Até então, a óptica do consumo crônico de etanol é dominante sobre a maioria das análises que se relacionam ao dano dessa substância no organismo. Entretanto, a ingestão aguda de etanol também traz seus malefícios e começa a ser estudada mais a fundo.

O consumo agudo e em grandes quantidades de álcool predomina sobre indivíduos na idade universitária com uma prevalência entre 43-58,5% e 32-54% em homens e mulheres, respectivamente, no Reino

Unido e Estados Unidos.¹⁴ Já foram demonstrados danos cardiovasculares (hipertensão, susceptibilidade a infartos) e cerebrais (déficit de aprendizado e memória) em pacientes que consomem álcool em episódios esporádicos, porém em quantidade excessiva.^{15,16}

Nesse contexto, Andrade e colaboradores¹⁷ estabeleceram recentemente, um modelo experimental de administração intragástrica aguda de alta dose 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. Diante do exposto este estudo objetivou determinar a presença de alterações em órgãos alvo do TGI (fígado, estômago e intestinos) de camundongos tratados agudamente com etanol 50% através de estudo histopatológico destes órgãos, já que análises com esse cunho são escassas na literatura.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

O estudo foi realizado na sala de experimentação animal do Biotério e Laboratório de Histologia/Patologia da Faculdade de Medicina de Itajubá (FMIIt).

Os procedimentos seguiram as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e as resoluções brasileiras específicas de bioética de pesquisa de acordo com a Lei Federal N° 11.794, de 8 de outubro de 2008. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Itajubá sob protocolo n° 09/14. Foram utilizados 8 camundongos da linhagem C57BL/6, com idade entre 8 e 10 semanas, fêmeas, pesando entre 18 e 22g, oriundos do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas CEBIO-UFMG e foram alojados no Biotério da FMIIt, sendo observado o período de quarentena. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas contendo 4 animais por gaiola escolhidos aleatoriamente, com água e ração *ad libitum* (à exceção do último dia, como relatado adiante) e submetidos a ciclo claro-escuro de 12 horas.

TRATAMENTO

Os animais foram divididos em 2 grupos e receberam o seguinte tratamento: Grupo 1 - controle (n=4): foi administrado aos animais 0,2mL de salina fisiológica 0,15M, por dia, durante 4 dias consecutivos de modo intragástrico por gavagem (utilizando uma agulha de ponta arredondada acoplada a uma seringa de 1mL). Grupo 2 – experimental (n=4): foi administrado aos animais 0,2mL de etanol 50% (v/v), por dia, durante os mesmos 4 dias consecutivos também de modo intragástrico por gavagem (utilizando uma agulha de ponta arredondada acoplada a uma seringa de 1mL). Ao final do período experimental todos os animais foram submetidos a jejum de 12 horas.

Eutanásia

No 5° dia os animais passaram por eutanásia através de deslocamento cervical de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, após anestesia com Cetamina (50mg/Kg) / Xilazina (25mg/Kg) por via intraperitoneal.

Preparação Histológica

Após a eutanásia, foi realizada uma laparotomia e foram retirados os seguintes órgãos: Fígado (lobo esquerdo), estômago, intestinos delgado e grosso. O lobo esquerdo do fígado, assim que retirado, foi imerso em formaldeído tamponado a 15%. O estômago foi lavado com formol, aberto em sua curvatura maior, fixado a uma base plástica com grampeador (para a maior exposição da mucosa possível) e imerso em formol tamponado a 15%. Por não haver separação macroscópica nítida entre as porções do intestino delgado em camundongos, o critério para distinção foi baseado segundo Ferraris e colaboradores¹⁸. O intestino delgado foi lavado com formol e então dividido em quatro partes, da parte proximal para a distal em tamanhos de 20%, 30%, 30% e 20%. Essas porções serão designadas como: duodeno, jejuno proximal, jejuno distal e íleo, respectivamente. O intestino grosso foi preparado sem divisões, e o ceco foi retirado da análise.

A preparação para análise histológica do intestino consistiu em enrolar cada porção sobre

um palito, fazendo uma espécie de “rocambole”, com a porção proximal no interior. Em seguida, todas as porções do intestino delgado e grosso foram fixados em formol tamponado a 15%. No laboratório de Patologia/Histologia as peças foram preparadas através dos seguintes passos: Desidratação em álcool; Diafanização em Xilol; Inclusão em parafina; Cortes de 4µm usando um micrótomo; Banho Maria e captura da secção de tecido; Secagem em estufa; Desparafinação com Xilol; Banhos de álcool; Coloração com Hematoxilina e posteriormente, Eosina. Por fim aplicação do Bálsamo do Canadá e colocação da lamínula a fim de proteger o corte. Com as lâminas prontas, foi possível analisá-las à microscopia óptica.

RESULTADOS

O tratamento com etanol produziu hiperemia de alguns vasos em 25% dos fígados

Análise Histológica

Para cada animal em questão foram confeccionadas 2 lâminas: uma com cortes de estômago e fígado juntas, e a outra com cortes de intestino delgado e grosso; no total foram preparadas 16 lâminas histológicas. Foi realizada uma contagem de caráter qualitativo, ao microscópio óptico, a fim de averiguar a presença ou ausência de alterações dos tecidos citados dos animais tratados agudamente com etanol em comparação aos tecidos dos animais do grupo controle. Desse modo, a porcentagem de órgãos afetados foi medida direta e objetivamente ao passo que, se 2 dos 4 estômagos analisados de um determinado grupo apresentassem alterações, a porcentagem seria de 50%, por exemplo.

analisados quando comparados com o grupo controle. Não foram evidenciadas alterações de parênquima hepático, conforme a Figura 1.

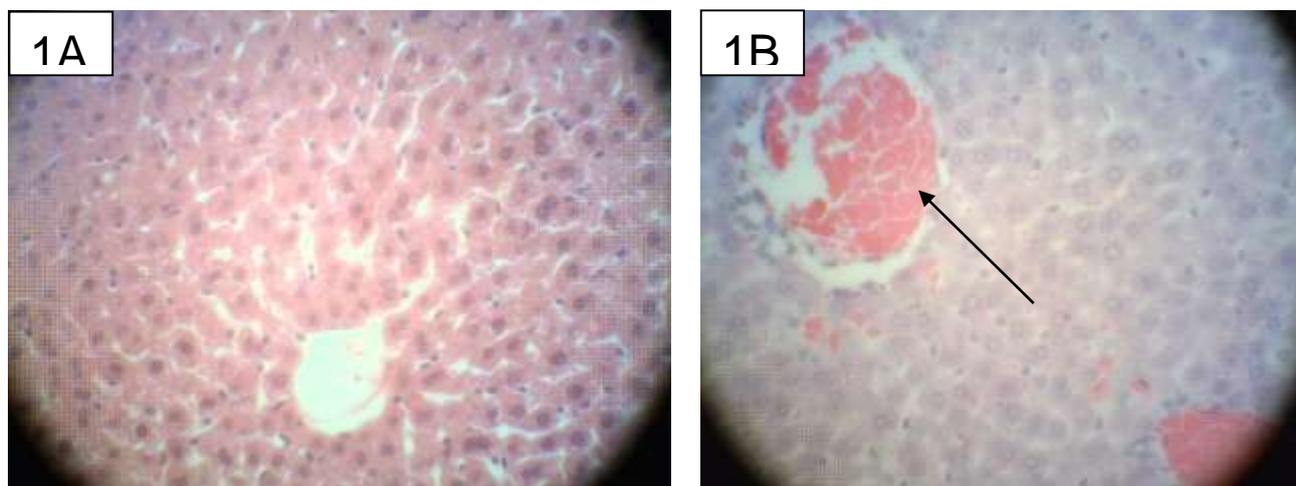


Figura 1. Corte histológico de fígados. Fig. 1A: grupo controle; Fig 1B: grupo tratado com etanol, evidenciando hiperemia (seta).

Da mesma forma, o referido tratamento produziu lesão ulcerada superficial com hiperemia, hemorragia e resquícios de material necrótico ao redor da ulceração em 25% dos estômagos analisados se comparados ao grupo controle. Evidenciou-se ainda úlcera mais profunda na parede gástrica, com infiltrado

linfocitário em outros 25% dos estômagos analisados em comparação com o grupo controle, demonstrando gravidade mais severa e uma resposta imune do organismo, conforme Figuras 2 e 3.

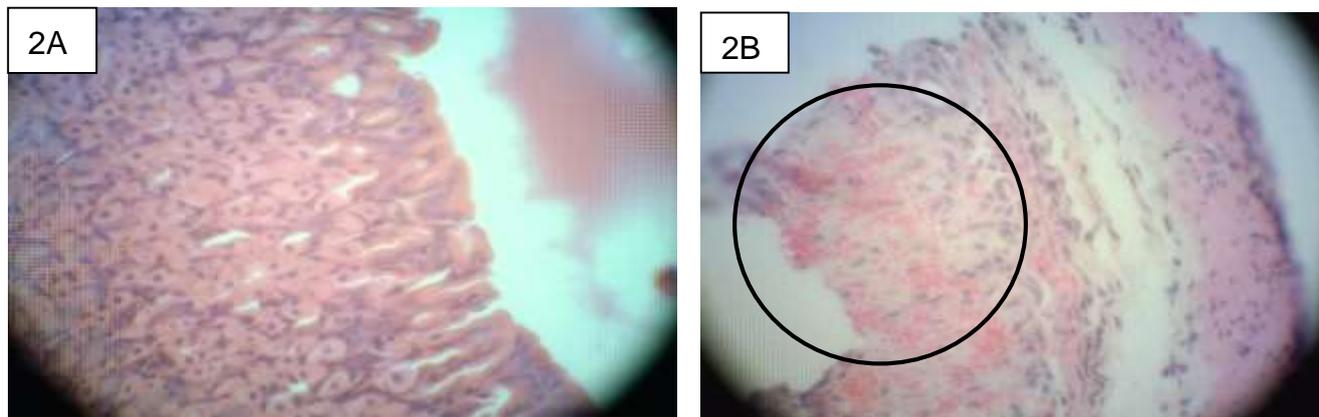


Figura 1. Corte histológico de estômagos. Fig 2A: grupo controle; 2B: grupo tratado agudamente com etanol demonstrando hiperemia e lesão ulcerada superficial (círculo).



Figura 2: Corte histológico de estômago de animal tratado com etanol, evidenciando lesão ulcerada profunda na mucosa gástrica. Úlcera (seta); Infiltrado linfocitário (círculo)

Nos intestinos não foi observada alteração quando comparado o grupo controle

ao grupo que recebeu tratamento agudo com etanol, como demonstra a Figura 4

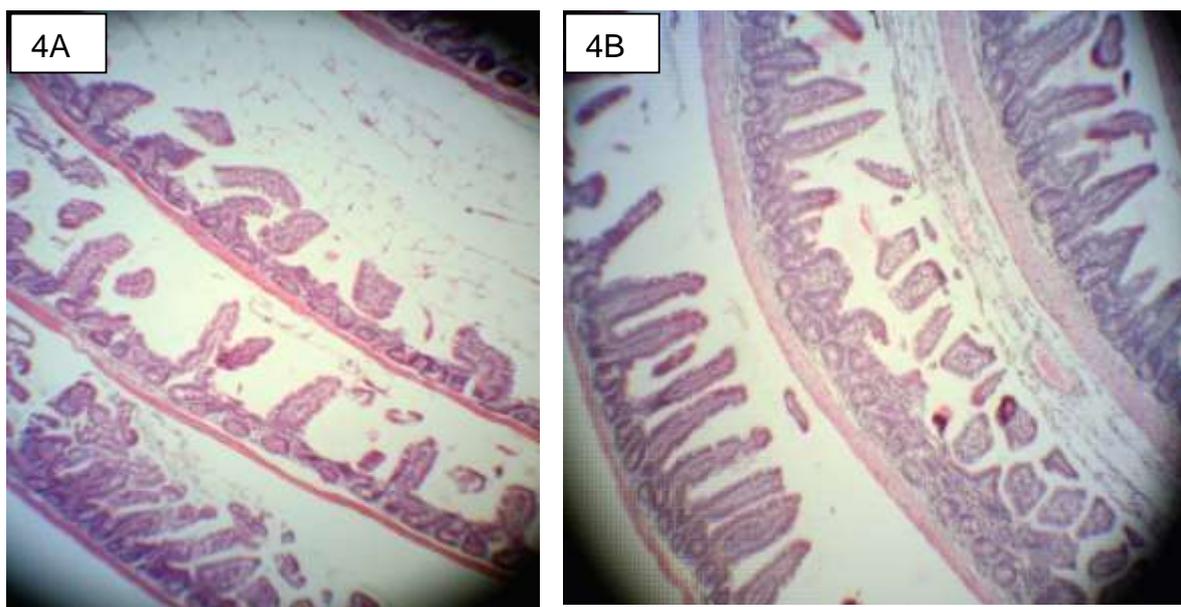


Figura 4: Corte histológico de intestinos (jejuno distal). Fig. 4A: grupo controle; Fig 4B: grupo tratamento. Sem diferença significativa entre os dois grupos.

DISCUSSÃO

Alguns danos causados por esse tipo de consumo já foram descritos em alguns órgãos e sistemas.^{15,16} No que tange os órgãos do trato gastrointestinal (TGI) há uma certa carência de pesquisas que avaliam o consumo “*binge*” isoladamente. Estudo¹⁹ demonstrou que o consumo em caráter “*binge*”, foi determinante no aparecimento da esteatose hepática (integrante da Doença Hepática Alcoólica). Esse grupo demonstrou que tanto análises histológicas quanto bioquímicas, demonstraram evidências de deposição de lípidos intra hepatócitos.

Estudo recente, demonstrou que o consumo “*binge*” associado a um tratamento crônico de 10 dias de etanol, causou um dano hepático inflamatório superior ao observado apenas com o tratamento crônico, evidenciado por aumento de ALT e AST.²⁰ Esses dois estudos citados, estão em discordância aos

resultados encontrados no atual trabalho. As metodologias aplicadas, embora satisfaçam os critérios de consumo “*binge*”, foram diferentes, e no último estudo citado, o consumo crônico estabelecido como premissa ao consumo agudo pode ter sido a razão da discrepância entre os resultados obtidos e os disponíveis na literatura.

De acordo com outro estudo²¹, a associação de álcool em caráter crônico/agudizado e dieta hiperlipidêmica foi capaz de aumentar os níveis de triglicérides e a deposição de lipídios no parênquima hepático, determinando esteatose hepática. Porém, o consumo isolado de álcool, não teve repercussões hepáticas a nível histológico, tampouco no aparecimento de esteatose hepática, vindo de encontro com os resultados encontrados no presente estudo. Desse modo, acreditamos que a presença de uma dieta hiperlipídica parece ter sido determinante no surgimento da esteatose hepática. Já o álcool, isoladamente, tanto a pesquisa citada quanto no

presente estudo pouco repercutiu na formação de esteatose.

O aparecimento de úlceras gástricas após tratamento agudo com álcool parece estar bem determinado na literatura, de acordo com certos estudos.²²⁻²⁴ Tais achados são congruentes aos resultados encontrados no presente trabalho e embora as metodologias difiram em alguns pontos, o caráter agudo de administração foi mantido. Acredita-se que o mecanismo envolvido nesse tipo de lesão considera fatores como a formação de espécies reativas de oxigênio, dano direto aos capilares da mucosa e alteração de estrutura e função de proteínas celulares.²³

Em relação às conseqüências do etanol na histopalogia dos intestinos, a literatura é escassa. Estudo utilizando a mesma metodologia de administração aguda de etanol 50% descreveu alterações no equilíbrio da microbiota

intestinal com aumento no número de colônias patogênicas em comparação com as simbióticas.²⁵ Porém dados da histopalogia não foram encontrados com metodologias semelhantes. Na atual pesquisa não houve diferença significativa em tecidos intestinais no grupo tratado com etanol 50%, se comparados ao grupo controle.

CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente estudo permitem concluir que o consumo agudo de etanol 50%, o chamado '*Binge Drinking*', no modelo experimental em questão, foi capaz de causar lesão em órgãos alvo do TGI, como fígado e sobretudo o estômago, demonstrando, nas devidas proporções, que o abuso de substâncias alcoólicas de modo agudo é deletério em camundongos.

REFERÊNCIAS

1. Laranjeira R, Pinsky I, Zalesk M, Caetano R. I Levantamento nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira. Brasília: SENAD/MS; 2007.40p.
2. World Health Organization. Global status report on alcohol and health. Geneva: WHO; 2011. 85p.
3. Babor FT. Alcohol research and the alcoholic beverage industry: issues, concern and conflicts of interest. *Addiction*. 2009;104:34-47.
4. Standridge JB, Zylstra RG, Adams SM. Alcohol consumption: an overview of benefits and risks. *South Med J*. 2004;97(7):664-72.
5. Grinfeld H. Que efeitos podem ser esperados da exposição pré-natal ao etanol em camundongos prenhes e sua descendência? *Einstein*. 2004;2(3):187-92.
6. Macieira MS, Silva EA, Almeida WF, Nakamura-palacios EM, Vasquez EC. Efeitos da administração crônica do álcool sobre os mecanismos neurais da regulação da pressão arterial. *Arq Bras Cardiol*. 1997;68(3):149-54.
7. Freire TM, Machado JC, Melo EV, Melo DG. Efeitos do consumo de bebida alcoólica sobre o feto. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2005;27(7):376-81.
8. Downs CA, Trac D, Brewer EM, Brown LA, Helms MN [Internet]. Chronic alcohol ingestion changes the landscape of the alveolar epithelium. *Bio Med Research International*. [Acesso em: 2014 Fev 02]. 2013:1-6. Disponível em: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/470217/>
9. Schinoni MI. Fisiologia hepática. *Gaz Méd*. 2006;76(1):5-8.
10. Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology*. 2011;141(5):1572-85.
11. Fritz KS, Green MF, Petersen DR, Hirschey MD. Ethanol metabolism modifies hepatic protein acylation in mice. *PLOS ONE*. 2013;9(8):1-2.
12. Botorabi F, Jänis J, Valjakka J, Isoniemi S, Vainiotalo P, Vullo D, et al. Modification of carbonic anhydrase II with acetaldehyde, the first metabolite of

- ethanol, leads to decreased enzyme activity. *BMC Biochemistry*. 2008;9:32.
13. Tome S, Lucey MR. Current management of alcoholic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004;19(7):707-14.
 14. Howell NA, Worbe Y, Lange I, Tait R, Irvine M, Banca P, et al. Increased ventral striatal volume in college-aged binge drinkers. *PLOS ONE*. 2013;9(8):1-7.
 15. Pajak A, Szafraniec K, Kubinova R, Malyutina S, Peasey A, Pikhart H, et al. Binge drinking and blood pressure: cross-sectional results of the HAPIEE Study. *PLOS ONE*. 2013;6(8):1-8.
 16. Sneider JT, Cohen-Gilbert JE, Crowley DJ, Paul MD, Silveri MM. Differential effects of binge drinking on learning and memory in emerging adults. *J Addict Res Ther*. 2013;(Supl 7):1-3.
 17. Andrade MC, Menezes JS, Cassali GD, Martins-Filho AO, Cara DC, Faria AMC. Alcohol-induced gastritis prevents oral tolerance induction in mice. *Clin Exp Immunol*. 2006;146(2):312-22.
 18. Ferraris RP, Villenas SA, Diamond J. Regulation of brush-border enzyme activities and enterocyte migration rates in mouse small intestine. *Am J Physiol*. 1992;262(6 Pt 1):1047-59.
 19. Korkusuz HI, Keese D, Raschidi BA, Hübner F, Namgaladze D, Hintereder G, et al. Detection of a fatty liver after binge drinking: correlation of MR-spectroscopy, DECT, biochemistry and histology in a rat model. *Acad Radiol*. 2011;18(11):1349-57.
 20. Bertola A, Park O, Gao B. Chronic plus binge ethanol feeding synergistically induces neutrophil infiltration and liver injury: a critical role for e-selectin. *Hepatology*. 2013;58(5):1814-23.
 21. Duly AMP, Alani B, Huang EYW, Yee C, Haber OS, McLennan SV, et al. Effect of multiple binge alcohol on diet-induced liver injury in a mouse model of obesity. *Nutr Diabetes*. 2015;5:e154.
 22. Birdane FM, Cemek M, Birdane YO, Gülçin İ, Büyükokuroğlu ME. Beneficial effects of *Foeniculum vulgare* on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. *WJG*. 2007;13(4):607-11.
 23. Al Batran R, Al-Bayaty F, Ameen Abdulla M, Al-Obaidi MM, Hajrezaei M, Hassandarvish P, et al. Gastroprotective effects of *Corchorus solitorius* leaf extract against ethanol-induced gastric mucosal hemorrhagic lesions in rats. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28(8):1321-9.
 24. Jeon W-Y, Lee M-Y, Shin I-S, Lim H-S, Shin H-K. Protective effects of the traditional herbal formula oryeongsan water extract on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. *Evidence-based Complementary and Alternative Med*. 2012;2012:438191.
 25. Lima ACS, Silva HP, Diniz MS, Roberto BB, Maciel FD, Andrade MC. Efeito da ingestão aguda de álcool na microbiota do trato gastrointestinal e na produção local de iga secretora em camundongos. *Rev Cienc Saúde*. 2011;1(1):1-9.

Correspondência: Hugo Ribeiro Bellato Av. Renó Júnior, 368 | São Vicente | CEP 37502-138 | Itajubá – MG 3629-8700 - hugobellato@hotmail.com