

RUPTURA DO MECANISMO DE CONTROLE DA CRIPTA E DA VILOSIDADE DO INTESTINO DELGADO NO ALCOOLISMO CRÔNICO EXPERIMENTAL

S. ZUCOLOTO, M. A. ROSSI, N. A. WRIGHT, M. ALLISON, G. MUCCILLO

Departamento de Patologia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Brasil.

Departamento de Histopatologia. Real Escola Médica de Pós-Graduação. Universidade de Londres. Inglaterra.

Departamento de Geologia, Física e Matemática. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Brasil.

RESUMO

Quarenta ratos Wistar foram divididos em quatro grupos de 10 animais cada: GSE — dieta sólida mais etanol, GSC — controle pareado com GSE, GLE — dieta líquida mais etanol e GLC — controle pareado com GLE. Os animais foram seguidos durante 24 dias e pesados cada 4 dias e o consumo de dieta anotado diariamente. Foram estimados o número de enterócitos da vilosidade (N) e cripta, a taxa de produção celular na cripta (TPCC), o índice de proliferação celular na cripta (Ip) e o tempo do ciclo celular na cripta (T) do jejuno proximal e íleo distal. Todos os animais alcoólicos recebendo dieta líquida ou sólida consumiram quantidades adequadas da dieta, e mostraram desenvolvimento normal. Todavia, os animais do GSE consumiram mais calorias totais, mais calorias sob forma de álcool e mostraram adaptação à dieta mais precoce em comparação aos animais do GLE. A população celular da vilosidade do jejuno proximal dos ratos alcoólicos (GSE e GLE) estava diminuída, possivelmente em consequência da alta concentração luminal local de etanol (efeito tóxico). O N e o T das criptas dos ratos alcoólicos (GSE e GLE) estavam aumentados, mas o TPCC e o Ip da cripta foram semelhantes em todos os grupos. Este desequilíbrio do mecanismo de controle, entre o aumento de N e T e não alterações do TPCC e do Ip nos ratos alcoólicos é consequência do efeito directo do álcool a partir da circulação sanguínea. Resultados semelhantes foram obtidos no epitélio do íleo distal, embora análogos em todos os grupos. A partir desses resultados, nós podemos concluir que o período de ingestão de álcool pelos ratos foi curto para o aparecimento de lesão no epitélio do íleo distal.

SUMMARY

Rupture of the control mechanism of the crypt and villus of the small intestine in experimental chronic alcoholism.

Forty Wistar rats were allocated into four groups of 10 animals each: GSE — ethanol solid diet group; GSC — pair fed with GSE; GLE — ethanol liquid diet group, and GLC — pair fed with GLE. The animals were followed up during 24 days and they were weighed each four days and their dietary consumption recorded daily. The number of enterocytes (N) of the villus and crypt, the crypt cell proliferation index (Ip) and the crypt cell cycle time (T), in the proximal jejunum and distal ileum were estimated. All the alcoholic animals receiving either liquid or solid diet consumed adequate amounts of diet, and showed normal development. However GSE animals consumed more total calories, more calories as alcohol and showed early adaptation to the diet in comparison to GLE animals. Villus cell population from proximal jejunum of alcoholic rats (GSE and GLE) were reduced and this effect is probably consequence of high local luminal ethanol concentration (toxic effect). The N and T in the crypt of alcoholic rats (GSE and GLE) were increased but the TPCC and Ip in the crypt were similar in all groups. This imbalance of control mechanism, between the increase of N and T and no alteration of the TPCC and Ip in the alcoholic rats is very likely a consequence of the direct effect of blood borne ethanol. Similar results were obtained in the distal ileal epithelium, but they were analogous in all groups. From these results, we can conclude that the period of ingestion of alcohol by alcoholic rats was too short for the appearance of damage in the distal epithelium of ileum.

INTRODUÇÃO

Há evidência de que o alcoolismo crônico induz esteatorreia, má nutrição, ou simples diarreia.¹ Estas condições podem levar a má absorção intestinal, causadas por secreções anormais do pâncreas, do fígado, ou a combinação de todos acima. Alterações morfológicas e funcionais do epitélio do intestino delgado têm sido reportadas em pacientes alcoólicos crônicos e no animal experimental.²⁻²¹ Todavia o mecanismo destas alterações não é ainda

bem compreendido. Má nutrição e efeitos tóxico directo e tóxico do álcool no enterócito têm sido relatados como os mecanismos patogénicos mais importantes. Para se estudar estes efeitos tóxicos do álcool no intestino tem sido usado dois tipos de modelos experimentais: 1) dieta sólida mais álcool adicionado a água, e 2) dieta líquida contendo todos os nutrientes mais álcool.

Diante da inexistência de um estudo crítico do efeito do etanol no epitélio do intestino delgado, quer administrado

associado a uma dieta sólida, quer a uma dieta líquida, o presente trabalho tem os seguintes objectivos:

1. Estudar a ingestão de alimentos e o crescimento de animais alcoólicos alimentados com dieta sólida fortificada mais solução de etanol 32% (v/v) e sacarose 25% (p/v) em comparação com seus respectivos controles pareados durante 24 dias de experimentação (modelo de dieta sólida).
2. Estudar as ingestões de alimentos e o crescimento dos animais alcoólicos ingerindo dieta líquida contendo álcool em comparação com seus respectivos controles pareados (modelo de dieta líquida).
3. Estudar comparativamente as ingestões alimentares e o crescimento dos animais alcoólicos utilizando os modelos de dieta sólida e líquida.
4. Avaliar a toxicidade do etanol no epitélio do jejuno proximal e íleo distal através do estudo morfocinético da unidade cripta-vilosidade, tanto no modelo de dieta sólida como no modelo de dieta líquida.

MATERIAL E MÉTODO

Animal. Foram utilizados 40 ratos machos da raça Wistar, pesando em média 150,0 g, que ficaram durante 5 dias em adaptação no Biotério do Hospital John Radcliffe, Oxford, Inglaterra onde foi realizado o experimento. Após este período de adaptação os animais foram divididos em 4 grupos: GSE - Grupo Alcoólico que recebeu dieta sólida fortificada mais etanol - 10 ratos; GSC - Grupo Controle Pareado que recebeu dieta sólida fortificada, isocalórica com o grupo alcoólico GSE (substituindo as calorias provindas do álcool por carboidrato) — 10 ratos; GLE - Grupo Alcoólico que recebeu dieta líquida mais etanol — 10 ratos; e GLC - Grupo Controle Pareado que recebeu dieta líquida isocalórica com o grupo alcoólico GLE (substituindo as calorias provindas do álcool por carboidratos) — 10 ratos.

Dieta. Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais. A dieta sólida foi colocada em comedouros metálicos e a dieta líquida e as misturas líquidas (solução de etanol 32% mais sacarose 25% e solução de sacarose 25%) em seringa graduada em cuja extremidade foi adaptado um tubo de alumínio de 5 cm de comprimento e 4 mm de diâmetro, contendo na ponta uma bola de aço que não deixava escoar o conteúdo o que só acontecia quando a bola era pressionada pela língua do rato. Todos os animais tiveram 5 dias de adaptação à nova dieta. O GLE foi também adaptado a ingestões crescentes de álcool. Nos dois primeiros dias foram alimentados com dieta líquida misturada com 20 g de etanol/litro de dieta, no 3.º e 4.º dias, 40 g, de etanol/litro de dieta, no 5.º dia 50 g/litro.²² Os ratos do GSE só tiveram adaptação à nova dieta e não às ingestões crescentes de álcool. Os controles das ingestões de alimentos dos animais foram feitos no período da manhã. Os animais foram pesados de 4 em 4 dias e o consumo de dieta anotado diariamente. Os animais dos grupos GSE e GSC foram alimentados com dieta sólida fortificada,^{19, 23} cuja composição é a seguinte: Caseína livre de vitaminas 27%, Gordura 15,0% (mistura de óleo de girassol, óleo de oliva, óleo de fígado de bacalhau nas respectivas proporções 10: 24: 3), Carboidrato 37,4% (mistura de maltose, sacarose, glicose nas proporções 1: 1: 1:), Carboximetil celulose de alta viscosidade (Sigma London Chemical Company, Ltd.) 4,0%, Mistura de vitaminas suplementada (Nutritional Biochemical Corporation, Cleveland, USA - NBC) 10,0%, Mistura de salina 4,0% NBC, Cloreto de colina 1,8%, Cistina 0,2%, Metionina 0,6%, uma grama desta mistura fornece 4,282 calo-

rias e nos diversos cálculos de ingestões calóricas foram aproximadas para 4,3 calorias.

Os ratos do grupo GSC foram pareados com aqueles do grupo GSE e receberam quantidades idênticas de dieta sólida fortificada e a mesma quantidade de água mais sacarose isocalórica com a solução de etanol-sacarose consumida pelos animais experimentais. A sacarose foi adicionada a água na forma de uma solução a 25% e também à dieta sólida fortificada.

O grupo GLE foi alimentado com dieta líquida misturada com etanol cuja composição é a seguinte: Caseína livre de vitaminas 47,3 g, Gordura 41,2 g, Carboidrato 12,5 g, Carboximetil celulose 6 g, Mistura de vitaminas 10 g, Cloreto de colina 0,25 g, Cistina 0,5 g, Metionina 1,5 g, Etanol 50 g, em 1000 ml de H₂O.²⁴

As composições de gordura, carboidrato, mistura de vitaminas e mistura salina foram as mesmas das dietas dos grupos GSE e GSC.

Os componentes da dieta líquida foram colocados em liquificador e homogenizados durante 30 minutos. Com uso da carboximetil celulose, a suspensão manteve-se estável durante 48 horas, tempo suficiente para o nosso objetivo, visto que, as dietas líquidas eram preparadas diariamente. Um mililitro da dieta líquida fornece uma caloria.

Os ratos do grupo GLC foram pareados com aqueles do grupo GLE e receberam quantidades idênticas de dieta líquida e as calorias do etanol foram substituídas por carboidrato.

Colheita do material. Após 24 dias de experimentação todos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical no período das 13,0 às 18,0 horas. Uma hora antes do sacrifício três animais de cada grupo receberam injeção de timidina marcada intraperitonealmente (0,5 uCi de timidina/grama de peso corporal). A timidina foi obtida do centro Radioquímico de Amersham, Inglaterra, e a sua actividade específica foi 6,7 Ci/mMol. Todos os ratos foram injetados intraperitonealmente, inclusive os três primeiros, que já haviam recebido timidina marcada, com 1 mg de sulfato de vincristina (Oncovin-Laboratórios Eli Lilly)/kg de rato. Após 30 minutos da injeção de sulfato de vincristina foi iniciado o sacrifício dos animais e isto acontecia em cada 15 minutos, durante 165 minutos tempo em que há boa correlação entre o acúmulo de mitose e o tempo de ação do sulfato de vincristina.^{24, 25} Imediatamente após os sacrifícios dos animais fragmentos de jejuno proximal e do íleo distal foram retirados e preparados para microautorradiografia (somente os animais que haviam recebido timidina marcada) e de todos os animais para microdissecção.

População celular. Os fragmentos para a microdissecção mediam cerca de 1 cm de comprimento e após serem abertos ao nível da implantação do mesentério, foram estendidos em papel de filtro e fixados por imersão em líquido de Clarks durante 24 horas. Após fixação, os fragmentos foram estocados em solução de etanol a 75% até o momento de serem analisados. A microdissecção seguiu o método de Clarke,²⁷ modificado por Wright.²⁶ Para tanto os fragmentos foram inicialmente imersos em álcool a 50% durante uma hora, hidrolizados em solução de ácido clorídrico 1N durante seis minutos a 60 °C e corados em solução de Feulgen por 60 minutos. Durante todo o período da microdissecção propriamente dita os fragmentos foram mantidos, numa solução de ácido acético a 45%. As vilosidades e as criptas isoladas foram colocadas entre lâminas e lamelas e com discreta pressão feita na lamela havia separação das células, facilitando a identificação dos enterócitos e suas contagens. As populações de enterócitos foram estimadas em 10 vilosidades e em 10 criptas de cada região do intestino delgado,

isto é jejuno proximal e íleo distal. Foram também anotados os números de mitoses/cryptas e calculados os índices mitóticos (percentagem de mitose na cripta).

Proliferação celular: A taxa de produção celular na cripta (TPCC) foi calculada através de linha de regressão, colocando-se o índice mitótico em ordenada e o tempo de acção do sulfato de vincristina em abscissa. A declividade da linha de regressão multiplicada por 60 minutos obteve-se a TPCC.

O índice de proliferação celular na cripta (I_p) isto é, o tamanho do compartimento proliferativo na cripta, foi calculado usando microautorradiografia. Foram retirados do jejuno proximal e do íleo distal, fragmentos medindo cerca de 1 cm de comprimento. Após serem abertos ao nível da implantação do mesentério, foram estendidos em papel de filtro e fixados por imersão em líquido de Carnoy durante seis horas. Depois da fixação, os fragmentos foram transferidos para uma solução de etanol a 75 % até o momento de serem processados para microautorradiografia. Todos os fragmentos foram incluídos em parafina e destes retirados cortes de 3 micrometros de espessura. Em cima dos cortes histológicos nas lâminas, foram colocadas placas autorradiográficas da marca Kodak AR 10 (Kodak Ltd, Inglaterra) em quarto iluminado com luz vermelha de 15 watts de potência, deixando a emulsão fotográfica em contato com os cortes histológicos.²⁸ O filme ficou exposto durante 28 dias no escuro a 4 °C. Após este período o mesmo foi revelado com revelador D9 (Kodak Ltd, Inglaterra), fixado em fixador Kodafix (Kodak Ltd, Inglaterra). Os cortes histológicos foram corados através da emulsão autorradiográfica com hematoxilina e eosina. Para cada animal e numa região do intestino (jejuno proximal e ou íleo distal), 100 cryptas cortadas longitudinalmente foram estudadas e anotadas as posições dos enterócitos marcados ou não com timidina triada na coluna longitudinal da cripta, começando no fundo da mesma em direcção à junção cripta-vilosidade. Foi considerada célula marcada aquela com 5 ou mais grãos de prata acima do núcleo. Os dados obtidos foram analisados com auxílio de curva, onde foi colocado os índices de células

marcadas para cada posição em ordenadas e as posições das células da cripta em abscissas.^{25, 29} Traçando-se perpendiculares à ordenada, 50 % do pico máximo da curva, foram demarcadas nas abscissas os pontos de separação entre os compartimentos proliferativos e de maturação da cripta.^{30, 31, 32}

O tempo do ciclo celular (T_c) é o tempo gasto pelo enterócito para atravessar todas as fases do ciclo (G1, S, G2, M) e foi calculado pela equação: $TC = \frac{I_p}{TPCC/N}$ onde, I_p = índice de proliferação celular na cripta, TPCC = taxa de produção celular na cripta, e N = número de enterócitos na cripta.

Análise estatística: Para análise estatística dos dados de ingestão alimentar e de crescimento dos animais, utilizou-se Análise de Variância.

Os acúmulos de células em mitose foram analisadas através de comparações de linhas de regressão entre os diversos grupos.³³

As curvas entre as posições de células marcadas nas diversas posições na cripta foram analisadas de acordo com Cairnie e Bentley²⁹ e Wright et al.²⁵

RESULTADOS

A ingestão média diária de dieta sólida fortificada foi de 9,3 g/dia/rato para o grupo que recebeu dieta sólida fortificada mais etanol (GSE), enquanto que o seu respectivo controle pareado (GSC) consumiu 15,5 g/dia/rato. Este último ingeriu a mesma quantidade de dieta sólida fortificada que o grupo alcoólico (GSE). A diferença ponderal da ingestão sólida total entre os dois grupos foi dividida à complementação de carboidrato (mistura de proporções iguais de glicose, sacarose e maltose) ao álcool ingerido pelo GSE. O grupo alcoólico (GSE) ingeriu 13,8 ml/dia/rato de solução aquosa de etanol a 32 % (v/v) mais sacarose a 25 % (p/v). O grupo controle pareado (GSC) recebeu a mesma quantidade volumétrica de líquido em solução de sacarose a 25 % (p/v). A ingestão calórica média proveniente das dietas sólidas e das soluções de ambos os grupos está mostrada no Quadro 1.

QUADRO I Ingestões médias diárias de dieta sólida, solução de sacarose 25 % mais etanol 32 % (mistura líquida), dieta líquida e calórica dos diversos nutrientes no final do experimento

GRUPO	Dieta sólida g/dia/rato	Mistura líquida ml/dia/rato	Kcal / dia / rato				
			Proteína	Gordura	carboidrato	Etanol	Total
GSE	9,3 ± 0,20	13,8 ± 0,34	10,3 ± 0,22 (13,1)	12,5 ± 0,27 (15,9)	30,8 ± 0,87 (39,3)	24,8 ± 0,61 (31,7)	78,4 ± 1,66 (100,0)
GSC	15,5 ± 0,38	13,8 ± 0,34	10,3 ± 0,22 (13,1)	12,5 ± 0,27 (15,9)	55,6 ± 1,36 (71,0)	— —	78,4 ± 1,66 (100,0)
GLE	dieta líquida ml/dia/rato 51,0 ± 1,90		10,0 ± 0,40 (19,6)	18,9 ± 0,70 (37,0)	4,2 ± 0,20 (8,4)	17,9 ± 0,60 (35,0)	51,0 ± 1,90 (100,0)
GLC	51,0 ± 1,90		10,0 ± 0,40 (19,6)	18,9 ± 0,70 (37,0)	22,1 ± 1,10 (43,4)	— —	51,0 ± 1,90 (100,0)

Valores são expressos como média ± erro padrão da média.

Valores entre parêntesis referem-se às percentagens calóricas dos nutrientes.

A ingestão média diária de dieta líquida contendo etanol pelo grupo experimental (GLE) foi igual à ingestão de dieta líquida sem etanol pelo grupo controle pareado (GLC) 51 ml/dia/rato ou 51 calorias/dia/rato (Quadro 1).

Os animais alcoólicos do grupo alimentado com dieta sólida (GSE) receberam mais calorias durante todo o experimento em comparação com os animais do grupo alimentado com dieta líquida (GLE) ($p < 0,001$). A ingestão calórica absoluta de etanol foi semelhante em ambos os grupos (GSE e GLE), exceção feita aos quatro primeiros dias de experimento em que o GSE ingeriu 22 calorias/dia/rato contra 12,4 calorias/dia/rato pelo GLE ($p < 0,005$). A ingestão média total de etanol no grupo GSE foi 24,6 cal/dia/rato contra 17,7 cal/dia/rato pelo GLE ($p < 0,001$) (Quadro 2). A ingestão calórica relativa de etanol do GLE foi 35%, semelhante a 31,7% do grupo GSE (Quadro 1).

Os animais alcoólicos que receberam dieta líquida (GLE) tiveram índices de crescimento significativamente menores nos primeiros 16 dias de experimentação em comparação com os animais que receberam dieta sólida mais álcool (GSE). Todavia, no período 16 - 24 dias estes parâmetros foram semelhantes em ambos os grupos (Quadro 3).

O Quadro 4 mostra que os animais alcoólicos que receberam dieta sólida (grupo GSE) e dieta líquida (grupo GLE),

tiveram diminuição, estatisticamente significativa, na contagem de enterócitos nas vilosidades do epitélio do jejuno proximal em comparação com seus respectivos controles pareados (GSC e GLC). Ao contrário, as populações das criptas do jejuno proximal foram significativamente maiores nos ratos alcoólicos (GSE e GLE) comparados com seus respectivos controles pareados (GSC e GLC). A população celular das vilosidades e das criptas no epitélio do íleo distal foi semelhante nos grupos alcoólicos (GSE e GLE) em comparação com os respectivos controles pareados (GSC e GLC).

Com relação à cinética celular epitelial, utilizou-se bloqueador de mitose (sulfato de vincristina) e microautorradiografia, os diversos parâmetros taxa de produção celular e índice de proliferação na cripta foram semelhantes em todos os grupos. Porém, o tempo do ciclo celular da cripta de jejuno proximal foi mais prolongado nos ratos alcoólicos em comparação com os respectivos controles pareados e o tempo do ciclo celular nas criptas ileais dos ratos alcoólicos não tiveram grandes diferenças em relação aos grupos controles pareados (Quadro 5).

Os diferentes tipos de dietas e os diferentes estados nutricionais nos diversos grupos estudados não interferiram nos parâmetros morfométricos e citocinéticos do epitélio do intestino delgado.

QUADRO 2 Ingestão calórica média dos ratos em cada 4 dias de experimento (Kcal/dia/rato)

GRUPO	DIAS DE EXPERIMENTO						Total
	0-4	4-8	8-12	12-16	16-20	20-24	
GSE							
Ingestão de nutrientes	67,0*	73,0*	81,9*	79,1*	82,6*	85,8*	78,4*
	± 3,1	± 3,7	± 4,5	± 2,5	± 0,7	± 1,8	± 1,7
Ingestão de etanol	22,0**	22,7	25,6	24,4	25,5	27,5	24,6*
	± 1,4	± 1,8	± 1,6	± 1,2	± 0,4	± 1,1	± 0,83
GLE							
Ingestão de nutrientes	34,2*	49,6*	45,9	51,9*	57,9*	66,5*	51,0*
	± 2,3	± 0,3	± 1,1	± 2,6	± 2,1	± 3,0	± 1,9
Ingestão de etanol	12,4**	17,0	16,1	18,0	20,1	22,8	17,7**
	± 0,7	± 0,1	± 0,5	± 0,8	± 0,7	± 1,2	± 0,6 ±

Valores são expressos como média ± erro padrão da média.

* Significância ($p < 0,001$).

** Significância ($p < 0,005$).

QUADRO 3 Taxa de crescimento médio dos ratos em cada 4 dias de experimento (g/dia/rato)

GRUPO	DIAS DE EXPERIMENTO					
	4	8	12	16	20	24
GSE	2,00*	3,00*	3,50*	3,75*	3,80*	3,75**
	± 0,30	± 0,15	± 0,16	± 0,25	± 0,28	± 0,24
GSC	1,90	3,00	3,63	3,80	3,94	3,82
	± 0,40	± 0,15	± 0,14	± 0,26	± 0,35	± 0,36
GLE	0,20*	0,80*	2,40*	2,67*	3,08*	3,40**
	± 0,01	± 0,05	± 0,19	± 0,20	± 0,26	± 0,41
GLC	0,16	0,10	2,17	2,63	2,94	3,35
	± 0,01	± 0,05	± 0,12	± 0,13	± 0,14	± 0,24

Valores são expressos como média ± erro padrão da média.

* (GSE × GLE) Significante ($p < 0,001$).

** (GSE × GLE) Não significante.

(GSE × GSC) e (GLE × GLC) Não significante.

QUADRO 4 Efeito da ingestão crônica de etanol na população celular da cripta e da vilosidade do jejuno proximal e íleo distal nos grupos GSE, GSC, GLE e GLC

GRUPO	VILOSIDADE		CRIPTA	
	Jejuno	Íleo	Jejuno	Íleo
GSE	10 820,0 ± 350,5	6 913,0 ± 304,1	681,5 ± 20,7	561,7 ± 11,9
GSC	12 798,0 ± 408,2	7 140,0 ± 257,0	491,3 ± 15,8	553,7 ± 13,2
p	< 0,005	NS	< 0,005	NS
GLE	11 020,4 ± 357,9	7 067,0 ± 311,4	611,0 ± 15,7	523,7 ± 12,3
GLC	12 544,5 ± 457,9	7 384,2 ± 268,4	546,0 ± 16,1	505,7 ± 15,0
p	< 0,005	NS	< 0,005	NS

Valores são expressos como média ± erro padrão da média.

NS — Não significativo.

QUADRO 5 Efeito da ingestão crônica de etanol na Taxa de Produção Celular por hora (TPCC), no índice de proliferação (Ip) e no tempo do ciclo celular (T) da cripta do jejuno proximal e íleo distal nos grupos GSE, GSC, GLE e GLC

GRUPO	JEJUNO			ÍLEO		
	TPCC	Ip	T	TPCC	Ip	T
GSE	18,0 ± 0,8	0,61 ± 0,03	23,4	19,8 ± 0,7	0,58 ± 0,05	16,6
GSC	22,0 ± 1,0	0,59 ± 0,03	13,1	18,0 ± 0,7	0,61 ± 0,06	19,0
p	NS	NS	—	NS	NS	—
GLE	21,0 ± 1,0	0,58 ± 0,04	17,1	16,2 ± 0,8	0,55 ± 0,5	17,1
GLC	23,4 ± 1,0	0,60 ± 0,05	14,3	18,0 ± 1,0	0,60 ± 0,04	17,7
p	NS	NS	—	NS	NS	—

Valores são expressos como média ± erro padrão da média.

NS — Não significativo.

DISCUSSÃO

Os animais alcoólicos (GSE) ingeriram 9,3 g/dia/rato provindos da dieta sólida fortificada a 13,8 ml/dia/rato de solução etanol a 32 % (v/v) mais sacarose a 25 % (p/v), o que perfaz ingestão média calórica de 78,4 cal/dia/rato. Quantidade semelhante foi ingerida pelos ratos controles pareados (GSC). Esta ingestão calórica é adequada para o desenvolvimento do animal^{34, 35} e maior do que os relatados na literatura.^{7, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 19, 23, 36} O desenvolvimento dos animais, avaliado pelo ganho ponderal de peso corporal, nos grupos GSC foi semelhante. Os índices de crescimento médios do GSE — 3,75 g/dia/rato e o GSC — 3,83 g/dia/rato foram superiores aos relatos por vários autores.^{22, 23, 37, 38, 39, 40, 41}

Os animais dos grupos GLE e GLC ingeriram quantidades adequadas de nutrientes e tiveram índices de crescimento médios semelhantes entre si. O índice do grupo alcoólico (GLE), foi 3,4 g/dia/rato e do grupo controle pareado (GLC), 3,33 g/dia/rato. Estes índices foram superiores aos encontrados na literatura, utilizando-se delineamento experimental semelhante.^{22, 24, 41, 42}

O modelo de dieta líquida utilizado no presente experimento foi propositalmente semelhante ao realizado pelo grupo de Lieber,^{5, 22, 24, 41} a fim de obter dados comparáveis. A diferença foi o estabilizador da dieta líquida. Neste foi usado como estabilizador a carboximetil celulose de alta vis-

cosidade. É sabido que a mesma não interfere no desenvolvimento do animal, na absorção dos diversos nutrientes, como também não altera a mucosa intestinal.⁴³ O contrário se dá quando se usa o carreginato de sódio.^{43, 44} Este efeito poderia explicar o pouco crescimento dos animais do grupo de Lieber.^{22, 24, 41} Lieber et al,²² verificaram índice de crescimento para os seus ratos alcoólicos de 1,86 g/dia/rato, DeCarli e Lieber,²⁴ 3,05 g/dia/rato e Baraona et al,⁴¹ 2,1 g/dia/rato. Estes autores também verificaram que os ratos alcoólicos tiveram índices de crescimentos menores que os controles pareados.

Os animais alcoólicos com dieta sólida (GSE) ingeriram mais calorias em comparação com animais alcoólicos com dieta líquida (GLE). Esta menor ingestão calórica do grupo GLE, fez com que o mesmo tivesse menor ganho ponderal. O menor ganho ponderal aconteceu nos 16 primeiros dias de experimentação, nos ratos alcoólicos do grupo GLE em comparação com os animais alcoólicos do grupo GSE. Este baixo ganho ponderal se manteve durante todo o experimento e no final do mesmo os índices de crescimento foram semelhantes (GSE — 3,75 g/dia/rato versus GLE — 3,40 g/dia/rato). A quantidade média absoluta de calorias ingeridas sob a forma de álcool foi maior no grupo GSE comparado com o grupo GLE (GSE — 24,6 g/dia/rato versus GLE — 17,7 cal/dia/rato — $p < 0,025$) e a quantidade relativa média de calorias provenientes do álcool foi semelhante em ambos os grupos (GLE — 35 % versus GSE — 31,7 %). A ingestão de etanol aumenta quando se utiliza dieta sólida

mais solução contendo 25 % de etanol e 32 % de sacarose.^{7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 23, 36, 45}

Concluindo os resultados do presente trabalho permitem afirmar que com a associação de dieta sólida mais solução de álcool-sacarose os animais adaptam-se mais rapidamente à ingestão alimentar em comparação aos animais que ingeriram dieta líquida mais álcool. Para se estudar o efeito tóxico direto do álcool no organismo os dois métodos são adequados, porém, pelos nossos dados o modelo de dieta sólida é mais adequada e mimetiza as condições em que o homem normalmente ingere álcool.

Os ratos alcoólicos (GSE e GLE) tiveram diminuição do número de enterócitos na vilosidade, aumento de enterócitos na cripta, prolongamento do tempo do ciclo celular na cripta e não ocorreu aumento do índice de proliferação e de produção celular na cripta, no epitélio do jejuno proximal em comparação com os respectivos ratos controles (GSC e GLC). Por estes dados pode-se afirmar que houve ruptura de mecanismo do controle da unidade cripta-vilosidade do epitélio do intestino delgado do jejuno proximal nos ratos alcoólicos permitindo explicar os dois efeitos tóxico do álcool.

Como houve redução do número de células da vilosidade (compartimento funcional) causado pela alta concentração luminal de álcool (efeito tópico), a cripta deveria responder com aumento da proliferação celular.^{20, 46} Porém no presente trabalho não houve diferença nos parâmetros de proliferação celular, fazendo exceção ao tempo do ciclo celular que se tornou mais prolongado nos ratos alcoólicos. Esta pobre resposta adaptativa da cripta poderia explicar o efeito tóxico directo do álcool provindo pela circulação sanguínea. Se o efeito crónico do álcool se mantem por períodos mais prolongados a tendência deste epitélio é se tornar atrofico. Zucoloto e Rossi¹⁹ demonstraram que ratos alimentados com dieta sólida e solução de 32 % de etanol e 25 % de sacarose, durante 16 semanas, notaram diminuição do índice mitótico e diminuição da altura do enterócito do terço médio da vilosidade.

Esta interpretação não concorda com a emitida por Baraona et al.,⁵ que trabalharam com ratos ingerindo dieta líquida contendo álcool. Estes últimos autores encontraram atrofia do epitélio do jejuno proximal dos ratos alcoólicos e interpretaram seus achados como havendo apenas efeito tópico do álcool durante a absorção no epitélio do jejuno proximal, devido à alta concentração do mesmo neste nível.

Os dados do epitélio do íleo distal dos ratos alcoólicos, não mostraram diferenças morfométricas e citocinéticas comparados com os observados nos animais controles pareados alimentados com dieta sólida e líquida. Como neste segmento intestinal o álcool não é absorvido,¹ o efeito tóxico directo do álcool é somente proveniente da circulação sanguínea e 24 dias de experimentação não foram suficientes para romper o mecanismo de controle da unidade cripta-vilosidade. Tempo mais prolongado de ingestão de álcool induziu atrofia das células colunares no terço médio da vilosidade, e alterações ultraestruturais das mesmas.^{13, 18, 19, 47} Porém, os presentes dados foram diferentes dos encontrados por Baraona et al.,⁵ e Seitz et al.,⁴⁸ que utilizaram também dieta líquida nutricionalmente adequada durante 3 semanas e verificaram hiperplasia do epitélio do íleo distal nos ratos alcoólicos.

Os presentes resultados morfocinéticos do epitélio do intestino delgado nos permitem concluir que quando há associação de dois efeitos do álcool: efeito tópico durante a absorção e efeito tóxico directo do álcool provindo da circulação sanguínea induz o rompimento do mecanismo do controle da unidade cripta-vilosidade no epitélio do jejuno pro-

ximal dos ratos alcoólicos. Porém, um único efeito que é o efeito tóxico directo do álcool provindo da circulação sanguínea não foi suficiente para romper o mecanismo de controle da unidade cripta-vilosidade do epitélio do íleo distal. Os resultados também permitem concluir que os dados obtidos do epitélio do intestino delgado não foram influenciados pelo tipo da dieta usada e nem pelos diferentes estados de nutrição dos animais.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa outorgada à S. Zucoloto para a realização de estágio no Departamento de Patologia de Oxford, Inglaterra onde foi realizado este trabalho e à Márcia Aparecida Oliva Destido pelo serviço dactilográfico.

BIBLIOGRAFIA

- MEZEY, E.: Intestinal function in chronic alcoholism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1975; 252: 215.
- TOMASULO, P. A.; KARTER, R. M. H.; IBER, F. L.: Impairment of thiamine absorption in alcoholism. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 1968; 21: 1341.
- ISRAEL, Y.; VALENZELA, J. E.; SALAZAR, J.; UGARTE, G.: Alcohol and amino acid transport in the human small intestine. *J. Nutr.*, 1969; 98: 222.
- ROGGIN, G. M.; IBER, F. L.; KATER, R. M. H.; TOBON, F.: Malabsorption in the chronic alcoholic. *Johns Hopk. Med. J.*, 1969; 125: 321.
- BARAONA, E.; PIROLA, R. C.; LIEBER, C. S.: Small intestinal damage and changes in cell population produced by ethanol ingestion in the rat. *Gastroenterology*, 1974; 66: 226.
- DEDIEU, P.; MUSSINI, J.; DUDEA, M. C.; MINICONI, P.: Étude fonctionnelle et histologique de l'intestin grêle chez l'éthylisme chronique. *Arch. Franç. Mal. Appar. Dig.*, 1975; 64: 639.
- ROSSI, M. A.: Chronic effect of alcohol on the myocardium catecholamine concentration in rats. *Can. J. Phys. Pharm.*, 1980 a; 58: 874.
- ROSSI, M. A.: Alcohol and malnutrition in the pathogenesis of experimental alcoholic cardiomyopathy. *J. Path.*, 1980 b; 130: 105.
- ROSSI, M. A.; OLIVEIRA, J. S. M.: Effect of prolonged ethanol administration on the noradrenaline levels of rat heart. *Eur. J. Pharm.*, 1976; 40: 187.
- ROSSI, M. A.; OLIVEIRA, J. S. M.; ZUCOLOTO, S.: Heart norepinephrine concentration after chronic alcohol ingestion in the rat. *Experimentia*, 1976 a; 32: 206.
- ROSSI, M. A.; OLIVEIRA, J. S. M.; ZUCOLOTO, S.; BECKER, P. F. L.: Norepinephrine levels and morphologic alterations of myocardium in chronic alcoholic rats. *Beitr. Path.*, 1976 b; 159: 51.
- ROSSI, M. A.; ZUCOLOTO, S.: Effect of alcohol on ganglion cells in the superior cervical ganglia on young rats. *Beitr. Path.*, 1976; 157: 183.
- ROSSI, M. A.; ZUCOLOTO, S.: Effect of chronic ethanol ingestion on the small intestinal ultrastructure in rats. *Beitr. Path.*, 1977; 161: 50.
- ROSSI, M. A.; ZUCOLOTO, S.: Condition of rat testis after prolonged ethanol consumption. *Arch. Path. Lab. Med.*, 1978; 102: 263.
- ROSSI, M. A.; ZUCOLOTO, S.; CARILLO, S. V.: Impairment of fat absorption induced by alcohol in rats. *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, 1980; 50: 315.

16. ROSSI, M. A.; ZUCOLOTO, S.; DUTRA DE OLIVEIRA, J. E.; BECKER, P. F. L.; OLIVEIRA, J. S. M.: Hepatic damage produced by long term alcohol consumption in well nourished rats. *Arch. Latinoame. Nutr.*, 1978 a; 28: 29.
17. ROSSI, M. A.; ZUCOLOTO, S.; BECKER, P. F. L.; DUTRA DE OLIVEIRA, J. E.: Effects of chronic ethanol consumption on the hepatic morphology in the rat. *Ciência e Cultura.*, 1978 b; 30: 465.
18. ZUCOLOTO, S.; ROSSI, M. A.: Effect of ethanol ingestion on the epithelial cell population in rat small intestine. *Experimentia.*, 1976; 32: 614.
19. ZUCOLOTO, S.; ROSSI, M. A.: Effect of chronic ethanol consumption on mucosal morphology and mitotic index in the rat small intestine. *Digestion.*, 1979; 19: 277.
20. ZUCOLOTO, S.; WRIGHT, N.; BAMBLE, M.; RECORD, C.: Assessment of villus and crypt population sizes in human small intestinal biopsies. *Gut.*, 1979; 20: A 921.
21. BODE, J. CH.: Alcohol and the Gastrointestinal Tract. In «Advances in Internal Medicine and Pediatrics», eds: Frick, H. V. P.; Harnock, G. A.; Martini, G. A.; Prader, A. Springer-Verlag, Berlin, 1980.
22. LIEBER, C. S.; JONES, D. P.; DeCARLI, L. M.: Effects of prolonged ethanol intake: production of fatty liver despite diets. *J. Clin. Invest.*, 1965; 44: 1009.
23. KOCH, O. R.; PORTA, E. A.; HARTROFF, W. S.: A new experimental approach in the study of chronic alcoholism. III. Role of alcohol versus sucrose or fat-derived calories in hepatic damage. *Lab. Invest.*, 1968; 18: 379.
24. DeCARLI, L. M.; LIEBER, C. S.: Fatty liver in the rat after prolonged intake of ethanol with nutritionally adequate new liquid diet. *J. Nutr.*, 1967; 91: 331.
25. WRIGHT, N. A.; MORLEY, A. R.; APPLETON, D. R.: The acid of testosterone on cell proliferation and differentiation in the small bowel. *J. Endocr.*, 1972; 52: 161.
26. WRIGHT, N. A.: Cell Proliferation in the Normal Gastrointestinal Tract. Implications for Proliferative Responses. In «Cell proliferation in the gastrointestinal tract», eds. Appleton, D. R.; Sunter, J. P.; Watson, A. J. Pitman Medical, Bath Great Britain, 1980.
27. Clarke, R. M.: Progress architecture and epithelial cell production rate in the small intestine of the albino rat. *J. Anat.*, 1970; 107: 519.
28. PELC, S. R.: The stripping film technique of autoradiograph. *Int. J. Appl. Rad. Isotopes.*, 1956; 1: 172.
29. CAIRNIE, A. B.; BENTLEY, J.: Cell proliferation studies in the intestinal epithelium of the rat. Hyperplasia during lactation. *Exp. Cell Res.*, 1967; 46: 428.
30. QUASTLER, H.; SHERMAN, F. G.: Cell proliferation kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exp. Cell Res.*, 1959; 17: 420.
31. CAIRNIE, A. B.; LAMERTON, L. F.; STEEL, G. G.: Cell proliferation studies in the intestinal epithelium of the rat. Experimental observations. *Exp. Cell Res.*, 1965 a; 39: 528.
32. CAIRNIE, A. B.; LAMERTON, L. F.; STEEL, G. G.: Cell proliferation studies in the intestinal epithelium of the rat. II. Theoretical aspects. *Exp. Cell Res.*, 1965 b; 39: 539.
33. BROWNLEE, K. A.: Statistical Theory and Methodology in Science and Engineering. John Wiley and Sons. Inc. New York, 1960.
34. WARNER, R. G.: Nutrient Requirement of Laboratory Rat. In «Nutrient Requirement of Domestic Animals». Edited by the National Academy of Science, n.º 10. Washington, D. C. National Research Council, 1962.
35. LAU, H. C.; FLAIM, E.; RITCHEY, S. J.: Changes in body weight gain and adipose tissue cellularity in protein restricted and rehabilitated rats. *Nutr. Rep. Intern.* 1976; 14: 33.
36. PORTA, E. A.; GOMES-DUMM, C. L. A.: A new experimental approach in the study of chronic alcoholism. I. Effect of high alcohol intake in rat fed a commercial laboratory diet. *Lab. Invest.*, 1968; 18: 352.
37. BEST, C. H.; HARTROFF, W. S.; LUCAS, C. C.; RIDOUT, J. H.: Liver damage produced by feeding alcohol or sugar and its prevention by choline. *Brit. Med. J.*, 1949; 2: 1001.
38. KLATSKIN, G.; GEWIN, H. M.; KREHL, W. A.: Effects of prolonged alcohol ingestion on the liver of the rat under conditions of controlled dietary intake. *Yale J. Biol. Med.*, 1951; 317: 23.
39. SCHEIG, R.; ALEXANDER, N. M.; KLATSKIN, G.: Effects of prolonged ingestion of glucose or ethanol on tissue lipid composition and lipid biosynthesis in rat. *J. Lipid Res.*, 1966; 7: 188.
40. TAKEUCHI, J.; TAKADA, A.; KATO, Y.: Hepatic changes in chronic alcoholic rats following periodic acute alcoholic intoxications. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1971; 24: 557.
41. BARAONA, E.; PIROLA, R. C.; LIEBER, C. S.: The pathogenesis of post prandial hyperlipemia in rats fed ethanol containing diets. *J. Clin. Invest.*, 1973; 52: 296.
42. PATEK, A. J.; BOWRY, S. C.; SABESIN, S. M.: Minimal Hepatic changes in rats fed alcohol high casein diet. *Arch. Path. Lab. Med.*, 1976; 100: 19.
43. HAWKINS, W. W.; YAPHE, W.: Carrageenan as a dietary constituent for the rat: faecal excretion, nitrogen absorption, and growth. *Can. J. Biochem.*, 1965; 43: 479.
44. WATANABE, K.; REDDY, B. S.; WONG, C. Q.; WETISBURGER, J. H.: Effect of dietary undergraded carrageenan on colon carcinogenesis in F 344 rats treated with azosynthame or methylnitrosourea. *Cancer Res.*, 1978; 38: 4427.
45. PORTA, E. A.; KOCH, O. R.; HARTROFF, W. S.: A new experimental approach in the study of chronic alcoholism. IV. Reproduction of alcoholic cirrhosis in rats and the role of lipotropes versus vitamins. *Lab. Invest.*, 1969; 20: 562.
46. WRIGHT, N. A.: Cell proliferation in health and disease. In: «Recent advances in histopathology». Churchill livingstone, London, New York, 1984.
47. RUBIN, E.; RYBAK, B. J.; LINDENBAUM, J.; GERSON, C. D.; WALKER, C.; LIEBER, C. S.: Ultrastructural changes in the small intestine induced by ethanol. *Gastroenterology.*, 1972; 63: 801.
48. SEITZ, H.; CZYGAN, P.; KOMMERELL, B.: Stimulation of thymidine incorporation in isolated rat intestinal mucosal cells by feeding on ethanol-containing liquid diet. *Digestion.*, 1982; 23: 65.

Pedido de separatas: Sérgio Zucoloto
 Departamento de Patologia
 Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,
 Universidade de São Paulo
 14.100 - Ribeirão Preto, São Paulo. Brasil.