



Prevalência de *Enterobacteriaceae* Fermentadoras de Lactose em Animais Experimentais Submetidos à Injúria por Ingestão Alcoólica e Tratamento com Bactérias Ácido-Lácticas (BAL) Presuntivamente Probióticas

Jotta Júnior Novais, Marisa Soares dos Santos, Ronize Viviane Jorge Faria, Letícia Antunes Athayde, Mariléia Chaves Andrade, Sergio Avelino Mota Nobre

Introdução

Membros da família *Enterobacteriaceae* têm como principal característica serem Gram-negativas, oxidase negativa, fermentadoras ou não fermentadoras de lactose. São microrganismos que habitam o intestino de animais, também podendo ser encontrada no solo, água e em plantas [1]. As bactérias da família *Enterobacteriaceae* estão intimamente relacionadas a enfermidades diarréicas. Segundo a OMS é considerada a segunda maior causa de mortes em crianças de menos de cinco anos de idade [2]. Os probióticos vêm sendo definidos como microrganismos vivos que provocam efeitos positivos ao hospedeiro. O uso de BAL como probiótico desencadeia uma reação imunomoduladora, em nível de imunidade inata e adquirida, quando consumida em quantidades apropriadas, além de melhorar o desempenho adquirido através da melhor absorção de nutrientes, uma vez que as microvilosidades encontradas no TGI apresentam aumento em sua área. Contudo essas bactérias devem ser resistentes às condições do TGI para que a administração seja efetiva [3]. Estudos exploram o uso de probióticos como tratamento contra patógenos do TGI, se referindo a BAL como complementos de terapias convencionais [4]. Os probióticos estão sendo usados como alternativa para inibição de agentes patógenos e produzir enzimas [5]. Podem ser encontrados no mercado incluído em rações ou produzidos em forma de cápsulas, em pasta em pó ou granulado, podendo consistir de apenas uma cepa até oito cepas [6].

Material e métodos

Camundongos fêmeas (entre 8-10 semanas de idade) da linhagem C57BL/6 selvagens, mantidos em gaiolas com água e ração (Labina) *ad libitum*, a uma temperatura aproximada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e em ciclo claro-escuro de 12 horas foram aleatoriamente separados em quatro grupos, contendo 6 animais/grupo em cada gaiola.

O grupo um foi representado pelos animais tratados com salina + caldo BHI (Caldo Infuso Coração) (Salina - BHI), o grupo dois foi representado pelos animais tratados com salina + Bactéria Ácido Láctica (Salina - BAL), o grupo 3 foi representado pelos animais tratados com etanol + Caldo BHI (EtOH - BHI) e o grupo 4 foi representado pelos animais tratados com etanol + BAL (EtOH - BAL).

Durante quatro dias consecutivos, foi realizada a administração intragástrica (i.g.) de 0,2 mL de EtOH (50%)/animal ou salina, e vinte e quatro horas após a última administração i.g. (EtOH ou salina), os animais foram tratados com 0,2 mL de BAL em Caldo BHI ou somente o meio de cultura Caldo BHI, por via intragástrica, durante 4 dias consecutivos.

Após um intervalo de sete dias, foram realizadas as intervenções experimentais. Durante a necropsia foram retirados os seguintes órgãos: estômago, intestino delgado e intestino grosso.

Para as análises microbiológicas, procederam-se diluições seriadas das amostras (10^{-2} e 10^{-4}). Alíquotas das diluições foram distribuídas superficialmente no meio de cultura Agar MacConkey e foram incubadas a 37°C , por 24 horas (overnight).

As colônias desenvolvidas a partir das amostras foram selecionadas utilizando microscópio estereoscópico, conforme características morfológicas. Para confirmar a distinção entre as colônias, procedeu-se a bacterioscopia a partir da coloração de Gram. Colônias distintas foram então multiplicadas e conservadas a -20°C , com aporte de crioprotetor.

O teste de oxidase foi realizado em esfregaços dos isolados em tiras de oxidase, utilizando alça de platina, o qual apresentou resultados em poucos segundos.

O projeto foi submetido à Comissão de Ética em Experimentação e Bem-estar Animal (CEEBEA) da Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES) sob processo de nº 043/2013 para análise e apreciação.

Resultados

No grupo de bactérias isoladas foi observado que 63,63% realizam fermentação láctica (LAC +) sendo destes 27,27% residentes do sítio referente ao estômago, e 18,18% para isolados do intestino grosso e delgado. No estômago foi



identificado bactérias com a presença de oxidase (OXID +) em lavados do intestino delgado e intestino grosso (Tabela 2).

Nota-se com a soma dos isolados em todos os sítios, cada tratamento possui uma notável diferença quanto a população microbiota do trato gastrointestinal. No tratamento com salina e BHI podemos tomar como grupo controle, onde a população microbiológica em todos os sítios houveram isolados. Quando o caldo BHI no tratamento é substituído por bactérias ácido-láticas (BAL) nota-se uma redução da população do estômago e intestino grosso e uma total inibição de bactérias no intestino delgado. Ao provocar injúria alcóolica, porém retirando BAL e inserindo BHI percebe-se que o etanol age diretamente no estômago diminuindo seu efeito agressivo na microbiota ao longo de sua extensão. Com o quarto tratamento, onde se causa injúria alcóolica somada a BAL fica evidente que é potencializado a ação probiótica em todos os sítios com exceção do estômago, onde a injúria alcóolica é reduzida e a microbiota permanece aparentemente com os mesmos valores (Tabela 1).

Discussão

Os resultados indicam que a BAL em questão, possui um potencial efeito probiótico, pois tal tem ação inibitória e fomentativo relacionado aos patógenos. A BAL apresentou maior característica inibitória no intestino delgado e o etanol apresentou no estômago. Houve maior potencial inibitório quando a BAL foi aliada ao etanol, onde foi notada maior expressão inibitória ao longo do trato gastrointestinal. Houve resultados onde a BAL aliada ao etanol propiciou o crescimento de bactérias, onde o tratamento apenas com etanol e BHI havia provocado estresse.

Conclusão

De acordo com os dados obtidos sugere-se que a BAL em estudo possui um potencial probiótico devido alteração da diversidade da microbiota do TGI. Devido a prevalência de Enterobacteriaceae em diferentes seções da TGI, pode-se assumir que existe certo nível de adaptações para tal. Compreende-se que são necessários estudos posteriores quanto os padrões de distribuição dos microrganismos na microbiota.

Referências

- [1] TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. Microbiologia. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010. 285 p;
- [2] PAZOS M, Alvaro; GUERRERO F, Milena. Inhibición de colonización intestinal por *Vibrio cholerae* con *Lactobacillus acidophilus* 1 en conejos lactantes. Rev.MVZ Cordoba, Córdoba, v. 18, supl. 1, Dec. 2013. Available from <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682013000400013&lng=en&nrm=iso>. access on 19 Aug. 2014.
- [3] MORENO BAPTISTA, Roselynn et al .Capacidad inmunomoduladora de cepas potencialmente probióticas de *Lactobacillus* aisladas de leche materna y heces de lactante. Rev. Soc. Ven. Microbiol., Caracas, v. 33, n. 1, jun. 2013. Disponible en <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562013000100006&lng=es&nrm=iso>. accedido en 20 agosto 2014.
- [4] PAZOS, Alvaro J. et al . CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA LÁCTICA GÁSTRICA ASOCIADA A GASTRITIS CRÓNICA. Rev Univ. salud., Pasto, v. 14, n. 1, Jan. 2012. Available from <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-71072012000100002&lng=en&nrm=iso>. access on 20 Aug. 2014.
- [5] VERSCHUERE, Laurent *Ob*. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and molecular biology reviews, v. 64, n. 4, p. 655-671, 2000;
- [6] AFRC, R. FULLER. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology, v. 66, n. 5, 1989. p. 367-368.



FÓRUM ENSINO - PESQUISA
EXTENSÃO - GESTÃO

FEPEG

UNIVERSIDADE: SABERES E PRÁTICAS INOVADORAS

Trabalhos científicos • Apresentações artísticas
e culturais • Debates • Minicursos e Palestras



24 a 27
setembro

Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro

www.fepeg.unimontes.br

Tabela 1. Frequência de isolamento de bactérias LAC + e LAC - em trato gastrointestinal (TGI) de camundongos C57BL/6 submetidos a injúria por ingestão alcoólica e tratamento com bactérias ácido-lácticas (BAL) presuntivamente probióticas.

Tratamento	Sítios Amostrados					
	Estômago		Intestino delgado		Intestino grosso	
	LAC +	LAC -	LAC +	LAC -	LAC +	LAC -
Salina - BHI	13,6% (3)	9% (2)	13,6% (3)	4,5% (1)	4,5% (1)	4,5% (1)
Salina - BAL	ND	9% (2)	ND	ND	ND	4,5% (1)
EtOH - BHI	ND	ND	4,5% (1)	ND	13,6% (3)	4,5% (1)
EtOH - BAL	13,6% (3)	ND	ND	ND	ND	ND

ND = Não detectado

Tabela 2. Frequência de isolamento de bactérias OXID + e OXID - em trato gastrointestinal (TGI) de camundongos C57BL/6 submetidos a injúria por ingestão alcoólica e tratamento com bactérias ácido-lácticas (BAL) presuntivamente probióticas.

Tratamento	Sítios Amostrados					
	Estômago		Intestino delgado		Intestino grosso	
	OXID +	OXID -	OXID +	OXID -	OXID +	OXID -
Salina - BHI	ND	22,72% (5)	9% (2)	9% (2)	4,5% (1)	4,5% (1)
Salina - BAL	ND	9% (2)	ND	ND	ND	4,5% (1)
EtOH - BHI	ND	ND	ND	4,5% (1)	ND	18,18% (4)
EtOH - BAL	ND	13,6% (3)	ND	ND	ND	ND

ND = Não detectado